

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO**

FERNANDA NOGUEIRA PORTO

**PESQUISA DE GENES DE RESISTÊNCIA E FATORES DE
PATOGENICIDADE EM BACTÉRIAS ISOLADAS EM
PISCICULTURAS ORNAMENTAIS NO NORTE FLUMINENSE**

Campos dos Goytacazes - RJ

2025

FERNANDA NOGUEIRA PORTO

**PESQUISA DE GENES DE RESISTÊNCIA E FATORES DE PATOGENICIDADE
EM BACTÉRIAS ISOLADAS EM PISCICULTURAS ORNAMENTAIS NO NORTE
FLUMINENSE**

**Dissertação apresentada ao Centro de
Ciências e Tecnologias Agropecuárias
da Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro, como parte
das exigências para obtenção do título
de Mestre em Medicina Veterinária.**

Orientador: Olney Vieira da Motta

Campos dos Goytacazes
2025

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

P853

Porto, Fernanda Nogueira.

PESQUISA DE GENES DE RESISTÊNCIA E FATORES DE PATOGENICIDADE EM BACTÉRIAS ISOLADAS EM PISCICULTURAS ORNAMENTAIS NO NORTE FLUMINENSE / Fernanda Nogueira Porto. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2026.

113 f.

Bibliografia: 89 - 105.

Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2026.

Orientador: Olney Vieira da Motta.

1. Resistência antimicrobiana. 2. Genes de resistência . 3. Piscicultura ornamental. 4. Fatores de virulência bacteriana. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 124

FERNANDA NOGUEIRA PORTO

PESQUISA DE GENES DE RESISTÊNCIA E FATORES DE PATOGENICIDADE EM
BACTÉRIAS ISOLADAS EM PISCICULTURAS ORNAMENTAIS NO NORTE
FLUMINENSE

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

Aprovada em 06 de novembro de 2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Olney Vieira da Motta (Orientador) UENF

Prof. Dr. Manuel Vazquez Vidal Júnior (Membro) UENF

Prof. Dr. Bruno de Araújo Penna (Membro) UFF

Prof. Dr. João Carlos de Alquino Almeida (Membro) UENF

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) e ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) pelo oferecimento deste curso.

Ao meu orientador Olney Vieira da Motta, pela oportunidade de desenvolver esta pesquisa, pelos ensinamentos transmitidos ao longo de toda a jornada acadêmica e pelo acompanhamento constante desde a graduação.

À professora Solange Silva Samarão que me ensinou novas técnicas experimentais, pela paciência e pela generosidade em compartilhar seu conhecimento, contribuindo diretamente para a execução deste estudo.

As técnicas do laboratório Lourdes e Gina, pelo suporte nas etapas práticas e pela disponibilidade em me auxiliar sempre que necessário.

Agradeço também ao professor Wilder Hernando Ortiz Vega, responsável pela análise estatística, pela atenção, disponibilidade e análises que enriqueceram significativamente os resultados deste trabalho.

Ao professor Bruno de Araújo Penna, que gentilmente cedeu as cepas controle utilizadas nas análises moleculares, possibilitando a execução de ensaios fundamentais para a pesquisa.

Ao professor Manuel Vazquez Vidal Júnior, que coordenou e organizou as visitas às propriedades rurais para coleta das amostras, pela colaboração e empenho em viabilizar essa importante etapa do estudo, além de ceder um dos seus orientados para nos acompanhar durante a visita técnica.

Às colegas de laboratório, Amanda e Nayara, pela convivência diária, pelas trocas de experiências e pelo companheirismo, em especial por compartilharem não apenas os resultados positivos, mas também os desafios e frustrações que fazem parte do processo científico.

Agradeço de forma especial à Nayara pela companhia durante as coletas, pelo auxílio em todas as etapas da pesquisa, desde o início da minha iniciação científica até a conclusão deste trabalho. Sou profundamente grata pelo apoio não apenas técnico, mas também emocional, e pela amizade sincera que construímos ao longo dessa trajetória.

Agradeço à minha família, pelo amor incondicional, pela paciência e pelo apoio em todos os momentos. Em especial à minha mãe, por termos chegado até aqui juntas, mesmo diante de tantas turbulências ao longo do caminho.

Por fim, agradeço à Nalla, minha fiel companheira de quatro patas, que há mais de uma década me acompanha com lealdade e carinho, oferecendo conforto e alegria em cada etapa da minha vida, independentemente da cidade ou das circunstâncias.

