

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO  
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS AGROPECUÁRIAS  
LABORATÓRIO DE SANIDADE ANIMAL

NAYARA BORGES SAMPAIO

ANÁLISE DA MICROBIOTA INTESTINAL DE TRUTA ARCO-ÍRIS (*Oncorhynchus mykiss*, WALBAUM, 1792) E SEU AMBIENTE AQUÁTICO NA REGIÃO SERRANA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

2021

NAYARA BORGES SAMPAIO

ANÁLISE DA MICROBIOTA INTESTINAL DE TRUTA ARCO-ÍRIS (*Oncorhynchus mykiss*, WALBAUM, 1792) E SEU AMBIENTE AQUÁTICO NA REGIÃO SERRANA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal na Área de Concentração em Sanidade Animal.

ORIENTADOR: Prof. DSc. Olney Vieira da Motta

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

2021

**FICHA CATALOGRÁFICA**

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

S192

Sampaio, Nayara Borges.

ANÁLISE DA MICROBIOTA INTESTINAL DE TRUTA ARCO-ÍRIS (*Oncorhynchus mykiss*, WALBAUM, 1792) E SEU AMBIENTE AQUÁTICO NA REGIÃO SERRANA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO / Nayara Borges Sampaio. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2021.

132 f. : il.

Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2021.

Orientador: Olney Vieira da Motta.

1. Truta arco-íris. 2. Microbiota intestinal. 3. Multirresistência aos antimicrobianos. 4. Fatores de patogenicidade. 5. PCR. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 636

NAYARA BORGES SAMPAIO

ANÁLISE DA MICROBIOTA INTESTINAL DE TRUTA ARCO-ÍRIS (*Oncorhynchus mykiss*, WALBAUM, 1792) E SEU AMBIENTE AQUÁTICO NA REGIÃO SERRANA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal na Área de Concentração em Sanidade Animal.

**BANCA EXAMINADORA**

Aprovada em 30 de setembro de 2021.



---

Professor João Carlos de Aquino Almeida (DSc. em Ciências Biológicas) – CBB/UENF



---

Professor Manuel Vazquez Vidal Júnior (DSc. em Zootecnia) – CCTA/UENF



---

Solange Silva Samarão (DSc. em Biociências e Biotecnologia) – FAETEC/RJ



---

Professor Olney Vieira da Motta (DSc. em Biociências e Biotecnologia) – CCTA/UENF

(ORIENTADOR)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecerei sempre em primeiro lugar à Deus, principalmente pela saúde (neste ano atípico que enfrentamos) e determinação. Que toda honra e toda glória seja dada a Deus sobre cada vitória conquistada em minha vida;

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), ao Laboratório de Sanidade Animal (LSA), ao corpo docente e administrativo, pela oportunidade da realização do curso de mestrado;

Ao meu orientador professor Olney Vieira da Motta. Obrigada pela oportunidade, incentivo, apoio e confiança durante a realização deste trabalho;

Aos professores que compõem a banca de dissertação. Obrigada pela disponibilidade e atenção;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pela concessão da bolsa de estudos ao longo do mestrado;

À Associação de Aquicultores da Região Serrana do estado do Rio de Janeiro (AquiSerra). Obrigada presidente Frederico Lucho pela colaboração para a realização deste estudo e aos truticultores da associação pela receptividade e doação das trutas arco-íris utilizadas nesse experimento;

Ao meu parceiro de vida, Vitor Gonçalves, pela disponibilidade de me auxiliar nas coletas e de bônus, admirar lindas paisagens da região serrana;

A toda equipe do LSA: Solange Samarão, Gina Nunes, Lourdes Bernardino, Alice Vaillant, Maria Luiza Martins, Nina Quintanilha, Sr. Eli e Sueli por compartilhar inúmeras placas de Petri e, principalmente, pela troca de conhecimentos. Obrigada!

Ao Dr. Josias Machado da Unidade de Experimentação Animal da UENF, por todas as dicas na etapa de análise molecular;

À minha querida mãe, Saionara Sampaio, a qual amo e tenho muito orgulho. Minha maior incentivadora. Obrigada, sem você não sou; E a todos aqueles que, direta ou indiretamente, me acompanharam nessa estrada, meu muito obrigada.

*“Mesmo quando tudo parece desabar,  
cabe a mim decidir entre rir ou chorar,  
ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri,  
no caminho incerto da vida,  
que o mais importante é o decidir.”*

*(Cora Coralina)*

## RESUMO

A truticultura é uma atividade aquícola amplamente desenvolvida nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, incluindo a região serrana do Estado do Rio de Janeiro, alvo deste estudo. A antibioticoterapia é adotada na profilaxia e tratamento de doenças bacterianas. No entanto, estes fármacos atuam em bactérias comensais e patogênicas da microbiota intestinal de peixes saudáveis e doentes, o que aumenta a presença de resíduos no ambiente se utilizados de forma indiscriminada, favorecendo a pressão seletiva de bactérias resistentes aos antimicrobianos e ao aumento da transferência horizontal de genes de resistência (ARGs) entre diversas populações bacterianas. O trabalho teve como objetivo realizar o levantamento de microrganismos comensais e patogênicos cultiváveis do conteúdo intestinal de trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e seu ambiente aquático para pesquisa de bactérias multirresistentes aos antimicrobianos e fatores de patogenicidade circulantes na região. Foram coletados 50 peixes da espécie *O. mykiss* e 9 amostras de água dos tanques ativos. Destes, obteve-se 222 isolados bacterianos, e posteriormente foi avaliado o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos. Do total de isolados, 54,5% (n=121) apresentaram bactérias Gram-negativas, destacando-se espécies da Família *Enterobacteriaceae*, *Aeromonaceae* e *Pseudomonadaceae*; e 45,5% (n=101) Gram-positivas, destacando-se espécies do gênero *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Kocuria* spp. e *Gemella* spp. Cepas bacterianas pertencentes aos filos Proteobacteria, Firmicutes e Actinobacteria foram isolados no conteúdo intestinal de *O. mykiss*; em amostras do ambiente aquático foram identificadas espécies dos filos Proteobacteria e Firmicutes. Foi observado que 65,3% (n=79) das bactérias Gram-negativas e 82,2% (n=83) Gram-positivas apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano e o perfil de multirresistência foi observado em 7,4% (n=9) e 36,6% (n=37), respectivamente. Em ambos os grupos, observou-se maiores percentuais de resistência aos antibióticos da classe beta-lactâmicos, destacando-se: Cefalotina (45,5%), Amoxicilina + Ác. Clavulânico (27,3%), Ampicilina (26,5%) e Cefoxitina (24%) para bactérias Gram-negativas; Amoxicilina e Oxacilina (48,5%), Ampicilina (42,6%), Penicilina G (39,6%), Clindamicina (33,7%), Gentamicina (28,7%) e Tetraciclina (27,7%) para Gram-

positivas. Na análise molecular, cepas de *Staphylococcus* spp. (n=51) submetidas à técnica de PCR para detecção do gene *mecA* resistente à meticilina e detecção de enterotoxinas estafilocócicas A, C e D, apresentaram os resultados: 33,3% (n=17) positivas para a presença do gene *mecA*; 98,0% (n=50) para o gene *sea*; 9,8% (n=5) pra o gene *sec*; e 13,7% (n=7) para o gene *sed*. Conclui-se que diversas espécimes bacterianas apresentam potencial risco à truticultura como patógenos oportunistas e à comunidade, sendo fundamental orientar os produtores quanto à adoção de boas práticas sustentáveis na truticultura, a fim de prevenir a disseminação de genes resistentes e enterotoxigênicos, suas consequências no ambiente e na saúde pública.

**Palavras-chave:** Truta arco-íris; Microbiota intestinal; Multirresistência aos antimicrobianos; Fatores de patogenicidade; PCR.

## ABSTRACT

Trout farming is an aquaculture activity widely developed in the South and Southeast regions of Brazil, including the serrana region of the State of Rio de Janeiro, the target of this study. Antibiotic therapy is used in the prophylaxis and treatment of bacterial diseases. However, these drugs act on commensal and pathogenic bacteria in the intestinal microbiota of healthy and sick fish, which increases the presence of residues in the environment if used indiscriminately, favoring the selective pressure of bacteria resistant to antimicrobials and increasing horizontal transfer of resistance genes (ARGs) among diverse bacterial populations. The aim of this work was to survey commensal and cultivable pathogenic microorganisms in the intestinal content of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and its aquatic environment to investigate multi-resistant bacteria to antimicrobials and pathogenicity factors circulating in the region. Fifty fish of the species *O. mykiss* and 9 water samples were collected from the active tanks. Of these, 222 bacterial isolates were obtained, and the antimicrobial susceptibility profile was subsequently evaluated. Of the total of isolates, 54.5% (n=121) presented Gram-negative bacteria, especially species from the *Enterobacteriaceae* family, *Aeromonaceae* and *Pseudomonadaceae*; and 45.5% (n=101) Gram-positive, highlighting species of the genus *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Kocuria* spp. and *Gemella* spp. Bacterial strains belonging to the phyla Proteobacteria, Firmicutes and Actinobacteria were isolated from the intestinal contents of *O. mykiss*; in samples from the aquatic environment, species of the phyla Proteobacteria and Firmicutes were identified. It was observed that 65.3% (n=79) of Gram-negative bacteria and 82.2% (n=83) of Gram-positive bacteria were resistant to at least one antimicrobial and the multi-resistance profile was observed in 7.4% (n=9) and 36.6% (n=37), respectively. In both groups, higher percentages of resistance to antibiotics of the beta-lactam class were observed, highlighting: Cephalotin (45.5%), Amoxicillin + Ác. Clavulanic (27.3%), Ampicillin (26.5%) and Cefoxitin (24%) for Gram-negative bacteria; Amoxicillin and Oxacillin (48.5%), Ampicillin (42.6%), Penicillin G (39.6%), Clindamycin (33.7%), Gentamicin (28.7%) and Tetracycline (27.7%) for Gram-positives. In the molecular analysis, strains of *Staphylococcus* spp. (n=51) submitted to the PCR technique for detection of the

*mecA* gene resistant to methicillin and detection of staphylococcal enterotoxins A, C and D, presented the results: 33.3% (n=17) positive for the presence of the *mecA* gene; 98.0% (n=50) for the *sea* gene; 9.8% (n=5) for the *sec* gene; and 13.7% (n=7) for the *sed* gene. It is concluded that several bacterial specimens present potential risk to trout farming as opportunistic pathogens and to the community, being fundamental to guide producers regarding the adoption of good sustainable practices in trout farming, in order to prevent the dissemination of resistant and enterotoxigenic genes, their consequences on the environment and public health.

**Keywords:** Rainbow trout; Intestinal microbiota; Multi-resistance to antimicrobials; Pathogenicity factors; PCR.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|   |    |
|---|----|
| FIGURA 1: Truticultura localizada em Itamonte – MG na Serra da Mantiqueira (propriedade comparativa) .....  | 44 |
| FIGURA 2: Relação da distância entre as propriedades estudadas (P0: Truticultura em Itamonte – MG na Serra da Mantiqueira; P1: Truticultura Samadhi; P2: Truticultura Arco-íris; P3: Truticultura Trutas do vale; P4: Truticultura do Vascão) ..... | 44 |
| FIGURA 3: Localidades das truticulturas da região serrana fluminense (P1: Truticultura Samadhi; P2: Truticultura Arco-íris; P3: Truticultura Trutas do vale; P4: Truticultura do Vascão) .....  | 45 |
| FIGURA 4 (A e B): Tanques cobertos de trutas arco-íris ( <i>O. mykiss</i> ) em fase de engorda da truticultura Samadhi localizada em Teresópolis – RJ.....  | 45 |
| FIGURA 5: Tanques cobertos de trutas arco-íris ( <i>O. mykiss</i> ) em fase de engorda com constante renovação de água da truticultura Samadhi localizada em Teresópolis – RJ.....  | 46 |
| FIGURA 6: Tanques cobertos de trutas arco-íris ( <i>O. mykiss</i> ) com constante renovação de água da truticultura Arco-Íris localizada em Nova Friburgo – RJ.....   | 46 |
| FIGURA 7: Tanques de alvenaria para cultivo de trutas arco-íris ( <i>O. mykiss</i> ) em fase de engorda com constante renovação de água da truticultura Truta do Vale localizada em Nova Friburgo – RJ.....   | 47 |
| FIGURA 8: Tanques cobertos de trutas arco-íris <i>O. mykiss</i> em fase de engorda com constante renovação de água da truticultura do Vascão localizada em Nova Friburgo – RJ.....  | 47 |
| FIGURA 9: Tanques cobertos de trutas arco-íris <i>O. mykiss</i> com constante renovação de água da truticultura do Vascão localizada em Nova Friburgo – RJ.....   | 48 |
| FIGURA 10: Coleta de amostra de água de cano de captação para distribuição aos tanques de truticultura ativos, localizados na truticultura do Vascão em Nova Friburgo – RJ.....   | 50 |
| FIGURA 11 (A e B): Análise macroscópica da condição física dos animais coletados, para posterior análise de peso, comprimento total (CT) e comprimento padrão (CP). (A) <i>O. mykiss</i> macho; (B) <i>O. mykiss</i> fêmea.....                     | 60 |

|  |     |
|--|-----|
| FIGURA 12: Distribuição do número de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas isoladas do conteúdo intestinal de trutas arco-íris ( <i>O. mykiss</i> ) e amostras ambientais (água).....  | 67  |
| FIGURA 13: Ocorrência relativa em percentagem (%) de isolados Gram-negativos e Gram-positivos provenientes de conteúdo intestinal de <i>O. mykiss</i> e amostras de água.....  | 67  |
| FIGURA 14: Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em bactérias gram-negativas isoladas de conteúdo intestinal de trutas arco-íris ( <i>O. mykiss</i> ) e amostras ambientais (água).....  | 80  |
| FIGURA 15: Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em bactérias gram-positivas isoladas de conteúdo intestinal de trutas arco-íris ( <i>O. mykiss</i> ) e amostras ambientais (água).....  | 88  |
| FIGURA 16 (A e B): Gel de agarose 1% resultante da eletroforese de produtos de amplificação de PCR para genes de <i>Staphylococcus</i> spp. resistentes a Meticilina: <i>mecA</i> . M: marcador de peso molecular (Ladder 1 kb. Ludwig®); CP: controle positivo <i>S. aureus</i> ATCC 33591; CN: controle negativo; 5, 22, 29, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53 e 54: amostras positivas para o gene <i>mecA</i> ; 3, 4, 6, 7, 8, ,9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 e 40: amostras negativas..... | 98  |
| FIGURA 17 (A e B): Gel de agarose 1% resultante da eletroforese de produtos de amplificação de PCR para genes de <i>Staphylococcus</i> spp. produtores de enterotoxina A: <i>sea</i> . M: marcador de peso molecular (Ladder 100 kb. Ludwig®); CP: controle positivo <i>S. aureus</i> ATCC 13565; CN: controle negativo; 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 e 50: amostras positivas para o gene <i>sea</i> ; 39: amostra negativa.....              | 103 |
| FIGURA 18 (A): Gel de agarose 1% resultante da eletroforese de produtos de amplificação de PCR para genes de <i>Staphylococcus</i> spp. produtores de enterotoxina C: <i>sec</i> . M: marcador de peso molecular elisa (Ladder 100 kb. Ludwig®); CP: controle positivo <i>S. aureus</i> ATCC 19095; CN: controle negativo; 11 e 13: amostras positivas para o gene <i>sec</i> ; 2, 3, 4,5, 6, 7, 8, 9, 10 e 12: amostras negativas.....  | 104 |
| FIGURA 18 (B): Gel de agarose 1% resultante da eletroforese de produtos de amplificação de PCR para genes de <i>Staphylococcus</i> spp. produtores de enterotoxina C: <i>sec</i> . M: marcador de peso molecular (Ladder 100 pb. Ludwig®); CP: controle positivo <i>S. aureus</i> ATCC 19095; CN: controle negativo; 26, 27 e 31: amostras positivas para o gene <i>sec</i> ; 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 28, 29, 30, 12, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 e 44: amostras negativas.....   | 104 |

FIGURA 19 (A): Gel de agarose 1% resultante da eletroforese de produtos de amplificação de PCR para genes de *Staphylococcus* spp. produtores de enterotoxina D: *sed*. M: marcador de peso molecular (Ladder 100 pb. Ludwig®); CP: controle positivo *S. aureus* ATCC 23235; CN: controle negativo; 1, 11, 22 e 23: amostras positivas para o gene *sed*; 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 25, 26, 27, 28, 29 e 30: amostras negativas.....105

FIGURA 19 (B): Gel de agarose 1% resultante da eletroforese de produtos de amplificação de PCR para genes de *Staphylococcus* spp. produtores de enterotoxina D: *sed*. M: marcador de peso molecular (Ladder 100 pb. Ludwig®); CP: controle positivo *S. aureus* ATCC 23235; CN: controle negativo; 31, 33 e 34: amostras positivas para o gene *sed*; 32, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41 e 42: amostras negativas.....105

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1: Valores individuais de peso de dez O. mykiss das cinco propriedades analisadas. Fonte: a autora (2021). Software: Minitab® versão 2018.....62

GRÁFICO 2: Teste de Tukey avaliando o peso das cinco propriedades. Os valores foram considerados significativos quanto  $p < 0,05$ . Fonte: a autora (2021). Software: Minitab® versão 2018.....63

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| TABELA 1: Relação da distribuição dos animais coletados, amostras ambientais e ao local de produção dos mesmos.....   | 50 |
| TABELA 2: Sequência de oligonucleotídeos para pesquisa de gene de resistência aos antimicrobianos e genes enterotoxigênicos em <i>Staphylococcus</i> spp. utilizados nesse estudo.....  | 55 |
| TABELA 3: Estatística descritiva dos resultados biométricos de <i>O. mykiss</i> das propriedades do estudo com valores médios, desvio padrão, variância, valores mínimos, valores máximos e mediana.....                            | 61 |
| TABELA 4: Relação de bactérias Gram-negativas identificadas fenotipicamente provenientes do conteúdo intestinal de <i>O. mykiss</i> e percentual (%) de animais colonizados, considerando dez <i>O. mykiss</i> por propriedade..... | 63 |
| TABELA 5: Relação de bactérias Gram-negativas identificadas fenotipicamente provenientes do conteúdo intestinal de <i>O. mykiss</i> e percentual (%) de animais colonizados, considerando dez <i>O. mykiss</i> por propriedade..... | 68 |
| TABELA 6: Relação de bactérias Gram-negativas isoladas de amostras ambientais (água) de propriedades selecionadas para o estudo.....  | 73 |
| TABELA 7: Relação de bactérias gram-positivas identificadas fenotipicamente provenientes do conteúdo intestinal de <i>O. mykiss</i> e percentual (%) de animais colonizados, considerando dez <i>O. mykiss</i> por propriedade..... | 75 |
| TABELA 8: Relação de bactérias Gram-positivas isoladas de amostras ambientais (água) de propriedades selecionadas para o estudo.....  | 79 |
| TABELA 9: Perfil de resistência antimicrobiana de bactérias Gram-negativas isoladas de conteúdo intestinal de <i>O. mykiss</i> de cinco truticulturas na região alvo do estudo.....   | 83 |
| TABELA 10: Perfil de resistência antimicrobiana de bactérias Gram-negativas isoladas de amostras ambientais (água) de cinco truticulturas analisadas no presente estudo.....  | 86 |
| TABELA 11: Perfil de resistência antimicrobiana de bactérias Gram-negativas isoladas de conteúdo intestinal de <i>O. mykiss</i> de cinco truticulturas na região alvo do estudo.....  | 92 |

TABELA 12: Perfil de resistência antimicrobiana de bactérias Gram-negativas isoladas de amostras ambientais (água) de cinco truticulturas analisadas no presente estudo.....96

TABELA 13: Relação de cepas identificadas do gênero *Staphylococcus* spp. associada à sua origem, perfil de suscetibilidade fenotípica aos antimicrobianos oxacilina, cefoxitina, presença do gene *mecA* e enterotoxinas *sea*, *sec* e *sed*.....100

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMC – Amoxicilina + Ácido Clavulânico

AMI – Amicacina

AMO – Amoxicilina

AMP – Ampicilina

Amplicons – produtos amplificados

AquiSerra – Associação de Aquicultores da Região Serrana do estado do Rio de Janeiro

ARGs – Genes de Resistência aos Antimicrobianos

ATCC - American Type Culture Collection

BHI – Brain Heart Infusion – Infusão Cérebro Coração

BORSA – “Borderline Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*”

CFL – Cefalotina

CFO – Cefoxitina

CI – Conteúdo intestinal

CIP – Ciprofloxacino

CLI – Clindamicina

CLO Cloranfenicol

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

CP – Comprimento padrão

CPM – Comprimento padrão médio

CT – Comprimento total

CTM – Comprimento total médio

CTX – Cefotaxima

DNA – Ácido desoxirribonucleico

ENO – Enrofloxacina

ERI – Eritromicina

EUCAST – European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FAO – Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação

FIPERJ – Fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro

FLF – Florfenicol

GEN – Gentamicina

H<sub>2</sub>S – Sulfeto de Hidrogênio

HGT – Transferência horizontal de genes

Kg – Kilograma

Km – Quilômetro

MC – Massa corporal

MCM – Massa corporal média

MDR – Resistentes a múltiplas drogas

*MecA* – Gene que codifica resistência à meticilina/oxacilina

mg – Miligrama

mg/L – Miligrama por Litro

mL – Mililitro

MPA – Ministério da Pesca e Aquicultura

MRCONS – “Methicillin-Resistant *Coagulase-Negative Staphylococci*”

MRS – Methicillin-Resistant *Staphylococcus*”

MRSA – “Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*”

MSSA – “Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus*”

MSCONS – “Methicillin-Susceptible *Coagulase-Negative Staphylococci*”

NaCl – Cloreto de Sódio

NAL – Ácido Nalidíxico

OTUs – Unidade taxonômica operacional

OXA – Oxacilina

PB – Pares de base

PBP – “Penicillin Binding Protein” – Proteína Ligadora à Penicilina

PBP2a – “Penicillin-binding protein PBP2a” - Proteína de ligação à penicilina PBP2a

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PEN – Penicilina G

pH – Potencial hidrogeniônico

Primer – Oligonucleotídeo iniciador

RPM – Rotação por minuto

RVS – Rappaport Vassiliadis Enrichment

CONS – *Staphylococcus Coagulase Negativa*

Spp. – Espécies

Sp. – Espécie

STEC – *Escherichia coli* shigatoxigênica

SUT – Sulfazotrim

TET – Tetraciclina

TOB – Tobramicina

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

UI – Unidade Internacional

UV – Ultravioleta

V – Volts

VAN – Vancomicina

VM – Vermelho de metila

VP – Voges-Proskauer

XDR – Extensivamente resistentes a drogas

## LISTA DE SÍMBOLOS

% – Percentagem

US\$ – Dólar americano

°C – Grau Celsius

® – Marca registrada

™ – Marca registrada

µg – Micrograma

µL – Microlitro

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....  | 22        |
| <b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....   | 24        |
| <b>3 OBJETIVOS</b> .....   | 25        |
| 3.1. OBJETIVO GERAL .....  | 25        |
| 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....   | 25        |
| <b>4 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....   | 26        |
| 4.1 A TRUTICULTURA COMO ATIVIDADE AQUÍCOLA NO BRASIL, NO MUNDO<br>E SUA RELEVÂNCIA NA REGIÃO SERRANA DO ESTADO DO RIO DE<br>JANEIRO..... | 26        |
| 4.2 ASPECTOS BIOLÓGICOS DA TRUTA ARCO-ÍRIS ( <i>O. mykiss</i> ) .....  | 27        |
| 4.3 MICROBIOTA INTESTINAL DA TRUTA ARCO-ÍRIS ( <i>O. mykiss</i> ) .....  | 29        |
| 4.4 DOENÇAS BACTERIANAS NA TRUTICULTURA .....  | 31        |
| 4.5 ANTIMICROBIANOS MAIS UTILIZADOS NA AQUICULTURA .....   | 35        |
| <b>4.5.1 Resistência microbiana</b> .....  | <b>36</b> |
| <b>4.5.2 Resistência aos antimicrobianos na aquicultura</b> ...  | <b>37</b> |
| <b>4.5.3 Genes de resistência aos antimicrobianos (ARGs)</b> .....   | <b>40</b> |
| 4.6 FATORES DE PATOGENICIDADE .....  | 41        |
| <b>5 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....  | 43        |
| 5.1 ÁREA DE ABRANGÊNCIA DO ESTUDO .....  | 43        |
| <b>5.1.1 Aplicação de questionários</b> .....  | <b>48</b> |
| 5.2 COLETA DE AMOSTRAS.....  | 49        |
| <b>5.2.1 Coleta de amostras de animais</b> .....   | <b>49</b> |
| <b>5.2.2 Coleta de amostras de água</b> .....  | <b>49</b> |
| 5.3 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA .....  | 51        |
| <b>5.3.1 Microrganismos Gram-Negativos</b> .....   | <b>51</b> |
| <b>5.3.2 Microrganismos Gram-Positivos</b> .....   | <b>52</b> |
| 5.4 PESQUISA DE BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES .....  | 53        |
| <b>5.4.1 Análise do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos</b> .....  | <b>53</b> |
| 5.5 INVESTIGAÇÃO MOLECULAR .....   | 54        |
| <b>5.5.1 Extração e quantificação de DNA</b> .....   | <b>54</b> |

|  |            |
|--|------------|
| 5.5.2 Reação em Cadeia da Polimerase .....   | 55         |
| 5.5.3 Leitura dos produtos da PCR por eletroforese .....                                 | 56         |
| 5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....  | 57         |
| 5.6.1 Questionários .....  | 57         |
| 5.6.2 Características gerais dos animais amostrados .....                                | 57         |
| 5.6.3 Microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos .....                               | 57         |
| <b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>  | <b>58</b>  |
| 6.1 ANÁLISE DESCRITIVA DOS QUESTIONÁRIOS .....   | 58         |
| 6.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS ANIMAIS AMOSTRADOS .....                                  | 59         |
| 6.3 CARACTERÍSTICAS GERAIS DE AMOSTRAS AMBIENTAIS .....                                  | 63         |
| 6.4 RELAÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS .....   | 66         |
| 6.5 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS .....   | 68         |
| <b>6.5.1 Bactérias Gram-Negativas .....</b>  | <b>68</b>  |
| <b>6.5.2 Bactérias Gram-Positivas .....</b>  | <b>75</b>  |
| 6.6 PERFIL DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS .....                                  | 80         |
| <b>6.6.1 Bactérias Gram-Negativas .....</b>  | <b>80</b>  |
| <b>6.6.2 Bactérias Gram-Positivas .....</b>  | <b>88</b>  |
| 6.7 ANÁLISE MOLECULAR .....  | 97         |
| <b>6.7.1 Detecção do gene <i>mecA</i> em cepas do gênero <i>Staphylococcus</i> .....</b> | <b>97</b>  |
| <b>6.7.2 Detecção de fatores de patogenicidade .....</b>                                 | <b>102</b> |
| 6.7.2.1 Enterotoxinas produzidas por cepas do gênero <i>Staphylococcus</i> .....         | 102        |
| 6.7.2.1.1 Enterotoxina A .....   | 102        |
| 6.7.2.1.2 Enterotoxina C .....   | 104        |
| 6.7.2.1.3 Enterotoxina D .....   | 105        |
| <b>7 CONCLUSÃO .....</b>   | <b>107</b> |
| <b>8 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>  | <b>108</b> |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....   | 109        |
| APÊNDICE 1 .....   | 130        |

## 1 INTRODUÇÃO

A aquicultura é uma atividade em amplo desenvolvimento (VARADI et al., 2009) e vem apresentando as maiores taxas de crescimento nos últimos anos no Brasil e no mundo (TAVARES et al., 2014a). Tal expansão tem sido impulsionada pela maior demanda de proteína de origem animal e mudança nos hábitos alimentares da população (FAO, 2011).

Em 2011, o Brasil, considerado maior produtor sul-americano, produziu 628 mil toneladas de pescado, o que corresponde a menos de 1% da produção aquícola mundial. No entanto, o país apresenta grande potencial a ser explorado, devido a sua ampla extensão territorial, clima favorável e disponibilidade de recursos hídricos. Na produção nacional, destacam-se as espécies nativas o tambacú (híbrido), tambaqui *Colossoma macropomum*, curimatá *Prochilodus lineatus* e pacu *Piaractus mesopotamicus*, e entre as espécies exóticas a tilápia *Oreochromis niloticus*, carpa *Cyprinus carpio* e a truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (MPA, 2012).

A truta arco-íris *O. mykiss* (Walbaum, 1792) teve sua introdução no Brasil no ano de 1949 (WELCOMME, 1988). É o salmonídeo mais difundido no Brasil, nos rios e lagos de água fria, límpidas e bem oxigenadas de regiões serranas do Sul e Sudeste, as quais promovem ambientes favoráveis para sua sobrevivência (FROESE & PAULY, 2009; MACHADO et al., 2007).

Os maiores produtores nacionais de truta arco-íris encontram-se nas regiões da Serra da Mantiqueira/SP, Região Serrana do RJ e MG, Serra do Caparaó/ES e SC (MAGALHÃES et al., 2002). Na região Serrana do estado do Rio de Janeiro, destacam-se as cidades de Petrópolis, Teresópolis e Nova Friburgo, região alvo do estudo (MACHADO et al., 2007).

Em relação à produção nacional, segundo o último Boletim estatístico da pesca e aquicultura, 2.135,619 toneladas de pescado de truta foram produzidas em 2018, onde 68,6% foram produzidas na região Sudeste e 31,4% na região Sul (DELLOVA et al., 2019). O pleno conhecimento de seu manejo, adaptabilidade em regiões não exploradas pela piscicultura, associado ao alto valor agregado a sua carne e derivados tem levado ao alto interesse na sua produção ao nível nacional (MPA, 2012).

No entanto, com a intensificação do cultivo de trutas na indústria aquícola mundial, fatores associados a alterações físico-químicas da água, alimentação, alta densidade de estocagem, transporte e estresse podem levar a supressão imunológica

destes animais aquáticos, no qual favorece a ocorrência de doenças infecciosas e perdas econômicas consideráveis ao produtor, tornando necessário o uso de antimicrobianos (GASTALHO et al., 2014).

A antibioticoterapia na produção aquícola através de ração medicada ou banhos de imersão são medidas adotadas para o tratamento e profilaxia de infecções ou como promotores de crescimento (em doses sub-terapêuticas) (SMITH et al., 2009). Porém, a administração desses fármacos por via oral atinge peixes saudáveis e doentes da população, além de modificar a microbiota intestinal dos peixes e do ambiente aquático em que vivem (TAVARES et al., 2014b).

No Brasil, somente dois antibióticos são liberados para o uso na aquicultura: oxitetraciclina e florfenicol (PADUA et al., 2012; SINDAN, 2018). O uso inadequado e contínuo de agentes antimicrobianos no mesmo ciclo de produção favorece a pressão seletiva de bactérias resistentes aos antimicrobianos e ao aumento da transferência horizontal de genes de resistência entre diversas populações bacterianas (SAPKOTA et al., 2008) e leva a importantes impactos na saúde animal, humana e ambiental (GASTALHO et al., 2014; WEIR et al., 2012).

O sistema de cultivo da região serrana do estado do Rio de Janeiro tem se intensificado, transformando a truticultura em uma atividade zootécnica de bons resultados econômicos para o produtor, porém, pouca informação se dispõe sobre os microrganismos constituintes da microbiota intestinal, comensais e patogênicos, que acometem estes animais aquáticos e o perfil de resistência da população bacteriana nesta região. O trabalho teve como objetivo realizar a identificação de cepas bacterianas cultiváveis do conteúdo intestinal de trutas arco-íris associado à análise do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos, pesquisa de genes de resistência e fatores de patogenicidade através da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), em propriedades da região serrana, localizadas no estado do Rio de Janeiro que exercem atividade de truticultura e uma propriedade comparativa no estado de Minas Gerais.

Desse modo, o conhecimento da diversidade microbiana intestinal de truta arco-íris e avaliação do perfil de resistência bacteriana da região, visa contribuir para a melhoria no manejo sanitário, prevenir prejuízos na produção e conscientizar a utilização de antimicrobianos na produção animal, visto que a resistência bacteriana oferece risco à saúde pública.

## 2 JUSTIFICATIVA

A truticultura é uma atividade aquícola em amplo desenvolvimento no mundo e o aumento da densidade populacional nos tanques em consequência à implantação de práticas de manejo inadequadas, predispõem os peixes aos agentes bacterianos presentes no ambiente. Atualmente existem poucas informações disponíveis sobre microrganismos resistentes presentes na microbiota intestinal de *O. mykiss* e seu ambiente aquático na região alvo do estudo, sobre o potencial de risco que eles representam para animais e humanos. Assim, cada vez mais se faz necessário compreender o panorama de resistência aos antimicrobianos, com a finalidade de estimular o uso consciente destes produtos para minimizar as consequências indesejáveis, tais como as perdas financeiras ocasionadas por um manejo sanitário inadequado e a contaminação do ambiente com resíduos dessas substâncias, o que tem se tornado uma preocupação global pela disseminação de bactérias multirresistentes. Desse modo, o presente estudo visa contribuir para o entendimento dos principais microrganismos cultiváveis que compõem a microbiota intestinal de trutas arco-íris e o ambiente aquático da região, além do esclarecimento e orientação aos produtores sobre o uso de agentes antimicrobianos para auxiliar na prevenção destes eventos, principalmente nas políticas de prevenção da ocorrência de doenças no cultivo de trutas arco-íris e, conseqüentemente, a contaminação ambiental (água, solo e sedimentos) com microrganismos multirresistentes e fatores de patogenicidade causadores de enfermidades nos âmbitos veterinário e humano. Tendo em vista a ativa produção da espécie *O. mykiss* na região alvo, é imprescindível avaliar o potencial de risco da entrada dos mesmos em fazendas de peixes de água doce, nos sistemas fluviais de áreas circunvizinhas que exercem atividade aquícola.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVOS GERAIS

- Pesquisar bactérias Gram-positivas e Gram-negativas da microbiota intestinal de trutas arco-íris (*O. mykiss*) e ambiente aquático na região alvo de estudo para pesquisa de bactérias multirresistentes aos fármacos e fatores de patogenicidade circulantes na região.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar, caracterizar fenotipicamente, investigar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos e estocar microrganismos oriundos de amostras isoladas do intestino de trutas arco-íris (*O. mykiss*) e amostras ambientais (água) de propriedades com atividade aquícola desta espécie;
- Detectar a presença de genes de resistência a antimicrobianos, em bactérias intestinais de trutas arco-íris e ambientais, através da PCR convencional com iniciadores específicos;
- Determinar os fatores de patogenicidade de importância na saúde animal e humana;
- Verificação do uso de antimicrobianos, associado ao histórico e manejo sanitário nas truticulturas através de questionários, de modo a auxiliar os produtores regionais em relação às políticas de prevenção de doenças e ao uso correto de antimicrobianos.

## 4 REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1 A TRUTICULTURA COMO ATIVIDADE AQUÍCOLA NO BRASIL, NO MUNDO E SUA RELEVÂNCIA NA REGIÃO SERRANA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

A truticultura, atividade aquícola inserida na piscicultura, apresenta alto desenvolvimento no Brasil e no mundo, devido à resistência e adaptabilidade dos peixes, associada a maior demanda de proteína de origem animal e mudança de hábitos alimentares da população (FAO, 2011). De acordo com Sleeman e colaboradores (2017) a produção anual global de truta arco-íris (*O. mykiss*) é superior a 2,9 megatoneladas e US\$ 13,7 bilhões.

No Brasil, esta espécie foi introduzida no ano de 1949, por iniciativa do Ministério da Agricultura com o objetivo de povoar os rios das regiões serranas do Sudeste brasileiro, pobres em ictiofauna nativa (WELCOMME, 1988), na qual encontraram nas frias corredeiras dessa região, condições favoráveis para seu cultivo. Devido às suas características, boa adaptação ao ambiente, sabor delicado e excelente qualidade nutricional, a truta despertou grande interesse por parte de criadores em realizar o seu cultivo comercial (MACHADO et al., 2007).

No ano de 2018, em relação à produção nacional, segundo o último Boletim estatístico da pesca e aquicultura, foram produzidos 2.135,619 toneladas de pescado de truta, na qual 68,6% foram produzidas na região Sudeste e 31,4% na região Sul (DELLOVA et al., 2019). Os maiores produtores nacionais de trutas encontram-se nas regiões da Serra da Mantiqueira/SP, Região Serrana do RJ e MG, Serra do Caparaó/ES e SC (MACHADO et al., 2007; MAGALHÃES et al., 2002). Na região Serrana do estado do Rio de Janeiro, destacam-se as cidades de Petrópolis, Teresópolis e Nova Friburgo, região alvo do estudo (MACHADO et al., 2007).

Em relatório realizado pela Fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro (FIPERJ), até o ano de 2017, constavam 21 truticulturas da região Serrana Fluminense cadastradas no sistema, porém, somente 12 delas em atividade plena. Nos anos de 2012 - 2016 a Região Serrana Fluminense produziu aproximadamente 5 t por mês, sendo Nova Friburgo o município de maior produção, com média de 3,5 t por mês (FIPERJ, 2017). No entanto, diante do cenário do ano de 2020 em virtude da pandemia pelo novo coronavírus Sars-CoV-2 causador da Covid-19, com o lockdown

das cidades e fechamento temporário dos restaurantes e/ou redução da sua capacidade de acordo com os decretos dos municípios - respeitando o distanciamento social -, muitos produtores inativaram suas propriedades neste período e de acordo com dados da Associação de Aquicultores da Região Serrana do estado do Rio de Janeiro (AquiSerra), poucas truticulturas permanecem ativas, com produção para abastecer prioritariamente o comércio local.

Na caracterização das truticulturas brasileiras, a maioria apresenta-se como empreendimentos agrícolas do tipo familiar. A sustentabilidade econômica nessa atividade depende da utilização de tecnologias que proporcionem aumento da produtividade e diversificação de produtos de valor agregado (TABATA & PORTZ, 2004).

Os roteiros gastronômicos existentes em algumas regiões produtoras constituem grande oportunidade regional, com capacidade de explorar novos mercados e fortalecer a imagem da truta como produto típico. Destaca-se o município de Nova Friburgo do estado do Rio de Janeiro, que tem seu nome estreitamente ligado ao consumo de truta arco-íris (DIAS, 2017). Sua criação está fortemente vinculada ao território serrano, com envolvimento da comunidade local na exploração econômica, atividades culturais e gastronômicas que giram em torno do produto, tendo como exemplos, o “Festival de truta em Nova Friburgo/RJ” e a “Rota da Truta” em Santa Catarina e Rio Grande do Sul, nas quais movimentam o turismo regional (FIPERJ, 2017).

Toda atividade em expansão demanda uma série de investimentos em pesquisas e melhoramento, visando à redução de custos e aumento de produção (VARADI et al., 2009), que com o tempo e a prática conduzem ao conhecimento das consequências e efeitos positivos e negativos da atividade sobre o meio ambiente.

#### 4.2 ASPECTOS BIOLÓGICOS DA TRUTA ARCO-ÍRIS (*O. mykiss*)

A truta arco-íris é um salmonídeo originário da América do Norte (WELCOMME, 1988) e considerado o peixe mais amplamente disseminado pelo mundo, estando presente em mais de 106 países (SILVA et al., 2017). Foi introduzida no Brasil em 1949, por iniciativa do Ministério da Agricultura para povoar os rios das regiões serranas dos estados do Rio de Janeiro e São Paulo, pobres em ictiofauna nativa (WELCOMME, 1988).