Obrigada.

RESUMO

PORTO, Fernanda Nogueira. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Novembro de 2025. Pesquisa de genes de resistência e fatores de patogenicidade em bactérias isoladas em pisciculturas ornamentais no Norte Fluminense. Orientador: Olney Vieira da Motta.

O uso inadequado e irracional de antimicrobianos na piscicultura pode resultar na utilização intensa e transferência de genes de resistência antimicrobiana, sendo o ambiente aquático o mais eficiente para a seleção de populações bacterianas resistentes e troca destes genes. Este estudo investigou o perfil de resistência antimicrobiana em bactérias coletadas em propriedades do maior polo de piscicultura ornamental brasileira, na divisa entre os estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais, região que tem ligação direta com o Rio Paraíba. Foram analisadas 63 cepas Gram-positivas e 101 Gram-negativas, avaliando-se a sensibilidade a diferentes antibióticos e a presença de genes de resistência. Entre as Gram-positivas, os antibióticos com maiores taxas de resistência foram ERI e PEN (42,9%), seguidos por OXA (36,5%) e AMO (30,2%). Nas Gram-negativas, os maiores índices de resistência foram observados para AMO (67,6%) e TET (41,6%), enquanto antibióticos como CIP (4,0%) e FLF (3,0%) apresentaram baixa resistência. A análise dos genes revelou baixa frequência geral, com destaque para *seb* (36,5%) e *sea* (11,3%) nas Gram-positivas, e *blaSHV* (5,9%) e *blaTEM* (4,0%) nas Gram-negativas. O estudo também avaliou a capacidade de adesão das bactérias com presença de genes de resistência, sendo a maioria das amostras fracamente aderente (55,6%), sugerindo que não há associação clara entre esses genes e aumento da produção de biofilme. Os resultados indicam que, embora a resistência bacteriana fenotípica apresente valores importantes para alguns antibióticos, a presença de genes de resistência ainda é relativamente baixa na região estudada. Isso sugere que o ambiente de piscicultura ornamental possui potencial de disseminação de resistência, mas atualmente com frequência limitada de genes, reforçando a importância do uso controlado de antimicrobianos e monitoramento contínuo para prevenir a ampliação da resistência antimicrobiana em espécies domésticas e no ambiente aquático.

Palavras-chaves: Resistência antibacteriana, genes de resistência, fatores de virulência bacteriana, piscicultura ornamental.

ABSTRACT

PORTO, Fernanda Nogueira. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Novembro de 2025. Research on resistance genes and pathogenicity factors in bacteria isolated from ornamental fish farms in Northern Fluminense. Advisor: Olney Vieira da Motta.

The inadequate and irrational use of antimicrobials in aquaculture can result in their intensive use and in the transfer of antimicrobial resistance genes, with the aquatic environment being the most efficient for the selection of resistant bacterial populations and the exchange of these genes. This study investigated the antimicrobial resistance profile of bacteria collected from farms in the largest ornamental fish farming region in Brazil, located on the border between Rio de Janeiro and Minas Gerais, a region directly connected to the Paraíba River. A total of 63 Gram-positive and 101 Gram-negative strains were analyzed for susceptibility to different antibiotics and the presence of resistance genes. Among Gram-positive bacteria, the highest resistance rates were observed for ERI and PEN (42.9%), followed by OXA (36.5%) and AMO (30.2%). In Gram-negative bacteria, the highest resistance was observed for AMO (67.6%) and TET (41.6%), while CIP (4.0%) and FLF (3.0%) showed low resistance. Genetic analysis revealed generally low frequencies of resistance genes, with *seb* (36.5%) and *sea* (11.3%) being most frequent in Gram-positive strains, and *blaSHV* (5.9%) and *blaTEM* (4.0%) in Gram-negative strains. The study also assessed bacterial adhesion in relation to the presence of resistance genes, finding that most samples were weakly adherent (55.6%), suggesting no clear association between these genes and increased biofilm production. The results indicate that, although phenotypic resistance is significant for some antibiotics, the overall presence of resistance genes remains relatively low in the studied region. This suggests that ornamental fish farming environments have the potential for resistance dissemination but currently show limited gene prevalence, highlighting the importance of controlled antimicrobial use and continuous monitoring to prevent the spread of antimicrobial resistance in domestic animals and aquatic ecosystems.

Keywords: Antimicrobial resistance, resistance genes, bacterial virulence factors,

ornamental aquaculture,

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequências de nucleotídeos dos conjuntos de iniciadores utilizados para amplificar genes de resistência bacteriana.	40
Tabela 2: Volume dos componentes utilizados para a realização das PCR, utilizando o MasterMix: ThermoScientific MasterMix 2X, com total de 25 µL.	42
Tabela 3: Protocolos de realização das PCR para a pesquisa dos genes de resistência a antibióticos utilizados, utilizando o MasterMix ThermoScientific MasterMix 2X.	43
Tabela 4: Interpretação dos resultados de capacidade de formação de biofilme conforme descrito por Stepanovic (2007).	45
Tabela 5: Cepas positivas para o gene sea.	53
Tabela 6: Cepas positivas para o gene seb.	55
Tabela 7: Ensaio de produção de biofilme.	61
Tabela 8: Análise de frequências da resistência bacteriana em amostras provenientes de diferentes fontes na piscicultura ornamental.	70
Tabela 9: Variância total explicada da PCA para bactérias Gram-positivas.	74
Tabela 10: Teste de Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) e Esfericidade de Bartlett.	75
Tabela 11: Matriz de componentes.	75
Tabela 12: Matriz de correlações entre antibióticos e genes.	76
Tabela 13: Variância explicada pelos componentes principais em bactérias Gram-negativas.	78
Tabela 14: Teste de Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) e Esfericidade de Bartlett.	79
Tabela 15: Matriz de correlações entre antibióticos e genes de resistência em	

bactérias Gram-negativas.....	79
Tabela 16: Matriz de componentes rotacionados para bactérias Gram-negativas. ..	81
Tabela 17: Identificação das amostras Gram-positivas.	106
Tabela 18: Identificação das amostras Gram-negativas.	110

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Ligação do Rio Muriaé com o Rio Paraíba. Fonte: Google Maps..... 22
- Figura 2:** Propriedade localizada em Patrocínio de Muriaé - MG. (Fonte: arquivo pessoal). 31
- Figura 3:** A: peixes da espécie Betta (*Betta splendens*); B: peixes da espécie Acará (*Pterophyllum*); C: Peixes da espécie Guppy (*Poecilia reticulata*). (Fonte: arquivo pessoal). 32
- Figura 4:** A: Coleta de amostras de água; B: Coleta de amostra de suíno; C: Coleta de amostra de cão; D: Coleta de amostra de peixes. (Fonte: arquivo pessoal). 33
- Figura 5:** Realização do teste de Voges-Proskauer. (Fonte: arquivo pessoal)..... 37
- Figura 6:** Realização do teste de sensibilidade a antimicrobianos pelo método de difusão em disco. (Fonte:arquivo pessoal). 38
- Figura 7:** Resistência e sensibilidade a bactérias Gram-negativas. 48
- Figura 8:** : Resistencia e sensibilidade a bactérias Gram-positivas..... 49
- Figura 9:** Gel de agarose 1% resultante da eletroforese de produtos de amplificação de PCR para gene *mecA*. MM: marcador de peso molecular; CP: controle positivo; CN: controle negativo; poços 1-12, 13-16: negativos; poço 17: amostra 78..... 50
- Figura 10:** Gel de agarose 1% resultante da eletroforese de produtos de amplificação de PCR para gene *tetM*. MM: marcador de peso molecular; CP: controle positivo; CN: controle negativo; poços 4, 12, 19, 26: positivos..... 51
- Figura 11:** Gel de agarose 1% resultante da eletroforese de produtos de amplificação de PCR para gene *tetA*. MM: marcador de peso molecular;