Seu habitat natural é a água doce, mas podem deslocar-se para a água salgada com níveis de oxigênio dissolvido limitantes, sendo 5,5 mg/L a concentração mínima para a espécie. Apresentam tolerância a temperaturas de 0 a 26°C, no entanto, o crescimento e a reprodução acontece em águas mais frias, entre 9 e 17°C e ricas em oxigênio (FAO, 2012).

O nome desta espécie está associado a habilidade de assumir uma diversificada gama de cores e tonalidades que variam de acordo com o tamanho, ambiente e maturidade sexual (FAO, 2011). Em água doce, a coloração do corpo das trutas é verde escuro ou marrom com manchas escuras no corpo, nadadeira dorsal e cauda, com uma banda na cor avermelhada que se estende ao longo do corpo (FAO, 2014).

Anatomicamente, trata-se de um peixe de escamas, corpo esguio, alongado e pouco comprimido. Em ambientes marinhos, a truta pode atingir 7 a 10 kg em três anos, diferentemente das criadas em água doce, que atingem 2 a 4,5 kg no mesmo período (FROESE & PAULY, 2009).

A maturidade sexual ocorre aos dois ou três anos de vida, dependendo do sexo, temperatura e disponibilidade de alimento. No Brasil, os machos atingem a maturidade sexual precocemente a partir do primeiro ano e as fêmeas a partir do segundo. No seu habitat natural, essa espécie desova na primavera, enquanto no Brasil a desova ocorre no outono e inverno, quando os dias são mais curtos e a temperatura da água é mais baixa (FROESE & PAULY, 2009; SILVA et al., 2017).

Com relação aos hábitos alimentares, são peixes carnívoros, naturalmente predadores de peixes menores, invertebrados aquáticos e terrestres em estado selvagem. Porém, podem mudar seus hábitos alimentares em resposta às mudanças nas características do seu macro habitat e disponibilidade de alimento (FAO, 2012).

As trutas que são cultivadas em sistema intensivo, a fração proteica e lipídica são importantes como fonte de energia, sendo utilizados nas proporções entre 42 e 48% de proteína bruta e entre 16 e 24% de lipídeos, dependendo da fase de crescimento (HARDY, 2002). No Brasil, a quantidade de lipídeos recomendada é menor em relação à utilizada em outros países, sendo de 10 a 12%. Neste sistema, a alimentação representa o principal custo de produção das trutas arco-íris (JOKUMSEN & SVENDSEN, 2010).

É importante destacar que para realizar a engorda na truticultura é necessária a adoção de instruções técnicas a fim de obter um melhor rendimento e produtividade,

tais como: água com parâmetros físico-químicos ideais; estrutura adequada e alimentação balanceada, exigindo conhecimento técnico e dedicação do produtor. Devem ser acondicionadas em tanques pequenos e com renovação constante de água e o seu ciclo de produção é de 10 a 18 meses, até chegar ao peso comercial de abate, em média 350 gramas (FAO, 2011).

A média de expectativa de vida desta espécie é de 4 a 5 anos. Considerado um peixe nobre, de sabor delicado e excelentes qualidades nutricionais (SILVA et al., 2017), possui alta adaptação ao ambiente, o que para os autores Jokumsen e Svendsen (2010) é uma das razões da sua ampla distribuição.

#### 4.3 MICROBIOTA INTESTINAL DE TRUTA ARCO-ÍRIS (*O. mykiss*)

A microbiota intestinal desempenha um papel importante na saúde animal e na fisiologia do hospedeiro, no desenvolvimento e utilização de nutrientes. Esta microbiota é influenciada por fatores externos tais como dieta, habitat e doença; e fatores internos do hospedeiro, como status imunológico, condições físico-químicas e anatomia intestinal (GOLDSMITH & SARTOR, 2014). Sabe-se que nos peixes, a microbiota intestinal saudável é essencial para promover a saúde e o bem-estar do hospedeiro e favorece a redução de bactérias patogênicas (AUSTIN & AUSTIN, 2016b; FJELLHEIM et al., 2007).

As trutas arco-íris possuem uma microbiota intestinal de microrganismos comensais, simbióticos e patogênicos (SANDRINI et al., 2015). Esta é constituída por bactérias aeróbias, anaeróbias facultativas e anaeróbias obrigatórias, sendo sua composição variável de acordo com a idade, estado nutricional e condições ambientais (AMARANTE et al., 2018).

Segundo Ingerslev e colaboradores (2012), os peixes durante o primeiro estágio de vida são desprovidos de microbiota intestinal, pois nutrem-se das reservas do saco vitelínico, que é considerado estéril. Formam sua microbiota apenas quando o intestino se torna completamente funcional. Os autores ainda reportam que a microbiota intestinal antes da primeira alimentação se origina da água circulante do ambiente. Assim, ao começarem a se alimentar, os peixes terão o primeiro contato das bactérias do alimento com o intestino. Esta microbiota adquirida com a alimentação por sua vez, virá a competir com a microbiota que se estabelece antes da alimentação.

*Oncorhynchus mykiss* é extremamente dependente das condições ambientais para sua sobrevivência, uma vez que o ambiente aquático não é constante e sofre influência direta de temperatura, oxigênio dissolvido e presença de substâncias tóxicas na água. Estes transtornos interferem na saúde dos peixes, tornando-os suscetíveis a vários tipos de doenças infectocontagiosas ou não. A tecnificação da truticultura tem levado ao aumento da densidade populacional nos tanques e em consequência a implementação de práticas de manejo que se inadequadas, predispõem os peixes aos agentes bacterianos presentes no ambiente (DEPARTMENT OF AGRICULTURE & AQUACULTURE, 2010). Desse modo, as condições ambientais são consideradas um dos fatores limitantes para o sucesso na criação de trutas, exigindo assim que a água seja limpa, fria e abundante (LAZZAROTTO & CARAMASCHI, 2009).

Sendo assim, a microbiota intestinal dos peixes é fortemente relacionada à microbiota aquática e por sua vez, mantém estreita relação, tanto quantitativa quanto qualitativamente, com aspectos físico-químicos e microbiológicos do ambiente (SCHAFER et al., 2004). Cepas de *E. coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp. e *Yersinia enterocolitica* podem ser encontradas nos peixes devido à contaminação fecal do ambiente aquático (HERRERA et al., 2006; SHABARINATH et al., 2007). *Salmonella* spp. não é um componente natural da microbiota dos animais aquáticos, no entanto, quando encontrados são decorrentes da contaminação fecal por água poluída, manipuladores de alimentos infectados, contaminação cruzada durante a preparação ou transporte (ANTUNES et al., 2018; CARRASCO et al., 2012).

Ainda, bactérias oportunistas podem tornar-se patogênicas em casos de estresse e levar os peixes à mortalidade (INGERSLEV et al., 2014). Olsen e colaboradores (2005), relataram que o estresse agudo mudou a conformação da microbiota no intestino das trutas arco-íris cultivadas na Estação de Pesquisa Aquícola de Matre/Noruega, aumentando a suscetibilidade à diversas doenças.

Segundo Nayak (2010) e Vatsos (2017), os microrganismos colonizadores no trato gastrointestinal de peixes de água doce incluem os gêneros *Vibrio*, *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Plesiomonas*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Acinetobacter*, *Clostridium*, *Bacteroides*, *Fusarium* e gêneros da família Enterobacteriaceae; enquanto que em peixes marinhos, *Vibrio* é o mais comum.

Parshukov e colaboradores (2019) analisaram a variação da microbiota intestinal dependendo do estado de infecção e observou que a diversidade da comunidade microbiana da truta arco-íris saudável foi significativamente maior do que em peixes não saudáveis. A maior contribuição para a composição microbiana intestinal de peixes saudáveis foi realizada por cepas bacterianas pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Cetobacterium* e *Lactobacillus*. Já a microbiota de peixes não saudáveis foi representada pelos gêneros *Serratia*, *Bacillus*, *Pseudomonas* e um isolado da família Mycoplasmataceae e *Renibacterium*. Os resultados demonstraram alterações da microbiota intestinal da truta arco-íris durante co-infecções e estas podem ser úteis para o desenvolvimento de novas estratégias para o controle de doenças.

Ingerslev e colaboradores (2014) realizaram um estudo do desenvolvimento da microbiota intestinal em trutas arco-íris onde foram isolados treze gêneros, incluindo *Treponema*, *Streptophyta*, *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Clostridium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Citrobacter*, *Shewanella*, *Escherichia*, *Acinetobacter*, *Pedobacter*, *Sediminibacterium* e duas famílias: Lachnospiraceae e Enterobacteriaceae. Os autores concluíram que a microbiota destes animais aquáticos era dominada por quatro filos: Bacteroidetes, Proteobacteria, Firmicutes e Actinobacteria, e estes constituem a microbiota 'central' no intestino de truta arco-íris (NAVARRETE et al., 2012; WONG et al., 2013).

Em contrapartida, Ricaud e colaboradores (2018) em seu estudo observaram que Proteobacteria, Firmicutes e Actinobacteria são os filos dominantes nas bactérias da microbiota intestinal de trutas arco-íris, sendo encontrados em 97% dos isolados bacterianos analisados e os filos Bacteroidetes, Firmicutes, Gemmatomonadetes, Fusobacteria, Spirochaeta e Cyanobacteria representaram menos de 3%. Além disso, a dieta alimentar pode influenciar na constituição da microbiota intestinal. Destaca-se o filo Firmicutes em dietas baseadas em plantas, enquanto que Proteobacteria é dominante quando os peixes são alimentados com dieta marinha (INGERSLEV et al., 2014).

#### 4.4 DOENÇAS BACTERIANAS NA TRUTICULTURA

As bactérias compõem a microbiota natural do meio aquático. No entanto, dentro do sistema de cultivo intensivo aquícola, algumas espécies são consideradas

patogênicas oportunistas, pois provocam infecções em peixes que estão em condições ambientais desfavoráveis (MURRAY et al., 2011). Tais condições como alta densidade populacional, má qualidade de água e manejo intensivo levam à redução significativa da imunidade dos peixes, favorecendo o estabelecimento e a disseminação de diversos agentes infecciosos (PULKKINEN et al., 2010). Desse modo, as bactérias causam elevados prejuízos econômicos na produção, associado ao fator que algumas espécies são zoonóticas (NOGA, 2010) e/ou resistentes aos antimicrobianos usados atualmente (CHIDEROLI et al., 2017) e podem transmitir genes de resistência para espécies de bactérias patogênicas para os humanos (CHENIA, 2016; MIRANDA et al., 2013; WHO, 2017; XIONG et al., 2015).

Com relação às enfermidades bacterianas na tricultura que causam maiores perdas na produção aquícola nacional e mundial destacam-se a doença da boca vermelha causada pela bactéria *Yersinia ruckeri* (ORMSBY et al., 2016), a furunculose causada por *Aeromonas salmonicida* e os quadros septicêmicos causados por *Aeromonas hydrophila* com alto índice de letalidade mundial (AUSTIN & AUSTIN, 2016a; GASTALHO et al., 2014; HEDAYATIANFARD et al., 2014); Como também a doença da coluna causada por *Flavobacterium columnare*. Ambos reportados apresentam-se como bastonetes Gram-negativos (DECLERCQ et al., 2013).

Destacam-se também as Estreptococoses (também conhecida como Lactococoses), considerada como um complexo de doenças similares causada por diferentes gêneros e espécies de bactérias (*Lactococcus garvieae*, *L. piscium*, *Streptococcus agalactiae*, *S. iniae* e *S. dysgalactiae*), sendo no Brasil *S. agalactiae* a espécie mais isolada em tilápias e *L. garvieae* em trutas arco-íris. Apresentam-se como cocos Gram-positivos, de crescimento anaeróbio facultativo, catalase negativas. *Lactococcus garvieae* é considerado um patógeno zoonótico emergente, levando a quadros de septicemia, letargia e natação errática em peixes, podendo acometer humanos com distúrbios gastrointestinais através do consumo de peixes contaminados (MEYBURGH et al., 2018; VENDRELL et al., 2006; WANG et al., 2007). Existem relatos de surtos de lactococose na aquicultura no Brasil causados por *L. garvieae* (EVANS et al., 2009; FUKUSHIMA et al., 2017).

Semelhante aos sinais clínicos da Lactococose, a Enterococose é uma doença bacteriana causada por espécies do gênero *Enterococcus* (AUSTIN & AUSTIN, 2016b; NOGA, 2010) que durante muito tempo teve sua patogenicidade questionada, devido ao fato de constituírem a microbiota normal de várias espécies animais,

inclusive a humana. No entanto, com os avanços dos últimos anos no diagnóstico deste gênero bacteriano e o aumento exponencial de registros de doenças provocadas pelo mesmo, tem sido relatada doenças em humanos (KAYAOGLU & ORSTAVIK, 2004), diversos animais domésticos (LU et al., 2002; SANCIU et al., 2012; SEPUTIENE et al., 2012) e peixes, como *O. mykiss* (BEKKER et al., 2011). No Brasil, pelo menos quatro espécies de *Enterococcus* já foram descritas causando doenças em peixes: *E. casseliflavus*, *E. faecalis*, *E. durans* e *E. sulfureus*; sendo *E. casseliflavus* e *E. faecalis* as espécies predominantes (SEBASTIÃO et al., 2015).

Outro importante patógeno emergente na piscicultura mundial é a infecção causada pela bactéria Gram-positiva *Weissella ceti*, caracterizada por um quadro de septicêmico hemorrágico descrito em trutas arco-íris. É responsável por provocar alta taxa de mortalidade no verão, acometendo animais de todas as fases e a perdas econômicas consideráveis na truticultura (COSTA et al., 2014). Há também a Doença Renal Bacteriana, causada pela bactéria Gram-positiva *Renibacterium salmoninarum* que acometem *O. mykiss* (CHAMBERS et al., 2008).

A doença da boca vermelha, causada por *Y. ruckeri*, é uma bacteremia infecciosa aguda ou crônica que afeta principalmente os salmonídeos. É caracterizada pela presença de zonas hemorrágicas em vários tecidos e órgãos, particularmente ao redor da boca e nos intestinos, além de ser encontrada no ambiente aquático. Trata-se de uma doença infecciosa grave em trutas arco-íris, resultando sérios impactos econômicos (ORMSBY et al., 2016).

Já a furunculose, causada pelo patógeno *A. salmonicida*, trata-se de uma das principais doenças de salmonídeos, especialmente no Salmão do Atlântico; no entanto, as trutas arco-íris são mais resistentes. É caracterizada por úlceras cutâneas e septicemia, sendo que em alguns países, é considerada uma doença de declaração obrigatória (PAVANELLI et al., 2002).

No Brasil, *Aeromonas caviae*, *A. hydrophila*, *A. jandaei* e *A. veronii* são as principais espécies reportadas (DA SILVA et al., 2012; SEBASTIÃO et al., 2015). A principal fonte de *Aeromonas* spp. é o ambiente aquático (GASTALHO et al., 2014) São considerados patógenos facultativos ou oportunistas, causando a doença quando os peixes são submetidos a fatores estressantes (OLIVEIRA et al., 2014). A ocorrência de surtos é frequente em fazendas de espécies de peixes tanto exóticos como nativos e existe uma diversidade considerável em trutas arco-íris (DUMAN et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2014).

No ambiente aquático, *Pseudomonas* spp. podem ser encontradas tanto em animais doentes como em sadios, sendo considerados patógenos secundários ou oportunistas (WOO & BRUNO, 2011). Algumas espécies do gênero *Pseudomonas* como *P. putida*, *P. tructae*, *P. plecoglossicida*, *P. aeruginosa* e *P. fluorescens*, são patógenos de peixes já relatados em diversos estudos (EISSA et al., 2010; OH et al., 2019b; SEBASTIÃO et al., 2015). No cultivo de trutas arco-íris, *P. fluorescens*, *P. putida* e *P. tructae* causam graves perdas econômicas devido a sua alta patogenicidade (ALTINOK et al., 2006). Os sinais clínicos incluem ascite hemorrágica bacteriana, septicemia e necrose das nadadeiras (NOGA, 2010; WOO & BRUNO, 2011).

Outro gênero abundante na água é *Edwardsiella* spp., bactéria Gram-negativa, anaeróbica facultativa, pertencente à Família Enterobacteriaceae que pode acometer cultivos em água doce e marinha. A bactéria causa Edwardsielose em diversas espécies de peixes, já relatado em *O. mykiss* (ALEXANDRINO et al., 1999) e pode levar a graves perdas econômicas na aquicultura mundial. O quadro clínico da edwardsielose varia de acordo com a espécie do patógeno envolvida, podendo ocorrer septicemia hemorrágica ou enterite. Na piscicultura, quatro espécies de *Edwardsiella* são patogênicas, nomeadamente: *E. tarda*, *E. ictaluri*, *E. piscicida* e *E. hoshinae* (JORGENSEN et al., 2015). Adicionalmente, a enfermidade possui maior diversidade de hospedeiros e pode também, ser transmitida ao homem pela ingestão de peixes contaminados, causando infecções entéricas, meningites e abscessos hepáticos (BUJÁN et al., 2018; LEUNG et al., 2019).

Ainda, *Citrobacter* spp. pertencente também à Família Enterobacteriaceae é uma bactéria Gram-negativa encontrada na água, solo, alimentos, intestino humano e de várias espécies animais; incluindo peixes (BRENNER et al., 2005). *Citrobacter freundii* é a principal espécie patogênica para peixes e relatado em *O. mykiss* (AUSTIN & AUSTIN, 2016b; BRENNER et al., 2005; LÜ et al., 2011; NAWAZ et al., 2008; NOGA, 2010; TÜRE & KUTLU, 2018; WOO & BRUNO, 2011). Atualmente é considerado um patógeno emergente e apresenta elevada resistência (GALLANI et al., 2016; NAWAZ et al., 2008). A infecção por *C. freundii* geralmente ocorre quando há má qualidade da água ou peixes imunossuprimidos e os sinais clínicos incluem letargia, movimentos descoordenados, lesões hemorrágicas na pele, olho e base das nadadeiras (LÜ et al., 2011).

Espécies do gênero *Staphylococcus*, como *S. xylosus*, também representam consideráveis perdas econômicas na produção de trutas arco-íris, na qual os peixes acometidos apresentam exoftalmia e aumento de infecções secundárias bacterianas (OH et al., 2019a). Além disso, *Staphylococcus* spp. são reconhecidos por sua resistência aos antimicrobianos de amplo espectro e impactos na saúde pública através do seu potencial zoonótico (LOZANO et al., 2016, ONMAZ et al., 2015).

Assim, as bactérias representam o principal grupo de microrganismos patogênicos para a piscicultura. O controle de doenças nesta atividade aquícola envolve o uso de antibióticos e exige uma série de cuidados e técnicas de manejo, específicas na administração dos fármacos aos animais associado a melhores condições de higiene, garantia de boa qualidade da água e redução do estresse (MURRAY et al., 2011).

#### 4.5 ANTIMICROBIANOS MAIS UTILIZADOS NA AQUICULTURA

A antibioticoterapia em peixes deve ser realizada como medida terapêutica de combate a surtos de doenças bacterianas. Uma produção saudável é feita por meio da adoção de bom manejo sanitário no sistema de cultivo, o que ajuda a controlar as doenças bacterianas na produção de peixes, devido à ausência de métodos alternativos de prevenção, como vacinas, para a maioria das enfermidades (TAVARES et al., 2014b). Atualmente, cerca de 31 diferentes antimicrobianos são legalmente usados na aquicultura mundial e também considerados de grande importância na medicina humana, destacando-se: as aminopenicilinas (amoxicilina e ampicilina); anfenicóis (cloranfenicol e florfenicol); macrolídeos (eritromicina); aminoglicosídeos (estreptomicina e neomicina); nitrofuranos (furazolidona); quinolonas (ácido oxolínico e nalidíxico); fluoroquinolonas (enrofloxacina e flumequina); tetraciclinas (oxitetraciclina, clortetraciclina, tetraciclina) e sulfonamidas (DSA, 2020; GASTALHO et al., 2014; LIU et al., 2017; LOZANO et al., 2018; FDA, 2021; YOSHIMIZU et al., 2016). Apesar dessa quantidade relativamente alta, vários outros antimicrobianos são usados de forma ilegal (LIU et al., 2017).

No Brasil, inobstante ao crescente número de relatos de bacterioses que ocasionam grandes perdas na produção aquícola (CHIDEROLI et al., 2017; SEBASTIÃO et al., 2015), somente dois antimicrobianos têm uso aprovado para o tratamento de *Aeromonas* móveis, a oxitetraciclina e o florfenicol (PADUA, et al., 2012;

SINDAN, 2018). Outros aprovados para uso em outras espécies ou mesmo não aprovados, são ilegalmente utilizados.

O florfenicol é uma droga sintética derivada do cloranfenicol (SCHWARZ et al., 2004), inibidor da síntese proteica bacteriana, e devido as suas características lipofílicas, tem alta penetração nos tecidos e atividade antimicrobiana, sendo pouco solúvel em soluções aquosas. As tetraciclinas têm sido utilizadas na aquicultura para controlar a furunculose em salmonídeos e oxitetraciclina é usada na maioria das fazendas das indústrias pesqueiras como agente profilático. São fármacos de amplo espectro incluindo a tetraciclina, clortetraciclina, doxiciclina e minociclina, que apresentam atividade contra uma ampla gama de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (HEDAYATIANFARD et al., 2014).

#### **4.5.1 Resistência microbiana**

A resistência aos antimicrobianos é definida como uma condição ao qual o microrganismo é capaz de sobreviver à exposição ao antibiótico, sendo a bactéria capaz de resistir à ação dessas drogas por diversos mecanismos (BARIE, 2012). Esta resistência tem aumentado rapidamente nos últimos anos no Brasil e no mundo, gerando uma necessidade crescente do conhecimento do perfil de sensibilidade e caracterização molecular das bactérias que com maior frequência causam infecção (BARIE, 2012; NIKOLAIDIS et al., 2014).

Esta resistência bacteriana pode ser natural ou adquirida. A primeira é uma característica intrínseca e permanente de cepas de uma mesma espécie, determinada geneticamente. Por sua vez, a resistência adquirida é uma característica própria de uma espécie bacteriana, que por natureza apresenta sensibilidade a um antibiótico, mas que sofre modificações genéticas seja por mutações no DNA cromossômico ou aquisição de genes de resistência. Esta resistência é evolutiva e depende diretamente da dose ou frequência de administração de antimicrobianos (PÉREZ-CANO & ROBLES-CONTRERAS, 2013).

Neste sentido, existem quatro mecanismos de resistência bacteriana, nos quais: as bactérias podem produzir enzimas que causam destruição ou inativação enzimática da droga; alterar e reduzir a permeabilidade das células bacterianas; desenvolver rotas metabólicas alternativas para substituir àquelas inibidas pelas

drogas, e também os antibióticos podem ser eliminados da célula ou o sítio-alvo da droga pode ser alterado estruturalmente (BARIE, 2012; TORTORA et al., 2012).

Na resistência adquirida, a conjugação é o mecanismo de transferência de genes de resistência aos antimicrobianos mais frequente, onde ocorre mobilização plasmidial entre as bactérias, ocorrendo a transferência do material genético. No entanto, a resistência adquirida também pode ocorrer por transdução ou transformação (SILVA et al., 2013).

A resistência às drogas frequentemente é carregada por plasmídeos ou por pequenos segmentos de DNA denominados transposons, os quais podem transferir um fragmento de DNA para outro. Alguns plasmídeos, incluindo-se aqueles chamados de fatores de resistência, podem ser transferidos entre células bacterianas em uma população e entre populações de bactérias diferentes, porém proximamente relacionadas. Fatores de resistência com frequência apresentam genes que conferem resistência a diferentes antibióticos (TORTORA et al., 2012).

O fenômeno de emergência e disseminação de resistência a antibióticos, associado a mutações espontâneas ou induzidas e a transferência horizontal de genes, representa atualmente um sério problema no contexto do controle e tratamento efetivo das doenças infecciosas de origem bacteriana, seja na saúde humana ou animal, onde as bactérias apresentam vários mecanismos facilitadores da troca de genes, no qual explica parcialmente o aumento da resistência aos antimicrobianos às várias classes de agentes antimicrobianos (SÁNCHEZ et al., 2012).

#### **4.5.2 Resistência aos antimicrobianos na aquicultura**

Com a intensificação do cultivo de trutas na indústria aquícola mundial, fatores associados a alterações físico-químicas da água, alimentação, alta densidade de estocagem, transporte e estresse podem levar a supressão imunológica destes animais aquáticos, no qual favorece a ocorrência de doenças infecciosas e perdas econômicas consideráveis ao produtor, tornando necessário o uso de antimicrobianos (GASTALHO et al., 2014).

Estes fármacos têm sido utilizados na produção aquícola como promotores de crescimento, no tratamento e na profilaxia de infecções, administrados através de ração medicada, banhos de imersão, ou, em circunstâncias extremas, por meio de injeção intramuscular ou intraperitoneal (SMITH et al., 2009). Todavia, o uso constante

destes fármacos nos meios de produção são o maior desencadeador do aumento de resistência aos antimicrobianos (WEIR et al., 2012).

Fatores relacionados à baixa disponibilidade de medicamentos veterinários aprovados para uso na aquicultura e ao crescente número de surtos de bacterioses, propiciam o uso inadequado de substâncias não autorizadas na atividade. Ainda, a falta de conhecimento prévio e específico da utilização, concentração e via ideal de administração, aumentam a probabilidade dos produtores utilizarem fármacos de forma indiscriminada no mesmo ciclo de produção, ocasionando importantes impactos na saúde animal, humana e ambiental (GASTALHO et al., 2014; WEIR et al., 2012).

O uso contínuo de diversos antimicrobianos na aquicultura pode acelerar o processo de resistência bacteriana, tornando-os ineficazes (CHIDEROLI et al., 2017); associado também ao desenvolvimento de reservatórios de genes de resistência aos antibióticos em ecossistemas aquáticos, de modo que estes genes podem se espalhar por transferência gênica para outras populações bacterianas, incluindo também patógenos humanos e gerar impactos em espécies não alvos (DOBIASOVA et al., 2014; MIRANDA et al., 2013).

O método de administração por via oral atinge peixes saudáveis e doentes da população, além de modificar a microbiota intestinal natural dos peixes e o meio ambiente (SMITH et al., 2009; TAVARES et al., 2014b). A alimentação com adição de medicamentos que não for consumida, eventualmente será depositada por gravidade, em sedimentos no fundo e adjacências dos locais de aquicultura, contaminando assim, o meio ambiente (SAPKOTA et al., 2008).

Clortetraciclina, oxitetraciclina, enrofloxacina, amoxicilina, florfenicol, lincomicina, tilosina, sulfadiazina e trimetoprim são algumas das moléculas de antibióticos que apresentam alto potencial de disseminação no ambiente, devido ao uso intensivo na produção animal e aquicultura, sua via de administração principalmente tópica ou oral e às baixas taxas de metabolismo no organismo animal (BOXALL et al., 2003; BUTT & VOLKOFF, 2019). Tal efeito adverso está associado à bioacumulação (AMARANTE et al., 2018). Concentrações significativas de antibióticos que permanecem por longo período de tempo no ambiente aquático, é a principal pressão seletiva para genes de resistência aos antimicrobianos em bactérias, em sedimentos e na camada de água superficial (leito aquático). Assim, ajudam a estabelecer o ambiente como um reservatório para propagação posterior e

proliferação de genes de resistência a antibióticos para patógenos através da água e da cadeia alimentar (KHAN et al., 2013).

Estudos têm relatado que bactérias patogênicas de peixes na aquicultura (*A. salmonicida*, *A. hydrophila*, *Vibrio anguillarum* e *V. salmonicida*) podem transmitir genes de resistência a antimicrobianos não só para bactérias do mesmo gênero como também a outros agentes patogênicos, como *E. coli* (FAO, 2006). Fatores de virulência como citotoxinas geneticamente semelhantes à shiga-toxina de *E. coli* shigatoxigênica, foram encontrados em plasmídeos de *Aeromonas* spp., potencializando o fator patogênico deste gênero (CANTAS et al., 2012).

Em estudo realizado por Duman e colaboradores (2017) todos os sete isolados de *Citrobacter* spp. investigados em trutas arco-íris mostraram-se fenotipicamente resistentes ao sulfametoxazol, suscetíveis à tetraciclina e na análise molecular os genes de resistência incluíram *sull*, *tetA*, *tetB* e *tetD*. Em outro estudo realizado também em *O. mykiss*, sete isolados de *Enterobacter* spp., duas linhagens de *Pseudomonas* spp., e um isolado de *Morganella* e *Stenotrophomonas* foram fenotipicamente resistentes ao sulfametoxazol e alguns foram resistentes à tetraciclina, florfenicol, amoxicilina e doxiciclina, identificando-se genes de resistência *floR*, *tetC*, *tetD* e *tetE* na análise molecular (DUMAN et al., 2019).

Um aumento global na resistência aos antibióticos tem sido registrado, denominando-se cepas bacterianas multirresistentes às drogas (MDR) ou popularmente conhecidas como “superbactérias” (WHO, 2014). Uma bactéria é definida multirresistente quando esta apresenta resistência a pelo menos um agente antimicrobiano de três classes distintas (MAGIORAKOS et al., 2012).

Rezai e colaboradores (2018) avaliaram os perfis de incidência e resistência aos antimicrobianos de espécies de *Listeria* em 120 trutas arco-íris de criação e 120 trutas à venda no oeste do Irã. Deste total, 35,83% (n=86) foram contaminados por *Listeria* spp. As maiores taxas de resistência a antibióticos foram observadas contra tetraciclina (62,79%), enrofloxacina (56,97%), ciprofloxacino (38,37%), penicilina (36,04%) e ampicilina (34,88%).

O surgimento de bactérias resistentes a antimicrobianos pode ser ainda maior do que o que tem sido detectado, já que a maioria dos estudos têm se limitado a demonstrar essa resistência em bactérias cultiváveis, que constituem apenas uma pequena proporção do total de bactérias presentes no ambiente aquático (BISSETT et al., 2006; RADHOUANI et al., 2014).

As bactérias podem ser intrinsecamente resistentes a alguns antibióticos, devido à mutações nos genes cromossomais e por transferência horizontal de genes, portanto, é importante a identificação precoce de mecanismos naturais de resistência e de alvos que podem provocar mudanças estruturais dos antimicrobianos e descontinuação no desenvolvimento de agentes que falhariam em seu uso clínico devido à resistência (BLAIR et. al., 2014).

Desse modo, o monitoramento regular da contaminação por populações bacterianas associadas à análise do perfil de resistência aos antimicrobianos, melhoria das condições sanitárias na cadeia produtiva local e o uso prudente de antibióticos é necessário (REZAI et al., 2018).

#### **4.5.3 Genes de resistência aos antimicrobianos (ARGs)**

O grupo de genes envolvido na resistência aos antimicrobianos tem sido denominado resistoma, cujo conceito inclui não só genes que codificam determinantes reais de resistência, como também genes precursores que podem evoluir para tais características (CANTON et al., 2009; MARTINEZ et al., 2015). Consequentemente, como os ensaios moleculares são baseados em parâmetros genéticos mais estáveis, ensaios de PCR podem oferecer, potencialmente, maior sensibilidade dos que os métodos baseados em cultivo (MAHEUX et al., 2014).

Na aquicultura, os genes de resistência à tetraciclina, mencionados previamente foram *tetM*, *tetO*, *tetS*, *tetA* e *tetB* (ARAÚJO et al., 2015; HEDAYATIANFARD et al., 2014). Roberts (2012) comprova em seu estudo que a ampla utilização de tetraciclina na aquicultura induz à seleção de bactérias resistentes a este fármaco.

*Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram-positiva e um importante patógeno devido à sua estável habilidade para desenvolver resistência aos antimicrobianos (PLATA et al., 2009). Os genes de resistência a meticilina estão relacionados a *S. aureus* resistentes a meticilina e são conhecidos como MRSA (Methicilin Resistant *Staphylococcus aureus*) (PRINCIPATO & QIAN, 2014). O aumento do número de cepas de MRSA constitui um grande desafio no tratamento e controle de infecções estafilocócicas, pois estas são resistentes à maioria dos antimicrobianos usados na prática clínica, principalmente aos da classe beta-

lactâmicos, dificultando o tratamento clínico com as opções terapêuticas disponíveis na farmacopéia (PINCHUCK et al., 2010, QUINN et al., 2011; SADER et al. 2016).

O principal mecanismo que confere esta resistência relaciona-se à alteração do sítio de ação dos antibióticos beta-lactâmicos, ou seja, alteração das proteínas ligadoras de penicilinas denominadas PBP's, sintetizada pelo gene *mecA* (QUINN et al., 2011). Além disso, a resistência a um antimicrobiano pode ajudar na co-seleção de resistência a outros fármacos, nos casos de resistência múltipla aos antimicrobianos (MAGIORAKOS et al., 2012).

Estudos registram a ocorrência desses genes em águas residuais em usinas de tratamento (GOLDSTEIN et al., 2012), e o primeiro registro de ocorrência de MRSA em um animal aquático ocorreu na Malásia, em uma fazenda de tilápias (ATYAH, et al., 2010). Em estudo realizado por Hammad e colaboradores (2012), cepas MRSA foram isoladas em peixes disponíveis para consumo e destacado o risco de transmissão dessas cepas multirresistentes para seres humanos. Oh e colaboradores (2019a), avaliaram que *S. xylosum*, espécie do mesmo gênero, leva a quadros de exoftalmia e rompimento da barreira imune primária, com aumento de infecções secundárias bacterianas quando alocados em condições precárias, mortalidade e perdas econômicas na produção de trutas arco-íris.

#### 4.6 FATORES DE PATOGENICIDADE

As ilhas de patogenicidade constituem segmentos de DNA inseridos no cromossomo bacteriano, que atribuem uma variedade de características de virulência aos microrganismos que a possuem; entre elas destacam-se a capacidade de adesão e invasão no epitélio da célula hospedeira, à produção de toxinas, captação de ferro do meio ambiente e síntese do sistema de secreção tipo III, dispositivo molecular que permite a translocação de moléculas efetoras para o interior da célula hospedeira. A capacidade de adquirir propriedades patogênicas em um único evento genético permite a evolução, bem como o surgimento de microrganismos patogênicos (GOMES et al., 2016).

Na aquicultura, foram relatados fatores de virulência, como citotoxinas geneticamente semelhantes à shiga-toxina de *E. coli* shigatoxigênica (STEC), em plasmídeos de *Aeromonas* spp., realçando o potencial patogênico deste gênero e a sua plasticidade genética (CANTAS et al., 2012).

*Staphylococcus aureus* é um importante patógeno relacionado à saúde animal e humana pela elevada patogenicidade e aumento na prevalência de cepas multirresistentes aos antibióticos (ACOSTA et al., 2017). É também, responsável por causar toxi-infecções alimentares estafilocócicas e a síndrome do choque tóxico em humanos, após a ingestão de alimentos contaminados por enterotoxinas produzidas pelo mesmo gênero, considerada a segunda maior causa de doenças transmitidas por alimentos (DTA) no Brasil (ANVISA, 2014), tendo amplo impacto na saúde pública (PRINCIPATO & QIAN, 2014). São produzidas no alimento após contaminação pela bactéria, multiplicando-se e liberando as toxinas. O processo de intoxicação alimentar estafilocócica ocorre rapidamente com sintomatologia aguda pela ingestão das toxinas pré-formadas, dependendo da quantidade de toxina no alimento ingerido e a suscetibilidade individual à toxina e incluem cólicas abdominais, vômitos, náuseas e diarreia (FORSYTHE, 2013; TANG et al., 2011).

Entre as mais de 20 enterotoxinas classificadas até o momento, *sea* e *seb* são as melhores caracterizadas e classificadas como superantígenos, pois induzem a uma ativação intensa das células T (DE SANTANA et al., 2010; PINCHUCK et al., 2010). A enterotoxina *sea* é a toxina mais associada com intoxicações causadas por *Staphylococcus* spp. (cerca de 77% dos surtos), seguida pela toxina *sed* (responsável por 38% dos surtos) (FORSYTHE, 2013). Diversos autores também relataram que os genes de enterotoxinas *sea*, *seb*, *sec*, *seg*, *seh* e *sei* são os mais comuns em *Staphylococcus* spp. isolados de amostras de peixes (SAITO et al., 2011; VÁZQUEZ-SÁNCHEZ et al., 2012).

São toxinas altamente termoestáveis, resistentes à ação de enzimas proteolíticas do sistema digestivo, capazes de afetar as células de revestimento do trato gastrointestinal (TORTORA et al., 2012). Também, são altamente resistentes à desnaturação, o que permite que permaneçam intactas em alimentos contaminados e causem surtos de doenças. Assim, o surgimento de cepas de *S. aureus* e *Staphylococcus Coagulase Negativa* (CONS) multirresistentes a drogas é uma grande preocupação, pois é uma causa comum de diarreia associada aos antibióticos em pacientes hospitalizados (PINCHUCK et al., 2010).

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 ÁREA DE ABRANGÊNCIA DO ESTUDO

A seleção e contato prévio com os produtores foi realizado através de dados disponibilizados pela Associação de Aquicultores da Região Serrana do estado do Rio de Janeiro (AquiSerra). Ao todo, 10 (dez) truticultores estão associados à AquiSerra, sendo 8 (oito) propriedades localizadas no município de Nova Friburgo e 2 (duas) no município de Teresópolis. No entanto, somente 5 (cinco) propriedades localizadas em Nova Friburgo e 2 (duas) em Teresópolis permaneceram ativas diante do cenário pandêmico vivido no ano de 2020 e que ainda se vive, onde os truticultores tiveram sua produção impactada devido ao baixo fluxo de consumidores nos restaurantes e comércio local, associado também ao fechamento temporário dos mesmos diante aos decretos emitidos pela prefeitura local durante o período.

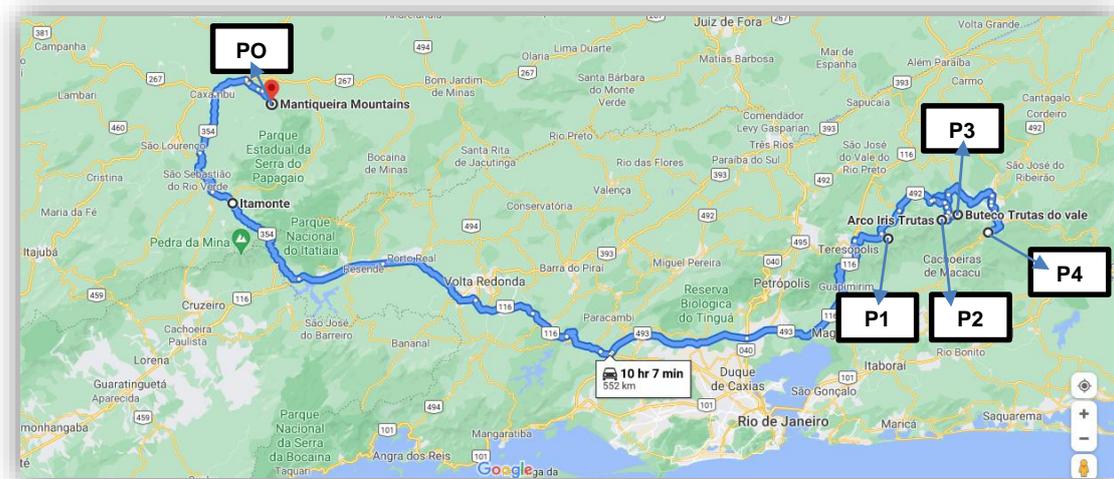
Sendo assim, foram visitadas 5 (cinco) propriedades que exercem atividade aquícola relacionada à truticultura, na qual 4 (quatro) delas estão localizadas na região serrana do estado do Rio de Janeiro (três propriedades no município de Nova Friburgo e uma propriedade em Teresópolis) e uma propriedade comparativa localizada no município de Itamonte, estado de Minas Gerais (Serra da Mantiqueira) (Figura 1).