poços 1, 2 e 5: positivos.	52
Figura 12: Gel de agarose 1% resultante da eletroforese de produtos de amplificação de PCR para gene <i>tetB</i> . MM: marcador de peso molecular; poço 5: positivo.....	53
Figura 13: Gel de agarose 1% resultante da eletroforese de produtos de amplificação de PCR para gene <i>sea</i> . M: marcador de peso molecular; CN: controle negativo; poços 1-9, 12-13: negativos; poço 10: amostra 126.....	54
Figura 14: Gel de agarose 1% resultante da eletroforese de produtos de amplificação de PCR para gene <i>sea</i> . M: marcador de peso molecular; CN: controle negativo; poços 3, 6, 7, 8, 9 e 14 positivos.	54
Figura 15: Gel de agarose 1% resultante da eletroforese de produtos de amplificação de PCR para gene <i>seb</i> . MM: marcador de peso molecular; CP: controle positivo; CN: controle negativo; poços: 1, 4, 6 e 7: amostras 2, 45, 68 e 70 positivos.	56
Figura 16 Gel de agarose 1% resultante da eletroforese de produtos de amplificação de PCR para gene <i>seb</i> . MM: marcador de peso molecular; CP: controle positivo; CN: controle negativo; poços 1-3a, 7-8b, 10-12a, 2b, 4-6b, 8-14b positivos.....	56
Figura 17: Gel de agarose 1% resultante da eletroforese de produtos de amplificação de PCR para gene <i>blaCTXM</i> . MM: marcador de peso molecular; CP: controle positivo; CN: controle negativo; Poço 1 e 2: positivos.....	57
Figura 18: Gel de agarose 1% resultante da eletroforese de produtos de amplificação de PCR para gene <i>blaSHV</i> . MM: marcador de peso molecular; CP: controle positivo; CN: controle negativo; poços 1-11: negativos; Poço 12: amostra 196.	58
Figura 19: Gel de agarose 1% resultante da eletroforese de produtos de amplificação de PCR para gene <i>blaSHV</i> . MM: marcador de peso	

molecular; CP: controle positivo; CN: controle negativo; poços 1, 2 e 3: positivos.....	58
Figura 20: Gel de agarose 1% resultante da eletroforese de produtos de amplificação de PCR para gene <i>bla</i> TEM. MM: marcador de peso molecular; CP: controle positivo; CN: controle negativo; poços 1, 3, 5 e 6: positivos.....	59
Figura 21: Gel de agarose 1% resultante da eletroforese de produtos de amplificação de PCR para gene <i>aac(6)'lb-cr</i> . MM: marcador de peso molecular; CP: controle positivo; CN: controle negativo; poços 2 e 3: negativos; poços 1 e 6: positivos.....	60
Figura 22: Gel de agarose 1% resultante da eletroforese de produtos de amplificação de PCR para gene <i>qnrS</i> . MM: marcador de peso molecular; CP: controle positivo; CN: controle negativo; poços 1, 2 e 3: positivos. .	61
Figura 23: Sequenciamento da amostra 178, para o gene <i>mecA</i>	63
Figura 24: Sequenciamento da amostra 251, para o gene <i>tetM</i>	63
Figura 25: Sequenciamento da amostra 272, para o gene <i>tetM</i>	64
Figura 26: Sequenciamento da amostra 2110, para o gene <i>tetM</i>	64
Figura 27: Sequenciamento da amostra 2118, para o gene <i>tetM</i>	65
Figura 28: Sequenciamento da amostra 2100, para o gene <i>bla</i> CTX-M.	65
Figura 29: Sequenciamento da amostra 223, para o gene <i>aac(6)'lb-cr</i>	66
Figura 30: Sequenciamento da amostra 278, para o gene <i>aac(6)'lb-cr</i>	66
Figura 31: Sequenciamento da amostra 223, para o gene <i>tetA</i>	67
Figura 32: Sequenciamento da amostra 297, para o gene <i>tetA</i>	67
Figura 33: Sequenciamento da amostra 2100, para o gene <i>tetB</i>	68
Figura 34: Sequenciamento da amostra 215, para o gene <i>bla</i> SHV.....	68

Figura 35: Sequenciamento da amostra 221, para o gene <i>blaSHV</i>	69
Figura 36: Sequenciamento da amostra 222, para o gene <i>blaSHV</i>	69
Figura 37: Biplot da análise de componentes principais para bactérias Gram-positivas.....	74
Figura 38: Biplot da análise de componentes principais para bactérias Gram-negativas.	78
Figura 39: Plotagem bidimensional da Análise de Correspondência Múltipla entre Espécie bacteriana identificada e fonte de obtenção. Proximidade entre centroides (médias multivariadas com formatos de asterisco e diamante) indica maior associação.....	82
Figura 40: Plotagem bidimensional da Análise de Correspondência Múltipla entre Espécie de <i>Staphylococcus</i> e genes <i>sea</i> e <i>seb</i> . Proximidade entre centroides (médias multivariadas com formatos de asterisco e círculo colorido) indica maior associação.....	84