A relação da distância (552 km) no que se refere a propriedade localizada na Itamonte – MG (Serra da Mantiqueira) em comparação às propriedades localizadas na região serrana do estado do RJ estão amostradas na Figura 2.

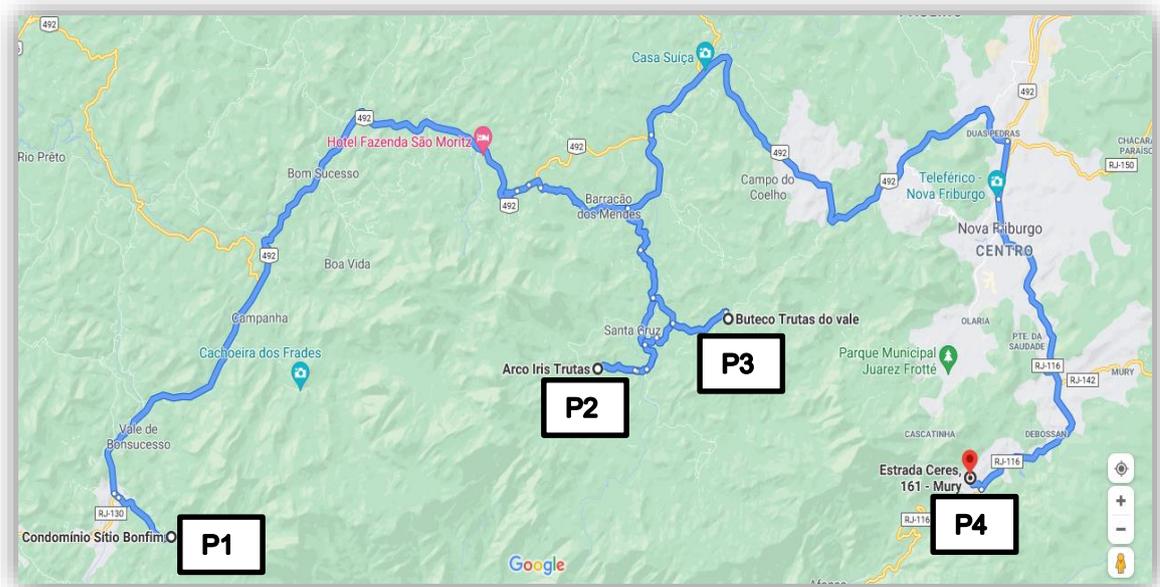
As truticulturas localizadas na região serrana do estado do RJ (Figura 3) que fizeram parte do estudo incluem: Truticultura Samadhi (P1), localizada em Teresópolis – RJ (Figura 4A e B; e Figura 5); Truticultura Arco-Íris em Três Picos (P2) (Figura 6); Truticultura Truta do vale/Buteco Trutas do vale em Salinas (P3) (Figura 7), e Truticultura do Vascão (P4) (Figura 8; Figura 9) em Serra Nevada, ambas localizadas no município de Nova Friburgo – RJ.



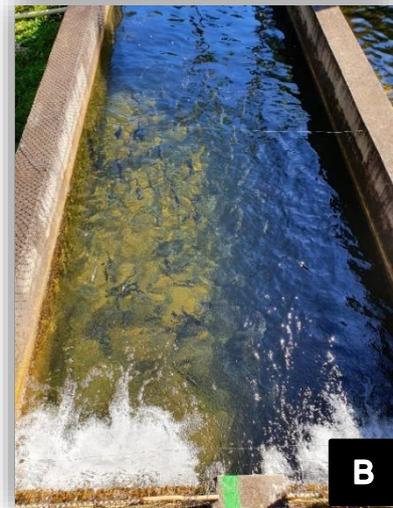
**FIGURA 1:** Truticultura localizada em Itamonte – MG na Serra da Mantiqueira (propriedade comparativa).



**FIGURA 2:** Relação da distância entre as propriedades estudadas (P0: Truticultura em Itamonte – MG na Serra da Mantiqueira; P1: Truticultura Samadhi; P2: Truticultura Arco-Íris; P3: Truticultura Trutas do vale; P4: Truticultura do Vascão).



**FIGURA 3:** Localidade das truticulturas da região serrana fluminense (P1: Truticultura Samadhi; P2: Truticultura Arco-íris; P3: Truticultura Trutas do vale; P4: Truticultura do Vascão).



**FIGURA 4 (A e B):** Tanques cobertos de trutas arco-íris (*O. mykiss*) em fase de engorda da truticultura Samadhi localizada em Teresópolis – RJ.



**FIGURA 5:** Tanques cobertos de trutas arco-íris (*O. mykiss*) em fase de engorda com constante renovação de água da truticultura Samadhi localizada em Teresópolis – RJ.



**FIGURA 6:** Tanques cobertos de trutas arco-íris (*O. mykiss*) em fase de engorda com constante renovação de água da truticultura Arco-Íris localizada em Nova Friburgo – RJ.



**FIGURA 7:** Tanques de alvenaria para cultivo de trutas arco-íris (*O. mykiss*) em fase de engorda com constante renovação de água da truticultura Truta do Vale localizada em Nova Friburgo – RJ.



**FIGURA 8:** Tanques cobertos de trutas arco-íris (*O. mykiss*) em fase de engorda e alevinos, com constante renovação de água da truticultura do Vascão localizada em Nova Friburgo – RJ.



**FIGURA 9:** Tanques cobertos de trutas arco-íris (*O. mykiss*) com constante renovação de água da truticultura do Vascão localizada em Nova Friburgo – RJ.

Fotos: Arquivo pessoal.

### 5.1.1 Aplicação de questionários

Os questionários (APÊNDICE 1) foram administrados durante entrevistas nas propriedades visitadas. Abordaram-se fatores relacionados ao histórico da propriedade e manejo sanitário, com ênfase na pesquisa sobre o uso de antimicrobianos relacionados à produção de peixes da espécie *O. mykiss*, e também relacionados à produção animal exercida na propriedade, quando fosse o caso.

A partir da análise do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos das bactérias isoladas, o produtor regional foi auxiliado em relação às políticas de prevenção de doenças, sobre o uso correto de antimicrobianos para tratamento e como promotores de crescimento, a adoção de um manejo correto das atividades agropecuárias e a conservação de ambientes aquáticos, de modo a prevenir a contaminação ambiental com agentes antimicrobianos.

## 5.2 COLETA DE AMOSTRAS

### 5.2.1 Coleta de amostras de animais

Foram coletados 10 (dez) trutas arco-íris (*O. mykiss*) em cada propriedade visitada, totalizando 50 *O. mykiss* submetidas a resfriamento, acondicionadas em caixas isotérmicas com uma camada de gelo sob os peixes, e acima, outra camada de gelo picado (TAVARES et al., 2014a) e enviados ao Laboratório de Sanidade Animal. Os peixes foram identificados individualmente com informações sobre a data de coleta, peso, sexo, comprimento total e padrão, sistema de cultivo e propriedade de origem. A coleta foi realizada durante o inverno e o início da primavera (período de julho a outubro), durante a fase de engorda.

Para processamento, em ambiente estéril na capela de fluxo laminar, foi realizada a separação do segmento intestinal, dissecação asséptica com o auxílio de placas de Petri e inoculação do conteúdo intestinal através de alça de platina, ambas estéreis. Os inóculos foram acondicionados em tubos cônicos de 15 mL com os respectivos meios de enriquecimento: 3,0 mL Caldo Brain Heart Infusion (BHI) (Acumedia, EUA), 3,0 mL Caldo BHI (Acumedia, EUA) acrescido de 7,5% cloreto de sódio (NaCl) e 3,0 mL Caldo Rappaport Vassiliadis (RVS) (Kasvi, Espanha) para exames bacteriológicos em meio de cultivo, identificação fenotípica e bioquímica.

### 5.2.2 Coleta de amostras de água

Amostras de água de superfície dos tanques foram coletadas de acordo com (KHAN et al., 2013), em três a cinco pontos em cada local visitado, em uma profundidade de 0,5m e quantidades iguais foram misturadas, formando uma única amostra que completou os recipientes plástico estéreis de polietileno de 120 mL. Adicionalmente, foram coletadas amostras da água dos canos de captação para distribuição aos tanques ativos (Figura 10). O material foi transportado sob refrigeração e processado no Laboratório de Sanidade Animal da UENF. Dados regionais sobre temperatura, potencial hidrogeniônico (pH) e sistema de cultivo foram coletados.

Posteriormente, realizou-se alíquota da amostra final (3,0 mL) para tubos cônicos de 15 mL contendo os meios de enriquecimento: 3,0 mL Caldo BHI

(Acumedia, EUA) e 3,0 mL Caldo BHI (Acumedia, EUA) acrescido de 7,5% NaCl para análise bacteriológica.



**FIGURA 10:** Coleta de amostra de água de cano de captação para distribuição aos tanques de truticultura ativos, localizados na Truticultura do Vascão em Nova Friburgo – RJ.

Foto: Arquivo pessoal.

A relação de trutas arco-íris machos e fêmeas associada às amostras de água coletadas nas propriedades estudadas estão apresentadas na Tabela 1.

**TABELA 1:** Relação da distribuição dos animais coletados, amostras ambientais e ao local de produção dos mesmos.

| Propriedade  | Localização                             | Nº de amostras coletadas |      |
|--------------|---|--------------------------|------|
|              |   | <i>O. mykiss</i>         | Água |
| <b>P0</b>    | Itamonte – RJ<br>(Serra da Mantiqueira) | 10<br>(10M)              | 0    |
| <b>P1</b>    | Teresópolis – RJ                        | 10<br>(6M; 4F)           | 2    |
| <b>P2</b>    | Nova Friburgo – RJ<br>(Salinas)         | 10<br>(9M; 1F)           | 2    |
| <b>P3</b>    | Nova Friburgo – RJ<br>(Três Picos)      | 10<br>(9M; 1F)           | 1    |
| <b>P4</b>    | Nova Friburgo – RJ<br>(Serra Nevada)    | 10<br>(8M; 2F)           | 4    |
| <b>TOTAL</b> |   | 50<br>(42M; 8F)          | 9    |

P0= Truticultura de Itamonte-MG; P1= Truticultura Samadhi de Teresópolis-RJ; P2= Truticultura Arco-íris de Nova Friburgo-RJ; P3=Truticultura Truta do Vale de Nova Friburgo-RJ; P4= Truticultura do Vascão de Nova Friburgo-RJ; M= Macho; F= Fêmea.

## 5.3 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA

### 5.3.1 Microrganismos Gram-negativos

Os inóculos do conteúdo intestinal e amostras de água acondicionados em tubos cônicos de 15 mL contendo 3,0 mL de Caldo BHI (Acumedia, EUA) foram incubados em estufa de cultura bacteriológica (SolidSteel) por 24 horas e posteriormente centrifugados a 5.000 rpm por 15 minutos e após, desprezado o sobrenadante. Os pellets contendo possivelmente os microrganismos Gram-negativos constituintes da microbiota intestinal dos peixes e do ambiente aquático foram transferidos com alça de platina para placas de Petri com meios Ágar MacConkey (Acumedia, EUA), sendo incubadas em estufa bacteriológica (SolidSteel) a 37°C por 24 horas.

As características morfológicas e morfotintoriais das colônias foram avaliadas. Para tal, as colônias foram coradas pelo método de Gram (Laborclin, Brasil) e submetidas aos testes de produção de catalase (Peróxido de Hidrogênio a 3%) e produção de oxidase (Fluka, Chemika, Suíça).

Adicionalmente, novo inóculo da microbiota intestinal dos peixes foi realizado em tubos cônicos de 15 mL contendo 3,0 mL de Caldo RVS (Kasvi, Epanha), meio de enriquecimento seletivo com a finalidade de otimizar o isolamento de espécies do gênero *Salmonella*. As amostras foram acondicionadas a banho-maria (Novatecnica, SP) à 42°C por 24 horas. Após esse período, o tubo foi encaminhado para centrifugação e o pellet estriado para placa de Petri com Ágar Hektoen Enteric (Acumedia, EUA), meio diferencial utilizado para o isolamento de espécies dos gêneros *Salmonella* e *Shigella*. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica (SolidSteel) a 37°C por 24 horas.

Bactérias isoladas foram transferidas para tubos contendo os testes bioquímicos convencionais, necessários para a sua identificação. Avaliou-se a utilização dos carboidratos (glicose, sacarose, lactose, maltose, arabinose e sorbitol), produção de indol, prova do vermelho de metila (VM), prova de Voges-Proskauer (VP), utilização do citrato, produção de urease, descarboxilação da lisina, arginina e ornitina, esculina, produção de sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) e prova de motilidade (BRENNER et al., 2005; CLSI, 2013; KONEMAN et al., 2001; TORTORA et al., 2012). Para identificação de cepas do gênero *Aeromonas* e *Pseudomonas* também foi realizado o

teste OF-glicose (HiMedia, Índia), recomendado para a determinação do metabolismo oxidativo e fermentativo de carboidratos por bactérias Gram-negativas.

As colônias que apresentaram-se lactose positiva em Ágar MacConkey (Acumedia, EUA), foram posteriormente repicadas em novas placas de Petri contendo Ágar Eosina-Azul de Metileno (HiMedia, Índia), utilizado para diferenciação de bacilos entéricos Gram-negativos. Neste meio, cepas de *E. coli*, grandes fermentadores de lactose, conferem características próprias, apresentando coloração verde metálico (NEOGEN, 2011).

### 5.3.2 Microrganismos Gram-positivos

Para cultura de bactérias Gram-positivas, amostras de água e conteúdo intestinal de trutas arco-íris foram acondicionados em tubos cônicos de 15 mL contendo 3,0 mL de caldo de enriquecimento BHI (Acumedia, EUA) acrescido de 7,5% NaCl para *Staphylococcus* spp. e incubado a 37°C por 24 horas. Após incubação, os tubos foram centrifugados a 5.000 rpm durante 15 minutos e realizada a sementeira do material por estriamento com alça de platina em placa de Petri contendo meio Ágar Manitol e posteriormente em Ágar Sangue (Acumedia, EUA) suplementado com 5% de sangue estéril desfibrinado de carneiro para observação de hemólise, sendo ambos incubados em estufa bacteriológica (SolidSteel) a 37°C por 24 horas.

Adicionalmente, cada inoculo do conteúdo intestinal acondicionado em tubos com Caldo BHI (Acumedia, EUA) foram centrifugados 5.000 rpm durante 15 minutos, desprezado o sobrenadante e realizada a sementeira do material por estriamento com alça de platina para placa de Petri contendo Ágar de Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (Kasvi, Espanha) e acondicionados em jarra de anaerobiose em estufa bacteriológica (SolidSteel) a 37°C por 24 a 72 horas para observação de crescimento de colônias do gênero *Lactobacillus* e *Lactococcus*, bactérias ácido-láticas (LAB).

Após o crescimento, foram avaliadas as colônias e suas características morfológicas e morfotintoriais. Para tal, as colônias foram coradas pelo método de Gram (Laborclin, Brasil) e submetidas aos testes de catalase (Peróxido de Hidrogênio a 3%), oxidase (Fluka Chemika, Suíça) e todos os testes bioquímicos necessários para identificação.

A análise das amostras Gram-positivas e Gram-negativas seguiram o padrão de identificação bioquímico-fisiológico convencionais, onde o Manual de Bacteriologia

Sistemática de Bergey's (BRENNER et al., 2005) foi consultado e posteriormente teve sua classificação confirmada pelo equipamento Vitek 2 (Biomérieux, França), do Laboratório de Sanidade Animal da UENF.

#### 5.4 PESQUISA DE BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES

##### 5.4.1 Análise do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos

Nesta etapa as amostras foram caracterizadas de acordo com o perfil de sensibilidade a antimicrobianos. O teste foi realizado através da técnica de disco-difusão em Ágar Mueller Hinton (Acumedia, EUA), também conhecido como método de Kirby-Bauer (BAUER et al., 1966), de acordo com as normas do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012), utilizando-se discos impregnados (Cefar, SP, Brasil).

A técnica de disco-difusão em Ágar Mueller Hinton (Acumedia, EUA) consiste em colônias puras cultivadas em estufa bacteriológica (SolidSteel) a 37°C por 24 horas, onde são inoculadas em 2,0 mL de solução salina 0,85% estéril, de modo a obter turbidez igual a 0,5 de acordo com a escala de MacFarland ( $10^8$  UFC/mL) padronizada em densitômetro (Densimat, bioMérieux, França). A suspensão foi semeada com auxílio de swab estéril por induto contínuo em placa de Petri contendo 20 mL de Ágar Mueller Hinton (Acumedia, EUA). Em seguida, os discos de cada antibiótico (Laborclin, Brasil) foram adicionados às placas com auxílio de uma pinça e incubada em estufa bacteriológica (SolidSteel) a 37°C por 24 horas.

Para bactérias Gram-positivas foi avaliado o perfil de suscetibilidade aos seguintes antibióticos: Amoxicilina (AMO, 30µg), Ampicilina (AMP, 10µg), Cefalotina (CFL, 30µg), Cefoxitina (CFO, 30µg), Cefotaxima (CTX, 30 µg), Clindamicina (CLI, 2µg), Sulfazotrim (SUT, 25 µg), Eritromicina (ERI, 15µg), Amicacina (AMI, 30µg), Gentamicina (GEN, 10µg), Oxacilina (OXA, 1µg), Penicilina G (PEN, 10U), Tetraciclina (TET, 30µg), Vancomicina (VAN, 30µg) e Florfenicol (FLF, 30µg).

As análises para bactérias Gram-negativas: Amoxicilina + Ácido Clavulânico (AMC, 10µg), Ampicilina (AMP, 10µg), Ácido Nalidíxico (NAL, 30 µg), Cefalotina (CFL, 30µg), Cefoxitina (CFO, 30µg), Cefotaxima (CTX, 30 µg), Ciprofloxacino (CIP, 5µg), Cloranfenicol (CLO, 30µg), Sulfazotrim (SUT, 25µg), Enrofloxacin (ENO, 5µg),

Gentamicina (GEN, 10µg), Tetraciclina (TET, 30µg), Tobramicina (TOB, 30µg) e Florfenicol (FLF, 30µg).

Apesar do disco de oxacilina não ser mais recomendado para previsão da resistência à oxacilina desde 2009 (CLSI), ele foi incluído neste estudo com o objetivo de comparar o seu desempenho com o disco de ceftioxime.

Posteriormente, foi avaliado o perfil de crescimento bacteriano através da mensuração do diâmetro dos halos de inibição existentes em volta de cada disco de antibiótico. De acordo com o valor em milímetros do diâmetro dos halos de inibição formados, a suscetibilidade ao antibiótico foi caracterizada como: sensível, resistência intermediária ou resistente frente ao fármaco testado segundo recomendações do CLSI (2011).

## 5.5 INVESTIGAÇÃO MOLECULAR

### 5.5.1 Extração e Quantificação de DNA

Para a extração do material genético microbiano de bactérias Gram-positivas do gênero *Staphylococcus* spp. isoladas do conteúdo intestinal de trutas arco-íris e amostras de água, foi empregado o kit PREPMAN ULTRA® (Applied Biosystems, Life Technologies, EUA) conforme instruções do fabricante.

Os isolados de *Staphylococcus* spp. foram acrescidos em Caldo BHI (Acumedia, EUA) por 12-18 horas a 37°C em estufa bacteriológica (SolidSteel). Posteriormente, centrifugados 13.000 rpm por 15 minutos e o pellet estriado em Ágar Mueller Hinton (Acumedia, EUA) em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. A partir deste meio, os isolados bacterianos cultivados foram submetidos à técnica de extração de DNA.

Colônias foram suspendidas em 100 µl de PREPMAN ULTRA® nos microtubos tipo eppendorf. As amostras após devidamente fechadas e identificadas, foram agitadas no Vortex (MOD QL901 - Biomixer) durante 10 a 30 segundos. Posteriormente, os microtubos tipo eppendorf foram acondicionados a placas aquecedoras Thermomixer R Comfort® (Eppendorf AG, Hamburg 2007) a 100°C durante 10 minutos. Depois de cessado 2 minutos em temperatura ambiente, os tubos foram submetidos à centrifugação através de Microcentrífuga 5415D EPPENDORF® a 13.000 RPM durante 2 minutos.

Após, foram transferidos 50 µl do sobrenadante do DNA extraído para um segundo conjunto de tubos tipo eppendorf estéreis e identificados, armazenados à -20°C para uso posterior na reação de PCR, e o pellet, que continha as proteínas bacterianas e restos de parede celular desprezados. A quantidade e a qualidade do material genético extraído foi estimado através do NanoDrop ND-2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific™).

### 5.5.2 Reação em Cadeia da Polimerase

As Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) foram realizadas para detecção da presença de genes de resistência de antimicrobianos em isolados de amostras de água e da microbiota intestinal de *O. mykiss* coletados e extraídos previamente. O DNA extraído foi submetido a análise através da técnica convencional, com adição de iniciadores de resistência aos antimicrobianos e fatores de patogenicidade.

Os isolados de *Staphylococcus* spp. foram analisados com iniciadores específicos para enterotoxinas estafilocócicas (genes *sea*, *sec* e *sed*) e para o gene *mecA* resistente à meticilina através da PCR convencional, seguindo a metodologia descrita no trabalho de Mehrotra e colaboradores (2000) com algumas modificações nas condições. Os iniciadores específicos com suas respectivas sequências de oligonucleotídeos foram descritos na Tabela 2.

**TABELA 2:** Sequência de oligonucleotídeos para pesquisa de gene de resistência aos antimicrobianos e genes enterotoxigênicos em *Staphylococcus* spp. utilizados nesse estudo.

| GENE               | DESCRIÇÃO                | INICIADORES 5' - 3'   | AMPLICON |
|--------------------|--------------------------|---|----------|
| <b><i>mecA</i></b> | Resistência a meticilina | ATC GAT GGT AAA GGT TGG C<br>AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C    | 533pb    |
| <b><i>sea</i></b>  | Enterotoxina A           | GGT TAT CAA TGT GCG GGT GG<br>CGG CAC TTT TTT CTC TTC GG      | 102pb    |
| <b><i>sec</i></b>  | Enterotoxina C           | AGA TGA AGT AGT TGA TGT GTA TGG<br>CAC ACT TTT AGA ATC AAC CG | 451pb    |
| <b><i>sed</i></b>  | Enterotoxina D           | CCA ATA ATA GGA GAA AAT AAA AG<br>ATT GGT ATT TTT TTT CGT TC  | 278pb    |

Fonte: MEHROTRA et al., 2000.

Para realização das amplificações dos fragmentos das amostras de *Staphylococcus* spp. para o gene *mecA*, as amostras foram identificadas e acondicionadas em microtubos tipo eppendorf de 200 µL em volumes totais de 25 µL,

contendo: 12,5 µL de GoTaq® Green Master Mix 2x (Promega Corporation®), 1 µL do primer *mecA* – Forward (F'), 1 µL do primer *mecA* – Reverse (R'), 1 µL ou 2 µL de DNA molde (considerando variações devido a quantificação do material genético de cada amostra por µL), e o volume restante completado com Água Milli-Q (Thermo Scientific™).

A incubação foi realizada em Termociclador apropriado TC – 412 (Techne®). Para realização das amplificações dos fragmentos obedeceu às seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, seguida por 40 ciclos de amplificação (desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 58°C por 2 minutos, extensão a 72°C por 1 minuto) e extensão final a 72°C por 7 minutos.

Para a amplificação do DNA para genes enterotoxigênicos foi realizada a reação em microtubos tipo eppendorf de 200 µL em volumes totais de 25 µL, contendo: 12,5 µL de GoTaq® Green Master Mix 2x (Promega Corporation®), 1 µL de cada oligonucleotídeo (20 pmol), 2 µL de DNA molde e 8,5 µL de água ultrapura que compõe o Kit. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de amplificação (desnaturação a 94°C por 2 minutos, anelamento a 57°C por 2 minutos, extensão a 72°C por 1 minuto) e extensão final a 72°C por 7 minutos.

Foram utilizadas como controles positivos para o gene *mecA* a cepa ATCC 33591 *S. aureus* resistente à metilina e para os genes das enterotoxinas estafilocócicas foram utilizadas as cepas enterotoxigênicas ATCC 13565 (*sea*), ATCC 19095 (*sec*) e ATCC 23235 (*sed*), do acervo do Laboratório de Sanidade Animal da UENF.

Para evitar contaminação com produtos da PCR, a extração, amplificação e a eletroforese dos produtos amplificados foram realizadas em diferentes setores do Laboratório de Sanidade Animal, da UENF.

### **5.5.3 Leitura dos produtos da PCR por eletroforese**

Após a execução das etapas de amplificação dos fragmentos de DNA, os produtos amplificados (amplicons) foram fracionados em alíquotas. Posteriormente, aplicados nos poços do gel de agarose a 1% e submetidos à eletroforese em cubas contendo

tampão TAE (Tris/Ácido Acético/EDTA 0,5X), ligada a uma fonte de corrente elétrica em voltagem de 100 V, durante aproximadamente 60 minutos e visualizados diretamente sob luz ultravioleta através de transiluminador UV (DyNA Light, Labnet, EUA) e a imagem do gel documentada através do software GelDoc-It™ (UVP, Imaging System). O tamanho dos fragmentos de DNA das amostras foi comparado com o marcador padrão de peso molecular de 1kb (para *mecA*) e 100pb (para enterotoxinas *sea*, *sec* e *sed*) (Ladder, Ludwig Biotec, Brasil) aplicado no gel.

## 5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

### 5.6.1 Questionários

Foi realizada a análise descritiva dos dados obtidos através dos questionários aplicados nas propriedades aquícolas visitadas.

### 5.6.2 Características gerais dos animais amostrados

Os resultados dos parâmetros zootécnicos que incluem peso, comprimento total e comprimento padrão dos animais amostrados foram submetidos à análise descritiva e de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. Os resultados foram expressos como média, desvio padrão da média, variância, mediana, valores mínimos e máximos e foram considerados significativos quanto  $p \leq 0,05$ . Os cálculos da análise estatística foram realizados com auxílio do software Minitab® versão 2018.

### 5.6.3 Microrganismos Gram-negativos e Gram-positivos

Foi adotada a estatística descritiva para o percentual de amostras isoladas do conteúdo intestinal de trutas arco-íris e amostras de água positivas para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e seus respectivos perfis de resistência aos antimicrobianos e fatores de patogenicidade. A análise estatística do perfil de resistência aos antimicrobianos foi realizada através do teste exato de Fisher com auxílio do software Minitab® versão 2018, comparando-se as classes de antibióticos com maiores percentuais de resistência e os resultados foram considerados significativos quanto  $p \leq 0,05$ .

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 ANÁLISE DESCRITIVA DOS QUESTIONÁRIOS

Foram aplicados 5 questionários em cada propriedade visitada. Destes, 80% (n=4) foram respondidos por produtores da região serrana fluminense e 20% (n=1) por produtor do estado de Minas Gerais. 100% dos produtores declararam possuir assistência veterinária, sendo a região serrana fluminense assessorada pela FIPERJ.

Com relação ao sistema de cultivo, 80% das propriedades visitadas possuem sistema de cultivo intensivo com produção de trutas arco-íris em tanques de alvenaria e 20% sistema semi-intensivo com produção em tanques escavados. A alimentação da produção é realizada com ração comercial extrusada para peixes carnívoros na frequência de duas vezes ao dia em 100% das propriedades. No quesito produção de outras espécies animais, 60% dos produtores afirmaram exercer outras atividades de produção animal, sendo estas: aves; rãs; carpas; e tilápias.

Do total, 80% das propriedades a água de abastecimento dos tanques é através de nascentes; e 20% através de riachos de decantação. A renovação de água dos tanques é contínua em 100% das propriedades e não possuem água tratada. Não há histórico quanto ao uso de agrotóxicos nas propriedades visitadas. Ainda, 40% das propriedades afirmaram utilizar de forma profilática Terramicina® (oxitetraciclina) na água dos tanques, sendo apresentadas como P1 E P4; E 20% utilizam sal na água quando necessário. Ainda, 40% apresentam histórico de perdas na produção, onde a truticultura P2 apresentou ictiofitiríase (*Ichthyophthirius multifiliis*) em alevinos de *O. mykiss* no ano de 2019 e a truticultura P4 no ano de 2020 perdeu em média 5 a 6 trutas por dia, apresentando nadadeiras comprometidas e posteriormente ao utilizar Terramicina® as perdas cessaram.

Foi observada que a produção de *O. mykiss* na região serrana, alvo deste estudo, foi reduzida considerando o cenário pandêmico vivido no ano de 2020 e que percorre até os dias atuais. Ao entrar em contato com as produtores associados na AquiSerra no período inicial do estudo, foi observado que das dez truticulturas associadas, duas foram desativadas temporariamente e duas truticulturas associaram-se entre si, unindo a produção em uma só propriedade. Outras, reduziram a compra de alevinos para engorda, e conseqüentemente redução da produção,

levando em consideração que em virtude da pandemia pelo novo coronavírus Sars-CoV-2 da Covid-19, em vários períodos do ano, principalmente no primeiro semestre de 2020 (período das coletas), onde foram publicados decretos municipais nos quais solicitava o fechamento temporário de restaurantes e/ou redução da sua capacidade. Das truticulturas analisadas, 40% delas possuíam concomitantemente à produção de trutas arco-íris, o preparo e degustação da espécie em restaurantes na mesma localidade em atividade.

Vale considerar que, no ano de 2019, a truticultura P1 produziu 1.500 kg de trutas arco-íris. Em contrapartida, no ano de 2020, nesta mesma propriedade o último abate em junho reuniu apenas 70 kg de *O. mykiss*. A truticultura P2 efetuava a compra de 30 a 50 mil alevinos ao ano; E a truticultura P4 comprava aproximadamente 8 mil alevinos, antes dos impactos diretos da pandemia.

A média de *O. mykiss* nas truticulturas analisadas no momento das coletas tratavam-se de 400 trutas para engorda distribuídas nos tanques e um tanque à parte para alevinos em 60% das propriedades (P1, P2 e P4), tendo em média dois mil *O. mykiss*. A limpeza diária dos tanques era realizada em 100% das propriedades e a renovação de água é constante, conforme já relatada.

Assim, conforme discutido, embora existam muitas publicações sobre a prevalência de ARGs no ambiente aquático, há informações muito limitadas disponíveis sobre o desenvolvimento e a disseminação da resistência a antibióticos de fazendas de peixes aquáticos para sistemas fluviais (CAPKIN et al., 2015). Desse modo, também é importante determinar os efeitos de longo prazo dos antibióticos nas bactérias ambientais e patogênicas e desenvolver alguma alternativa estratégica para reduzir o uso desses antibióticos (OZTURK & ALTINOK, 2014).

## 6.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS ANIMAIS AMOSTRADOS

Foram inspecionados o estado clínico geral de cada animal coletado, sexo, mensuração de peso corporal por meio de balança eletrônica, determinação do comprimento total (distância entre a ponta do focinho e o maior raio caudal) e comprimento padrão (distância entre a ponta do focinho e o final do pedúnculo caudal) antes da necropsia para separação do segmento intestinal em capela de fluxo laminar no Laboratório de Sanidade Animal da UENF.

Sendo assim, 50 espécies de *O. mykiss* foram inspecionadas. Para análise de diferenciação, foram adotadas referências descritas por Machado e colaboradores (2007) na qual o macho apresenta as laterais mais brilhante e a mandíbula é pronunciada; já as fêmeas possuem o corpo arredondado e a cabeça mais delicada (Figura 10A; Figura 10B). Todas as trutas arco-íris coletadas apresentaram-se clinicamente saudáveis. Não se fez necessária submissão ao Comitê de Ética, pois os espécimes (*O. mykiss*) foram abatidos pelos produtores para a facultação e/ou comercialização.



**FIGURA 11 (A e B):** Análise macroscópica da condição física dos animais coletados. (A) *O. mykiss* macho; (B) *O. mykiss* fêmea.

Observou-se que os animais inspecionados apresentaram comprimento total médio (CTM) variando de 22,08 cm a 29,50 cm; Comprimento padrão médio (CPM) de 19,39 cm a 26,30 cm e massa corporal média (MCM) de 157,5g a 456,8g. Características gerais, incluindo a estatística descritiva dos valores biométricos avaliados estão apresentados na Tabela 3.

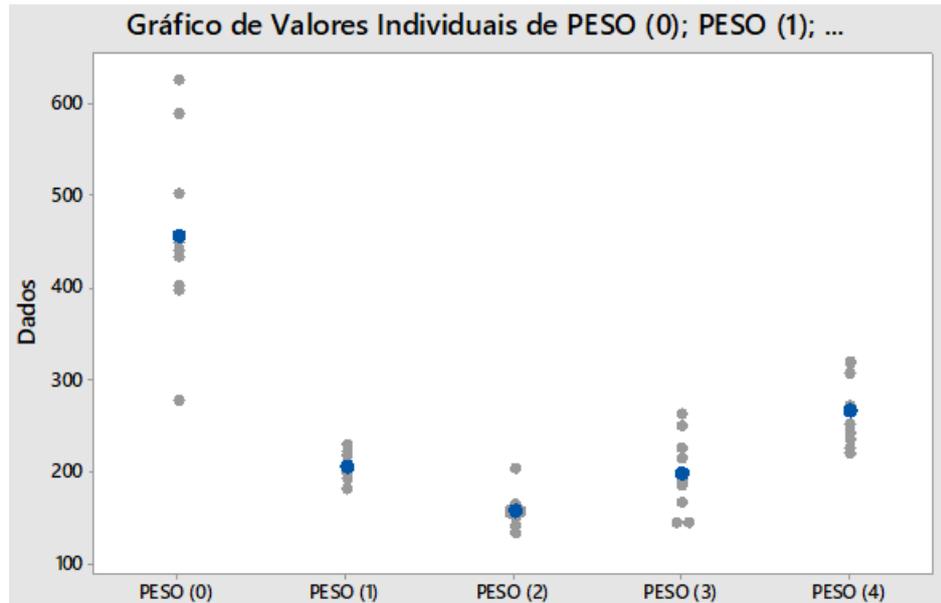
**TABELA 3:** Estatística descritiva dos resultados biométricos de *O. mykiss* das propriedades do estudo com valores médios, desvio padrão, variância, valores mínimos, valores máximos e mediana.

| Propriedades analisadas | Variável | Média  | Desvio Padrão | Variância | Mínimo  | Máximo | Mediana |
|-------------------------|----------|--------|---------------|-----------|---------|--------|---------|
| P0                      | PESO     | 456,8  | 98,8          | 9754,3    | 276,8   | 625,0  | 443,7   |
|                         | COMP. T. | 29,500 | 2,173         | 4,722     | 25,000  | 32,000 | 29,000  |
|                         | COMP. P. | 26,300 | 2,251         | 5,067     | 22,0000 | 29,500 | 25,750  |
| P1                      | PESO     | 205,90 | 14,46         | 209,21    | 182,00  | 230,00 | 202,50  |
|                         | COMP. T. | 24,360 | 0,891         | 0,794     | 23,000  | 26,000 | 24,350  |
|                         | COMP. P. | 20,790 | 0,736         | 0,541     | 20,000  | 22,000 | 20,550  |
| P2                      | PESO     | 157,50 | 18,52         | 343,17    | 135,00  | 204,00 | 156,00  |
|                         | COMP. T. | 22,080 | 0,905         | 0,820     | 20,800  | 24,000 | 22,000  |
|                         | COMP. P. | 19,390 | 1,041         | 1,083     | 18,000  | 21,500 | 19,000  |
| P3                      | PESO     | 199,2  | 40,8          | 1664,2    | 145,0   | 263,0  | 196,5   |
|                         | COMP. T. | 23,180 | 1,465         | 2,146     | 20,500  | 25,000 | 23,500  |
|                         | COMP. P. | 19,700 | 1,252         | 1,567     | 17,500  | 22,000 | 19,750  |
| P4                      | PESO     | 266,3  | 37,7          | 1424,5    | 220,0   | 320,0  | 260,5   |
|                         | COMP. T. | 27,830 | 0,767         | 0,589     | 26,500  | 29,000 | 27,750  |
|                         | COMP. P. | 23,870 | 0,896         | 0,802     | 22,500  | 25,000 | 24,000  |

Fonte: a autora (2021). Software: Minitab® versão 2018.

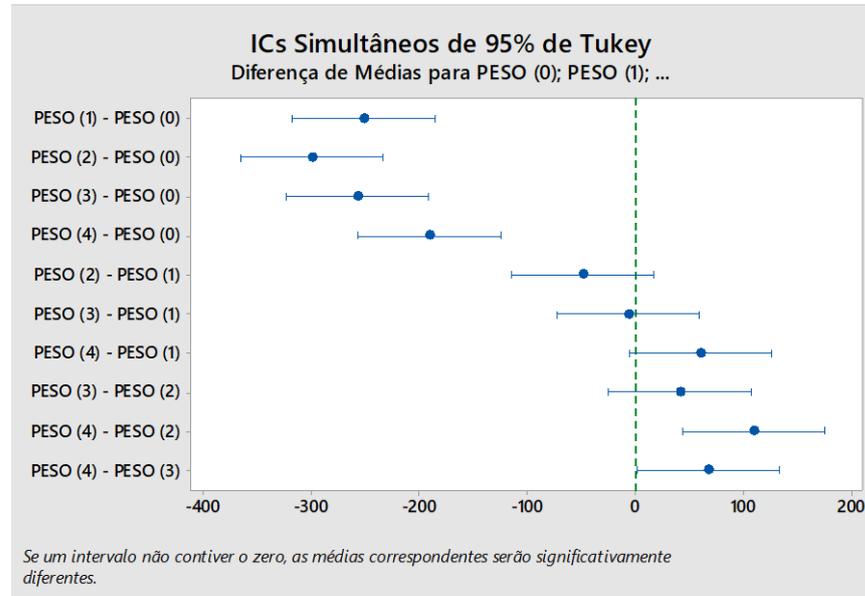
Com relação aos valores de massa corporal, pode-se observar ausência de uniformidade nestes dados com relação a P0 quando comparada às propriedades P1, P2, P3 e P4 da região serrana que apresentaram-se mais uniformes. Este fato pode ser em decorrência da amostragem apresentar diferentes fases de engorda no período coletado, onde o desenvolvimento das trutas é individual e em delineamento conforme a orientação do manejo alimentar e condições favoráveis para seu crescimento na região em que se exerce a atividade aquícola. Comparativamente, a truticultura P0 exerce cultivo semi-intensivo e as demais cultivo intensivo. Logo, no sistema intensivo, há maior controle do ambiente, com adoção de bom manejo alimentar e melhor uniformidade dos lotes, conforme destacado no Gráfico 1. Considere os números 0, 1, 2, 3 e 4 para P0, P1, P2, P3 e P4, respectivamente.