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 JUSTIFICATIVA	19
3 OBJETIVOS	20
3.1 OBJETIVO GERAL	20
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
4.1 A PISCICULTURA ORNAMENTAL E SEU IMPACTO NA SAÚDE ÚNICA 21	
4.2 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS	25
4.2.1 Genes de resistência a beta-lactâmicos	26
4.2.2 Genes de resistência a fenicóis	26
4.2.3 Genes de resistência a macrolídeos	27
4.2.4 Gene de resistência a aminoglicosídeos	27
4.2.5 Genes de resistência a quinolonas.....	27
4.2.6 Genes de resistência a sulfonamidas	28
4.2.7 Genes de resistência a tetraciclinas	28
4.3 BIOFILME	29
5 MATERIAL E MÉTODOS	30
5.1 ORIGEM DAS AMOSTRAS	30
5.2 COLETA DE AMOSTRAS.....	31

5.2.1	Amostras de animais	31
5.2.2	Amostras de água	32
5.3	PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS	33
5.3.1	Reativação de amostras coletadas anteriormente.....	33
5.3.2	Amostras de animais	34
5.3.3	Amostras de água	34
5.4	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA.....	35
5.5	PESQUISA DE BACTÉRIAS RESISTENTES.....	37
5.5.1	Avaliação de resistência a antimicrobianos	37
5.6	ANÁLISE MOLECULAR.....	39
5.6.1	Extração e quantificação de DNA.....	39
5.6.2	Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) e Eletroforese	39
5.7	ENSAIO DA PRODUÇÃO DE BIOFILME	44
5.8	SEQUENCIAMENTO DE SANGER.....	45
5.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
6	RESULTADOS.....	47
6.1	IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA E PERFIL DE SUCEPTIBILIDADE.....	47
6.2	ANÁLISE MOLECULAR.....	49
6.2.1	Detecção de <i>mecA</i> em <i>Staphylococcus spp.</i>	50
6.2.2	Detecção de genes de tetraciclina.....	50
6.2.3	Detecção de enterotoxinas em <i>Staphylococcus spp.</i>	53

6.2.4	Detecção de genes de resistência betalactâmicos em bactérias gram-negativas.....	57
6.2.5	Detecção de genes de resistência a aminoglicosídeos em bactérias gram-negativas	59
6.2.6	Detecção de genes de resistência a quinolonas em bactérias gram-negativas.....	60
6.3	ENSAIO DA PRODUÇÃO DE BIOFILME	61
6.4	SEQUENCIAMENTO	62
6.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	70
6.5.1	Análise descritiva simples.....	70
6.5.2	ANÁLISE FATORIAL	73
6.5.3	Análise de Correspondência Múltipla	81
7	DISCUSSÃO	84
8	CONCLUSÃO.....	88
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
	APÊNDICE	106
	APÊNDICE A – AMOSTRAS GRAM-POSITIVAS.....	106
	APÊNDICE B – AMOSTRAS GRAM-NEGATIVAS	110

1 INTRODUÇÃO

A piscicultura é uma atividade de natureza econômica que apresenta forte e rápido crescimento, trazendo alta lucratividade para o país, geração de empregos e fornecimento de alimento para boa parte da população (CREPALDI, 2006). Nesse contexto, para prevenção e tratamento de doenças na produção e como promotores de crescimento dos animais se faz uso de agentes antimicrobianos, muitas vezes de maneira indiscriminada (MARSHALL e LEVY, 2011), o que tem aumentado de forma global a resistência microbiana em ambientes aquáticos (HIRSCH, 2006).

A resistência aos antimicrobianos acontece quando a bactéria expressa genes que permitem a mediação no mecanismo de ação do antibiótico por transmutação espontânea de DNA ou por modificação e transmissão de plasmídeos (SANTOS, 2004). Bactérias resistentes a antibióticos são encontradas em diferentes nichos ecológicos. Dentre esses nichos, o ambiente aquático é considerado como o mais eficiente para a seleção de populações bacterianas resistentes, bem como para a troca de genes de resistência, por meio de elementos genéticos móveis (ALI, 2000). A antibioticoterapia na piscicultura ornamental pode resultar na utilização intensa de agentes antimicrobianos e transferência de grande quantidade, não apenas para os animais, mas, também, para o ambiente, contaminando, além da água, o solo, fertilização orgânica com material contaminado e também por contaminação cruzada através de produtos de origem animal (FARROKH, 2013; SMITH, 2014).

Os principais agentes antimicrobianos utilizados em aquicultura e de grande importância em medicina humana são: aminopenicilinas (amoxicilina e ampicilina); anfenicóis (cloranfenicol e florfenicol); macrolídeos (eritromicina); aminoglicosídeos (estreptomicina e neomicina); nitrofuranos (furazolidona), quinolonas (ácido oxolínico) e fluoroquinolonas (enrofloxacina e flumequina); tetraciclina (oxitetraciclina, clortetraciclina, tetraciclina) e sulfonamidas (GASTALHO, 2014). Os antibióticos que são permitidos para uso na piscicultura no Brasil são a oxitetraciclina (OTC) e o florfenicol (FFC) e são os mais utilizados para tratar infecções causadas por bactérias gram negativas em peixes (RIGOS e TROISI, 2005; CHEN, 2020).

Devido à baixa disponibilidade de variedades de medicamentos veterinários aprovados, a falta de conhecimento prévio e específico da utilização de fármacos, concentração e via ideal de administração nos sistemas de produção, os antimicrobianos são utilizados de forma indiscriminada no mesmo ciclo de produção, ocasionando sérios impactos na saúde animal, humana e ambiental (WEIR, 2012; GASTALHO, 2014).

O impacto no ambiente através da pressão seletiva pode levar à resistência aos antimicrobianos, tanto em bactérias comensais do intestino humano e animal, como em bactérias do ambiente, com a disseminação e transferência de genes de resistência entre diversas populações bacterianas (RADHOUANI, 2014).

2 JUSTIFICATIVA

É conhecida a presença de bactérias resistentes em isolados de animais de produção, inclusive na aquicultura e animais domésticos na região de Campos dos Goytacazes e microrregião. A resistência ocorre frequentemente por meio da aquisição de novos genes.

A utilização intensiva de antimicrobianos no âmbito da saúde humana e veterinária potencializa a transferência de genes de resistência entre diferentes populações bacterianas; com isso, novas espécies e gêneros com descrição prévia de genes da resistência continuam sendo descritos. Esses genes são expressos isoladamente ou em associação, potencializando sua patogenicidade por meio de estratégias como a formação de biofilme, que, no meio aquático, pode ter sua produção favorecida por microrganismos patogênicos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar o perfil de resistência antimicrobiana em populações bacterianas coletadas em pisciculturas ornamentais da região norte fluminense, para constatação da possível presença de genes específicos de resistência.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar amostras de peixes, animais domésticos e água de propriedades rurais com atividade em piscicultura ornamental para o isolamento de bactérias;
- Determinar o padrão de resistência das bactérias isoladas frente a antimicrobianos;
- Caracterizar microrganismos zoonóticos encontrados por técnicas bioquímicas;
- Identificar genes de resistência pela Reação da Polimerase em Cadeia (PCR);
- Comparar a produção de biofilme em cepas padrão (ATCC) e cepas ambientais, provenientes de amostras de água e provenientes de animais, identificadas.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 A PISCICULTURA ORNAMENTAL E SEU IMPACTO NA SAÚDE ÚNICA

A piscicultura ornamental movimentada mundialmente cerca de 350-400 milhões a 1 bilhão de exemplares por ano para mais de 100 países (CHAPMAN, 2000; RIBEIRO, 2009). O mercado mundial de espécies ornamentais é dominado, especialmente, por países asiáticos e europeus, dentre os quais se destaca a China. A produção de peixes ornamentais geralmente está concentrada em polos produtivos, como as regiões do Sul da Flórida (EUA) e da Zona da Mata de Minas Gerais (Brasil), consideradas os maiores polos de piscicultura ornamental desses países (REZENDE, 2021).

O Brasil apresentou, em 2022, uma população de 22,2 milhões de peixes ornamentais (ABINPET, 2023). Em 2018, as exportações brasileiras de pescado somaram US\$ 225,8 milhões em 2016, dos quais US\$ 6,5 milhões (2,9%) foram advindos das exportações de peixes ornamentais (REZENDE, 2021).