No Gráfico 1 observa-se que a propriedade 0, caracterizada pelo sistema semi-intensivo, além da diferença entre os pesos de trutas arco-íris quando comparadas às propriedades da região serrana (1, 2, 3, e 4) há heterogeneidade de peso entre as dez trutas coletadas na respectiva propriedade.



**GRÁFICO 1:** Valores individuais de peso de dez *O. mykiss* das cinco propriedades analisadas. Fonte: a autora (2021). Software: Minitab® versão 2018.

Na análise estatística de peso de *O. mykiss*, que é o fator determinante para a etapa de abate, as propriedades 1, 2, 3 e 4 provenientes da região serrana do estado do Rio de Janeiro apresentaram pesos similares entre si, próximos à média. Ainda, observa-se o zero entre os intervalos de suas médias correspondentes (Gráfico 2); quando a propriedade 0 é comparada às demais propriedades, observa-se médias significativamente diferentes, em virtude do peso consideravelmente maior, sendo as espécimes prontas para abate com o peso correspondente para tal. Quando compara-se o peso das trutas arco-íris das propriedade 2 e 4 também foi observada médias significativamente diferentes. Nos gráficos analisados, há de se considerar que o período em que as trutas arco-íris foram coletadas difere-se entre as propriedades, logo, considerando fatores como o ambiente, qualidade da água, nutrição, manejo alimentar, sanitário e de produção interferem diretamente na taxa de conversão alimentar e no crescimento, e conseqüentemente no ganho de peso destes animais.



**GRÁFICO 2:** Teste de Tukey avaliando o peso das cinco propriedades. Os valores foram considerados significativos quanto  $p \leq 0,05$ . Fonte: a autora (2021). Software: Minitab® versão 2018.

### 6.3 CARACTERÍSTICAS GERAIS DE AMOSTRAS AMBIENTAIS

As amostras de água foram obtidas concomitantemente à coleta dos animais. Foram coletadas 9 amostras ambientais (água) dos tanques ativos de propriedades da região serrana fluminense, onde suas características físico-químicas estão descritas na Tabela 4. Não foi possível realizar a coleta de amostras ambientais dos tanques da propriedade P0.

**TABELA 4:** Características gerais de amostras ambientais (água) coletados nas propriedades na região alvo do estudo.

| Propriedade | Sistema de cultivo | Aspecto | pH   | Temperatura da água | Condições climáticas no dia da coleta |
|-------------|--------------------|---------|------|---------------------|---------------------------------------|
| <b>P1</b>   | Intensivo          | Límpido | 6.62 | 16,2°C              | 18°C – 23°C                           |
| <b>P2</b>   | Intensivo          | Límpido | 6.50 | 16,6°C              | 18°C – 23°C                           |
| <b>P3</b>   | Intensivo          | Límpido | 6.64 | 16,2°C              | 18°C – 23°C                           |
| <b>P4</b>   | Intensivo          | Límpido | 6.89 | 17°C                | 16°C – 23°C                           |

P1= Truticultura Samadhi de Teresópolis-RJ; P2= Truticultura Arco-íris de Nova Friburgo-RJ; P3=Truticultura Truta do Vale de Nova Friburgo-RJ; P4= Truticultura do Vascão de Nova Friburgo-RJ.

Comparativamente, os tanques escavados adotados em sistemas semi-intensivos apresentam uma reprodução mais próxima do habitat dos peixes, podem ser revestidos e possuem como vantagens a exploração de grandes áreas naturais e baixo custo de construção, no entanto, exige maior cuidado com manutenções. Já os tanques de alvenaria em sistemas intensivos, possuem como vantagens a otimização de áreas pequenas para construção, boa condição de manejo e alta durabilidade, visto que não necessita grandes manutenções exceto o alto investimento inicial com edificações de engorda em relação à área. Outro fator limitante segundo Araújo e colaboradores (2006) é a quantidade e a qualidade da água disponível na propriedade, a qual deve ser livre de poluentes e sua vazão na estiagem conhecida, desse modo facilita o planejamento das instalações.

As propriedades da região serrana fluminense caracterizam-se pelo sistema de cultivo intensivo em tanques de alvenaria retangulares ou circulares, adotando-se o fluxo contínuo de entrada de água nos tanques, permitindo que ocorra constante renovação ao longo do dia. Desse modo, há potencialização da oferta de oxigênio e permite altas densidades de estocagem no mesmo tanque sem prejudicar o desempenho dos animais. A captação da água ocorre a partir de nascentes e riachos, através de uma pequena barragem onde a água é represada e captada por canos de PVC ou estruturas de alvenaria. O transporte de água para os tanques é realizado através de força gravitacional, sem custos. Ainda, pode-se realizar a decantação e fazer uso de calha coletora de água decantada, na qual este sistema é adotado pela propriedade 5 deste estudo. A propriedade da região mineira de Itamonte também adota o mesmo sistema com renovação constante de água com canos de PVC, no entanto, sua produção ocorre em tanques escavados.

Em três truticulturas com tanques de alvenaria, foram adotadas telas para retenção de sujidades antes da entrada da água nos tanques e em todas as truticulturas da região serrana do presente estudo é associado também à cobertura dos tanques com telas de proteção para evitar o ataque de predadores como pássaros.

As amostras de água de 100% (n=4) das propriedades analisadas apresentaram-se límpidas. A turbidez e a transparência da água são indicadores indiretos, importantes para avaliação da qualidade de água e do manejo alimentar (TABATA & PORTZ, 2004), e servem para auxiliar o produtor a avaliar, por exemplo, se o arraçoamento vem sendo praticado de forma correta.

Às análises físico-químicas da água, o pH deve obedecer o parâmetro entre 6,0 e 9,0 de acordo com a Resolução CONAMA 357/05 para águas doces (2005). Tabata (2006) sugerem pH próximo à neutralidade entre 6,5 e 8,5, sendo 7,0 o parâmetro ideal para fecundação. Águas ácidas tornam os peixes mais suscetíveis ao ataque de microrganismos devido à diminuição da produção do muco protetor da pele e enfraquecimento do indivíduo, enquanto que em água alcalinas a amônia se encontra presente em maior proporção, na forma tóxica ( $\text{NH}_3^-$ ), sendo um fator limitante (TABATA, 2006; PAVANELLI et al., 2002).

Considerando-se esses parâmetros, o estudo manteve-se dentro dos valores indicados nas quatro truticulturas analisadas, porém, situar-se dentro desse intervalo, não implica que a água seja de boa qualidade. Para esta afirmação é necessário o somatório de evidências obtidas em diferentes parâmetros físicos, químicos e microbiológicos. Inclusive, análise do teor de oxigênio dissolvido (ideal  $> 5,5\text{mg/L}$ ) e amoníaco são parâmetros que podem ser analisados em associação aos já propostos.

Com relação à temperatura, de acordo com Tabata (2006) os valores compreendidos entre 10 e 20°C são os indicados para o cultivo de *O. mykiss*, sendo que valores abaixo de 5°C prejudica a nutrição das trutas e temperaturas superiores a 24°C comprometem a depleção do oxigênio da água, sendo determinante para a sobrevivência. Além disso, temperaturas altas favorecem a proliferação de bactérias e diminuem a solubilidade do oxigênio. Inversamente, temperaturas muito baixas, embora sejam boas sob o ponto de vista sanitário e solubilidade do oxigênio, apresentam a desvantagem de um crescimento mais lento dos peixes, afetando o metabolismo dos mesmos. Vale destacar que os peixes são pecilotérmicos e que as variações na temperatura são extremamente estressantes, sobretudo para peixes em estágios mais jovens e, portanto, mais sensíveis. A truta arco-íris apresenta melhores taxas de crescimento e conversão alimentar na faixa térmica entre 15 e 17°C (TABATA, 2006; TABATA & PORTZ, 2004), intervalo este que a região do presente estudo se mantém, observando-se valores entre 16,2°C e 17°C conforme descrito na Tabela 4.

Ao considerar sistemas intensivos de produção, um aspecto imprescindível para o sucesso na criação de peixes é a manutenção da temperatura da água nos tanques, ocasionando conforto da espécie. O ambiente aquático exerce influência sobre a composição e diversidade da microbiota intestinal dos peixes, logo, o monitoramento da qualidade da água nos empreendimentos agrícolas deve ser

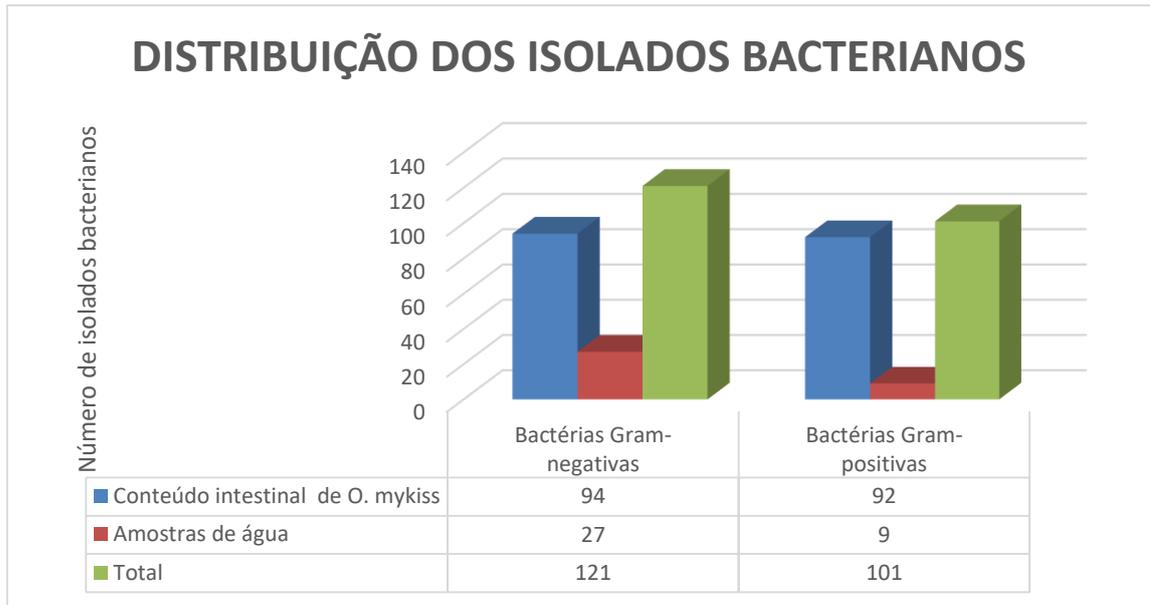
frequente, evitando-se fatores estressantes que afetam o sistema imunológico e podem predispor à invasão de patógenos oportunistas e infecções, comprometendo diretamente o desempenho zootécnico da produção (BULLER, 2004).

Os resultados observados no presente estudo demonstraram que a manutenção da qualidade da água foi garantida pela sua renovação constante, adoção de bom manejo, monitoração e limpeza periódica dos tanques.

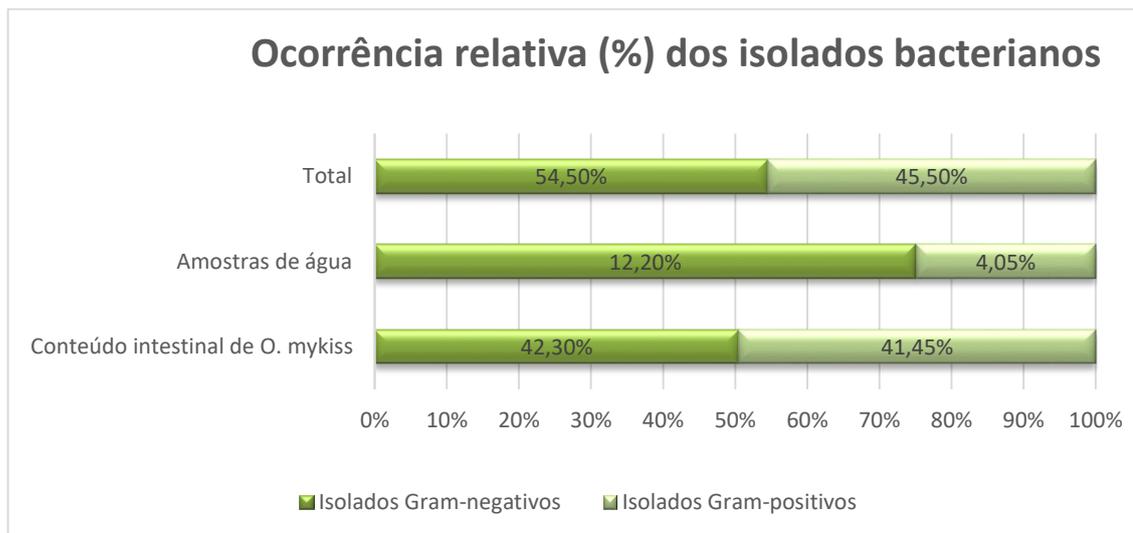
Ademais, pondera-se que o monitoramento da qualidade da água nos empreendimentos aquícolas deve ser frequente e atender à legislação vigente no que se refere a Resolução CONAMA 357/05 (CONAMA, 2005). Ainda, medidas preventivas e corretivas quando da ocorrência de variações bruscas nos parâmetros físico-químicos devem ser previstas, contingenciadas e realizadas, visto que a qualidade da água não só influencia o crescimento de *O. mykiss*, como interfere também na sobrevivência e conseqüentemente na qualidade do produto a ser comercializado.

#### 6.4 RELAÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS

As amostras coletadas foram submetidas a exames bacteriológicos em meio de enriquecimento/cultivo, isolamento, identificação fenotípica e bioquímica, onde foram isoladas 222 cepas bacterianas, sendo 54,50% (n=121) bactérias Gram-negativas e 45,50% (n=101) Gram-positivas. Destes percentuais, 42,30% (n=94) cepas Gram-negativas e 41,45% (n=92) Gram-positivas foram isoladas a partir do conteúdo intestinal de trutas arco-íris. Adicionalmente, 12,20% (n=27) bactérias Gram-negativas e 4,05% (n=9) Gram-positivas foram isoladas de amostras ambientais (água dos tanques) conforme descrito nas Figuras 12 e 13.



**FIGURA 12:** Distribuição do número de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas isoladas do conteúdo intestinal de trutas arco-íris (*O. mykiss*) e amostras ambientais (água).



**FIGURA 13:** Ocorrência relativa em porcentagem (%) de isolados Gram-negativos e Gram-positivos provenientes de conteúdo intestinal de *O. mykiss* e amostras de água.

Não foi encontrada correlação entre comprimento corporal total e padrão, peso, temperatura da água e pH em relação ao percentual de isolados bacterianos obtidos de *O. mykiss* criados em sistemas semi-intensivo, intensivo e amostras ambientais nas cinco truticulturas estudadas.

## 6.5 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS

### 6.5.1 Bactérias Gram-negativas

Do total de bactérias Gram-negativas isoladas (n=121), foram identificados 18 gêneros e 29 espécies, sendo que 24 espécies (n=108) pertencem à Família Enterobacteriaceae (89,3%), 4 espécies (n=11) pertencem à Família Aeromonadaceae (9,1%) e 1 espécie (n=2) foi isolada da Família Pseudomonadaceae (1,6%). Os microrganismos Gram-negativos isolados e sua frequência de colonização nos animais são apresentados na Tabela 5.

Considerando 54,50% (n=121) como o percentual total de bactérias Gram-negativas identificadas, observa-se que 42,34% (n=94) foram isoladas de conteúdo intestinal de *O. mykiss* e 12,16% (n=27) foram isolados provenientes de amostras ambientais (água).

**TABELA 5:** Relação de bactérias Gram-negativas identificadas fenotipicamente provenientes do conteúdo intestinal de *O. mykiss* e percentual (%) de animais colonizados, considerando dez *O. mykiss* por propriedade.

| Bactéria                       | P0       | P1       | P2       | P3       | P4 | TOTAL<br>(Ou<br>frequência<br>em %) |   |
|--------------------------------|----------|----------|----------|----------|----|-------------------------------------|---|
|                                |          |          |          |          |    |                                     | Nº de isolados / % de animais colonizados |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> |          | 1<br>10% | 1<br>10% |          |    | 1<br>10%                            | 4<br>(1,80%)                              |
| <i>Aeromonas</i> spp.          |          |          | 1<br>10% | 2<br>20% |    | 2<br>20%                            | 4<br>(1,80%)                              |
| <i>Aeromonas media</i>         |          |          |          | 1<br>10% |    |                                     | 1<br>(0,45%)                              |
| <i>Aeromonas sobria</i> *      |          | 1<br>10% |          |          |    |                                     | 1<br>(0,45%)                              |
| <i>Aeromonas veronii</i> *     |          |          | 2<br>20% |          |    | 1<br>10%                            | 3<br>(1,35%)                              |
| <i>Budvicia aquática</i>       |          |          |          | 6<br>60% |    | 6<br>60%                            | 12<br>(5,41%)                             |
| <i>Cedecea</i> spp.            | 1<br>10% |          |          |          |    |                                     | 1<br>(0,45%)                              |
| <i>Citrobacter braakii</i>     | 1<br>10% |          | 3<br>30% |          |    |                                     | 4<br>(1,80%)                              |
| <i>Citrobacter freundii</i> *  |          | 2<br>20% | 2<br>20% |          |    | 3<br>30%                            | 7<br>(3,16%)                              |
| <i>Citrobacter gillenii</i>    |          |          | 2<br>20% |          |    | 6<br>60%                            | 8<br>(3,61%)                              |
| <i>Citrobacter werkmanii</i>   |          |          |          |          |    | 1<br>10%                            | 1<br>(0,45%)                              |

|   |               |               |               |               |                |                |
|---|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------|----------------|
| <i>Edwardsiella piscicida</i> *                         |               |               |               |               | 1<br>10%       | 1<br>(0,45%)   |
| <i>Enterobacter</i> spp.                                | 1<br>10%      | 1<br>10%      |               |               |                | 2<br>(0,90%)   |
| <i>Enterobacter aerogenes</i>                           |               |               |               | 1<br>10%      |                | 1<br>(0,45%)   |
| <i>Enterobacter cloacae</i><br>complex*                 | 1<br>10%      |               |               |               |                | 1<br>(0,45%)   |
| <i>Cronobacter sakazakii</i>                            |               | 1<br>10%      |               |               |                | 1<br>(0,45%)   |
| Enterobacteriaceae                                      | 1<br>10%      | 1<br>10%      | 1<br>10%      | 1<br>10%      | 1<br>10%       | 5<br>(2,25%)   |
| <i>Escherichia coli</i>                                 | 3<br>30%      |               | 2<br>20%      | 2<br>20%      | 6<br>60%       | 13<br>(5,86%)  |
| <i>Hafnia alvei</i> *                                   |               | 5<br>50%      | 5<br>50%      |               |                | 10<br>(4,50%)  |
| <i>Kluyvera ascorbata</i>                               |               |               |               |               | 1<br>10%       | 1<br>(0,45%)   |
| <i>Klebsiella</i> spp.                                  |               | 2<br>20%      |               |               |                | 2<br>(0,90%)   |
| <i>Klebsiella oxytoca</i>                               | 1<br>10%      |               |               |               |                | 1<br>(0,45%)   |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i><br>subsp <i>pneumoniae</i> |               |               |               |               | 1<br>10%       | 1<br>(0,45%)   |
| <i>Pantoea agglomerans</i>                              |               |               |               | 2<br>20%      |                | 2<br>(0,90%)   |
| <i>Pseudomonas</i> spp.                                 | 1<br>10%      |               |               | 1<br>10%      |                | 2<br>(0,90%)   |
| <i>Serratia fonticola</i>                               | 1<br>10%      |               | 1<br>10%      |               |                | 2<br>(0,90%)   |
| <i>Serratia nematodiphila</i>                           | 1<br>10%      |               |               |               |                | 1<br>(0,45%)   |
| <i>Shigella sonnei</i>                                  |               |               |               |               | 1<br>10%       | 1<br>(0,45%)   |
| <i>Yersinia intermedia</i>                              |               | 1<br>10%      |               |               |                | 1<br>(0,45%)   |
| Total   | 12<br>(5,40%) | 15<br>(6,76%) | 20<br>(9,01%) | 16<br>(7,21%) | 31<br>(13,96%) | 94<br>(42,34%) |

P0= Truticultura de Itamonte-MG; P1= Truticultura Samadhi de Teresópolis-RJ; P2= Truticultura Arco-íris de Nova Friburgo-RJ; P3=Truticultura Truta do Vale de Nova Friburgo-RJ; P4= Truticultura do Vascão de Nova Friburgo-RJ; \*Patógenos patogênicos em peixes.

Os isolados Gram-negativos das famílias bacterianas identificadas no presente estudo acordam com estudo realizado por Kim e colaboradores (2007), que encontraram representantes das famílias *Aeromonadaceae*, *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonadaceae* como a microflora mais abundante em amostras de intestino de trutas arco-íris.

Observa-se que o microrganismo mais frequente isolado na microbiota intestinal de *O. mykiss* foi *Escherichia coli*, seguido de *Budvicia aquatica*, *Hafnia alvei* e *Citrobacter gillenii* (TABELA 5). Espécies da família *Enterobacteriaceae* já foram

descritas anteriormente como componentes do conteúdo intestinal de truta arco-íris (KIM et al., 2007; NAVARRETE et al., 2012).

Adicionalmente, bactérias pertencentes aos filos Proteobacteria e Firmicutes têm sido frequentemente encontradas no conteúdo intestinal de *O. mykiss* (NAVARRETE et al., 2012; NAYAK, 2010; WONG et al., 2013). Assim, o presente estudo reforça estudos anteriores, visto que na análise da microbiota intestinal de *O. mykiss* também foram observadas espécimes cultiváveis dos respectivos filos, totalizando 25 gêneros e 54 espécies, pertencentes aos filos Proteobacteria (100% dos isolados Gram-negativos), Firmicutes (94,62% dos isolados Gram-positivos) e Actinobacteria em menor percentual (5,38%).

Mansfield e colaboradores (2010) analisaram a microbiota intestinal de *O. mykiss* através de técnicas moleculares, onde as sequências frequentemente observadas foram semelhantes a Firmicutes e GammaProteobacteria, incluindo enterobactérias dos gêneros *Hafnia*, *Pseudomonas* e *Aeromonas*. A dominância de bactérias do filo Proteobacteria da microbiota intestinal de truta arco-íris têm sido observada em diversos estudos (HUBER et al., 2004; SPANGGAARD et al., 2000).

Navarrete e colaboradores (2010) utilizando métodos de sequenciamento de DNA baseados no gene 16S r-RNA, demonstraram que a microbiota intestinal de truta arco-íris é dominada por *Lactococcus lactis*, *Citrobacter gillenbergii*, *Kluyvera intermedia*, *Obseum bacterium proteus* e *Shewanella marinus*. Comparando com o presente estudo, três destas espécimes foram isoladas, sendo elas: *L. lactis*, *C. gillenbergii* e *Kluyvera* sp.

As espécies *C. gillenbergii*, *C. freundii*, *C. braakii*, *C. werkmanii* foram isoladas no conteúdo intestinal de *O. mykiss* entre quatro das cinco propriedades do presente estudo. Duman e colaboradores (2017) relataram o isolamento de *C. gillenbergii* pela primeira vez em trutas arco-íris apresentando sintomatologia clínica e diferentes isolados de *Citrobacter* spp. foram caracterizados como novas espécies. A ocorrência de epizootia de citrobacteriose em *O. mykiss* foi descrita por Altun e colaboradores (2013) na Turquia, onde *C. braakii* foi isolada.

Adicionalmente, *C. freundii* é considerado um patógeno oportunista com morbidade progressivamente alta. Em estudo realizado por Svetlana e colaboradores (2003), cepas de *Citrobacter freundii* foram isoladas em *O. mykiss* e identificadas através de testes fenotípicos, onde observou-se nos exames histopatológicos, alterações inflamatórias no intestino provocadas pela gastroenterite, sendo o primeiro

relato que confirma a patogenicidade de *C. freundii* nesta espécie em alevinos no período do verão, na Sérvia.

Não houve aparente relação entre os tipos de tanques de truticultura (retangulares e circulares) e manejo alimentar com o isolamento bacteriano. Embora não tenha ocorrido qualquer epizootia durante o período do estudo e as trutas analisadas apresentavam-se clinicamente saudáveis, foram observadas e amostradas diversas espécimes que podem levar à quadros patogênicos. *Pantoea agglomerans* isolada em uma truticultura do presente estudo já foi descrita por Austin & Austin (2007) em *O. mykiss* causando severa patogenicidade. *Hafnia alvei* é comumente isolada de solo, água, esgoto, mamíferos, aves, répteis, peixes e considerado um patógeno oportunista (AUSTIN & AUSTIN, 2007).

*Acinetobacter* spp. frequentemente foram isolados em caninos, felinos, equinos, incluindo pássaros; peixes de diferentes espécies incluindo trutas arco-íris (PELEG et al., 2008). *Acinetobacter* spp., *Enterobacter* spp. e *Pseudomonas* spp. são considerados autóctones na espécie *Oncorhynchus mykiss* (WONG et al, 2013) e também foram identificados neste estudo.

Além de *Aeromonas* spp., cepas *Pantoea* spp., *Buttiauxella agrestis* e *Budvicia aquatica* pertencentes à Família *Enterobacteriaceae* foram identificadas no trato intestinal de peixes salmonídeos de água doce pela primeira vez por Skrodenyte-Arbaciauskiene e colaboradores (2006), através de métodos moleculares.

Comparando as cinco truticulturas quanto aos isolados bacterianos Gram-negativos de *O. mykiss*, é notável a similaridade em gêneros. Observa-se que uma ampla diversidade de espécimes bacterianas Gram-negativas do conteúdo intestinal de *O. mykiss* fazem parte da microbiota aquática, como *B. aquatica*, *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp., *Kluyvera ascorbata*, *Serratia fonticola*, *Klebsiella oxytoca* e *Yersinia intermedia* (BULLER, 2004; GASTALHO et al., 2014). No entanto, atenção deve ser dada quanto ao isolamento de *H. alvei* que promove septicemia hemorrágica e alta mortalidade, *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* na qual causa doença da barbatana e cauda em *O. mykiss*, *Edwardsiella piscicida* e *Citrobacter* spp. pois são considerados patógenos oportunistas, causando surtos em condições de estresse aos animais com elevada virulência e consideráveis perdas na produção aquícola (GELEV et al., 1990; BUJÁN et al., 2018).

Além disso, *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* e *H. alvei* são as bactérias mais comumente responsabilizadas em surtos de intoxicação histamínica

em humanos pela ingestão de pescado (SILVEIRA et al., 2001). De forma complementar, *E. coli* é uma bactéria do grupo dos coliformes termotolerantes e está intimamente envolvido em manifestações clínicas de intoxicações alimentares em humanos via ingestão de água e alimentos contaminados, levando a quadros de síndromes gástricas e diarreicas (SANTIAGO et al., 2013). Ela é a única espécie do grupo dos coliformes termotolerantes cujo habitat exclusivo é o intestino humano e de animais homeotérmicos (CONAMA, 2005; OLIVEIRA et al., 2015; WELLINGTON et al., 2013).

Assim sendo, em decorrência do contato íntimo entre água e peixes no ambiente aquático, os dados do presente estudo onde *E. coli* foi o patógeno mais frequente isolado em *O. mykiss* são preocupantes, em virtude da manipulação da espécie durante as etapas de abate e processamento, possibilidade de contaminação cruzada e impactos na segurança alimentar (CALDORIN et al., 2013).

Embora cepas de *B. aquatica*, *Cedecea* spp., *Enterobacter* spp., *Shigella sonnei*, *Serratia fonticola*, *Serratia nematodiphila*, *Klebsiella oxytoca*, *Yersinia intermedia* e *Kluyvera ascorbata* terem sido isoladas no presente estudo, estas espécies não são citadas como patógenos de peixes, sendo encontradas frequentemente no ambiente (BULLER, 2004). Porém, *Cedecea* spp., *Enterobacter* spp., *Shigella sonnei*, *Klebsiella oxytoca*, *Kluyvera ascorbata* e *Cronobacter sakazakii* são patógenos oportunistas entéricos humanos amplamente distribuídos na natureza, causando doenças veiculadas principalmente pela ingestão de água ou alimentos provenientes de ambientes contaminados (BRANDÃO et al., 2018; DAVIN-REGLI et al., 2019; SARRIA et al., 2001; SINGH et al., 2016; SHAD & SHAD, 2020).

É importante destacar que a microbiota do peixe é reflexo da qualidade microbiológica da água, logo, é fundamental a manutenção dos tanques e o monitoramento frequente do status sanitário da produção.

Com relação às espécimes isoladas em amostras de água dos tanques, foram identificadas 13 espécies pertencentes ao filo Proteobacteria, sendo eles: *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, *B. aquatica*, *Buttiauxella agrestis*, *C. freundii*, *Citrobacter* spp., *E. coli*, *Enterobacter cloacae* complex, *Enterobacter taylorae*, *Cronobacter sakazakii*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia odorífera*, *Yersinia intermedia* e Enterobacteriaceae (TABELA 6). Não foi identificada a presença de *Salmonella* spp. nas amostras coletadas.

**TABELA 6:** Relação de bactérias Gram-negativas isoladas de amostras ambientais (água) de propriedades selecionadas para o estudo.

| <b>Bactéria</b>                                  | <b>P1<br/>(N=2)</b> | <b>P2<br/>(N=2)</b> | <b>P3<br/>(N=1)</b> | <b>P4<br/>(N=4)</b>  | <b>TOTAL</b>          |
|--|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|
| <i>Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida*</i> |                     | 1                   | 1                   |                      | 2<br>(0,90%)          |
| <i>Budvicia aquatica</i>                         | 1                   |                     |                     |                      | 1<br>(0,45%)          |
| <i>Buttiauxella agrestis</i>                     | 1                   |                     |                     |                      | 1<br>(0,45%)          |
| <i>Citrobacter freundii*</i>                     |                     | 1                   |                     |                      | 1<br>(0,45%)          |
| <i>Citrobacter spp.</i>                          |                     |                     |                     | 1                    | 1<br>(0,45%)          |
| <i>Escherichia coli</i>                          | 1                   | 2                   | 2                   | 6                    | 11<br>(4,96%)         |
| <i>Enterobacter cloacae complex*</i>             | 1                   |                     | 1                   |                      | 2<br>(0,90%)          |
| <i>Enterobacter taylorae</i>                     |                     |                     |                     | 1                    | 1<br>(0,45%)          |
| <i>Cronobacter sakazakii</i>                     | 1                   |                     |                     |                      | 1<br>(0,45%)          |
| Enterobacteriaceae                               | 1                   | 1                   |                     |                      | 2<br>(0,90%)          |
| <i>Klebsiella oxytoca</i>                        |                     | 1                   |                     | 1                    | 2<br>(0,90%)          |
| <i>Serratia odorífera</i>                        |                     |                     |                     | 1                    | 1<br>(0,45%)          |
| <i>Yersinia intermedia</i>                       |                     |                     |                     | 1                    | 1<br>(0,45%)          |
| <b>Total</b>                                     | <b>6</b><br>(2,70%) | <b>6</b><br>(2,70%) | <b>4</b><br>(1,80%) | <b>11</b><br>(4,96%) | <b>27</b><br>(12,16%) |

N= número de amostras coletadas; P1= Truticultura Samadhi de Teresópolis-RJ; P2= Truticultura Arco-íris de Nova Friburgo-RJ; P3=Truticultura Truta do Vale de Nova Friburgo-RJ; P4= Truticultura do Vascão de Nova Friburgo-RJ; \*Patógenos patogênicos em peixes.

Cepas bacterianas isoladas de água dos tanques apresentam similaridade em gênero e espécie comparando-se às cepas bacterianas da microbiota intestinal de *O. mykiss* do estudo, exceto as espécies *Buttiauxella agrestis*, *Serratia odorífera*, *Enterobacter taylorae* e *Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida* que foram isoladas somente em amostras ambientais. *Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida* é considerado um patógeno oportunista, causa furunculose em *O. mykiss*, com lesão necrótica focal em vários músculos e hemorragias ao longo do trato

digestivo, onde as lesões são patognomônicas e podem evoluir para septicemia fatal (JANDA & ABBOTT, 2010). Fatores estressantes no habitat aquático podem tornar *O. mykiss* suscetíveis a esta enfermidade.

*Budvicia aquatica* e *Yersinia intermedia* são microrganismos frequentemente isolados no ambiente aquático conforme já relatado. *Klebsiella oxytoca* isolada em ambientes aquáticos e solo, também pode ser encontrada no intestino de humanos e animais (SINGH et al., 2016). Cepas de *Buttiauxella agrestis* tem sido isolada no solo e espécies do complexo *Enterobacter cloacae* são amplamente isoladas na natureza mas podem atuar como patógenos (MEZZATESTA et al., 2012). As espécies *Klebsiella oxytoca*, *Buttiauxella agrestis*, *Enterobacter taylorae*, *Cronobacter sakazakii* e *Serratia odorífera* já foram reportadas em infecções oportunistas em humanos (BULLER, 2004).

Portanto, a presença de isolados Gram-negativos nas águas de produção de *O. mykiss* não deve ser negligenciada, bem como *Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida* com potencial virulência em trutas arco-íris. Essa espécie presente na água em algum momento pode causar doenças, principalmente para novos lotes de alevinos/juvenis usados no povoamento dos tanques e também quando ocorre fatores predisponentes como a elevação da temperatura da água (DUMAN et al., 2018; JANDA & ABBOTT, 2010).

Isolados pertencentes à Família *Enterobacteriaceae* nas amostras de água também merecem atenção, visto que em contato com seres humanos sensíveis podem desenvolver infecções nosocomiais, septicemia, infecções do trato urinário e de tecidos (BRANDÃO et al., 2018; BULLER, 2004; SINGH et al., 2016).

Adicionalmente, *Enterobacteriaceae* como *E. coli*, *Shigella spp.* e *Salmonella spp.* são responsáveis também por surtos infecciosos de origem alimentar em humanos, principalmente em casos que envolvem o consumo de organismos aquáticos criados em cativeiro, constituindo-se assim como agentes zoonóticos de caráter emergente (OLIVEIRA et al., 2015). Por essas questões, é fundamental o controle sanitário da produção aquícola, associada a adoção de boas práticas na produção de trutas.

### 6.5.2 Bactérias Gram-positivas

Com relação aos isolados Gram-positivos (n=101), foram identificados 6 gêneros e 20 espécies, sendo que 7 espécies (n=51) pertencem ao gênero *Staphylococcus* spp. (50,5%), 4 (n=20) pertencem ao gênero *Enterococcus* spp. (19,8%), 3 espécies (n=15) pertencem ao gênero *Lactococcus* spp. (14,8%), 3 (n=9) ao gênero *Streptococcus* spp. (8,9%), 2 espécies (n=5) pertencem ao gênero *Kocuria* spp. (5,0%) e 1 (n=1) ao gênero *Gemella* spp. (1%) (Tabela 7).

Considerando o percentual total de bactérias Gram-positivas representado por 45,50% (n=101), observa-se que 41,45% (n=92) foram isoladas de conteúdo intestinal de *O. mykiss* e 4,05% (n=9) foram isolados provenientes de amostras ambientais (água).

**TABELA 7:** Relação de bactérias gram-positivas identificadas fenotipicamente provenientes do conteúdo intestinal de *O.mykiss* e percentual (%) de animais colonizados, considerando dez *O. mykiss* por propriedade.

| Bactéria   | P0  | P1       | P2       | P3       | P4       | TOTAL         |
|--|---|----------|----------|----------|----------|---------------|
|  | Nº de isolados / % de animais colonizados |          |          |          |          |               |
| <i>Enterococcus</i> spp.                                   |   |          | 4<br>40% | 2<br>20% | 4<br>40% | 10<br>(4,51%) |
| <i>Enterococcus faecium</i>                                |   |          |          |          | 1<br>10% | 1<br>(0,45%)  |
| <i>Enterococcus columbae</i>                               |   | 1<br>10% |          |          |          | 1<br>(0,45%)  |
| <i>Gemella mobillorum</i>                                  |   | 1<br>10% |          |          |          | 1<br>(0,45%)  |
| <i>Kocuria rosea</i>                                       |   | 1<br>10% | 2<br>20% |          | 1<br>10% | 4<br>(1,80%)  |
| <i>Kocuria kristinae</i>                                   |   |          | 1<br>10% |          |          | 1<br>(0,45%)  |
| <i>Lactococcus lactis cremoris</i>                         | 3<br>30%                                  |          | 3<br>30% | 2<br>20% | 3<br>30% | 11<br>(4,96%) |
| <i>Lactococcus lactis lactis</i>                           | 1<br>10%                                  | 1<br>10% |          | 1<br>10% |          | 3<br>(1,35%)  |
| <i>Lactococcus mesenteroides</i><br><i>subsp. cremoris</i> |   | 1<br>10% |          |          |          | 1<br>(0,45%)  |
| <i>Staphylooccus sciuri</i>                                | 3<br>30%                                  |          | 1<br>10% |          | 7<br>70% | 11<br>(4,96%) |
| <i>Staphylococcus warneri</i>                              | 2<br>20%                                  | 4<br>40% | 4<br>40% | 2<br>20% |          | 12<br>(5,41%) |
| <i>Staphylococcus xylosus</i> *                            | 3<br>30%                                  | 1<br>10% | 2<br>20% | 1<br>10% | 4<br>40% | 11<br>(4,96%) |
| <i>Staphylococcus lugdunensis</i>                          | 1<br>10%                                  |          | 2<br>20% | 3<br>30% |          | 6<br>(2,70%)  |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> *                        | 4<br>40%                                  | 1<br>10% |          | 1<br>10% |          | 6<br>(2,70%)  |
| <i>Staphylococcus lentus</i>                               | 1<br>10%                                  | 1<br>10% |          | 1<br>10% |          | 3<br>(1,35%)  |

|                                    |         |         |          |         |          |
|------------------------------------|---------|---------|----------|---------|----------|
| <i>Staphylococcus haemolyticus</i> | 1       |         |          |         | 1        |
|                                    | 10%     |         |          |         | (0,45%)  |
| <i>Streptococcus</i> spp.          | 3       |         |          |         | 3        |
|                                    | 30%     |         |          |         | (1,35%)  |
| <i>Streptococcus sanguinis</i>     | 1       |         | 1        | 1       | 3        |
|                                    | 10%     |         | 10%      | 10%     | (1,35%)  |
| <i>Streptococcus mutans</i>        | 3       |         |          |         | 3        |
|                                    | 30%     |         |          |         | (1,35%)  |
| <b>Total</b>                       | 18      | 14      | 26       | 14      | 21       |
|                                    | (8,11%) | (6,31%) | (11,71%) | (6,31%) | (9,46%)  |
|                                    |         |         |          |         | (41,45%) |

P0= Truticultura de Itamonte-MG; P1= Truticultura Samadhi de Teresópolis-RJ; P2= Truticultura Arco-íris de Nova Friburgo-RJ; P3=Truticultura Truta do Vale de Nova Friburgo-RJ; P4= Truticultura do Vascão de Nova Friburgo-RJ; \*Patógenos patogênicos em peixes.

No conteúdo intestinal de *O. mykiss*, bactérias do filo Firmicutes foram dominantes (94,62% dos isolados Gram-positivos) e em menor percentual o filo Actinobacteria (5,38%).

A heterogeneidade da microbiota de *O. mykiss* pode ser maior do que os dados deste trabalho e outros estudos indicam, visto que o tipo de dieta e mudanças sazonais podem gerar leves alterações da microbiota intestinal desta espécie, conforme já foi relatado por alguns autores (INGERSLEV et al., 2014; MANSFIELD et al., 2010; WONG et al, 2013).

Similarmente aos nossos resultados, Ricaud e colaboradores (2018) identificaram 225 unidades taxonômicas operacional (OTUs) sugerindo alta variabilidade da microbiota intestinal. O filo mais dominante foi Proteobacteria, seguido por Firmicutes e Actinobacteria. Também, é constatado que bactérias do filo Firmicutes são dominantes em peixes alimentados com plantas, quando Proteobacteria é a mais abundante em peixes alimentados com dieta comercial (ABID et al., 2013; INGERSLEV et al., 2014). Os peixes em nosso estudo foram alimentados com dieta comercial em ração para engorda de peixes carnívoros contendo farinha de peixe, bem como ingredientes vegetais.

Observa-se que no presente estudo, espécies do gênero *Staphylococcus* foram as mais frequente isoladas do conteúdo intestinal de *O. mykiss*, seguido de espécies de *Enterococcus* e *Lactococcus*. A ocorrência de *Enterococcus* spp. no intestino de peixes e em ambientes aquícolas já foi reportada em pesquisas sobre análise da microbiota intestinal de várias espécies de peixes (MICHEL et al., 2007; VALENZUALA et al., 2010).

*Staphylococcus warneri* e *S. sciuri* foram as espécies mais frequente isoladas do conteúdo intestinal de *O. mykiss*, seguido por *S. xylosus*, *S. epidermidis*, *S. lentus* e *S. haemolyticus*. *Staphylococcus warneri* é comensal da pele de trutas arco-íris e

tem sido isolado no fígado e rim nas infecções oportunistas em *O. mykiss*, causando lesões ulceradas nas nadadeiras, exoftalmia e ascite. Em humanos, esta espécie é associada à septicemia, endocardites, infecções do trato gastrointestinal e urinário (BULLER, 2004; MUSHARRAFIEH et al., 2014).

*Staphylococcus haemolyticus*, *S. xylosus* e *S. epidermidis* são isolados frequentes na microbiota da pele em humanos e no ambiente aquático. No entanto, *S. xylosus* e *S. epidermidis* podem causar infecções oportunistas em *O. mykiss*, apresentando ulcerações e hemorragias em barbatanas, exoftalmia e predisposição às infecções secundárias (BULLER, 2004; OH et al., 2019a).

Espécies do gênero *Staphylococcus*, como *S. xylosus*, podem representar consideráveis perdas econômicas na produção de trutas arco-íris. Teve seu primeiro relato por Oh e colaboradores (2019a) em *O. mykiss* como patógeno primário, causando exoftalmia, aumento de infecções secundárias e considerável mortalidade. Além disso, *Staphylococcus* spp. são reconhecidos por sua resistência aos antimicrobianos de amplo espectro e impactos na saúde pública através do seu potencial zoonótico (LOZANO et al., 2016, ONMAZ et al., 2015).

Outros isolados Gram-positivos do presente estudo também devem ser destacados. *Kocuria* spp. normalmente é identificada na rotina laboratorial como CONS, com base na sua morfologia no gram, catalase positiva (KANDI et al. 2016). No nosso estudo, foi permitido o isolamento de espécies deste gênero através do equipamento com sistema de identificação automatizado Vitek 2 (Biomérieux, França), indicado por Boudewijns e colaboradores (2005).

*Kocuria* spp. tem sido reportadas como habitantes da pele normal e membranas mucosas de humanos e animais (KANDI et al., 2016). Também foi isolada de vários nichos ambientais e ecológicos (PARK et al. 2010). Geralmente são consideradas bactérias não patogênicas, raramente associadas a infecções humanas. No entanto, *Kocuria rosea* é uma espécie conhecida por causar infecção em pacientes imunocomprometidos (KANDI et al., 2016).

*Gemella* spp. são comensais das membranas mucosas de humanos e alguns outros animais de sangue quente. No entanto, podem atuar como patógenos oportunistas, principalmente em casos de endocardites em humanos (STEINBERGER et al., 2020). *Gemella morbillorum* isolada neste estudo, já foi isolada como flora normal na cavidade oral, no trato respiratório superior e trato gastrointestinal em humanos (COLLINS, 2006).

Bactérias ácido-láticas como *Lactococcus* também foram detectados na microbiota intestinal de salmões durante o inverno (com temperaturas próximas às propriedades do nosso estudo); seguido de *Streptococcus* e *Lactobacillus* (DEHLER et al., 2017). Bactérias lácticas tem sido amplamente identificadas na microbiota intestinal de salmão e truta arco-íris (HOVDA et al, 2007; INGERSLEV et al., 2014), onde cepas LAB, inclusive *Lactococcus lactis* divididas geneticamente em *L. lactis subsp. lactis*, *L. lactis subsp. hordniae* e *L. lactis subsp. cremoris* pela técnica de sequenciamento do gene 16S rRNA (WANG et al., 2008) foram consideradas bactérias benéficas, possuindo propriedades probióticas (BALCAZAR et al., 2008; INGERSLEV et al., 2014). Do mesmo modo, cepas LAB podem diminuir a ocorrência de cepas patogênicas como *Aeromonas* spp. (RIMOLDI et al., 2021). Como patógeno oportunista, há poucos trabalhos existentes na literatura, todavia, vale ressaltar um estudo reportado por Chen e colaboradores (2012) que apresentou *L. lactis subsp. lactis* como o responsável pela mortalidade de 100% dos esturjões híbridos de uma piscicultura em Taiwan, China.

Em estudo realizado por Huber e colaboradores (2004), analisou-se a composição da microbiota intestinal de *O. mykiss* e identificaram os gêneros bacterianos: *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Streptococcus* e *Enterococcus*. Xu e Zhang (2014) destacam os gêneros *Edwardsiella*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Flavobacterium* e *Streptococcus* como importantes patógenos em peixes com perdas econômicas mundial.

Vale ressaltar que as trutas arco-íris das propriedades analisadas nesta pesquisa foram obtidas de cinco produtores aquícolas de diferentes localidades, distantes entre si, com variação genética, ambiental e constante renovação de água nos tanques, diversificando microrganismos Gram-negativos e Gram-positivos da microbiota intestinal desta espécie.

É notável que muitas informações sobre a microbiota intestinal de truta arco-íris são derivadas da análise de microrganismos cultiváveis (HOVDA et al., 2007; RINGO & GATESOUBE, 1998; SCHAFFER et al, 2004) e estudos utilizando métodos moleculares baseados no sequenciamento e análise do gene 16S rRNA (NAVARRETE, 2012). O sequenciamento do gene do RNA ribossomal 16S tem sido amplamente utilizado com finalidade taxonômica e filogenética (BECKER et al., 2014; NAVARRETE 2010) e é considerado o método de referência para a identificação bacteriana. No entanto, comparativamente, observa-se alta concordância entre os

resultados da análise convencional de microrganismos cultiváveis e métodos moleculares (SPANGGAARD et al., 2000).

Com relação aos isolados Gram-positivos de amostras de água, foi observado que estes pertencem ao filo Firmicutes (TABELA 8).

**TABELA 8:** Relação de bactérias Gram-positivas isoladas de amostras ambientais (água) de propriedades selecionadas para o estudo.

| Bactéria                          | P1<br>(N=2)  | P2<br>(N=2)  | P3<br>(N=1) | P4<br>(N=4)  | TOTAL        |
|-----------------------------------|--------------|--------------|-------------|--------------|--------------|
| <i>Enterococcus spp.</i>          | 1            | 1            |             | 3            | 5<br>(2,25%) |
| <i>Enterococcus faecalis</i>      | 1            |              |             |              | 1<br>(0,45%) |
| <i>Enterococcus casseliflavus</i> |              |              |             | 1            | 1<br>(0,45%) |
| <i>Enterococcus faecium</i>       |              |              |             | 1            | 1<br>(0,45%) |
| <i>Staphylooccus sciuri</i>       |              |              |             | 1            | 1<br>(0,45%) |
| <b>Total</b>                      | 2<br>(0,90%) | 1<br>(0,45%) |             | 6<br>(2,25%) | 9<br>(4,05%) |

N= número de amostras coletadas; P0= Truticultura de Itamonte-MG; P1= Truticultura Samadhi de Teresópolis-RJ; P2= Truticultura Arco-íris de Nova Friburgo-RJ; P3=Truticultura Truta do Vale de Nova Friburgo-RJ; P4= Truticultura do Vascão de Nova Friburgo-RJ; \*Patógenos patogênicos em peixes.

Duas espécies foram encontradas apenas em amostras de água dos tanques: *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*, nas truticulturas 1 e 4, respectivamente. Estas espécies foram reconhecidas em quadros de endocardites em humanos e estão entre os patógenos mais frequentemente encontrados em infecções nosocomiais, incluindo bacteremia, infecções abdominais e urinárias (FISHER & PHILIP, 2009; SEBASTIÃO et al., 2015).

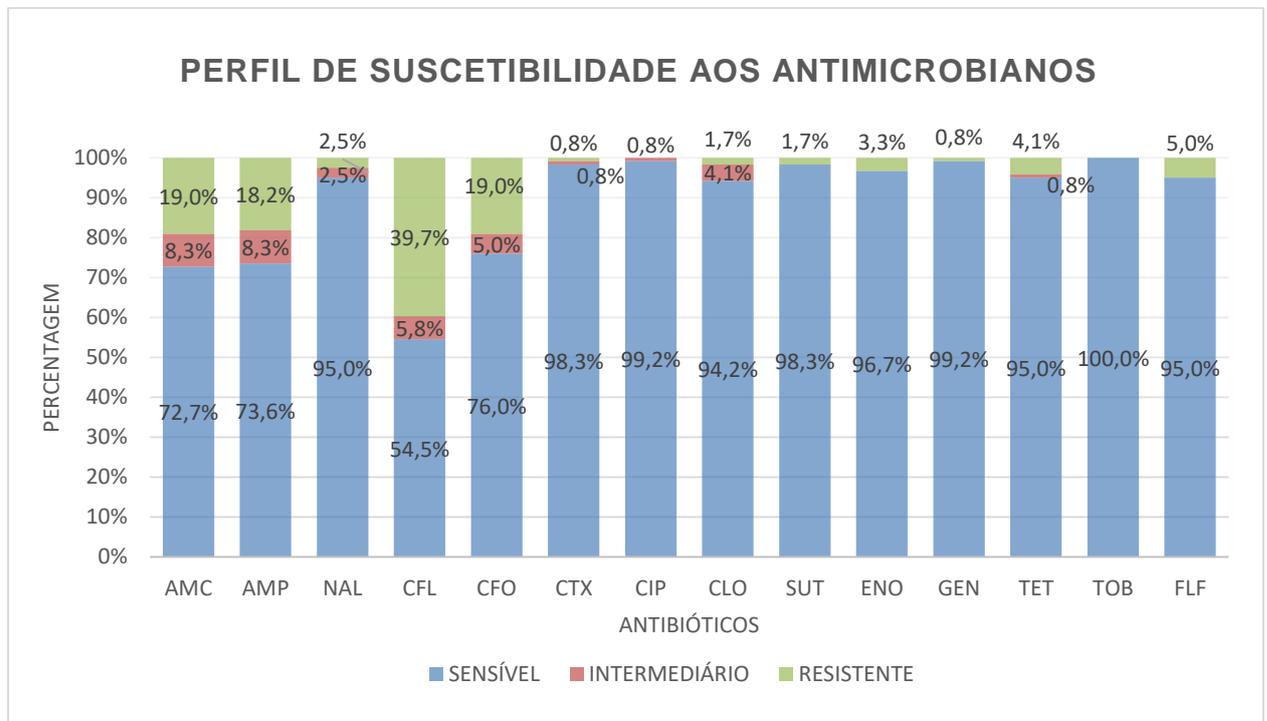
A relação de isolados Gram-positivos de amostras ambientais (água) é descrita na tabela 8. Não foram isoladas espécimes Gram-positivas na propriedade P3. Nas truticulturas P1, P2 e P4 foram identificados espécies do gênero *Enterococcus* spp. e *Staphylococcus* spp., apresentando similaridade entre ambos no isolamento de *Enterococcus* spp. e *S. sciuri* isolado em amostras ambientais da propriedade P4 também foi isolado no conteúdo intestinal de *O. mykiss* da mesma propriedade, confirmando o íntimo contato entre a microbiota aquática e a microbiota intestinal.

## 6.6 PERFIL DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

### 6.6.1 Bactérias Gram-negativas

Na análise do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos através da técnica de disco-difusão em Ágar Mueller Hinton (Acumedia, EUA), foi observado que 65,3% (n=79) dos isolados Gram-negativos apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano. O perfil de multirresistência aos antimicrobianos, ou seja, resistência de pelo menos um agente antimicrobiano de três classes distintas, foi observado em 7,4% (n=9) dos isolados Gram-negativos testados.

Observou-se maiores percentuais de resistência aos antibióticos da classe beta-lactâmicos: Cefalotina (45,5%), Amoxicilina + Ác. Clavulânico (27,3%), Ampicilina (26,5%) e Cefoxitina (24%). Menores percentuais de resistência foram observados em Cloranfenicol (5,8%), Ác. Nalidíxico, Tetraciclina e Florfenicol (5,0%), Enrofloxacina (3,3%), Sulfazotrim e Cefotaxima (1,7%), Ciprofloxacino e Gentamicina (0,8%). Tobramicina apresentou grande eficácia, com 100% de sensibilidade das estirpes bacterianas avaliadas (Figura 14).



**FIGURA 14:** Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em bactérias gram-negativas isoladas de conteúdo intestinal de trutas arco-íris (*O. mykiss*) e amostras ambientais (água).

Na análise estatística, comparando os dois grupos que apresentaram maior resistência aos antibióticos sendo as classes beta-lactâmicos e anfenicóis,

respectivamente, identificou-se que os antibióticos beta-lactâmicos apresentaram valor de resistência estatisticamente significativa ( $p = 0,000$ ).

O alto percentual de resistência aos antibióticos da classe beta-lactâmicos na aquicultura já foi descrito por diversos autores (AMARANTE et al, 2018; GASTALHO et al., 2014). Em cepas de *Aeromonas* spp., a resistência a esta classe de antibiótico é frequente (OLIVEIRA et al., 2014). Uma preocupação em decorrência da resistência bacteriana de isolados resistentes a esta classe é a pressão seletiva de genes de resistência em bactérias comensais do intestino animal e humano pelo uso contínuo de antimicrobianos, promovendo a transferência de genes potencialmente resistentes distribuídos no ambiente e também transferidos para diversas populações bacterianas, principalmente entre cepas Gram-negativas (CANTAS et al., 2012; CHENIA et al, 2016; DOBIASOVA et al., 2014; RADHOUANI et al., 2014). Já relatada em cepas isoladas de *O. mykiss* (CAPKIN et al, 2017). Ainda, Santos e Ramos (2018) destacam que *E. piscicida*, espécie pertencente à Família Enterobacteriaceae, pode atuar como reservatório de genes de resistência antimicrobiana no ambiente e facilitar a transferência desses genes para outras bactérias patogênicas no solo, água, animais e humanos.

Os resultados descritos na Figura 14 deste estudo, observando maiores percentuais de resistência aos antimicrobianos cefalotina, cefoxitina, amoxicilina + ác. clavulânico e ampicilina, corroboram com estudo realizado por Capkin e colaboradores (2017) em que avaliaram o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em 133 cepas bacterianas isoladas de *O. mykiss*, nas quais apresentaram maior prevalência de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos, seguido pela classe macrolídeos e sulfonamidas, observando os seguintes percentuais de resistência: cefalotina (70%), amoxicilina (63%), ampicilina (62%), eritromicina (68%) e sulfametoxazol (51%). Adicionalmente, 51% dos isolados eram resistentes a múltiplas drogas (MDR), enquanto 35% dos isolados eram extensivamente resistentes a drogas (XDR). Estes fatores são preocupantes, visto que a multirresistência aos antimicrobianos é um problema de saúde pública, e interfere diretamente no tratamento terapêutico, seja em animais ou em humanos.

Embora somente 7,4% ( $n=9$ ) dos isolados Gram-negativos do nosso estudo apresentaram-se multirresistentes, há de se considerar como um sobreaviso que a monitoração é imprescindível para que esses valores não se ampliem, juntamente com suas consequências.

No que se refere ao perfil de resistência aos antibióticos, Altinok e colaboradores (2009) analisaram 115 trutas arco-íris e isolaram 40 cepas bacterianas, nas quais mais de 50% dessas bactérias apresentaram-se resistentes aos antimicrobianos ampicilina, cefalotina, eritromicina, neomicina, sulfametoxazol e tetraciclina. Os antibióticos mais eficazes foram o ácido oxolínico e o florfenicol.

No nosso estudo, as cepas Gram-negativas analisadas apresentaram-se 100% sensíveis ao antibiótico tobramicina, mostrando alta eficácia aos isolados. No entanto, este não é autorizado para utilização na produção piscícola no Brasil. Os antimicrobianos autorizados referem-se ao florfenicol e oxitetraciclina, sendo o florfenicol preferencial para *O. mykiss* (PADUA et al., 2012; SINDAN, 2018). Analisando-o, este apresentou apenas 5% (n=5) de resistência, em cepas de *Acinetobacter baumannii complex*, *Pseudomonas spp.* e espécies de *Aeromonas*, demonstrando ainda, grande sensibilidade quando comparado aos outros antimicrobianos. Similarmente, os antimicrobianos ác. nalidíxico e tetraciclina também apresentaram 5% (n=5) de resistência entre as cepas *Pseudomonas spp.* e *Aeromonas spp.* para NAL e as cepas *Enterobacter spp.* e *C. freundii* para TET, respectivamente.

A relação individual dos isolados Gram-negativos do conteúdo intestinal (CI) de *O. mykiss* e amostras de água com os respectivos perfis de suscetibilidade frente aos 14 antimicrobianos testados estão apresentadas nas tabelas 9 e 10.

**TABELA 9:** Perfil de resistência antimicrobiana de bactérias Gram-negativas isoladas de conteúdo intestinal de *O. mykiss* de cinco truiticulturas na região alvo do estudo.

| Nº | ID     | ORIGEM DO ISOLADO | CEPA BACTERIANA                        | ANTIBIÓTICOS TESTADOS PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM DISCO |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----|--------|-------------------|--|---|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|    |        |                   |  | AMC   | AMP | NAL | CF L | CFO | CTX | CIP | CLO | SUT | ENO | GEN | TET | TOB | FLF |
| 1  | T1/P0  | CI                | <i>Escherichia coli</i>                | S   | R   | S   | R    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 2  | T1/P0  | CI                | <i>Serratia fonticola</i>              | S   | R   | S   | S    | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 3  | T2/P0  | CI                | <i>Enterobacter cloacae complex</i>    | I   | S   | S   | R    | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 4  | T2/P0  | CI                | <i>Escherichia coli</i>                | R   | I   | S   | R    | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 5  | T2/P0  | CI                | <i>Escherichia coli</i>                | R   | I   | S   | R    | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 6  | T3/P0  | CI                | <i>Citrobacter braakii</i>             | S   | S   | S   | R    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 7  | T3/P0  | CI                | <i>Cedecea spp.</i>                    | I   | R   | S   | R    | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 8  | T6/P0  | CI                | <i>Serratia nematodiphila</i>          | S   | R   | S   | R    | R   | S   | S   | S   | R   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 9  | T7/P0  | CI                | <i>Klebsiella oxytoca</i>              | S   | R   | S   | S    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 10 | T8/P0  | CI                | Enterobacteriaceae                     | S   | S   | S   | R    | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 11 | T9/P0  | CI                | <i>Enterobacter spp.</i>               | R   | R   | R   | R    | R   | S   | I   | S   | R   | R   | S   | R   | S   | S   |
| 12 | T10/P0 | CI                | <i>Pseudomonas spp.</i>                | S   | S   | S   | R    | R   | S   | S   | R   | S   | S   | S   | S   | S   | R   |
| 13 | T1/P1  | CI                | <i>Aeromonas sobria</i>                | S   | R   | S   | S    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 14 | T2/P1  | CI                | <i>Hafnia alvei</i>                    | S   | S   | S   | R    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 15 | T3/P1  | CI                | <i>Cronobacter sakasaki</i>            | S   | S   | S   | S    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 16 | T3/P1  | CI                | <i>Klebsiella spp.</i>                 | S   | S   | S   | S    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 17 | T3/P1  | CI                | <i>Klebsiella spp.</i>                 | S   | S   | S   | S    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 18 | T4/P1  | CI                | Enterobacteriaceae                     | R   | S   | S   | R    | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 19 | T4/P1  | CI                | <i>Yersinia intermedia</i>             | S   | I   | S   | S    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 20 | T4/P1  | CI                | <i>Hafnia alvei</i>                    | R   | I   | S   | R    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 21 | T5/P1  | CI                | <i>Enterobacter spp.</i>               | S   | S   | S   | S    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 22 | T5/P1  | CI                | <i>Hafnia alvei</i>                    | R   | S   | S   | R    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 23 | T5/P1  | CI                | <i>Citrobacter freundii</i>            | S   | S   | S   | S    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | I   | S   | S   |
| 24 | T6/P1  | CI                | <i>Citrobacter freundii</i>            | S   | S   | S   | R    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | I   | S   | S   |
| 25 | T6/P1  | CI                | <i>Hafnia alvei</i>                    | R   | S   | S   | R    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 26 | T7/P1  | CI                | <i>Acinetobacter baumannii complex</i> | S   | S   | S   | R    | I   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 27 | T10/P1 | CI                | <i>Hafnia alvei</i>                    | R   | S   | S   | R    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 28 | T1/P2  | CI                | <i>Hafnia alvei</i>                    | I   | I   | S   | R    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 29 | T1/P2  | CI                | <i>Citrobacter braaki</i>              | S   | S   | S   | I    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 30 | T1/P2  | CI                | <i>Citrobacter freundii</i>            | S   | S   | S   | I    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |

| Nº | ID     | ORIGEM DO ISOLADO | CEPA BACTERIANA                        | ANTIBIÓTICOS TESTADOS PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM DISCO |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----|--------|-------------------|--|---|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|    |        |                   |  | AMC   | AMP | NAL | CF L | CFO | CTX | CIP | CLO | SUT | ENO | GEN | TET | TOB | FLF |
| 31 | T2/P2  | CI                | <i>Hafnia alvei</i>                    | R   | S   | S   | R    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 32 | T3/P2  | CI                | <i>Citrobacter gillenii</i>            | S   | S   | S   | R    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 33 | T3/P2  | CI                | <i>Escherichia coli</i>                | S   | S   | S   | I    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 34 | T3/P2  | CI                | <i>Citrobacter freundii</i>            | S   | S   | S   | R    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 35 | T3/P2  | CI                | <i>Citrobacter braakii</i>             | S   | S   | S   | S    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 36 | T4/P2  | CI                | <i>Aeromonas veronii</i>               | I   | S   | S   | R    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 37 | T4/P2  | CI                | <i>Aeromonas spp.</i>                  | S   | S   | R   | R    | R   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | S   | S   |
| 38 | T4/P2  | CI                | <i>Hafnia alvei</i>                    | I   | S   | S   | R    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 39 | T4/P2  | CI                | <i>Hafnia alvei</i>                    | S   | S   | S   | I    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 40 | T5/P2  | CI                | <i>Hafnia alvei</i>                    | I   | I   | S   | R    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 41 | T5/P2  | CI                | <i>Citrobacter gillenii</i>            | S   | S   | S   | S    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 42 | T7/P2  | CI                | <i>Aeromonas veronii</i>               | S   | S   | S   | R    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 43 | T7/P2  | CI                | <i>Escherichia coli</i>                | S   | S   | S   | S    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 44 | T7/P2  | CI                | <i>Serratia fonticola</i>              | I   | S   | S   | R    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 45 | T7/P2  | CI                | Enterobacteriaceae                     | R   | I   | S   | R    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 46 | T7/P2  | CI                | <i>Citrobacter braakii</i>             | R   | I   | S   | R    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 47 | T10/P2 | CI                | <i>Acinetobacter baumannii complex</i> | S   | R   | S   | R    | I   | I   | S   | I   | S   | S   | S   | S   | S   | R   |
| 48 | T1/P3  | CI                | <i>Pseudomonas spp.</i>                | S   | R   | I   | R    | S   | S   | S   | I   | S   | S   | S   | S   | S   | R   |
| 49 | T1/P3  | CI                | <i>Escherichia coli</i>                | I   | S   | S   | R    | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 50 | T2/P3  | CI                | <i>Budvicia aquatica</i>               | S   | S   | S   | S    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 51 | T2/P3  | CI                | <i>Pantoea agglomerans</i>             | S   | S   | S   | S    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 52 | T3/P3  | CI                | <i>Aeromonas media</i>                 | S   | R   | I   | R    | I   | S   | S   | I   | S   | S   | S   | S   | S   | R   |
| 53 | T3/P3  | CI                | <i>Aeromonas spp.</i>                  | S   | S   | S   | S    | S   | S   | S   | I   | S   | S   | S   | S   | S   | R   |
| 54 | T3/P3  | CI                | <i>Budvicia aquatica</i>               | S   | S   | S   | S    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 55 | T5/P3  | CI                | <i>Eenterobacter aerogenes</i>         | S   | R   | S   | R    | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 56 | T5/P3  | CI                | <i>Budvicia aquatica</i>               | S   | S   | S   | S    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 57 | T5/P3  | CI                | <i>Eschechia coli</i>                  | I   | S   | S   | R    | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 58 | T7/P3  | CI                | Enterobacteriaceae                     | S   | S   | S   | S    | I   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 59 | T7/P3  | CI                | <i>Budvicia aquatica</i>               | S   | S   | S   | S    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 60 | T7/P3  | CI                | <i>Budvicia aquatica</i>               | S   | S   | S   | S    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 61 | T10/P3 | CI                | <i>Aeromonas spp.</i>                  | S   | R   | I   | I    | R   | S   | S   | I   | S   | S   | S   | S   | S   | R   |
| 62 | T10/P3 | CI                | <i>Budvicia aquatica</i>               | S   | S   | S   | S    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 63 | T10/P3 | CI                | <i>Pantoea agglomerans</i>             | S   | S   | S   | S    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |

| Nº | ID     | ORIGEM DO ISOLADO | CEPA BACTERIANA                                | ANTIBIÓTICOS TESTADOS PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM DISCO |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----|--------|-------------------|--|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|    |        |                   |  | AMC   | AMP | NAL | CFL | CFO | CTX | CIP | CLO | SUT | ENO | GEN | TET | TOB | FLF |
| 64 | T1/P4  | CI                | <i>Escherichia coli</i>                        | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 65 | T1/P4  | CI                | <i>Serratia sonnei</i>                         | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 66 | T1/P4  | CI                | <i>Budvicia aquatica</i>                       | S   | I   | S   | I   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 67 | T2/P4  | CI                | <i>Budvicia aquatica</i>                       | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 68 | T2/P4  | CI                | <i>Citrobacter freundii</i>                    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | S   |
| 69 | T2/P4  | CI                | <i>Aeromonas spp.</i>                          | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 70 | T3/P4  | CI                | <i>Budvicia aquatica</i>                       | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 71 | T3/P4  | CI                | <i>Citrobacter gillenii</i>                    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 72 | T3/P4  | CI                | <i>Escherichia coli</i>                        | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 73 | T4/P4  | CI                | <i>Aeromonas veronii</i>                       | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | S   |
| 74 | T4/P4  | CI                | <i>Aeromonas veronii</i>                       | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | S   |
| 75 | T4/P4  | CI                | <i>Citrobacter gillenii</i>                    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 76 | T4/P4  | CI                | <i>Budvicia aquatica</i>                       | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 77 | T5/P4  | CI                | <i>Escherichia coli</i>                        | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | S   | S   | S   |
| 78 | T5/P4  | CI                | <i>Klebsiella ascorbata</i>                    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 79 | T5/P4  | CI                | Enterobacteriaceae                             | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 80 | T6/P4  | CI                | <i>Budvicia aquatica</i>                       | I   | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 81 | T6/P4  | CI                | <i>Citrobacter freundii</i>                    | R   | I   | S   | R   | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 82 | T6/P4  | CI                | <i>Citrobacter werkmanii</i>                   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 83 | T6/P4  | CI                | <i>Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae</i> | S   | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 84 | T7/P4  | CI                | <i>Escherichia coli</i>                        | S   | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | S   |
| 85 | T7/P4  | CI                | <i>Escherichia coli</i>                        | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 86 | T7/P4  | CI                | <i>Citrobacter freundii</i>                    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 87 | T7/P4  | CI                | <i>Edwardsiella piscicida</i>                  | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 88 | T8/P4  | CI                | <i>Escherichia coli</i>                        | S   | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 89 | T8/P4  | CI                | <i>Acinetobacter baumannii complex</i>         | S   | S   | S   | R   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | S   | S   | S   |
| 90 | T8/P4  | CI                | <i>Citrobacter gillenii</i>                    | S   | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 91 | T9/P4  | CI                | <i>Citrobacter gillenii</i>                    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 92 | T9/P4  | CI                | <i>Budvicia aquatica</i>                       | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 93 | T10/P4 | CI                | <i>Citrobacter gillenii</i>                    | S   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 94 | T10/P4 | CI                | <i>Citrobacter gillenii</i>                    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |

T1 a T10= Trutas; P0= Truticultura de Itamonte-MG; P1= Truticultura Samadhi de Teresópolis-RJ; P2= Truticultura Arco-íris de Nova Friburgo-RJ; P3=Truticultura Truta do Vale de Nova Friburgo-RJ; P4= Truticultura do Vascão de Nova Friburgo-RJ. ID= identificação; CI= Conteúdo intestinal de *O. mykiss*; R= Resistente; I= Resistência intermediária; S=Sensível.

**TABELA 10:** Perfil de resistência antimicrobiana de bactérias Gram-negativas isoladas de amostras ambientais (água) de cinco truticulturas analisadas no presente estudo.

| Nº | ID     | ORIGEM DO ISOLADO | CEPA BACTERIANA                          | ANTIBIÓTICOS TESTADOS PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM DISCO |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----|--------|-------------------|--|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|    |        |                   |  | AMC   | AMP | NAL | CFL | CFO | CTX | CIP | CLO | SUT | ENO | GEN | TET | TOB | FLF |
| 1  | P1;TQ1 | ÁGUA TANQUE 1     | <i>Cronobacter sakasakii</i>             | S   | S   | S   | R   | I   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 2  | P1/TQ2 | ÁGUA TANQUE 2     | <i>Escherichia coli</i>                  | S   | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 3  | P1/TQ  | ÁGUA NASCENTE     | <i>Budvicia aquatica</i>                 | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 4  | P1/N   | ÁGUA NASCENTE     | <i>Escherichia coli</i>                  | S   | S   | S   | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 5  | P1/N   | ÁGUA NASCENTE     | Enterobacteriaceae                       | R   | R   | S   | R   | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 6  | P1/TQ  | ÁGUA TANQUE       | Enterobacteriaceae                       | S   | S   | S   | R   | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 7  | P1/N   | ÁGUA NASCENTE     | <i>Enterobacter cloacae complex</i>      | R   | S   | S   | R   | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 8  | P1/TQ1 | ÁGUA TANQUE 1     | <i>A. salmonicida subsp. salmonicida</i> | R   | R   | S   | R   | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 9  | P1/TQ1 | ÁGUA TANQUE 1     | <i>Buttiauxella agrestis</i>             | R   | S   | S   | R   | I   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 10 | P2/TQ  | ÁGUA NASCENTE     | <i>Citrobacter freundii</i>              | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 11 | P2N    | ÁGUA NASCENTE     | <i>Klebsiella oxytoca</i>                | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 12 | P2/TQ  | ÁGUA TANQUE       | <i>Escherichia coli</i>                  | S   | S   | S   | I   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 13 | P2/TQ  | ÁGUA TANQUE       | Enterobacteriaceae                       | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 14 | P3/TQ  | ÁGUA DE TANQUE 1  | <i>Escherichia coli</i>                  | S   | R   | R   | R   | R   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | R   | S   | S   |

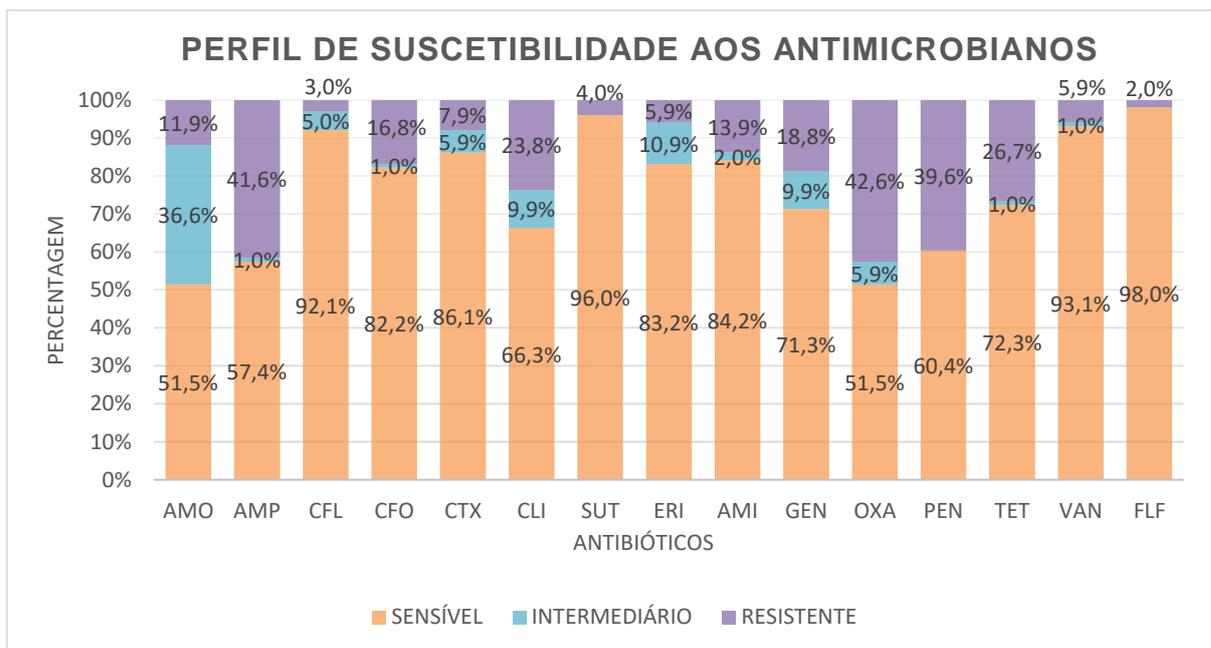
| Nº | ID     | ORIGEM DO ISOLADO | CEPA BACTERIANA                                 | ANTIBIÓTICOS TESTADOS PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM DISCO |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |      |     |     |
|----|--------|-------------------|---|---|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|
|    |        |                   |   | AMC   | AMP | NAL | CF L | CFO | CTX | CIP | CLO | SUT | ENO | GEN | TE T | TOB | FLF |
| 15 | P3/TQ  | ÁGUA TANQUE 1     | <i>Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida</i> | R   | R   | S   | R    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S    | S   | S   |
| 16 | P3/TQ  | ÁGUA TANQUE 1     | <i>Enterobacter cloacae complex</i>             | R   | S   | S   | R    | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S    | S   | S   |
| 17 | P3/TQ  | ÁGUA TANQUE 2     | <i>Escherichia coli</i>                         | R   | S   | S   | S    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S    | S   | S   |
| 18 | P4/TQ1 | ÁGUA TANQUE 1     | <i>Escherichia coli</i>                         | S   | S   | S   | S    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S    | S   | S   |
| 19 | P4/TQ2 | ÁGUA TANQUE 2     | <i>Escherichia coli</i>                         | S   | S   | S   | S    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S    | S   | S   |
| 20 | P4NR   | ÁGUA RESERV.      | <i>Escherichia coli</i>                         | S   | S   | S   | S    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S    | S   | S   |
| 21 | P4N    | ÁGUA NASCENTE     | <i>Escherichia coli</i>                         | S   | S   | S   | S    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S    | S   | S   |
| 22 | P4NC   | ÁGUA CANELETA     | <i>Escherichia coli</i>                         | S   | S   | S   | S    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S    | S   | S   |
| 23 | P4NC   | ÁGUA CANELETA     | <i>Klebsiella oxytoca</i>                       | S   | S   | S   | S    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S    | S   | S   |
| 24 | P4NC   | ÁGUA CANELETA     | <i>Citrobacter spp.</i>                         | S   | S   | S   | S    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S    | S   | S   |
| 25 | P4/TQ1 | ÁGUA TANQUE 1     | <i>Enterobacter taylorae</i>                    | S   | S   | S   | S    | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S    | S   | S   |
| 26 | P4TQ1  | ÁGUA TANQUE 1     | <i>Serratia odorifera</i>                       | S   | S   | S   | S    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S    | S   | S   |
| 27 | P4/TQ2 | ÁGUA TANQUE 2     | <i>Yersinia intermedia</i>                      | R   | S   | S   | S    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S    | S   | S   |

P1= Truticultura Samadhi de Teresópolis-RJ; P2= Truticultura Arco-íris de Nova Friburgo-RJ; P3= Truticultura Truta do Vale de Nova Friburgo-RJ; P4= Truticultura do Vascão de Nova Friburgo-RJ. ID= identificação; Cl= Conteúdo intestinal de *O. mykiss*; R= Resistente; I= Resistência intermediária; S=Sensível.

### 6.6.2 Bactérias Gram-positivas

Com relação às cepas Gram-positivas (n=101), foi observado que 82,2% (=83) dos isolados apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano e 36,6% (n=37) apresentaram multirresistência.

Os maiores percentuais de resistência foram observados nos antibióticos da classe beta-lactâmicos, lincosamidas, aminoglicosídeos, seguido pela classe de antibióticos tetraciclina: Amoxicilina e Oxacilina (48,5%), Ampicilina (42,6%), Penicilina G (39,6%), Clindamicina (33,7%), Gentamicina (28,7%), Tetraciclina (27,7%). Menores percentuais de resistência foram observados frente aos antimicrobianos: Cefoxitina (17,8%), Eritromicina (16,8%), Amicacina (15,9%), Cefotaxima (13,8%), Cefalotina (8,0%), Vancomicina (6,9%), Sulfazotrim (4,0%) e Florfenicol (2,0%) (Figura 15).



**FIGURA 15:** Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em bactérias gram-positivas isoladas de conteúdo intestinal de trutas arco-íris (*O. mykiss*) e amostras ambientais (água).

Nesse sentido, tanto bactérias Gram-negativas como bactérias Gram-positivas isoladas no presente estudo apresentaram maior resistência aos antimicrobianos da classe beta-lactâmicos. Quando compara-se ambos os grupos, bactérias Gram-positivas apresentaram maiores percentuais de resistência aos antimicrobianos no geral. Também, observa-se grande percentual de resistência à Ampicilina e Penicilina G. Considerando a sua ampla utilização na produção animal (ARIAS & CARRILHO,

2012; MARTINI et al., 2017), é possível que o aumento da resistência à Ampicilina possa estar relacionado ao uso de Penicilina em outras criações de animais da região, contaminando o solo e recursos hídricos, de modo que o ambiente aquático pode auxiliar na disseminação de cepas resistentes a diversos antibióticos e conseqüentemente habitar no trato gastrointestinal de espécies aquáticas.