O território brasileiro está inserido na região Neotropical, uma das áreas tropicais com maior biodiversidade de peixes global onde, somente na América do Sul, existem mais de cinco mil espécies válidas de peixes de água doce (REIS, 2016). Os peixes ornamentais são representados por espécies ícones, como a carpa ou koi (*Cyprinus carpio*), o kingiuo (*Carassius auratus*), o betta (*Betta splendens*) e o guppy (*Poecilia reticulata*), além de peixes com diversas formas, cores e tamanhos, como o tetra-cardinal (*Paracheirodon axelrodi*), o acará-disco (*Symphysodon discus*), aruanã (*Osteoglossum bicirrhosum*), arraia-de-fogo (*Potamotrygon henlei*), o tralhoto (*Anableps anableps*), o cascudo-zebra (*Hypancistrus zebra*) e o reticulatos (*Simpsonichthys reticulatus*) (REZENDE, 2021). Porém, os organismos aquáticos com fins ornamentais e de aquariofilia são definidos como quaisquer espécies com habitat predominantemente aquático, em qualquer um dos seus estágios de desenvolvimento, capturadas ou produzidas e que são mantidas prioritariamente em aquários, tanques, lagos ornamentais com fins estéticos, para entretenimento ou educação (RIBEIRO, 2010).

No Brasil, a piscicultura ornamental possui forte tradição local e é amplamente praticada por produtores rurais, especialmente em polos regionais

como a Zona da Mata Mineira, onde representa uma importante fonte de renda familiar. Estima-se que mais de 4 mil famílias dependam da renda obtida com a pesca de peixes ornamentais para seu sustento, enquanto cerca de 1.800 famílias têm na aquicultura de peixes ornamentais sua principal fonte de renda. Dessa forma, a pesca e a aquicultura de peixes ornamentais envolvem diretamente aproximadamente 6 mil famílias no país, configurando-se como uma atividade relevante para a geração de renda e o desenvolvimento socioeconômico local (ANATOLE, 2008). Na região Sudeste, destaca-se a mesorregião de Muriaé, em Minas Gerais, reconhecida como um importante polo da piscicultura ornamental continental (RESENDE e FUJIMOTO, 2021). O município está inserido na bacia hidrográfica do rio Muriaé, o qual é afluente direto do rio Paraíba do Sul, estabelecendo conexão hidrológica com o norte do estado do Rio de Janeiro, incluindo o município de Campos dos Goytacazes (Figura 1).