Na análise estatística, comparando os dois grupos que apresentaram maior resistência aos antibióticos sendo as classes beta-lactâmicos e lincosamidas, respectivamente, identificou-se que os antibióticos do grupo beta-lactâmicos apresentaram valor de resistência estatisticamente significativa ( $p = 0,045$ ).

Na aquicultura, Costa e colaboradores (2008) avaliaram a sensibilidade aos antimicrobianos de bactérias isoladas de jundiás (*Rhamdia quelen*) e observaram 95% dos isolados resistentes a penicilina. Várias são as estratégias de proteção bacteriana aos beta-lactâmicos, entre estas a destruição deste grupo de fármacos pela produção de beta-lactamase, diminuição da capacidade de penetração do antibiótico, assim como redução da afinidade do mesmo às PBPs (ZHANEL et al., 2006).

Entre os antimicrobianos com menor sensibilidade (51,5%) frente às cepas Gram-positivas do presente estudo, destacam-se os beta-lactâmicos Amoxicilina e Oxacilina.

Em cepas de *Staphylococcus* spp., a resistência fenotípica à oxacilina é extremamente variável e depende da expressão do gene *mecA*. Essa variabilidade é reconhecida como heterorresistência fenotípica, e se caracteriza pelo fato de que de toda população bacteriana heterogeneamente resistente, assim como todas as células, carregam o gene *mecA*, marcador genotípico da resistência aos antibióticos beta-lactâmicos, porém nem todas expressam fenotipicamente sua resistência da mesma forma (MIMICA & MENDES, 2007). Desse modo, também foi avaliada a resistência genotípica para a detecção do gene *mecA* nas 51 cepas CONS isoladas deste estudo, conforme será apresentado na seção posterior.

No presente estudo, cepas de *S. sciuri*, *S. warneri*, *S. xylosus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* e *Enterococcus* spp. apresentaram-se resistentes a TET. O alto índice de resistência ao antibiótico tetraciclina observada no presente estudo em isolados Gram-positivos, pode ser em decorrência ao uso deste mesmo fármaco na medicina veterinária e na aquicultura em todo o mundo (MIRANDA, 2012).

Segundo Álvarez e colaboradores (2004), na Venezuela, o ácido oxolínico, cloranfenicol, eritromicina e a tetraciclina são amplamente usados na aquicultura para o controle de patógenos Gram-negativos. O cloridrato de oxitetraciclina é um dos antibióticos de uso permitido nos Estados Unidos para controle de septicemia causada por *Aeromonas hydrophila* (FAO, 2009). No Brasil, a oxitetraciclina já é utilizada em propriedades aquícolas como agente profilático (HEDAYATIANFARD et al., 2014).

Em contrapartida, o uso destes fármacos impactam diretamente tanto bactérias Gram-negativas como bactérias Gram-positivas, visto que exerce pressão seletiva de resistência aos antibióticos. Estudo realizado por Hernandez (2005) relata que aproximadamente 70 a 80% dos fármacos utilizados na aquicultura permanecem por um período considerável no ambiente. Dessa maneira, a contaminação ambiental com antimicrobianos pode selecionar cepas bacterianas resistentes na microflora ambiental, disseminar genes de resistência e eventualmente atingir patógenos humanos, conforme discutido anteriormente (WHO, 2006).

Além disso, cefalotina por exemplo, não é licenciado para o tratamento de doenças de peixes e não têm sido utilizado na aquicultura, mas algumas das bactérias isoladas de peixes são resistentes a este antimicrobiano. A resistência pode ser obtida por genes localizados em elementos transponíveis de ambiente, humano ou de origem animal de bactérias existentes e transferidas para bactérias isoladas de peixes (CAPKIN et al., 2015).

Confirmando a transferência de genes de resistência aos antibióticos (ARGs) no ambiente aquático, Chen e colaboradores (2018) observaram que o uso de beta-lactâmicos e aminoglicosídeos na aquicultura na China, não resultou apenas no enriquecimento de ARGs específicos para esses dois tipos de antibióticos em um ambiente aquático, mas também elevou consideravelmente a abundância de ARGs relacionados a outras categorias de antibióticos, como sulfonamidas, tetraciclinas e macrolídeos.

Muitos elementos genéticos e determinantes de resistência para quinolonas, tetraciclinas e beta-lactamases são compartilhados entre bactérias aquáticas, patógenos de peixes e humanos e parecem ter origem a partir de bactérias aquáticas, evidenciando, assim, o impacto negativo do uso excessivo de antimicrobianos e necessidade de monitoramento do ambiente aquático (CABELLO, et al., 2013).

Devido a heterogeneidade espacial e temporal significativa da distribuição da resistência aos antimicrobianos e os fatores que afetam a sua evolução, disseminação

e persistência, é importante salientar que a mesma deve ser vista como um problema ecológico (RADHOUANI et al., 2014). Além da possibilidade do desenvolvimento de estirpes bacterianas resistentes no ambiente, animais e no homem, representam um risco potencial à saúde pública, há pouca aceitação dos consumidores a animais tratados (CANTON et al., 2009).

O antimicrobiano florfenicol foi o que apresentou maior sensibilidade (98%) frente as cepas Gram-positivas analisadas. Este é o único antimicrobiano com utilização específica para *O. mykiss*, com alta atividade antimicrobiana, que frequentemente apresenta os melhores resultados terapêuticos, inclusive para bactérias multirresistentes (CHIDEROLI et al., 2017; GASTALHO et al., 2014). Desse modo, através dos nosso estudo, considerando o percentual (36,6%) de cepas Gram-positivas multirresistentes, é orientado o uso preferencial do anfenicol florfenicol quando necessário na truticultura, visto que, quando comparada à classe tetraciclina, apresentou os menores percentuais de resistência e conseqüentemente maior eficácia frente aos isolados testados.

A relação individual dos isolados Gram-positivos isolados no conteúdo intestinal de *O. mykiss* e amostras ambientais (água) são descritas nas tabelas 11 e 12, respectivamente.

Estima-se que até 2025 a produção anual brasileira de peixes (que inclui a pesca e aquicultura) aumentará em mais de 100%, favorável aos investimentos feitos no setor nos últimos anos (FAO, 2016). Desse modo, para que a produção de peixes continue em crescimento é necessário que novas técnicas sustentáveis sejam adotadas no manejo, visando a questão das doenças e da multirresistência bacteriana aos antimicrobianos, que tem se acelerado em ritmo desproporcional ao do desenvolvimento de novas alternativas profiláticas e terapêuticas.

**TABELA 11:** Perfil de resistência antimicrobiana de bactérias Gram-negativas isoladas de conteúdo intestinal de *O. mykiss* de cinco truticulturas na região alvo do estudo.

| Nº | ID     | ORIGEM DO ISOLADO | CEPA BACTERIANA                           | ANTIBIÓTICOS TESTADOS PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM DISCO |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----|--------|-------------------|---|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|    |        |                   |   | AMO   | AMP | CFL | CFO | CTX | CLI | SUT | ERI | AMI | GEN | OXA | PEN | TET | VAN | FLF |
| 1  | T1/P0  | CI                | <i>Staphylococcus lentus</i>              | I   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | S   | S   |
| 2  | T1/P0  | CI                | <i>Staphylococcus lugdunensis</i>         | I   | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | S   | R   |
| 3  | T2/P0  | CI                | <i>Staphylococcus xylosus</i>             | I   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | S   | S   |
| 4  | T2/P0  | CI                | <i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i> | I   | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | R   | R   | S   | S   |
| 5  | T3/P0  | CI                | <i>Staphylococcus sciuri</i>              | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | R   |
| 6  | T3/P0  | CI                | <i>Staphylococcus sciuri</i>              | S   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 7  | T4/P0  | CI                | <i>Staphylococcus sciuri</i>              | S   | S   | S   | S   | S   | S   | I   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | S   | S   |
| 8  | T5/P0  | CI                | <i>Staphylococcus epidermidis</i>         | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 9  | T5/P0  | CI                | <i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i> | I   | R   | S   | S   | S   | R   | S   | I   | S   | R   | R   | R   | R   | S   | S   |
| 10 | T6/P0  | CI                | <i>Staphylococcus epidermidis</i>         | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 11 | T6/P0  | CI                | <i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i> | I   | R   | S   | S   | S   | R   | S   | I   | S   | R   | R   | R   | R   | S   | S   |
| 12 | T7/P0  | CI                | <i>Staphylococcus xylosus</i>             | S   | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | S   |
| 13 | T8/P0  | CI                | <i>Staphylococcus xylosus</i>             | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | S   |
| 14 | T8/P0  | CI                | <i>Staphylococcus warneri</i>             | I   | R   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 15 | T9/P0  | CI                | <i>Staphylococcus epidermidis</i>         | S   | R   | S   | S   | S   | S   | R   | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 16 | T9/P0  | CI                | <i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i> | I   | R   | S   | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | R   | R   | S   | S   |
| 17 | T10/P0 | CI                | <i>Staphylococcus epidermidis</i>         | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 18 | T10/P0 | CI                | <i>Staphylococcus warneri</i>             | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 19 | T1/P1  | CI                | <i>Staphylococcus warneri</i>             | R   | R   | R   | R   | S   | R   | S   | I   | S   | S   | R   | R   | S   | R   | S   |
| 20 | T2/P1  | CI                | <i>Staphylococcus epidermidis</i>         | R   | R   | R   | R   | S   | R   | S   | I   | S   | S   | R   | R   | S   | I   | S   |
| 21 | T4/P1  | CI                | <i>Staphylococcus warneri</i>             | R   | R   | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | S   |
| 22 | T4/P1  | CI                | <i>Streptococcus sanguinis</i>            | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | NT  | NT  | NT  | S   | S   | S   | S   |
| 23 | T5/P1  | CI                | <i>Kocuria rosea</i>                      | NT  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 24 | T5/P1  | CI                | <i>Enterococcus columbae</i>              | I   | R   | S   | S   | S   | R   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | S   | S   |
| 25 | T6/P1  | CI                | <i>Staphylococcus xylosus</i>             | I   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | S   | S   | S   |
| 26 | T7/P1  | CI                | <i>Staphylococcus warneri</i>             | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 27 | T7/P1  | CI                | <i>Staphylococcus warneri</i>             | I   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 28 | T8/P1  | CI                | <i>Staphylococcus lentus</i>              | I   | R   | S   | S   | S   | I   | S   | S   | S   | S   | R   | R   | S   | S   | S   |
| 29 | T9/P1  | CI                | <i>Gemella mobilorum</i>                  | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |

| Nº | ID     | ORIGEM DO ISOLADO | CEPA BACTERIANA                                  | AMO | AMP | CFL | CFO | CTX | CLI | SUT | ERI | AMI | GEN | OXA | PEN | TET | VAN | FLF |
|----|--------|-------------------|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 30 | T9/P1  | CI                | <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>          | S   | S   | S   | R   | S   | S   | R   | S   | S   | S   | S   | R   | R   | S   | S   |
| 31 | T10/P1 | CI                | <i>Lactococcus mesenteroides subsp. cremoris</i> | R   | R   | S   | S   | I   | S   | S   | S   | S   | S   | I   | R   | S   | S   | S   |
| 32 | T1/P2  | CI                | <i>Staphylococcus warneri</i>                    | S   | R   | S   | S   | S   | S   | S   | I   | S   | R   | R   | S   | S   | S   | S   |
| 33 | T1/P2  | CI                | <i>Enterococcus spp.</i>                         | I   | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | S   |
| 34 | T2/P2  | CI                | <i>Staphylococcus warneri</i>                    | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 35 | T2/P2  | CI                | <i>Kocuria rosea</i>                             | NT  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 36 | T2/P2  | CI                | <i>Enterococcus spp.</i>                         | I   | R   | S   | S   | S   | R   | S   | R   | S   | S   | R   | R   | S   | S   | S   |
| 37 | T3/P2  | CI                | <i>Staphylococcus sciuri</i>                     | I   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 38 | T3/P2  | CI                | <i>Enterococcus spp.</i>                         | I   | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | S   |
| 39 | T4/P2  | CI                | <i>Staphylococcus lugdunensis</i>                | R   | R   | S   | S   | I   | S   | S   | S   | S   | R   | R   | R   | S   | S   | S   |
| 40 | T4/P2  | CI                | <i>Enterococcus spp.</i>                         | I   | R   | S   | R   | S   | R   | S   | S   | S   | I   | I   | S   | S   | S   | S   |
| 41 | T5/P2  | CI                | <i>Staphylococcus haemolyticus</i>               | R   | R   | S   | S   | S   | R   | S   | S   | S   | S   | R   | R   | S   | S   | S   |
| 42 | T5/P2  | CI                | <i>Staphylococcus xylosus</i>                    | I   | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | R   | R   | S   | S   | S   |
| 43 | T5/P2  | CI                | <i>Streptococcus spp.</i>                        | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | NT  | NT  | NT  | S   | S   | S   | S   |
| 44 | T6/P2  | CI                | <i>Staphylococcus lugdunensis</i>                | I   | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | R   | R   | S   | S   | S   |
| 45 | T6/P2  | CI                | <i>Streptococcus spp.</i>                        | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | NT  | NT  | NT  | S   | S   | S   | S   |
| 46 | T7/P2  | CI                | <i>Staphylococcus warneri</i>                    | I   | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | R   | S   | S   | S   |
| 47 | T7/P2  | CI                | <i>Staphylococcus xylosus</i>                    | R   | R   | I   | R   | R   | R   | S   | S   | S   | R   | R   | R   | R   | S   | S   |
| 48 | T7/P2  | CI                | <i>Streptococcus mutans</i>                      | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | NT  | NT  | NT  | NT  | S   | S   | S   |
| 49 | T8/P2  | CI                | <i>Staphylococcus warneri</i>                    | R   | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | R   | R   | I   | S   | S   |
| 50 | T8/P2  | CI                | <i>Streptococcus mutans</i>                      | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | NT  | NT  | NT  | S   | S   | S   | S   |
| 51 | T8/P2  | CI                | <i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>        | S   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 52 | T9/P2  | CI                | <i>Kocuria kristinae</i>                         | NT  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 53 | T9/P2  | CI                | <i>Kocuria rosea</i>                             | NT  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 54 | T9/P2  | CI                | <i>Streptococcus spp.</i>                        | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | NT  | NT  | NT  | S   | S   | S   | S   |
| 55 | T9/P2  | CI                | <i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>        | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | I   | R   | S   | S   | R   | S   |
| 56 | T10/P2 | CI                | <i>Streptococcus mutans</i>                      | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | NT  | NT  | NT  | S   | S   | S   | S   |
| 57 | T10/P2 | CI                | <i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>        | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | S   |

| Nº | ID     | ORIGEM DO ISOLADO | CEPA BACTERIANA                           | AMO | AMP | CFL | CFO | CTX | CLI | SUT | ERI | AMI | GEN | OXA | PEN | TET | VAN | FLF |
|----|--------|-------------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 58 | T1/P3  | CI                | <i>Staphylococcus warneri</i>             | I   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 59 | T1/P3  | CI                | <i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i> | S   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | S   | R   | I   | R   | S   | S   | S   | S   |
| 60 | T1/P3  | CI                | <i>Staphylococcus epidermidis</i>         | R   | R   | S   | S   | I   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | R   | S   | S   | S   |
| 61 | T2/P3  | CI                | <i>Streptococcus sanguinis</i>            | S   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | S   | R   | I   | R   | S   | S   | S   | S   |
| 62 | T3/P3  | CI                | <i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i> | S   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | S   | R   | I   | R   | S   | S   | S   | S   |
| 63 | T4/P3  | CI                | <i>Enterococcus spp.</i>                  | I   | R   | S   | S   | S   | R   | S   | R   | S   | S   | R   | R   | S   | S   | S   |
| 64 | T4/P3  | CI                | <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | S   | R   | I   | R   | S   | S   | S   | S   |
| 65 | T7/P3  | CI                | <i>Staphylococcus lugdunensis</i>         | R   | R   | S   | S   | I   | S   | S   | S   | S   | R   | R   | R   | S   | S   | S   |
| 66 | T7/P3  | CI                | <i>Staphylococcus xylosus</i>             | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | R   | R   | S   | S   |
| 67 | T8/P3  | CI                | <i>Staphylococcus lugdunensis</i>         | R   | R   | S   | S   | I   | S   | S   | S   | S   | R   | R   | R   | S   | S   | S   |
| 68 | T8/P3  | CI                | <i>Enterococcus spp.</i>                  | I   | R   | S   | R   | S   | R   | S   | S   | S   | S   | I   | S   | S   | S   | S   |
| 69 | T9/P3  | CI                | <i>Staphylococcus warneri</i>             | R   | R   | S   | S   | I   | S   | S   | S   | S   | R   | R   | R   | S   | S   | S   |
| 70 | T9/P3  | CI                | <i>Staphylococcus lentus</i>              | I   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | R   | S   | S   | S   |
| 71 | T10/P3 | CI                | <i>Staphylococcus lugdunensis</i>         | S   | I   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | R   | R   | S   | S   | S   |
| 72 | T1/P4  | CI                | <i>Staphylococcus sciuri</i>              | S   | R   | S   | S   | S   | I   | S   | I   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 73 | T1/P4  | CI                | <i>Enterococcus faecium</i>               | I   | S   | S   | I   | R   | S   | S   | I   | R   | I   | R   | R   | R   | S   | S   |
| 74 | T2/P4  | CI                | <i>Staphylococcus sciuri</i>              | I   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | S   |
| 75 | T3/P4  | CI                | <i>Staphylococcus sciuri</i>              | I   | S   | S   | S   | S   | I   | S   | S   | S   | S   | I   | S   | R   | S   | S   |
| 76 | T3/P4  | CI                | <i>Staphylococcus xylosus</i>             | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | R   | R   | S   | S   |
| 77 | T3/P4  | CI                | <i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i> | S   | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | R   | S   | S   | R   | S   |
| 78 | T4/P4  | CI                | <i>Staphylococcus sciuri</i>              | S   | S   | S   | S   | S   | I   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | S   |
| 79 | T4/P4  | CI                | <i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i> | S   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | S   | R   | I   | R   | S   | S   | S   | S   |
| 80 | T5/P4  | CI                | <i>Staphylococcus sciuri</i>              | S   | S   | S   | S   | S   | I   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | S   |
| 81 | T6/P4  | CI                | <i>Staphylococcus sciuri</i>              | S   | S   | S   | S   | S   | I   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | R   | S   | S   |
| 82 | T6/P4  | CI                | <i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i> | S   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | S   | R   | I   | R   | S   | S   | S   | S   |
| 83 | T6/P4  | CI                | <i>Enterococcus spp.</i>                  | I   | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | S   |
| 84 | T7/P4  | CI                | <i>Staphylococcus sciuri</i>              | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | R   | S   | S   | S   |
| 85 | T7/P4  | CI                | <i>Staphylococcus xylosus</i>             | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | R   | S   | S   | S   |

| Nº | ID     | ORIGEM DO ISOLADO | CEPA BACTERIANA                | AMO | AMP | CFL | CFO | CTX | CLI | SUT | ERI | AMI | GEN | OXA | PEN | TET | VAN | FLF |
|----|--------|-------------------|--------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 86 | T7/P4  | CI                | <i>Enterococcus</i> spp.       | I   | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | S   | S   |
| 87 | T8/P4  | CI                | <i>Staphylococcus sciuri</i>   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | R   | S   | S   |
| 88 | T8/P4  | CI                | <i>Enterococcus</i> spp.       | S   | R   | I   | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | S   | S   |
| 89 | T9/P4  | CI                | <i>Kocuria rosea</i>           | I   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | I   | R   | S   | S   | R   | S   |
| 90 | T10/P4 | CI                | <i>Staphylococcus xylosum</i>  | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |
| 91 | T10/P4 | CI                | <i>Streptococcus sanguinis</i> | S   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | R   | I   | R   | S   | S   | S   | S   |
| 92 | T10/P4 | CI                | <i>Enterococcus</i> spp.       | I   | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | I   | S   | R   | S   | S   |

T1 a T10= Trutas; P0= Truticultura de Itamonte-MG; P1= Truticultura Samadhi de Teresópolis-RJ; P2= Truticultura Arco-íris de Nova Friburgo-RJ; P3=Truticultura Truta do Vale de Nova Friburgo-RJ; P4= Truticultura do Vascão de Nova Friburgo-RJ. ID= identificação; CI= Conteúdo intestinal de *O. mykiss*; R= Resistente; I= Resistência intermediária; S=Sensível; NT= Não testado.

**TABELA 12:** Perfil de resistência antimicrobiana de bactérias Gram-negativas isoladas de amostras ambientais (água) de cinco truticulturas analisadas no presente estudo.

| Nº | ID     | ORIGEM DO ISOLADO | CEPA BACTERIANA                   | ANTIBIÓTICOS TESTADOS PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM DISCO |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----|--------|-------------------|-----------------------------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|    |        |                   |                                   | AMO   | AMP | CFL | CFO | CTX | CLI | SUT | ERI | AMI | GEN | OXA | PEN | TET | VAN | FLF |
| 1  | P1/TQ  | ÁGUA TANQUE       | <i>Enterococcus</i> spp.          | S   | R   | I   | R   | R   | R   | S   | I   | R   | R   | R   | R   | S   | S   | S   |
| 2  | P2/TQ  | ÁGUA TANQUE       | <i>Enterococcus</i> spp.          | I   | S   | S   | R   | S   | R   | S   | S   | I   | S   | R   | S   | S   | S   | S   |
| 3  | P3/TQ  | ÁGUA TANQUE       | <i>Enterococcus faecalis</i>      | I   | R   | I   | R   | R   | R   | R   | I   | R   | R   | R   | R   | R   | S   | S   |
| 4  | P4N    | ÁGUA NASCENTE     | <i>Enterococcus</i> spp.          | I   | S   | S   | R   | R   | R   | S   | S   | R   | S   | R   | R   | S   | S   | S   |
| 5  | P4/TQ1 | ÁGUA TANQUE       | <i>Enterococcus casseliflavus</i> | S   | R   | S   | S   | S   | I   | S   | S   | I   | S   | R   | S   | S   | S   | S   |
| 6  | P4/TQ1 | ÁGUA TANQUE       | <i>Enterococcus faecium</i>       | I   | R   | I   | I   | R   | S   | S   | I   | R   | R   | R   | S   | R   | S   | S   |
| 7  | P4/TQ1 | ÁGUA TANQUE       | <i>Enterococcus</i> spp.          | I   | S   | S   | R   | R   | R   | S   | S   | R   | S   | R   | R   | S   | S   | S   |
| 8  | P4/TQ2 | ÁGUA TANQUE       | <i>Enterococcus</i> spp.          | I   | S   | S   | R   | R   | R   | S   | S   | R   | S   | R   | R   | S   | S   | S   |
| 9  | P4/TQ2 | ÁGUA TANQUE       | <i>Staphylococcus sciuri</i>      | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   |

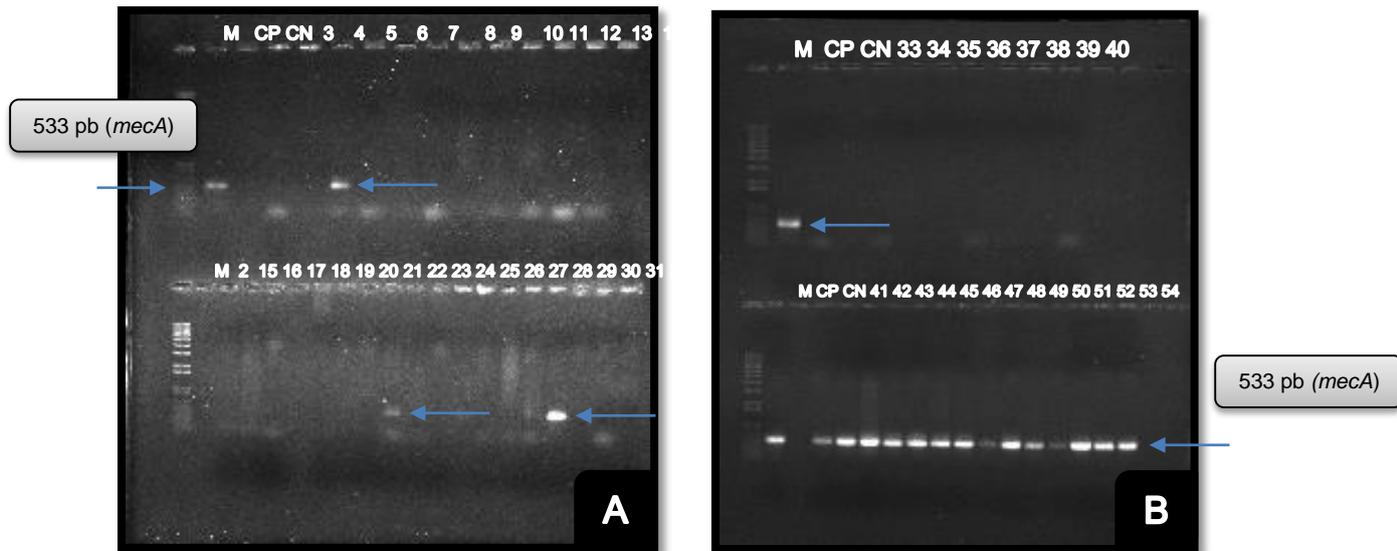
Trutas; P1= Truticultura Samadhi de Teresópolis-RJ; P2= Truticultura Arco-íris de Nova Friburgo-RJ; P3=Truticultura Truta do Vale de Nova Friburgo-RJ; P4= Truticultura do Vascão de Nova Friburgo-RJ. ID= identificação; CI= Conteúdo intestinal de *O. mykiss*; R= Resistente; I= Resistência intermediária; S=Sensível.

## 6.7 ANÁLISE MOLECULAR

### 6.7.1 Detecção do gene *mecA* em cepas do gênero *Staphylococcus*

Para detecção dos *Methicillin Resistant Staphylococcus* (MRS) existem métodos tradicionais e preconizados pelo CLSI e European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Um deles refere-se ao teste de disco-difusão em Ágar Mueller Hinton com os discos dos antibióticos oxacilina e cefoxitina (SCHISLER et al., 2009). Todavia, os testes moleculares para detecção da presença do gene *mecA* e/ou a expressão da proteína de ligação à penicilina (PBP), através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), são considerados os testes mais sensíveis na identificação de isolados meticilina resistentes (CLSI, 2010). No presente estudo, os dois métodos foram adotados para associação fenotípica e genotípica dos isolados *Staphylococcus* spp.

Assim sendo, cepas de *Staphylococcus* spp. (n=51) foram submetidas à técnica de PCR para detecção do gene *mecA* relacionado à resistência à meticilina/oxacilina, onde 33,3% (n=17) dos isolados foram positivos (FIGURA 16A e 16B). Fenotipicamente, 39,2% (n=20) apresentaram resistência ao antimicrobiano oxacilina e 3,9% (n=2) resistência intermediária, totalizando 43,1% (n=22). Apenas 7,8% (n=4) apresentaram resistência ao antimicrobiano cefoxitina. Todas as cepas de *Staphylococcus* spp. analisadas referem-se a *Staphylococcus Coagulase Negativa* (CONS).



**FIGURA 16 (A e B):** Gel de agarose 1% resultante da eletroforese de produtos de amplificação de PCR para genes de *Staphylococcus* spp. resistentes a Meticilina: *mecA*. M: marcador de peso molecular (Ladder 1 kb. Ludwig®); CP: controle positivo *S. aureus* ATCC 33591; CN: controle negativo; 5, 22, 29, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53 e 54: amostras positivas para o gene *mecA*; 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 e 40: amostras negativas.

Comparativamente, foi observado maior número de cepas de *Staphylococcus* spp. com resistência fenotípica à meticilina/oxacilina ( $n=22$ ), do que cepas com a presença genotípica do gene *mecA* ( $n=17$ ). A discrepância no que se refere às cinco cepas, identificadas como *S. warneri* (T1/P1; T1/P2), *S. epidermidis* (T2/P1), *S. lentus* (T8/P1) e *S. sciuri* (T3/P4), estão caracterizadas como amostras 18, 25, 19, 23 (FIGURA 16A) e 33 (FIGURA 16B) no gel de agarose, respectivamente.

Um fato a ser considerado de acordo com Hryniewicz e Garbacz (2017), cepas bacterianas definidas como BORSA (*Borderline Methicillin-resistant S. aureus*) apresentam resistência à penicilinase, com MICs de oxacilina igual a 1-8  $\mu\text{g/ml}$  e, ao contrário de cepas MRSA, não possuem uma proteína de ligação à penicilina alterada, PBP2a, codificada pelo gene *mecA* ou *mecC*. *Staphylococcus Coagulase Negativa* podem apresentar-se igualmente às cepas *S. aureus* MRSA, MSSA e BORSA, sendo relatadas como *Methicillin-resistant Coagulase-Negative Staphylococci* (MRCONS) e MSCONS. Assim sendo, consideramos as cinco cepas citadas nesse estudo semelhantes às cepas BORSA, no entanto tratando-se de *Borderline Methicillin-resistant Staphylococcus Coagulase Negativa* (ENRIGHT et al., 2002; HYRNIIEWICZ & GARBACZ, 2017).

A resistência a Oxacilina em *Staphylococcus* spp. é heterogênea, conferida principalmente pelo gene *mecA*, correlacionado à baixa afinidade deste

antimicrobiano para proteína PBP2a. Um segundo mecanismo de resistência, independente do gene *mecA*, é o fenótipo denominado “borderline” promovido pela hiperprodução de beta-lactamases (MARTINEAU et al., 2000). Um terceiro mecanismo de resistência descrito é a alteração de outras PBPs (PETERSEN et al., 2002; PETINAKI et al., 2001).

Em contrapartida, *S. xylosus* (T2/P0) apresentou-se suscetível a oxacilina no teste fenotípico, porém positivo para o gene de resistência a meticilina/oxacilina *mecA* quando testada genotipicamente.

*Staphylococcus warneri*, (amostra 22) apresentou resistência intermediária para oxacilina e positivou para a amplificação do gene *mecA*. Similarmente, amostras identificadas pelo número 41 ao 54 (Figura 16B), sendo estas identificadas como: *S. lugdunensis* (n=5), *S. warneri* (n=3), *S. xylosus* (n=3), *S. haemolyticus* (n=1), *S. epidermidis* (n=1) e *S. lentus* (n=1) apresentaram resistência fenotípica ao antimicrobiano oxacilina e positivas para amplificação do gene *mecA* de resistência à meticilina/oxacilina quando submetidos à técnica de PCR. Assim, são relatadas no presente estudo como *methicillin-resistant Coagulase-Negative Staphylococci* (MRCONS).

Similarmente às cepas MRCONS mencionadas no presente estudo, Hammad e colaboradores (2012), ao examinarem amostras de Salmão *Salmo salar* (sashimi) para consumo, identificaram cinco cepas MRSA e cinco cepas MRCONS: *S. aureus* (n=5), *S. haemolyticus* (n=2), *S. warneri* (n=2) e *S. pasteurii* (n=1). Dezesesseis restaurantes japoneses localizados em Salvador, no Brasil, também submetidos a avaliação microbiológica de sashimis, apresentam cepas de *S. aureus* em 72,5% das amostras e 38,8% apresentaram-se contaminadas por cepas MRSA. Ainda o perfil de resistência foi maior para os antimicrobianos penicilina (65,5%) e tetraciclina (22,5%) (CARVALHO et al., 2020), reforçando a prevalência de resistência aos antibióticos da classe beta-lactâmicos e tetraciclinas na piscicultura, também observada no presente estudo.

Cepas MRSA E MRCONS representam um importante problema de saúde pública. Ainda, a transmissão horizontal do gene *mecA* de MRCONS para *S. aureus* é um evento comum (WIELDERS et al, 2001). Aproximadamente 49,5% dos *S. aureus* obtidos de onze pisciculturas na Malásia apresentaram-se como cepas MRSA em tilápias *Oreochromis niloticus* cultivadas em gaiolas (ATYAH et al., 2010).

Embora as cepas MRCONS deste estudo tenham sido isoladas no conteúdo intestinal de trutas arco-íris, há de se considerar que na evisceração e manipulação desta espécie, pode ocorrer contaminação cruzada, e contaminar os alimentos posteriormente consumidos, afetando diretamente a segurança alimentar daqueles que o ingerem. Cepas MRSA já foram envolvidas em surtos de intoxicações alimentares (JONES et al., 2002).

As demais cepas testadas apresentaram-se negativas quanto à amplificação do gene *mecA* e suscetíveis a oxacilina fenotipicamente. Desta forma foram classificadas como MCONS (*Staphylococcus Coagulase Negativa* suscetíveis à meticilina), ao contrário daquelas denominadas cepas resistentes à droga, conhecidas como MRSA ou MRCONS (AIRES-DE-SOUSA et al., 2007).

A relação das cepas do gênero *Staphylococcus* spp. identificadas e submetidas à análise de presença do gene *mecA*, sua origem, respectiva resistência aos antimicrobianos oxacilina e cefoxitina e pesquisa de enterotoxinas A, C e D referentes ao tópico posterior à análise molecular encontram-se na Tabela 13.

**TABELA 13:** Relação de cepas identificadas do gênero *Staphylococcus* spp. associada à sua origem, perfil de suscetibilidade fenotípica aos antimicrobianos oxacilina, cefoxitina, presença do gene *mecA* e enterotoxinas *sea*, *sec* e *sed*.

| Identificação         | Origem | Perfil de suscetibilidade a Oxacilina | Perfil de suscetibilidade a Cefoxitina | Pesquisa do gene <i>mecA</i> | Pesquisa de enterotoxinas |            |            |
|-----------------------|--------|---------------------------------------|--|------------------------------|---------------------------|------------|------------|
|                       |        |                                       |  |                              | <i>sea</i>                | <i>sec</i> | <i>sed</i> |
| <i>S. lentus</i>      | T1/P0  | S                                     | S                                      | -                            | +                         | -          | -          |
| <i>S. lugdunensis</i> | T1/PO  | S                                     | S                                      | -                            | +                         | -          | -          |
| <i>S. xylosus</i>     | T2/P0  | S                                     | S                                      | +                            | +                         | -          | -          |
| <i>S. sciuri</i>      | T3/P0  | S                                     | S                                      | -                            | +                         | -          | -          |
| <i>S. sciuri</i>      | T3/P0  | S                                     | S                                      | -                            | +                         | -          | -          |
| <i>S. sciuri</i>      | T4/P0  | S                                     | S                                      | -                            | +                         | -          | -          |
| <i>S. epidermidis</i> | T5/P0  | S                                     | S                                      | -                            | +                         | -          | -          |
| <i>S. epidermidis</i> | T6/P0  | S                                     | S                                      | -                            | +                         | -          | -          |
| <i>S. xylosus</i>     | T7/PO  | S                                     | S                                      | -                            | +                         | -          | -          |
| <i>S. xylosus</i>     | T8/P0  | S                                     | S                                      | -                            | +                         | -          | +          |
| <i>S. epidermidis</i> | T9/P0  | S                                     | S                                      | -                            | +                         | +          | -          |
| <i>S. epidermidis</i> | T10/P0 | S                                     | S                                      | -                            | +                         | +          | -          |
| <i>S. warneri</i>     | T10/P0 | S                                     | S                                      | -                            | +                         | +          | -          |
| <i>S. warneri</i>     | T8/P0  | S                                     | S                                      | -                            | +                         | -          | -          |
| <i>S. warneri</i>     | T7/P1  | S                                     | S                                      | -                            | +                         | -          | -          |
| <i>S. warneri</i>     | T1/P1  | R                                     | R                                      | -                            | +                         | -          | -          |
| <i>S. epidermidis</i> | T2/P1  | R                                     | R                                      | -                            | +                         | +          | -          |

|                        |        |   |   |   |   |   |   |
|------------------------|--------|---|---|---|---|---|---|
| <i>S. warneri</i>      | T4/P1  | S | S | - | + | + | - |
| <i>S. xylosus</i>      | T6/P1  | S | S | - | + | - | - |
| <i>S. warneri</i>      | T7/P1  | I | S | + | + | - | - |
| <i>S. lentus</i>       | T8/P1  | R | S | - | + | - | - |
| <i>S. sciuri</i>       | T3/P2  | S | S | - | + | - | + |
| <i>S. warneri</i>      | T1/P2  | R | S | - | + | - | - |
| <i>S. warneri</i>      | T2/P2  | S | S | - | + | - | - |
| <i>S. warneri</i>      | T7/P2  | S | S | - | + | - | - |
| <i>S. warneri</i>      | T1/P3  | S | S | - | + | - | + |
| <i>S. xylosus</i>      | T8/P4  | I | S | + | + | - | - |
| <i>S. sciuri</i>       | T1/P4  | S | S | - | - | - | - |
| <i>S. sciuri</i>       | T2/P4  | S | S | - | + | - | - |
| <i>S. warneri</i>      | T4/P4  | S | S | - | + | - | - |
| <i>S. sciuri</i>       | T3/P4  | R | S | - | + | - | - |
| <i>S. sciuri</i>       | T5/P4  | S | S | - | + | - | - |
| <i>S. sciuri</i>       | T5/P4  | S | S | - | + | - | - |
| <i>S. sciuri</i>       | T6/P4  | S | S | - | + | - | + |
| <i>S. sciuri</i>       | P2/TQ  | S | S | - | + | - | - |
| <i>S. xylosus</i>      | T9/P4  | S | S | - | + | - | - |
| <i>S. xylosus</i>      | T10/P4 | S | S | - | + | - | - |
| <i>S. xylosus</i>      | T3/P4  | S | S | - | + | - | - |
| <i>S. lugdunensis</i>  | T4/P2  | R | S | + | + | - | + |
| <i>S. lugdunensis</i>  | T6/P2  | R | S | + | + | - | - |
| <i>S. warneri</i>      | T8/P2  | R | S | + | + | - | - |
| <i>S. xylosus</i>      | T5/P2  | R | S | + | + | - | - |
| <i>S. haemolyticus</i> | T5/P2  | R | S | + | + | - | - |
| <i>S. xylosus</i>      | T7/P2  | R | R | + | + | - | - |
| <i>S. warneri</i>      | T9/P3  | R | S | + | + | - | + |
| <i>S. lugdunensis</i>  | T10/P3 | R | S | + | + | - | + |
| <i>S. epidermidis</i>  | T1/P3  | R | S | + | + | - | - |
| <i>S. lentus</i>       | T9/P3  | R | S | + | + | - | - |
| <i>S. lugdunensis</i>  | T7/P3  | R | S | + | + | - | - |
| <i>S. lugdunensis</i>  | T8/P3  | R | S | + | + | - | - |
| <i>S. xylosus</i>      | T7/P4  | R | S | + | + | - | - |
| <i>S. warneri</i>      | T1/P1  | R | R | + | + | - | - |

T= Truta variando de 1 a 10; P0= Truticultura de Itamonte-MG; P1= Truticultura Samadhi de Teresópolis-RJ; P2= Truticultura Arco-íris de Nova Friburgo-RJ; P3=Truticultura Truta do Vale de Nova Friburgo-RJ; P4= Truticultura do Vascão de Nova Friburgo-RJ; R= Resistente; I= Resistência Intermediária; S=Sensível.

*Staphylococcus Coagulase Negativa*, por muito tempo considerado somente comensais da pele, vem sendo considerados como patógenos emergentes reconhecidos como causadores de diversos processos infecciosos. Mesmo

apresentando-se menos virulentos que *S. aureus*, podem causar infecções consideráveis (SIMOJOKI et al., 2012). E conforme relatado por diversos autores, cepas CONS podem agir como reservatório de genes de resistência para *S. aureus*, e através da transferência, disseminar a resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos e gerar impactos negativos na saúde pública (QUINN et al., 2011; WIELDERS et al., 2001).

A transferência horizontal de genes (HGT) é a transmissão de fragmentos de informações genéticas de diversas histórias evolutivas entre organismos por meio de herança horizontal. Este processo pode trazer novos genes e genótipos de diferentes linhagens em um genoma levando ao surgimento de novos clones patogênicos, e é um mecanismo de inovação fenotípica, como variações na adaptação ambiental e resistência a antibióticos, incluindo a disseminação de genes que codificam o fator de virulência (RAVENHALL et al., 2015). Além disso, tecnologia como a montagem de novo genoma microbiano foi usada para caracterizar a troca de fatores de virulência entre diferentes espécies e cepas, como a troca de toxina citolítica entre a sequência de *S. aureus* tipo 22 e o sorotipo O104: H4.17 de *E. coli* (DENG et al., 2019; MEL & MEKALANOS, 1996; MEMISEVIĆ et al., 2013; GILCHRIST et al., 2015).

Dessa maneira, é fundamental o monitoramento contínuo e implementação de estratégias de controle, visando o uso racional de antimicrobianos na piscicultura, o perfil de resistência de cada região, principalmente quando há ocorrência de infecções bacterianas no cultivo e desse modo, minimizar a contaminação de *O. mykiss* com cepas resistentes a meticilina/oxacilina.

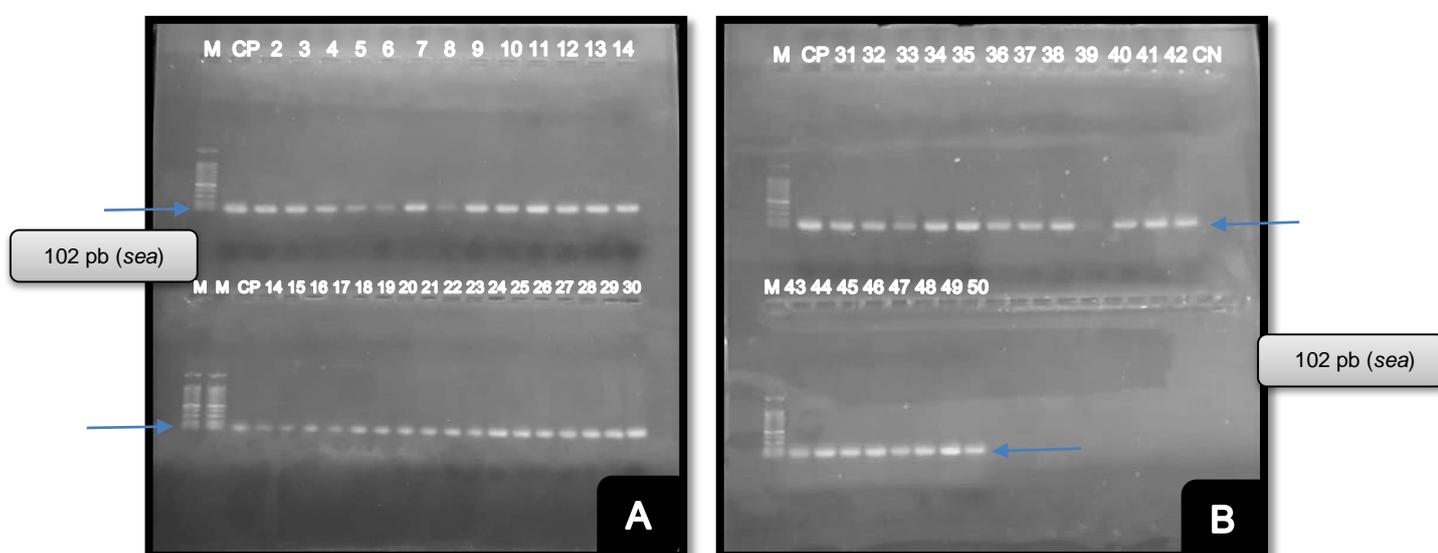
## **6.7.2 Detecção de fatores de patogenicidade**

### 6.7.2.1 Enterotoxinas produzidas por cepas do gênero *Staphylococcus*

#### 6.7.2.1.1 Enterotoxina A

Dos 51 isolados de *Staphylococcus* spp. submetidos à técnica de PCR para pesquisa da enterotoxina A, 98,0% (n=50) apresentaram-se positivos na detecção do gene *sea* e um isolado (2,0%) identificado como *S. sciuri* (T1/P4) apresentou-se negativo. As respectivas amostras amplificadas no gel de agarose estão apresentadas nas Figuras 17A e 17B.

Cepas enterotoxigênicas em peixes já foram relatadas por Saito e colaboradores (2011), nas quais foram identificadas 91 cepas de *S. aureus* em 550 amostras de peixes crus vendidos no Mercado japonês e 48,4% delas possuíam o gene *sea*. A Enterotoxina A é a toxina mais frequentemente associada às intoxicações alimentares causadas por *Staphylococcus* spp. nas quais cepas MRSA também são envolvidas (FORSYTHE, 2013; JONES et al., 2002) e entre cepas hospitalares de humanos, o perfil de multirresistência aos antibióticos em *S. aureus* observou-se a correlação com sua patogenicidade (ORTEGA et. al., 2010).



**FIGURA 17 (A e B):** Gel de agarose 1% resultante da eletroforese de produtos de amplificação de PCR para genes de *Staphylococcus* spp. produtores de enterotoxina A: *sea*. M: marcador de peso molecular (Ladder 100 kb. Ludwig®); CP: controle positivo *S. aureus* ATCC 13565; CN: controle negativo; 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 e 50: amostras positivas para o gene *sea*; 39: amostra negativa.

Das 50 amostras de *Staphylococcus* spp. positivas para enterotoxina A, 15 delas (30%) apresentaram-se concomitantemente o gene de resistência à meticilina/oxacilina *mecA* (Tabela 13).

A prevalência de cepas CONS com genes *mecA* de resistência a meticilina/oxacilina caracterizadas como MRSA e enterotoxinas A indica um potencial risco de doenças transmitidas por alimentos, denominadas como DTAs, se disseminando no trato gastrointestinal da comunidade, com sintomatologia clínica e impacto negativo na saúde pública.

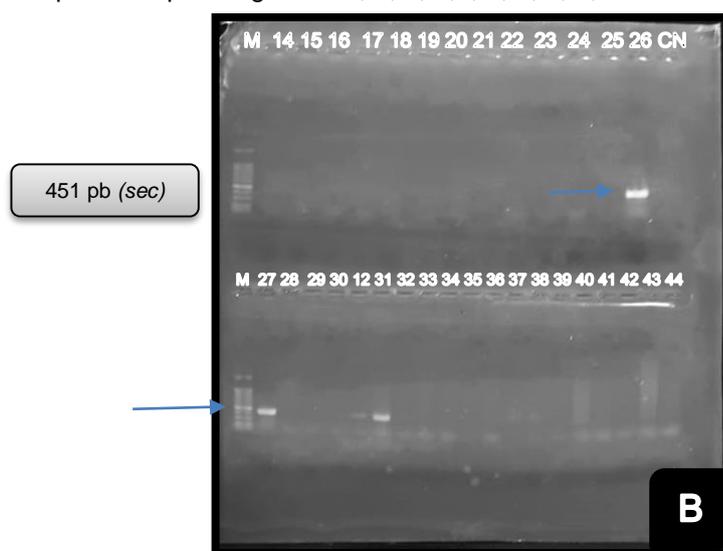
### 6.7.2.1.2 Enterotoxina C

Dos 51 isolados de *Staphylococcus* spp. (n=51), 9,8% (n=5) apresentaram-se positivos quanto à amplificação do gene *sec* referente a produção de enterotoxina C e 90,2% (n=46) apresentaram-se negativos para o gene, conforme apresentados nas Figuras 18A e 18B. Todas as cepas positivas para enterotoxina C apresentaram concomitantemente a amplificação do gene de enterotoxina A, potencializando o sua capacidade enterotoxigênica em causar toxinfecções alimentares (ORTEGA et al., 2010) (Tabela 13).

Espécimes aquáticas como *O. mykiss* são reservatórios para cepas enterotoxigênicas como *Staphylococcus* spp. e constituem riscos à saúde pública, conforme já relatado em outras espécies de peixes por Hussein e colaboradores (2019).



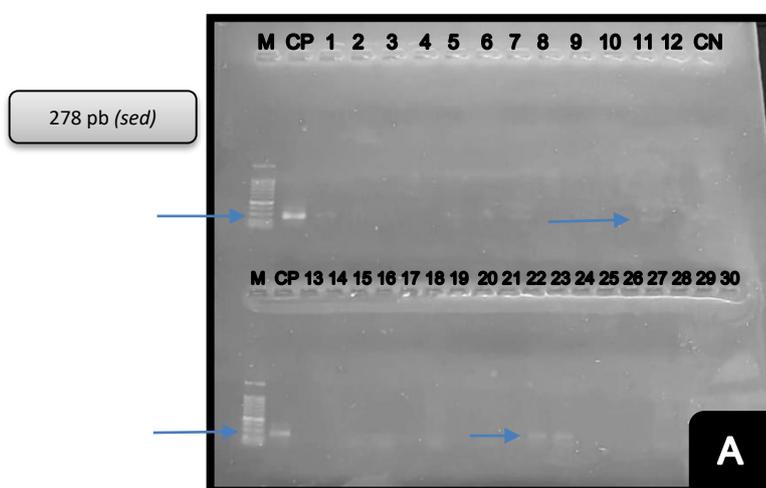
**FIGURA 18 (A):** Gel de agarose 1% resultante da eletroforese de produtos de amplificação de PCR para genes de *Staphylococcus* spp. produtores de enterotoxina C: *sec*. M: marcador de peso molecular elisa (Ladder 100 kb. Ludwig®); CP: controle positivo *S. aureus* ATCC 19095; CN: controle negativo; 11 e 13: amostras positivas para o gene *sec*; 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 12: amostras negativas.



**FIGURA 18 (B):** Gel de agarose 1% resultante da eletroforese de produtos de amplificação de PCR para genes de *Staphylococcus* spp. produtores de enterotoxina C: *sec*. M: marcador de peso molecular (Ladder 100 pb. Ludwig®); CP: controle positivo *S. aureus* ATCC 19095; CN: controle negativo; 26, 27 e 31: amostras positivas para o gene *sec*; 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 28, 29, 30, 12, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 e 44: amostras negativas.

### 6.7.2.1.3 Enterotoxina D

Dos 51 isolados de *Staphylococcus* spp., 13,7% (n=7) apresentaram-se positivos quanto à presença do gene *sed* referente a produção de enterotoxina D e 86,3% (n=44) apresentaram-se negativos para o gene, descritos nas Figuras 19A e 19B. Foi observado que quatro cepas identificadas como *S. xylosus* (n=1), *S. sciuri* (n=2) e *S. warneri* (n=1) apresentaram também o gene *sea* de enterotoxina A. Ainda, três cepas identificadas como *S. warneri* (n=1) e *S. lugdunensis* (n=2) apresentaram concomitantemente o gene *sed* da enterotoxina D, gene *sea* da enterotoxina A e o gene *mecA* denominando-se cepas MRSA (Tabela 13).



**FIGURA 19 (A):** Gel de agarose 1% resultante da eletroforese de produtos de amplificação de PCR para genes de *Staphylococcus* spp. produtores de enterotoxina D: *sed*. M: marcador de peso molecular (Ladder 100 pb. Ludwig®); CP: controle positivo *S. aureus* ATCC 23235; CN: controle negativo; 1, 11, 22 e 23: amostras positivas para o gene *sed*; 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 25, 26, 27, 28, 29 e 30: amostras negativas.



**FIGURA 19 (B):** Gel de agarose 1% resultante da eletroforese de produtos de amplificação de PCR para genes de *Staphylococcus* spp. produtores de enterotoxina D: *sed*. M: marcador de peso molecular (Ladder 100 pb. Ludwig®); CP: controle positivo *S. aureus* ATCC 23235; CN: controle negativo; 31, 33 e 34: amostras positivas para o gene *sed*; 32, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41 e 42: amostras negativas.

Hammad e colaboradores (2012) identificaram em amostras de sashimi genes que codificam as enterotoxinas estafilocócicas sendo estas *seb*, *sed* e gene *tsst* da toxina da síndrome do choque tóxico em 14,2% dos *S. aureus* isolados. Já o estudo realizado por Arslan e Özdemir (2017), 12,5% dos peixes de água doce e 9,1% dos peixes da água do mar analisados carregavam os genes *sed* de enterotoxina estafilocócica, não sendo detectada outros genes como *seb*, *sec*, *tsst* e *mecA*.

Considerando o percentual de cepas produtoras de enterotoxinas estafilocócicas A, C e D identificadas neste estudo e observado o potencial de associação das cepas enterotoxigênicas e cepas MRCONS resistentes à meticilina/oxacilina, é importante considerar o risco de DTAs. Desse modo, os resultados do presente estudo são preocupantes, visto que cepas enterotoxigênicas e MRCONS podem atuar na contaminação cruzada e interferir na segurança alimentar causando intoxicações alimentares, sendo necessário o monitoramento e boas práticas na produção e na manipulação destes animais após o abate.

Ainda, cepas enterotoxigênicas e MRCONS são consideradas como provável veículo de transmissão de cepas de *Staphylococcus* spp. multirresistentes e toxigênicos para humanos e outros animais.

## 7 CONCLUSÃO

- Espécimes bacterianas pertencentes aos filos Proteobacteria, Firmicutes e Actinobacteria foram isolados no conteúdo intestinal de *O. mykiss*; filos Proteobacteria e Firmicutes em amostras do ambiente aquático;
- Embora não tenha ocorrido qualquer epizootia durante o período do estudo e as trutas arco-íris analisadas apresentavam-se clinicamente saudáveis, foram amostradas espécimes bacterianas com elevados perfis de resistência ou multirresistência que podem levar à quadros patogênicos quando *O. mykiss* submetidos à estresse e/ou imunossupressão, atuando como patógenos oportunistas em espécies aquáticas e em espécies não alvos.
- Foi observado que 65,3% (n=79) das bactérias Gram-negativas e 82,2% (n=83) Gram-positivas apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano e o perfil de multirresistência foi observado em 7,4% (n=9) e 36,6% (n=37), respectivamente. Em ambos os grupos, observou-se maiores percentuais de resistência aos antibióticos da classe beta-lactâmicos;
- A classe de antibióticos tetraciclina apresentou consideráveis percentuais de resistência nos microrganismos Gram-positivos; E o antibiótico florfenicol apresentou alta sensibilidade; Quando analisados para bactérias Gram-negativas, ambos apresentaram o mesmo percentual de resistência (5%);
- As truticulturas estudadas apresentaram similaridade quanto às características das amostras ambientais, isolados bacterianos gram-negativos, gram-positivos e ao perfil de resistência aos antimicrobianos;
- A presença de cepas *Staphylococcus* spp. produtores de enterotoxinas e carregadores do gene *mecA* dos animais estudados são de grande importância para a saúde pública, sendo o primeiro relato em conteúdo intestinal desta espécie animal na região alvo de estudo, como provável veículo de transmissão de *Staphylococcus* spp. multirresistentes e enterotoxigênicos para humanos e outros animais com impactos negativos na saúde pública.

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O clima, a constante renovação de água dos tanques e manejo adotado pelos produtores da região serrana do estado do Rio de Janeiro permitem a criação de um ambiente favorável para o crescimento de trutas arco-íris, sem intercorrências. A região serrana possui potencial para ampla produção de trutas arco-íris, ademais sua alta adaptação. Assim, incentivos aos produtores devem ser realizados para reativarem seus trutários, de modo a alavancar a região como referência novamente.

Deve-se utilizar preferencialmente o anfenicol florfenicol nas truticulturas quando for necessário, visto que este apresentou alta sensibilidade frente às espécies bacterianas Gram-negativas e Gram-positivas.

Não obstante, cepas MRCONS deste estudo tenham sido isoladas no conteúdo intestinal de trutas arco-íris, há de se considerar que na evisceração e manipulação desta espécie, pode ocorrer contaminação cruzada, e contaminar os alimentos posteriormente consumidos, afetando diretamente a segurança alimentar daqueles que o ingerem. Considerando doenças transmitidas por alimentos (DTAs), cepas enterotoxigênicas também indicam um potencial risco de disseminação no trato gastrointestinal da comunidade, com sintomatologia clínica e impacto negativo na saúde pública.

Dessa maneira, é fundamental o monitoramento contínuo e implementação de estratégias de controle, visando o uso racional de antimicrobianos na piscicultura, a análise do perfil de resistência de cada região, principalmente quando há ocorrência de infecções bacterianas no cultivo e desse modo, minimizar a contaminação de *O. mykiss* com cepas multirresistentes aos antimicrobianos, resistentes à meticilina e cepas enterotoxigênicas.

Os dados obtidos não devem ser negligenciados, visto que o monitoramento do status sanitário da produção de *O. mykiss* é fundamental e o conhecimento da microbiota intestinal permite analisar juntamente o ambiente aquático.

Estudos mais amplos que envolvam outros índices epidemiológicos e biologia molecular devem ser acrescentados para análise da microbiota intestinal de *O. mykiss* e o real quadro sanitário das truticulturas da região serrana do estado do Rio de Janeiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABID, A.; DAVIES, S. J.; WAINES, P.; EMERY, M.; CASTEX, M.; GIOACCHINI, G.; CARNEVALI, O.; BICKERDIKE, R.; ROMERO, J.; MERRIFIELD, D. L. Dietary synbiotic application modulates Atlantic salmon (*Salmo salar*) intestinal microbial communities and intestinal immunity. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 35, n. 6, p. 1948-1956, 2013.

ACOSTA, A. C.; COSTA, M.M.; PINHEIRO JUNIOR, J. W.; MOTA, R. A. Fatores de virulência de *Staphylococcus aureus* - Revisão. **Medicina Veterinária (UFRPE)**, Recife, v. 11, n. 4, p. 252-269, 2017.

AIRES-DE-SOUZA, M., PARENTE, C.E.S.R., VIEIRA-DA-MOTTA, O., BONNA, I.C.F., SILVA, D.A. da, LENCASTRE, H. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from buffalo, bovine, ovine, and milk samples from Rio de Janeiro State, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 3845-3849, 2007.

ALEXANDRINO, A. C.; OKUMURA, M. P. M.; BALDASSI, L.; TABATA, Y. A.; DE-PAULI, A. O. S.; DE-ARAUJO, A. P.; ROSA, M. B. OCORRÊNCIA DE INFECÇÃO POR *Edwardsiella tarda* EM TRUTA ARCO-IRIS (*Oncorhynchus mykiss*) EM CULTIVO INTENSIVO. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 25 (único): p. 121-123, 1999.

ALTINOK, I.; KAYIS, S.; CAPKIN, E. *Pseudomonas putida* infection in rainbow trout. **Aquaculture**, v. 261, n. 1, p. 850-855, 2006.

ALTINOK, I.; KAYIS, S.; CAPKIN, E.; BALTA, F. Bacteria in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) in the Southern Black Sea Region of Turkey - A Survey. **The Israeli journal of aquaculture = Bamidgeh**, v. 61, n. 4, p. 339-344, 2009.

ALTUN, S.; DUMAN, M.; BUYUKEKIZ, A. G.; OZYGIT, M.; KARATAS, S.; TURGAY, E. Isolation of *Citrobacter braakii* from Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). **The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh**, 7p., 2013.

ÁLVAREZ, R. J. D.; AGURTO, C. P.; ÁLVAREZ, A. M. Y OBREGÓN, J. Resistência antimicrobiana en bacterias aisladas de tilápias, agua y sedimento em Venezuela. **Laboratorio de Microbiología de Peces y Crustáceos**, INIA - CENIAP, v. XIV, n. 6, 2004.

AMARANTE, J. F.; KOLLING, L.; FERRONATO, A. I.; VARGAS, A. C.; COSTA, M. M.; AMARANTE, T. A. B. Resistência aos antimicrobianos de bacterias obtidas de carpas (*Cyprinus carpio*) cultivadas em sistema semi-intensivo. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 19, p. 1-7, 2018.

ANTUNES, P.; CAMPOS, J.; MOURÃO, J.; PEREIRA, J.; NOVAIS, C.; PEIXE, L. Inflow water is a major source of trout farming contamination with *Salmonella* and multidrug resistant bacteria. **Science of The Total Environment**, v. 642, p. 1163-1171, 2018.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos – **VE-DTA**. 2014. Disponível em: <<http://www.portal.saude.gov.br>>. Acesso em: 20 mai., 2021.

ARAÚJO, C.; MUÑOZ-ATIENZA, E.; HERNÁNDEZ, P. E.; HERRANZ, C.; CINTAS, L. M.; IGREJAS, G.; POETA, P. Evaluation of *Enterococcus spp.* from Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum), Feed, and Rearing Environment Against Fish Pathogens. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 12, n. 4, p. 1-12, 2015.

ARAÚJO, R.V. de; VIVEIROS, A. T. M.; TABATA, Y. A.; CÉSAR, M. P. Manejo reprodutivo da truta arco-íris em cativeiro. Lavras: UFLA, 2006. Ano XII, n. 131. **Boletim técnico**.

ARIAS, M. V. B.; CARRILHO, C. M. D. M. Antimicrobial resistance in animals and in human being. The is reason for concern? **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 2, p. 775-790, 2012.

ARSLAN, S.; ÖZDEMİR, F. Molecular characterization and detection of enterotoxins, methicillin resistance genes and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* from fish and ground beef. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 20, n. 1, p. 85-94, 2017.

ATYAH, M.A.S.; ZAMRI-SAAD, M.; SITI-ZAHRAH, A. First report of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from cage-cultured tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Veterinary Microbiology**, v. 144, p. 502-504, 2010.

AUSTIN, B.; AUSTIN, D. A. *Aeromonadaceae* representatives (*Motile Aeromonas*). Bacterial fish pathogens Disease of Farmed and Wild Fish. Edinburgh, UK: **Springer Praxis Books**, p.161-214, 2016a.

AUSTIN, B.; AUSTIN, D. A. Bacterial fish pathogens, disease of farmed and wild fish. Sixth Edit ed. [s.l.] **Springer International Publishing Switzerland**, 2016b.

AUSTIN, B. & AUSTIN, D. A. Bacterial fish pathogens. Diseases of farmed and wild fish, 4th edn. **Praxis Publishing**, Chichester, 2007.

BALCAZAR, J. L.; VENDRELL, D.; BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; MUZQUIZ, J. L. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. **Aquaculture**, v. 278, n. 1-4, p. 188-191, 2008.

BARIE, P. S. Multidrug-resistant organisms and antibiotic management. **Surgical Clinics North America**, v. 92, n. 2, p. 345-391, 2012.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.

BECKER, K., HEILMANN, C., PETERS, G. *Coagulase-Negative Staphylococci*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 4, p. 870-926, 2014.

BEKKER, A.; HUGO, C.; ALBERTYN, J.; BOUCHER, C. E.; BRAGG, R. R. Pathogenic Gram-positive cocci in South African rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Journal of Fish Diseases**, v. 34, n. 6, p. 483–487, 2011.

BISSETT, A.; BOWMAN, J.; BURKE, C. Bacterial diversity in organically-enriched fish farm sediments. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 55, n. 15, p. 48-56, 2006.

BLAIR, J. M. A.; WEBBER, M. A.; BAYLAY, A. J.; OGBOLU, B. O.; PIDDOCK, L. J. V. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews**, v. 13, n. 1, p. 42-51, 2014.

BOUDEWIJNS, M.; VANDEVEN, J.; VERHAEGEN, J. Vitek 2 automated identification system and *Kocuria kristinae*. **Journal Clinical Microbiology**, v. 43, n. 5832, 2005.

BOXALL, A. B. A.; KOLPIN, D. W.; HALLING-SORENSEN, B.; TOLLS, J. Are veterinary medicines causing environmental risks? **Environmental Science & Technology**, v. 37, n. 15, p. 286- 294, 2003.

BRANDÃO, M. L. L.; UMEDA, N. S.; FILIPPIS, I. *Cronobacter* spp.: infections, occurrence and food regulations – a review in Brazil. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, e2017074, p.1-9, 2018.

BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T.; GARRITY, G. M.; BRENNER, D. J.; VOS, P. De; GARRITY, G. M.; GOODFELLOW, M.; NOEL, R. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Proteobacteria, The Gammaproteobacteria*. Second Edition. [s.l.] **Springer**, 2005.

BUJÁN, N.; TORANZO, A. E.; MAGARIÑOS, B. *Edwardsiella piscicida*: a significant bacterial pathogen of cultured fish. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 131, p. 59-71, 2018.

BULLER, N. B. *Bacteria from fish and other aquatic animals: a practical identification manual*. Australia: **CABI Publishing**, 394 p., 2004.

BUTT, R. L.; VOLKOFF, H. Gut Microbiota and Energy Homeostasis in Fish. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, n. 9, p. 1-12, 2019.

CANTAS, L.; MIDTLYNG, P. J.; SORUM, H. Impact of antibiotic treatments on the expression of the R plasmid *tra* genes and on the host innate immune activity during pRAS1 bearing *Aeromonas hydrophila* infection in zebrafish. **BMC Microbiology**, v. 12, n. 37, p. 1-10, 2012.

CABELLO, F. C.; GODFREY, H. P.; TOMOVA, A.; IVANOVA L.; DÖLZ H.; MILLANAO A.; BUSCHMANN A. H. Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. **Environmental Microbiology**, v. 15, n. 07, p. 1917-1942, 2013.

CALDORIN, M.; ALMEIDA, I. A. Z. C.; PERESI, J. T. M.; ALVES, E. C. A. Ocorrência de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) no Brasil e sua importância em saúde pública. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 10, n. 110, p. 4-20, 2013.

CANTON, R. Antibiotic resistance genes from the environment: a perspective through newly identified antibiotic resistance mechanisms in the clinical setting. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, n. 1, p. 20-25, 2009.

CAPKIN, E.; OZDEMIR, S.; OZTURK, R. C.; ALTINOK, I. Determination and transferability of plasmid-mediated antibiotic resistance genes of the bacteria isolated from rainbow trout. **Aquaculture Research**, p. 1-15, 2017.

CAPKIN, E.; TERZI, E.; ALTINOK, I. Occurrence of antibiotic resistance genes in culturable bacteria isolated from Turkish trout farms and their local aquatic environment. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 114, p. 127-137, 2015.

CARRASCO, E.; MORALES-RUEDA, A.; GARCIA-GIMENO, R. M. Cross-contamination and recontamination by *Salmonella* in foods: A review. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 545-556, 2012.

CARVALHO, J. S.; NETO, A. F. L.; MELO, I. M.; VARJÃO, L. M.; ANDRADE, C. A. N.; XAVIER, D. E.; LEAL, N. C.; ALMEIDA, R. C. C. Occurrence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Ready-to-Eat Raw Fish from Japanese Cuisine Restaurants in Salvador, Brazil **Journal of Food Protection**, v. 83, n. 6, p. 991-995, 2020.

CHAMBERS, E.; GARDINER, R.; PEELER, E. J. An investigation into the prevalence of *Renibacterium salmoninarum* in farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) and wild fish populations in selected river catchments in England and Wales between 1998 and 2000. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 31, n. 2, p. 89-96, 2008.

CHEN, B.; LIN, L.; FANG, L.; YANG, Y.; CHEN, E.; YUAN, K.; ZOU, S.; WANG, X.; LUAN, T. Complex pollution of antibiotic resistance genes due to *beta*-lactam and aminoglycoside use in aquaculture farming, **Water Research**, v.1, n. 134, p. 200-208, 2018.

CHEN, M. H.; HUNG, S. W.; SHYU, C. L.; LIN, C. C.; LIU, P. C.; CHANG, C. H.; SHIA, W. Y.; CHENG, C. F.; LIN, S. L.; TU, C. Y.; LIN, Y. H.; WANG, W. S. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* infection in Bester sturgeon, a cultured hybrid of *Huso huso* X *Acipenser ruthenus*, in Taiwan. **Research in Veterinary Science**, v. 93, p. 581-588, 2012.

CHENIA, H. Y. Prevalence and characterization of plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Aeromonas* spp. isolated from South African freshwater fish. **International Journal of Food Microbiology**, v. 231, p. 26–32, 2016.

CHIDEROLI, R. T.; AMOROSO, N.; MAINARDI, R. M.; SUPHORONSKI, S. A.; DE PADUA, S. B.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A.; MOSELA, M.; MORALEZ, A. T. P.; DE OLIVEIRA, A. G.; ZANOLO, R.; DI SANTIS, G. W.; PEREIRA, U. P. Emergence of a new multidrug-resistant and highly virulent serotype of *Streptococcus agalactiae* in fish farms from Brazil. **Aquaculture**, v. 479, p. 45-51, 2017.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals, Approved Standard – 4<sup>a</sup> ed, 2013.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved standards – 11<sup>a</sup> ed., v. 32, n. 1, 2012.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing. Twenty-first Informational Supplement M100-S21, 2011.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Surveillance for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Principles, Practices, and Challenges, v. 7, 2010.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Nineteenth Informational Supplement Approved Standard M100-S19, 2009.

COLLINS, M. D. The Genus *Gemella*. In: DWORKIN M., FALKOW S., ROSENBERG E., SCHLEIFER K. H., STACKEBRANDT E. (eds) **The Prokaryotes**, Springer, p. 511-518, 2006.

CONAMA - CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Diário Oficial [da] União, Seção 1, p. 58-63, 2005.

COSTA, F. A. A.; LEAL, C. A. G.; FIGUEIREDO, H. C. P. Infecção por *Weissella ceti* em peixes. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, n. 73, p. 57-65, 2014.

COSTA, M. M.; PEIXOTO, M.R.; BOIJINK, L. C.; CASTAGNA, L.; MEURER, F.; VARGAS, C. A. Sensibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de Jundiá (*Rhandia quelen*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 10, p. 477-480, 2008.

DA SILVA, B. C.; MOURIÑO, J. L. P.; VIEIRA, F. N.; JATOBÁ, A.; SEIFFERT, W. Q.; MARTINS, M. L. Haemorrhagic septicaemia in the hybrid surubim (*Pseudoplatystoma*

*corruscans* × *Pseudoplatystoma fasciatum*) caused by *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture Research**, v. 43, n. 6, p. 908–916, 2012.

DAVIN-REGLI, A.; LAVIGNE, J. P.; PAGÈS, J. M. *Enterobacter* spp.: Update on Taxonomy, Clinical Aspects, and Emerging Antimicrobial Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, n. 4, 32 p., 2019.

DECLERCQ, A. M.; HAESEBROUCK, F.; BROECK, W. V.; BOSSIER, P.; DECOSTERE, A. *Columnaris* disease in fish: a review with emphasis on bacterium-host interactions. **Veterinary Research**, v. 44, n. 27, p. 1-17, 2013.

DEHLER, C. E.; SECOMBES, C. J.; MARTIN, A. S. Environmental and physiological factors shape the gut microbiota of Atlantic salmon parr (*Salmo salar* L.). **Aquaculture**, v.467, p. 149-157, 2017.

DELLOVA, D.; FRANÇA, D.; DONATI, G.; CEZÁRIO, G.; MARINI, H.; REAL, J. V.; LINO, J.; PRIEBSCH, K.; ALBUQUERQUE, L.; OLIVEIRA, M.; VIEIRA, R. Anuário PeixeBR da Piscicultura. **Associação Brasileira de Piscicultura**, 148p., 2019.

DENG, Y.; XU, H.; SU, Y.; LIU, S.; XU, L.; GUO, Z.; WU, J.; CHENG, C.; FENG, J. Horizontal gene transfer contributes to virulence and antibiotic resistance of *Vibrio harveyi* 345 based on complete genome sequence analysis. **BMC Genomics**, v. 20, n. 1, 761p., 2019.

DEPARTMENT OF AGRICULTURE & AQUACULTURE. **FEASIBILITY ASSESSMENT OF FRESHWATER ARCTIC CHAR & RAINBOW TROUT GROW-OUT IN NEW BRUNSWICK**, 2010, 117p. Disponível em: <<https://freshwater-aquaculture.extension.org/wp-content/uploads/2019/08/Feasibility-Assesment-of-Freshwater-Arctic-Char-and-Rainbow-Trout.pdf>>. Acesso em: 30 abr. 2019.

DE SANTANA, E. H. W.; BELOTI, V.; ARAGON-ALEGRO, L. C.; DE MENDONÇA, M. B. O. C. Artigo de revisão. ESTAFILOCOCOS EM ALIMENTOS. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 77, n. 3, p. 545-554, 2010.

DIAS, A. A truta de Nova Friburgo. **Êxito Turismo Rio**, 2017. Disponível em: <<https://exitorio.com.br/ntc,3142,a-truta-de-nova-friburgo.html>>. Acesso em 06 dez. 2019.

DOBIASOVA, H.; KUTILOVA, I.; PIACKOVA, V.; VESELY, T.; CIZEK, A.; DOLEJSKA, M. Ornamental fish as a source of plasmid-mediated quinolone resistance genes and antibiotic resistance plasmids. *Veterinary Microbiology*. **Elsevier**, v. 17, n. 3, p. 413-421, 2014.

DSA - Departamento de Salud Animal. Informe sobre uso de antimicrobianos en la salmonicultura nacional. **SERNAPESCA - Subdirección de acuicultura**, 13p., 2020. Disponível em: <

[http://www.sernapesca.cl/sites/default/files/informe\\_sobre\\_uso\\_de\\_antimicrobianos\\_en\\_la\\_salmonicultura\\_nacional\\_ano\\_2020.pdf](http://www.sernapesca.cl/sites/default/files/informe_sobre_uso_de_antimicrobianos_en_la_salmonicultura_nacional_ano_2020.pdf)>. Acesso em 20 jun. 2021.

DUMAN, M.; SATICIOGLU, I. B.; ALTUN, S. Molecular characterization and antimicrobial resistance profile of fecal contaminants and spoilage bacteria that emerge in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms. **Bioscience of Microbiota, Food and Health**, v. 38, n. 2, p. 41-48, 2019.

DUMAN, M.; SANTICIOGLU, I. B.; BUYUKEKIZ, A. G.; BALTA, F.; ALTUN, S. Molecular Characterization and Antimicrobial Resistance Profile of Atypical *Citrobacter gillenii* and *Citrobacter* sp. isolated from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 10, p. 136-142, 2017.

DUMAN, M.; SATICIOGLU, I. B.; JANDA, J. M.; ALTUN, S. The determination of the infectious status and prevalence of motile *Aeromonas* species isolated from disease cases in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and aquarium fish. **Journal of Fish Diseases**, v. 41, n.12, p.1843-1857, 2018.

EISSA, N.M.E.; EL-GHIET, E.A.; SHAHEEN, A.A.; ABBASS, A. Characterization of *Pseudomonas* Species Isolated from Tilapia "*Oreochromis niloticus*" in Qaroun and Wadi-Ei-Rayan lakes, Egypt. **Global Veterinary Services & Agriculture**, v. 5, n. 2, p. 116-121, 2010.

ENRIGHT, M. C.; ROBINSON, D. A.; RANDLE, G.; FEIL, E. J.; GRUNNDMANN, H.; SPRATT, B. G. The evolutionary history of methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, v. 99, p. 7687-92, 2002.

EVANS, J. J.; KLESIOUS, P. H.; SHOEMAKER, C. A. First isolation and characterization of *Lactococcus garvieae* from Brazilian Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), and pintado, *Pseudoplathystoma corruscans* (Spix & Agassiz). **Journal of Fish Diseases**, v. 32, n. 11, p. 943-951, 2009.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Novo relatório da FAO aponta que produção da pesca e aquicultura no Brasil deve crescer mais de 100% até 2025. Brasil, 2016. Disponível em: <<http://www.fao.org/brasil/noticias/detail-events/pt/c/423722/>>. Acesso em: 30 jun. 2020.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Cultured Aquatic Species Information Programme. *Oncorhynchus mykiss*. Text by Cowx, IG. In: **FAO Fisheries and Aquaculture Department**. Rome, 2011-2014. Disponível em: <[http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oncorhynchus\\_mykiss/en](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oncorhynchus_mykiss/en)>. Acesso em 11 nov. 2019.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO yearbook: fisheries and aquaculture statistics 2007. Rome, p. 24-26, 72p., 2009. Disponível em: <<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/012/i1013t/i1013t.pdf>>. Acesso em 30 mai. 2020.

FAO, OIE, WHO. Antimicrobial Use in Aquaculture and Antimicrobial Resistance. Seoul, Republic of Korea, 2006. Disponível em: <[ftp://ftp.fao.org/ag/agn/food/aquaculture\\_rep\\_13\\_16june2006.pdf](ftp://ftp.fao.org/ag/agn/food/aquaculture_rep_13_16june2006.pdf)>. Acesso em 15 nov. 2019.

FDA. Drugs Approved for Use in Aquaculture, 2021. Disponível em: <<https://www.fda.gov/animal-veterinary/aquaculture/approved-aquaculture-drugs>>. Acesso em 15 abr. 2021.

FISHER, K.; PHILLIP, P. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. **Microbiology**, v. 155, p. 1749-1757, 2009.

FERNANDEZ-ALARCON, C.; MIRANDA, C. D.; SINGER, R. S.; LOPEZ, Y. L.; ROJAS, R.; BELLO H.; DOMINGUEZ, M.; GONZALEZ-ROCHA. Detection of the floR Gene in a Diversity of Florfenicol Resistant Gram-Negative Bacilli from Freshwater Salmon Farms in Chile. **Zoonoses and Public Health**, v. 57, n. 3, p. 181-188, 2010.

FIPERJ. Fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro. Relatório anual 2017. Disponível em: <[http://www.fiperj.rj.gov.br/fiperj\\_imagens/arquivos/revistarelatorios2017.pdf](http://www.fiperj.rj.gov.br/fiperj_imagens/arquivos/revistarelatorios2017.pdf)>. Acesso em 07 jan. 2020.

FJELLHEIM, A.J.; PLAYFOOT, K.J.; SKJERMO, J.; VADSTEIN O. *Vibrionaceae* dominates the microflora antagonistic towards *Listonella anguillarum* in the intestine of cultured Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) larvae. **Aquaculture**, v. 269, n. 1-4, p. 98-106, 2007.

FORSYTHE, S. J. Microbiologia da segurança dos alimentos [recurso eletrônico] / tradução: Andréia Bianchini et al.; revisão técnica: Eduardo Cesar Tondo. 2ª ed., Porto Alegre: **Artmed**, 2013.

FROESE, R., PAULY, D. 2009. FishBase. **World Wide Web electronic publication**. Disponível em: <<http://www.fishbase.org/home.htm>>. Acesso em 12 dez. 2019.

FUKUSHIMA, H. C. S.; LEAL, C. A. G.; CAVALCANTE, R. B.; FIGUEIREDO, H. C. P.; ARIJO, S.; MORIÑIGO, M. A.; ISHIKAWA, M.; BORRA, R. C.; RANZANI-PAIVA, M. J. T. *Lactococcus garvieae* outbreaks in Brazilian farms Lactococcosis in *Pseudoplatystoma* sp. – development of an autogenous vaccine as a control strategy. **Journal of Fish Diseases**, v. 40, n. 2, p. 263-272, 2017.

GALLANI, S. U.; SEBASTIÃO, F. de A.; VALLADÃO, G. M. R.; BOARATTI, A. Z.; PILARSKI, F. Pathogenesis of mixed infection by *Spironucleus* sp. and *Citrobacter freundii* in freshwater angelfish *Pterophyllum scalare*. **Microbial Pathogenesis**, v. 100, p. 119-123, 2016.

GASTALHO, S.; DA SILVA, G. J.; RAMOS, F. Uso de antibióticos em aquacultura e resistência bacteriana: Impacto em saúde pública. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, v. 3, n. 1, p. 27-41, 2014.

GELEV, I.; GELEV, E.; STEIGERWALT, A.G.; CARTER, G. P.; BRENNER, D. J. Identification of the bacterium associated with hemorrhagic septicemia in rainbow trout as *Hafnia alvei*. **Research in Microbiology**, v. 141, n. 5, p. 573-576, 1990.

GILCHRIST, C. A.; TURNER, S. D.; RILEY, M. F.; PETRI-JR, W. A.; HEWLETT, E. L. Whole-genome sequencing in outbreak analysis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 541-563, 2015.

GOLDSMITH, J. R. & SARTOR, R. B. The role of diet on intestinal microbiota metabolism: downstream impacts on host immune function and health, and therapeutic implications. **Journal of Gastroenterology**, v. 49, p. 785-798, 2014.

GOLDSTEIN, R. E. R.; MICALLEF, S. A.; GIBBS, S. G.; DAVIS, J. A., HE, X.; GEORGE, A.; KLEINFELTER, L. M.; SCHREIBER, N. A.; MUKHERJEE S.; SAPKOTA A.; JOSEPH S. W.; SAPKOTA, A. R. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Detected at Four U.S. Wastewater Treatment Plants. **Environmental Health Perspectives**, v. 120, n. 11, p. 1551- 1558, 2012.

GOMES, T. A. T.; ELIAS, W. P.; SCALETSKY, I. C. A.; GUTH, B. C. E.; RODRIGUES, J. F.; PIAZZA, R. M. F.; FERREIRA, L. C. S.; MARTINEZ, M. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 3-30, 2016.

HAMMAD A.M.; WATANABE W.; FUJII T.; SHIMAMOTO T. Occurrence and characteristics of methicillin-resistant and-susceptible *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from Japanese retail ready-to-eat raw fish. **International Journal of Food Microbiology**, v. 156, n. 3, p. 286-289, 2012.

HARDY, R. W. Nutrient requirements and feeding of finish for aquaculture. University of Idaho, USA. **National Fish Hatchery Road**, Hagerman, 2002.

HEDAYATIANFARD, K.; AKHLAGHI, M.; SHARIFIYAZDIS, H. Detection of tetracycline resistance genes in bacteria isolated from fish farms using polymerase chain reaction. **Veterinary Research Forum**, v. 5, n. 4, p. 269-275, 2014.

HERNANDEZ, G. C.; ULLLOA, P. J.; VERGARA, O. J. A.; ESPEJO, T. R.; CABELLO, C. F. *Vibrio parahaemolyticus* infections and algal intoxications as emergent public health problems in Chile. **Revista Médica de Chile**, v. 133, n.9, p. 1081-1088, 2005.

HERRERA, F. C.; SANTOS, J. A.; OTERO, A.; GARCÍA-LÓPEZ, M. L. Occurrence of foodborne pathogenic bacteria in retail prepackaged portions of marine fish in Spain. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, n. 3, p. 527–536, 2006.

HRYNIEWICZ, M. M.; GARBACZ, K. Borderline oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* (BORSA) – a more common problem than expected?. **Journal of Medical Microbiology**, v. 66, p. 1367-1373, 2017.

HOVDA, M. A. Application of PCR and DGGE to characterise the microflora of farmed fish. **University of Bergen**, p.123, 2007.

HUBER, I.; SPANGGAARD, B.; APPEL, K. F.; ROSSEN, L.; NIELSEN, T.; GRAM, L. Phylogenetic analysis and in situ identification of the intestinal microbial community of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, n. 1, p. 117-32, 2004.

HUSSEIN, M. A.; MERWAD, A. M. A.; ELABBASY, M. T.; SUELAM, I. I. A.; ABDELWAHAB, A. M.; TAHA, M. A. Prevalence of Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* and Shiga Toxin Producing *Escherichia coli* in Fish in Egypt: Quality Parameters and Public Health Hazard. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 19, n.4, p. 255-264, 2019.

INGERSLEV, H. C.; GERSDORFF-JORGENSEN, L.; LENZ-STRUBE, M.; LARSEN, N.; DALSGAARD, M.; BOYE, M.; MADSEN, L. The development of the gut microbiota in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is affected by first feeding and diet type. **Aquaculture**, Elsevier, v. 424-425, p. 24-34, 2014.

INGERSLEV, H. C.; BOYE, M.; DALSGAARD, M.; MADSEN, L. Studying the gut microbiota using rainbow trout as a model: the dynamics of the microbiota changes after first feeding. In: **ISME14 (14th International Symposium on Microbial Ecology) – Abstracts**, 2012.

JANDA, J. M. & ABBOTT, S. L. The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, p. 35-73, 2010.

JOKUMSEN A.; SVENDSEN, L. M. Farming of freshwater rainbow trout in Denmark. Charlottenlund: **DTU Aqua-rapport**, n. 219, 47p., 2010.

JONES, T. F.; KELLUM, M. E.; PORTER, S. S.; BELL, M.; SCHAFFNER, W. An outbreak of community-acquired foodborne illness caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, p. 82-84, 2002.

JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; CARROLL, K. C.; LANDRY, M. L.; FUNKE, G.; RICHTER, S. S.; WARNOCK, D. W. **Manual of clinical microbiology**. 11<sup>a</sup> ed. ASM Press, Washington, DC, 2015.

KANDI, V.; PALANGE, P.; VAISH, R.; BHATTI, A. B.; KALE, V.; KANDI, M. R.; BHOOMAGIRI, M. R. Emerging Bacterial Infection: Identification and Clinical Significance of *Kocuria* Species. **Cureus**, v. 8, n. 8, e731, 2016.

KAYAOGU, G.; ORSTAVIK, D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 15, n. 5, p. 308-320, 2004.

KHAN, G.A.; BERGLUND, B.; KHAN, K. M.; LINDGREN, P.E.; FICK, J. Occurrence and Abundance of Antibiotics and Resistance Genes in Rivers, Canal and near Drug Formulation Facilities – A Study in Pakistan. **PLOS ONE**, v. 8, n. 6, p. 4-11, 2013.

KIM, D. H.; BRUNT, J.; AUSTIN B. Microbial diversity of intestinal contents and mucus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 6, p.1654-64, 2007.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN-JUNIOR, W.C. Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido. 5ª ed. Rio de Janeiro: **MEDSI**, p.1465, 2001.

LAZZAROTTO, H.; CARAMASCHI, E. P. Introdução da truta no Brasil e na bacia do Rio Macaé, estado do Rio de Janeiro: Histórico, Legislação e Perspectivas. **Oecologia Brasiliensis**, v. 13, n. 4, p. 649-659, 2009.

LEUNG, K. Y.; WANG, Q.; YANG, Z.; SIAME, B. A. *Edwardsiella piscicida*: A versatile emerging pathogen of fish. **Virulence**, v. 10, n. 1, p. 555–567, 2019.

LIU, X.; STEELE, J. C.; MENG, X. Z. Usage, residue, and human health risk of antibiotics in Chinese aquaculture: A review. **Environmental Pollution**, v. 223, p. 161-169, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2017.01.003>>. Acesso em: 10 abr. 2021.

LOZANO, I.; DÍAZ, N. F.; MUÑOZ, S.; RIQUELME, C. Antibiotics in Chilean Aquaculture: A Review. **Antibiotic Use in Animals**, 21p., 2018.

LOZANO, C.; GHARSA, H.; BEN SLAMA, K.; ZARAZAGA, M.; TORRES, C. *Staphylococcus aureus* in Animals and Food: Methicillin Resistance, Prevalence and Population Structure. **A Review in the African Continent**. *Microorganisms*, v.4, n.12, p.1-19, 2016.

LÜ, A.; HU, X.; ZHENG, L.; ZHU, A.; CAO, C.; JIANG, J. Isolation and characterization of *Citrobacter* spp. from the intestine of grass carp *Ctenopharyngodon idellus*. **Aquaculture**, v. 313, n. 1-4, p. 156-160, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.01.018>>. Acesso em: 15 jun. 2021.

LU, H.; WENG, X.; LI, H.; YIN, Y.; PANG, M.; TANG, Y. *Enterococcus faecium* - related outbreak with molecular evidence of transmission from pigs to humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 913–917, 2002.

MACHADO, T.M.; TABATA, Y.A.; RIGOLINO, M.G. Manejo reprodutivo da truta arco-íris. **Textos Técnicos Instituto de Pesca**, Jun. 2007. Disponível em: [http://www.pesca.sp.gov.br/textos\\_tecnicos.php](http://www.pesca.sp.gov.br/textos_tecnicos.php). Acesso em 20 nov. 2019.

MAGALHÃES, A. L. B.; ANDRADE, R. F.; RATTON, T. F.; BRITO, M. F. G. Ocorrência da truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) (pisces: Salmonidae) no alto rio Aiuruóca e tributários, bacia do rio Grande, Minas Gerais, Brasil. **Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão**, v. 14, p. 33-40, 2002.

MAGIORAKOS, A.P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R.B. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 268-281, 2012.

MAHEUX, A.F.; BOUDREAU, D.K.; BISSON, M.A.; DION-DUPONT, V.; BOUCHARD, S.; NKURANGA, M.; BERGERON, M.G.; RODRIGUEZ, M.J. Molecular method for detection of total coliforms in drinking water samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 14, p. 4074-4084, 2014.

MANSFIELD, G. S.; DESAI, A. R.; NILSON, S. A.; KESSEL, A. G. V.; DREW, M. D.; HILL, J. E. Characterization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestinal microbiota and inflammatory marker gene expression in a recirculating aquaculture system. **Aquaculture**, v. 307, p. 95-104, 2010.

MARTINEAU, F.; PICARD, F. J.; LANSAC, N.; MÉNARD, C.; ROY, P. H.; OUELLETTE, M.; BERGERON, M. G. Correlation between the resistance genotype determined by Multiplex PCR assays and the antibiotic susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 2, p. 231-8, 2000.

MARTINI, C. L.; LANGE, C. C.; BRITO, M. A.; RIBEIRO, J. B.; MENDONÇA, L. C.; VAZ, E. K. Characterisation of penicillin and tetracycline resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk samples in Minas Gerais, Brazil. **The Journal of Dairy Research**, v. 84, n. 2, p. 202-205, 2017.

MARTINEZ, J. L.; COQUE, T. M.; BAQUERO, F. What is a resistance gene? Ranking risk in resistomes. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, p. 116-123, 2015.

MEHROTRA, M.; WANG, G.; JOHNSON, W. N. Multiplex PCR for Detection of Genes for *Staphylococcus aureus*, Enterotoxins, Exfoliative Toxins, Toxic Shock Syndrome Toxin 1, and Methicillin Resistance. **Journal Clinical Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1032-1035, 2000.

MEL S. F.; MEKALANOS, J. J. Modulation of horizontal gene transfer in pathogenic bacteria by in vivo signals. **Cell**, v. 87, n. 5, p. 795-798, 1996.

MEMISEVIĆ, V.; ZAVALJEVSKI, N.; PIEPER, R.; RAJAGOPALA, S. V.; KWON, K.; TOWNSEND, K.; YU, C.; YU, X.; DESHAZER, D.; REIFMAN, J.; WALLQVIST, A. Novel *Burkholderia mallei* virulence factors linked to specific host-pathogen protein interactions. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 12, n. 11, p. 3036-3051, 2013.

MEYBURGH, C. M.; BRAGG, R. R.; BOUCHER, C. E. Detection of virulence factors of South African *Lactococcus garvieae* isolated from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 85, n. 1, p. 1-9, 2018.

MEZZATESTA, M. L.; GONA, F.; STEFANI, S. *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. **Future Microbiology**, v. 7, n. 7, p. 887-902, 2012.

MICHEL, C.; PELLETIER, C.; BOUSSAHA, M.; DOUET, D. G.; LAUTRAITE, A.; TAILLIEZ, P. Diversity of lactic acid bacteria associated with fish and the fish farm environment, established by amplified rRNA gene restriction analysis. **Applied Environmental Microbiology**, v. 73, p. 2947-2955, 2007.

MIMICA, M. J.; MENDES, C. M. F. Diagnóstico laboratorial da resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 6, p. 399-406, 2007.

MPA - MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. Boletim estatístico da Pesca e Aquicultura - Brasil - 2010. Brasília, 2012, 129p. Disponível em: [https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/biblioteca/download/estatistica/est\\_2010\\_nac\\_boletim.pdf](https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/biblioteca/download/estatistica/est_2010_nac_boletim.pdf)>. Acesso em 25 Ago. 2020.

MIRANDA, C. D. Antimicrobial resistance associated with salmonid farming. In: **Antimicrobial Resistance in the Environment**; KEEN, P. L.; MONTFORTS, M. H. H. M.; Eds.; Wiley-Blackwell: Hoboken, NJ, p. 29, 2012.

MIRANDA, C. D.; TELLO, A.; KEEN, P. L. Mechanisms of antimicrobial resistance in finfish aquaculture environments. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, 233p., 2013.

MURRAY, A. G.; MALCOLM HALL, M.; MUNRO, L. A.; WALLACE, I. S. Modelling management strategies for a disease including undetected sub-clinical infection: Bacterial kidney disease in Scottish salmon and trout farms. **Epidemics**, v. 3, p. 171-182, 2011.

MUSHARRAFIEH, R.; TACCHI, L.; TRUJEQUE, J.; LAPATRA, S.; SALINAS, I. *Staphylococcus warneri*, a resident skin commensal of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with pathobiont characteristics. **Veterinary Microbiology**, v. 169, n. 1-2; p. 80-88, 2014.

NAVARRETE, P.; MAGNE, F.; ARANEDA, C.; FUENTES, P.; BARROS, L.; OPAZO, R.; ESPEJO, R.; ROMERO, J. PCR-TTGE analysis of 16S rRNA from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gut microbiota reveals host-specific communities of active bacteria. **PLOS ONE**, v. 7, n. 2, e31335, p. 1-10, 2012.

NAVARRETE P.; MAGNE F.; MARDONES P.; RIVEROS M.; OPAZO R.; SUAU, A.; POCHART, P.; ROMERO, J. Molecular analysis of intestinal microbiota of rainbow

trout (*Oncorhynchus mykiss*). **FEMS Microbiology Ecology**, v. 71, n. 1, p. 148-156, 2010.

NAWAZ, M.; KHAN, A. A.; KHAN, S.; SUNG, K.; STEELE, R. Isolation and characterization of tetracycline-resistant *Citrobacter* spp. from catfish. **Food Microbiology**, v. 25, n. 1, p. 85-91, 2008.

NAYAK, S. K. Role of gastrointestinal microbiota in fish, **Aquaculture Research**, v. 41, p. 1553-1573, 2010.

NEOGEN. Ágar Eosina Azul Metileno Holt – Eosin Methylene Blue Agar. PI7134, Rev 3, mar., 2011. Disponível em: <[https://www.neogen.com/pdf/acumedia\\_pi/7134\\_pt\\_pi.pdf](https://www.neogen.com/pdf/acumedia_pi/7134_pt_pi.pdf)>. Acesso em: 10 jan., 2019.

NIKOLAIDIS, I.; FAVINI-STABILE, S.; DESSEN, A. Resistance to antibiotics targeted to the bacterial cell wall. **Protein Science**, v. 23, n. 3, p. 243-259, 2014.

NOGA, E. J. Fish Disease: Diagnosis and Treatment. 2ª ed., **Wiley Blackwell**: Ames, IA, p. 13-48, p.143-147, p.375-420, 2010.

OH, W. T.; JUN, J. W.; GIRI, S. S.; YUN, S.; KIM, H. J.; KIM, S. G.; KIM, S. W.; HAN, S. J.; KWON, J.; PARK, S. C. *Staphylococcus xylosus* Infection Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) As a Primary Pathogenic Cause of Eye Protusion and Mortality. **Microorganisms**, v. 7, n. 330, p. 1-11, 2019a.

OH, W. T.; KIM, H. H.; JUN, J. W.; GIRI, S. S.; YUN, S.; KIM, H. J.; KIM, S. G.; KIM, S. W.; HAN, S. J.; KWON, J.; PARK, S. C. Genetic Characterization and Pathological Analysis of a Novel Bacterial Pathogen, *Pseudomonas tructae*, in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Microorganisms**, v. 7, n. 432, p. 1-12, 2019b.

OLIVEIRA, M. A.; TAKAMURA, A. E.; ARIAS VIGOYA, A. A.; ARAÚJO, F. E. *Enterobacteriaceae*: Bactérias Intestinalis de Organismos Aquáticos, Um Risco à Saúde Pública – revisão de literatura. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, n. 25, 20p., 2015. Disponível em: <[http://faef.revista.inf.br/imagens\\_arquivos/arquivos\\_destaque/XgAQ9Ni4eqdWmAm\\_2015-11-27-12-23-35.pdf](http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/XgAQ9Ni4eqdWmAm_2015-11-27-12-23-35.pdf)>. Acesso em: 08 jun., 2021.

OLIVEIRA, T.F.; TAVARES, G. C.; FIGUEIREDO, H. C. P.; LEAL, C. A. G. Septicemia por *Aeromonas* móveis em peixes. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, n. 73, p. 33-44, 2014.

OLSEN, R. E.; SUNDELL, C.; MAYHEW, T. M.; MYKLEBUST, R.; RINGO, E. Acute stress alters intestinal functions of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture**, v. 250, p. 480-495, 2005.

ONMAZ, N. E.; ABAY, S.; KARADAL, F.; HIZLISOY, H.; TELLI, N.; AL, S. Occurrence and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. in retail fish samples in Turkey. **Marine Pollution Bulletin**, v. 90, n. 1-2, p. 242-246, 2015.

ORMSBY, M. J.; CAWS, T.; BURCHMORE, R.; WALLIS, T.; VERNER-JEFFREYS, D. W.; DAVIES, R. L. *Yersinia ruckeri* Isolates Recovered from Diseased Atlantic Salmon (*Salmo salar*) in Scotland Are More Diverse than Those from Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Represent Distinct Subpopulations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 19, 2016.

ORTEGA, E.; ABRIOUEL, H.; LUCAS, R.; GÁLVEZ, A. Multiple Roles of *Staphylococcus aureus* Enterotoxins: Pathogenicity, Superantigenic Activity, and Correlation to Antibiotic Resistance. **Toxins**, n. 2, p. 2117-2131, 2010.

OZTURK, R. C.; ALTINOK, I. Bacterial and Viral Fish Diseases in Turkey. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 14, p. 275-297, 2014.

PADUA, S. B.; MENEZES FILHO, R. N.; CRUZ, C. Alevinos saudáveis: o ponto de partida para uma produção estável. **Panorama da Aquicultura**, v. 22, n. 134, p. 30-37, 2012.

PARK, E. J.; KIM, M. S.; ROH, S. W. *Kocuria atrinae* sp. nov., isolated from traditional Korean fermented seafood. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, p. 914-918, 2010.

PARSHUKOV, A. N.; KASHINSKAYA, E. N.; SIMONOV, E. P.; HLUNOV, O. V.; IZVEKOVA, G. I.; ANDREE, K. B.; SOLOVYEV, M. M. Variations of the intestinal gut microbiota of farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), depending on the infection status of the fish. **Journal of Applied Microbiology**, v. 127, p. 379-395, 2019.

PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M. Doenças de peixes: profilaxia, manejo, diagnóstico e tratamento. 2ª ed. Maringá: **UEM**, 305p., 2002.

PELEG, A. Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D. L. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 2, p. 538-582, 2008.

PÉREZ-CANO, H. J. & ROBLES-CONTRERAS, A. Aspectos básicos de los mecanismos de existencia bacteriana. **Revista Médica MD**, v. 3, p. 186-191, 2013.

PETERSEN, A.D.; WALKER, R.D.; BOWMAN, M.M.; SCHOTT, H.C.; ROSSER, E.J. Jr. Frequency of isolation and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus intermedius* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates from canine skin and ear samples over a 6-year period (1992-1997). **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 38, p. 407-413, 2002.

PETINAKI, E., DIMITRACOPOULOS, G., SPILIOPOULOU, I. Decreased affinity of PBP3 to methicillin in a clinical isolate of *Staphylococcus epidermidis* with borderline resistance to methicillin and free of the *mecA* gene **Microbial Drug Resistance**, v. 7, n. 3, p. 297-300, 2001.

PINCHUCK, I. V.; BESWICK, E. J.; REYES, V. E. Staphylococcal Enterotoxins. **Toxins**, v. 2, n. 8, p. 2177-2197, 2010.

PLATA, K.; ROSATO, A. E.; WEGRZYN, G. *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. **Acta Biochimica Polonica**, v. 56, n. 4, p. 597-612, 2009.

PRINCIPATO, M.; QIAN, B. F. Staphylococcal enterotoxins in the Etiopathogenesis of Mucosal Autoimmunity within the Gastrointestinal Tract. **Toxins**, v. 6, n. 5, p. 1471-1489, 2014.

PULKKINEN, K. A.; SUOMALAINEN, L. R.; READ, A. F.; EBERT, D.; RINTAMAKI, P.; VANTONEN, E. T. Intensive fish farming and the evolution of pathogen virulence: the case of columnaris disease in Finland. Proceedings of the Royal Society B: **Biological Sciences, Edinburg**, v. 277, n. 1681, p. 593-600, 2010.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; LEONARD, F. C.; FIZTPATRICK, E. S.; FANNING, S.; HARTIGAN, P. J. Veterinary Microbiology and Microbial Disease - *Staphylococcus* species. 2<sup>a</sup> ed. **Wiley-Blackwell Science**, p. 179-187, p. 219, p. 912, 2011.

RADHOUANI, H.; SILVA, N.; POETA, P.; TORRES, C.; CORREIA, S.; IGREJAS, G. Potential impact of antimicrobial resistance in wildlife, environment and human health. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. 23, p. 1-12, 2014.

RAVENHALL, M.; SKUNCA, N.; LASSALLE, F.; DESSIMOZ, C. Inferring horizontal gene transfer. **PLOS Computational Biology**, v.11, n. 5, e1004095, 2015.

REZAI, R.; AHMADI, R.; SALIMI, B. Prevalence and Antimicrobial Resistance Profile of *Listeria* Species Isolated from Farmed and On-Sale Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Western Iran. **Journal of Food Protection**, v. 81, n. 6, p. 886-891, 2018.

RICAUD, K.; REY, M.; PLAGNES-JUAN, E.; LARROQUET, L.; EVEN, M.; QUILLET, E.; SKIBA-CASSY, S.; PANSERAT, S. Composition of Intestinal Microbiota in Two Lines of Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Divergently Selected for Muscle Fat Content. **The Open Microbiology Journal**, v. 12, p. 308-320, 2018.

RIMOLDI, S.; ANTONINI, M.; GASCO, L.; MORONI, F.; TEROVA, G. Intestinal microbial communities of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) may be improved by feeding a *Hermetia illucens* meal/low-fishmeal diet. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 47, p. 365-380, 2021.

RINGO, E.; GATESOUBE, F. J. Lactic acid bacteria in fish: a review. **Aquaculture**, v. 160, p. 177-203, 1998.

ROBERTS, M. C. Mechanisms of bacterial antibiotic resistance and lessons learned from environmental tetracycline resistant bacteria. In *Antimicrobial Resistance in the Environment*; Keen, P. L.; Montforts, M. H. H. M., Eds.; **Wiley-Blackwell**: Hoboken, NJ, p.29, 2012.

SADER, H. S.; MENDES, R. E.; JONES, R. N.; FLAMM, R. K. Antimicrobial susceptibility patterns of community- and hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from United States Hospitals: results from AWARE Ceftaroline Surveillance Program (2012-2014). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 86, n. 1, p. 76-79, 2016.

SAITO, E.; YOSHIDA, N.; KAWANO, J.; SHIMIZU, A.; IGIMI, S. Isolation of *Staphylococcus aureus* from raw fish in relation to culture methods. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 73, p. 287-292, 2011.

SÁNCHEZ, B. P., MUÑOZ, M. R., GUTIÉRREZ, M. N. P. Resistencia bacteriana a los antibióticos: mecanismos de transferencia. **Spei Domus**, v. 8, n. 17, p. 31-37, 2012.

SANCIU, G.; MAROGNA, G.; PAGLIETTI, B.; CAPPUCINELLI, P.; LEORI, G.; RAPPELLI, P. Outbreak of mastitis in sheep caused by multi-drug resistant *Enterococcus faecalis* in Sardinia, Italy. **Epidemiology and Infection**, v. 141, n. 3, p. 1-3, 2012.

SANDRINI, S.; ALDRIWESH, M.; ALRUWAYS, M.; FREESTONE P. Microbial endocrinology: host-bacteria communication within the gut microbiome. **The Journal of Endocrinology**, v. 225, n. 2, p. 21-34, 2015.

SANTIAGO, J. A. S.; ARAÚJO, P. F. R.; SANTIAGO, A. P.; DE-CARVALHO, F. C. T.; VIEIRA, R. H. S. F. Bactérias patogênicas relacionadas à ingestão de pescados – Revisão. **Labomar Arquivos de Ciências do Mar**, v. 46, n. 2, p. 92-103, 2013.

SANTOS, L.; RAMOS, F. Antimicrobial resistance in aquaculture: Current knowledge and alternatives to tackle the problem. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 52, n. 2, p. 135-143, 2018.

SAPKOTA, A.; SAPKOTA, A. R.; KUCHARSKI, M.; BURKE, J.; MCKENZIE, S.; WALKER, P.; LAWRENCE, R. Aquaculture practices and potential human health risks: Current knowledge and future priorities. **Environment International**, v. 34, p. 1215-1226, 2008.

SARRIA, J. C.; VIDAL, A. M.; KIMBROUGH, R. C. Infections Caused by *Kluyvera* Species in Humans. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, p. e69–e74, 2001.

SCHAFER, I.; ROHRBACHER, L. O.; COLLA, N. C. Identificação dos gêneros bacterianos presentes em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) cultivadas na Serra Catarinense. **Revista de Clínicas Agroveterinárias**, v. 3, n. 1, p. 56-61, 2004.

SCHISLER, J. R., HILLIER, A., DANIELS, J. B., COLE, L. K., GEBREYES, W. A. Evaluation of Clinical Laboratory Standards Institute Interpretative Criteria for Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* Isolated from Dogs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 21, p. 684-688, 2009.

SCHWARZ, S.; KEHRENBURG, C.; DOUBLET, B.; CLOECKAERT, A. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 8, n. 5, p. 519-542, 2004.

SEBASTIÃO, F. D. A.; FURLAN, L.; HASHIMOTO, D. T.; PILARSKI, F. Identification of bacterial fish pathogens in Brazil by direct colony PCR and 16S rRNA gene sequencing. **Advances in Microbiology**, v. 5, n. 6, p. 409-424, 2015.

SEPUTIENE, V.; BOGDAITE, A.; RUZAUSKAS, M.; SUZIEDELIENE, E. Antibiotic resistance genes and virulence factors in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from diseased farm animals: pigs, cattle and poultry. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 15, n. 3, p. 431–438, 2012.

SHABARINATH, S.; KUMAR, H. S.; KHUSHIRAMANI, R.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. Detection and characterization of *Salmonella* associated with tropical seafood. **International Journal of Food Microbiology**, v. 114, n. 2, p. 227-233, 2007.

SILVA, C. C. C. DA; SOUZA, A. L. M. DE; POMBO, C. R.; MESQUITA, F. M. Qualidade Microbiológica de Filés de truta Arco-Íris do Rj, Brasil. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE DE QUALIDADE DE PESCADO, 7. **Anais... Instituto de Pesca de São Paulo**, 2017.

SILVA, K. C., KNBL, T., MORENO, A. M. Antimicrobial resistance in veterinary medicine: mechanisms and bacterial agents with the greatest impact on human health. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 50, n. 3, p. 171-183, 2013.

SIMOJOKI, H., HYVONEN, P., FERRER, C. P., TAPONEN, S., PYORALA, S. Is the biofilm formation and smile production ability of *coagulase-negative staphylococci* associated with the persistence and severity of intramammary infection?. **Veterinary Microbiology**, v. 158, p. 344-352, 2012.

SINDAN. **Compêndio de Produtos Veterinários**, 2018. Disponível em: <<http://www.cpv.com.br>>. Acesso em: 30 abr., 2020.

SINGH, C. L.; CARIAPPA, C. M. P.; KAUR, L. C. M. *Klebsiella oxytoca*: An emerging pathogen?. **Medical Journal Armed Forces India - MJAFI**, Elsevier, v. 72, n.1, p. 559-561, 2016.

SHAD, A. A.; SHAD, W. A. *Shigella sonnei*: virulence and antibiotic resistance. **Archives of Microbiology**, v. 14, p. 1-14, 2020.

SKRODENYTE-ARBACIAUSKIENE, V.; SRUOGA, A.; BUTKAUSKAS, D. Assessment of microbial diversity in the river trout *Salmo trutta fario* L. intestinal tract identified by partial 16S rRNA gene sequence analysis. **Fisheries Science**, v. 72, p. 597-602, 2006.

SLEEMAN, J. M.; DELIBERTO, T.; NGUYEN, N. Optimization of human, animal, and environmental health by using the One Health approach. **Journal of Veterinary Science**, v. 18, n. 1, p. 263-268, 2017.

SMITH, P.R.; LE-BRETON, A.; HORSBERG, T. E.; CORSIN, F. Guidelines for antimicrobial use in aquaculture. Guide to antimicrobial use in animals. Oxford, UK: **Blackwell Publishing Ltd**, p. 207-218, 2009.

SPANGGAARD, B.; NIELSEN, J.; HUBER, I.; NIELSEN, T. The microflora of rainbow trout intestine: A comparison of traditional and molecular identification. **Aquaculture**, v. 182, n.1-2, p.1-15, 2000.

STEINBERGER, J.; MOHAMED, M.; SUDHAKAR, R. Abstract 16259: *Gemella Morbillorum* Infective Endocarditis: A Systematic Review. **Circulation**, v. 142, A16259, 2020.

VARADI, L.; BARDOZ, T.; OBERDIECK, A. A handbook for sustainable aquaculture. **Eurofish International Organization**, Copenhagen, Denmark, 111p., 2009.

SVETLANA, J.; DOBRILA, J. D.; VELJOVIC, L. J. *Citrobacter freundii* as a cause of disease in fish. **Acta Veterinaria**, v. 53, n. 5-6, p. 399-410, 2003.

TABATA, Y. A. Criação de truta arco-íris. 2006. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <[http://www.infobibos.com/Artigos/2006\\_2/Truta/Index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2006_2/Truta/Index.htm)>. Acesso em: 22 jul. 2021.

TABATA, Y.A.; PORTZ, L. Truticultura em clima tropical. In: **Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva**. Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, cap. 11, p. 307-341, 2004.

TANG, J.; TANG, C.; CHEN, J.; DU, Y.; YANG, X.; WANG, C. Phenotypic characterization and prevalence of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates from outbreaks of illness in Chengdu City. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8: p. 1317–1320, 2011.

TAVARES, G. C.; FIGUEIREDO, H. C. P.; LEAL, C. A. G. Coleta e remessa de peixes para diagnóstico de doenças infecciosas. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**. Ed. FEP MVZ, n. 73, p. 79-88, 2014a.

TAVARES, G.C.; LEAL, C. A. G.; FIGUEIREDO, H. C. P. Antibioticoterapia em peixes: principais drogas, vias de administração e objetivos do tratamento. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**. Ed. FEP MVZ, n. 73, p. 66-77, 2014b.

TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C. L. Microbiologia [recurso eletrônico]. 10ª ed. Porto Alegre: **Artmed**, p. 113-295; p. 328-445; p. 553-580; p. 776- 809; 2012.

TÜRE, M.; KUTLU, I. Isolation of *Citrobacter freundii* from Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Freshwater Cage. **LIMNOFISH - Journal of Limnology and Freshwater Fisheries Research** v. 4, n. 2, p. 85-89, 2018.

VALENZUALA, A.S.; BEN OMAR, N.; ABRIOUEL, H.; CANAMERO, N.M.; GALVEZ, A. Isolation and identification of *Enterococcus faecium* resistance and production of bacteriocin-like substances. **Food Microbiology**, v. 27, p. 955-961, 2010.

VATSOS, I. N. Standardizing the microbiota of fish used in research. **Laboratory Animals**, v. 51, p. 353-64, 2017.

VAZQUEZ-SANCHEZ, D.; LOPEZ-CABO, M.; SAA-IBUSQUIZA, P.; RODRIGUEZ-HERRERA, J. J. Incidence and characterization of *Staphylococcus aureus* in fishery products marketed in Galicia (Northwest Spain). **International Journal of Food Microbiology**, v. 157, p. 286-296, 2012.

VENDRELL, D.; BALCAZAR, J. L.; RUIZ-ZARZUELA, I.; DE BLAS, I.; GIRONÉS, O.; MÚZQUIZ, J. L. *Lactococcus garvieae* in fish: a review. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 29, n. 4, p. 177-198, 2006.

WANG, C. Y.; SHIE, H. S.; CHEN, S. C.; HUANG, J. P.; HSIEH, I. C.; WEN, M. S. *Lactococcus garvieae* infections in humans: possible association with aquaculture outbreaks. **International Journal of Clinical Practice**, v. 61, n. 1, p. 68-73, 2007.

WANG, P. C.; LIN, Y. D.; LIAW, L. L.; CHERN, R. S.; CHEN, S. C. *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* also causes white muscle disease in farmed giant freshwater prawns *Macrobrachium rosenbergii*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 79, p. 917, 2008.

WEIR, M.; RAJIC, A.; DUTIL, L.; CERNICCHIARO, N.; UHLAND, F. C.; MERCIER, B.; TUS EVLJAK, N. Zoonotic bacteria, antimicrobial use and antimicrobial resistance in ornamental fish: a systematic review of the existing research and survey of aquaculture-allied professionals. **Epidemiology and Infection**, v. 140, n. 2, p. 192-206, 2012.

WELCOMME, R. L. International introductions of inland aquatic species. **FAO Fisheries Department**, v. 294, 318p., 1988.

WIELDERS, C. L. C.; VRIENS, M. R.; BRISSE, S.; DE GRAAF-MILTENBURG, L. A. M.; TROELSTRA, A.; FLEER, A.; SCHMITZ, F. J.; VERHOEF, J. Evidence for in-vivo transfer of *mecA* DNA between strains of *Staphylococcus aureus*. **The Lancet** **357**, p. 1674-1675, 2001.

WHO. Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance 2014, **World Health Organization**, 256p., 2014.

WHO/FAO/OIE. Expert consultation on antimicrobial use in aquaculture and antimicrobial resistance. Seoul, Republic of Korea, 13-16 June, 2006.

WHO, W. H. O. Critically important antimicrobials for human medicine. **WHO Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance (AGISAR)**, v. 5th, 2017.

WONG, S.; WALDROP, T.; SUMMERFELT, S.; DAVIDSON, J.; BARROWS, F.; KENNEY, P. B.; WELCH, T.; WIENS, G. D.; SNEKVIK, K.; RAWLS, J. F.; GOOD, C. Aquacultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) possess a large core intestinal microbiota that is resistant to variation in diet and rearing density. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 16, p. 4974-4984, 2013.

WOO, P. T. K.; BRUNO, D. W. **Fish diseases and disorders: viral, bacterial and fungal infections**. 2<sup>a</sup> ed., **CABI**, v. 3, 944p., 2011.

XIONG, W.; SUN, Y.; ZHANG, T.; DING, X.; LI, Y.; WANG, M.; ZENG, Z. Antibiotics, Antibiotic Resistance Genes, and Bacterial Community Composition in Fresh Water Aquaculture Environment in China. **Microbial Ecology**, v. 70, n. 2, p. 425-432, 2015.

YOSHIMIZU, M.; KASAI, H.; AOKI, T.; OTOTAKE, M.; SAKAI, M.; JUNG, T. S.; HIKIMA, J.; OKAMOTO, N.; SAKAMOTO, T.; OZAKI, A.; YAZAWA, R. Fish Diseases - Prevention and treatment of diseases caused by fish pathogens. **Encyclopedia of Life Support Systems – Eolss**, UNESCO, 2016.

XU, T.; ZHANG, X. H. *Edwardsiella tarda*: an intriguing problem in aquaculture. **Aquaculture**, v. 431, p. 129–135, 2014.

ZHANEL, G.; HISANAGA, T. L.; LAING, N. M.; DECORBY, M. R.; NICHOL, K.A.; WESHNOWESKI, B. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* out patient urinary isolates: final results from the North American Urinary Tract Infection Collaborative Alliance (NAUTICA). **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 27, n. 6, p. 468-475, 2006.

WELLINGTON, E. M. H.; BOXALL, A. B.; CROSS, P.; FEIL, E. J.; GAZE, W. H.; HAWKEY, P. M.; JOHNSON-ROLLINGS, A. S.; JONES, D. L.; LEE, N. M.; OTTEN, W.; THOMAS, C. M.; WILLIAMS, A. P. The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 2, p. 155-165, 2013.

APÊNDICE 1 – Questionário aplicado em entrevistas nas truticulturas visitadas.



**Laboratório de Sanidade Animal  
LSA/CCTA/UENF  
Setor de Microbiologia**

### QUESTIONÁRIO

Data: \_\_\_\_\_ Nº de Identificação: \_\_\_\_\_

Nome do local: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Nome do Proprietário ou Responsável: \_\_\_\_\_

Telefone para contato: ( ) \_\_\_\_\_

1) Existe Médico Veterinário responsável pela produção? ( ) Sim ( ) Não

2) Histórico da propriedade: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

3) Parâmetros produtivos: \_\_\_\_\_

4) Manejo: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

5) Características do sistema de cultivo: ( ) Intensivo ( ) Semi-intensivo

6) Existe algum histórico de ocorrência de doenças/surtos? ( ) Sim ( ) Não

Quais medicamentos foram utilizados? (Informações detalhadas sobre posologia):

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

7) Existem outros animais de produção? ( ) Sim ( ) Não

( ) Caninos ( ) Felinos ( ) Equinos ( ) Bovinos ( ) Ovinos ( ) Caprinos

( ) Aves Número de animais: \_\_\_\_\_

8) Existe histórico de uso de agrotóxicos na propriedade? ( ) Sim ( ) Não

Quais? Quando e como foram utilizados? \_\_\_\_\_

---

9) A água é tratada? ( ) Sim Produto: \_\_\_\_\_ ( ) Não  
Origem da água (para os tanques, consumo animal e humano): ( ) Açude  
( ) Cacimba/Poço ( ) Companhia de abastecimento ( ) Outro

10) Como é feito o descarte de resíduos? \_\_\_\_\_

Observações pertinentes: \_\_\_\_\_

---

Autorizo a Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) a entrar em minha propriedade, coletar animais e amostras de água para análise laboratorial e capturar imagens para fins de pesquisa científica, como parte do Projeto de Dissertação "**ANÁLISE DA MICROBIOTA INTESTINAL DE TRUTA ARCO-ÍRIS (*Oncorhynchus mykiss*, WALBAUM, 1792) E SEU AMBIENTE AQUÁTICO NA REGIÃO SERRANA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**".

Local \_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_