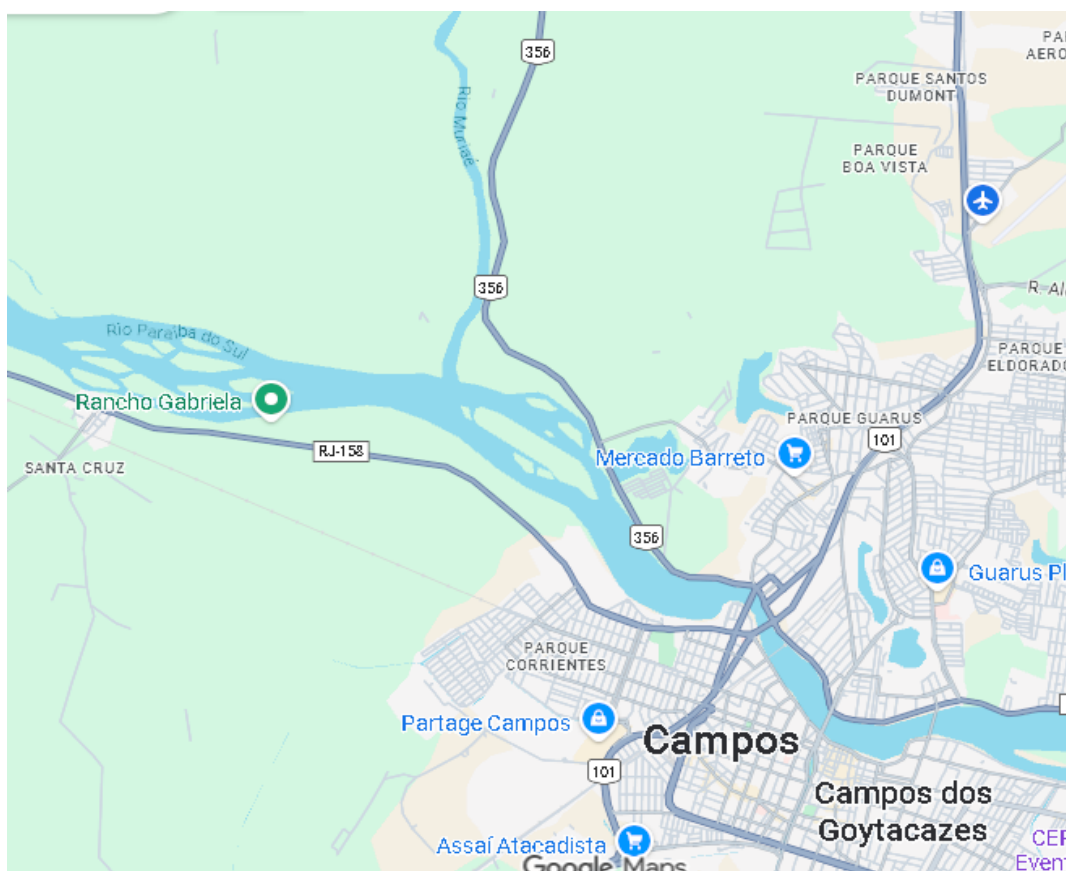


Figura 1: Ligação do Rio Muriaé com o Rio Paraíba. Fonte: Google Maps.

As doenças nesses peixes, em sua maioria, são causadas pelo desequilíbrio da relação hospedeiro-patógeno-ambiente (MORAES, 2004). As principais bactérias causadoras de mortalidade em peixes ornamentais são as Gram-negativas, tais como as dos gêneros *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Flavobacterium*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas* e *Vibrio*. Dentre as Gram-positivas, a maior taxa de mortalidade em peixes ornamentais tem sido causada pelo gênero *Streptococcus* (GREGORY, 2001).

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, 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, 2014).

O uso de antibióticos na aquicultura é regulamentado de forma rigorosa em diversos países, com o objetivo de garantir a segurança alimentar e reduzir a disseminação de resistência antimicrobiana. No Brasil, os principais antibióticos autorizados para peixes são o florfenicol e a oxitetraciclina, ambos utilizados exclusivamente para tratamento terapêutico de infecções bacterianas. Outros antimicrobianos, como enrofloxacin, eritromicina e sulfonamidas potencializadas com trimetoprim ou ormetoprim, são mencionados em documentos da FAO como utilizados na aquicultura brasileira, embora sua aprovação formal pela ANVISA não esteja claramente estabelecida. Diversos antibióticos, como cloranfenicol, nitrofuranos (furazolidona, nitrofurazona), substâncias tireostáticas, androgênicas ou anabolizantes, e antimicrobianos de uso exclusivo em humanos (como quinolonas e cefalosporinas de terceira e quarta gerações), são proibidos para uso em alimentação animal. O uso permitido deve ser exclusivamente terapêutico, com limites máximos de resíduos estabelecidos pelo MAPA, e fiscalizado em conjunto com a ANVISA (GOVERNO DO BRASIL, 2022 ; INFOTECA EMBRAPA, 2023).

No exterior, a regulamentação também é bastante restritiva, mas os antibióticos aprovados podem variar entre regiões. Na União Europeia, são permitidos florfenicol, gentamicina, sarafloxacin, sulfonamidas, tetraciclina, tilmicosina e trimetoprim, sempre para uso terapêutico e com prescrição veterinária obrigatória (FAO, 2021). Nos Estados Unidos, a FDA aprova florfenicol, oxitetraciclina, enrofloxacin, cloranfenicol, eritromicina e a combinação trimetoprim-

sulfametoxazol para tratamento de doenças em peixes, proibindo seu uso para promoção de crescimento. No Chile, a indústria do salmão utiliza florfenicol, oxitetraciclina, eritromicina e tilmicosina, sendo proibido o uso de quinolonas desde 2016. Já na China e no Vietnã, os antibióticos mais comuns incluem oxitetraciclina, enrofloxacin, amoxicilina e sulfonamidas, com regulamentações variáveis, sendo que programas de redução do uso de antimicrobianos vêm sendo implementados para minimizar riscos à saúde pública e ao meio ambiente (SEAFOOD WATCH, 2022).

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 e leva a importantes impactos na saúde animal, humana e ambiental (SAPKOTA, 2008).

Uma das maiores preocupações em saúde pública no mundo atualmente é a resistência aos antimicrobianos, que, usados de forma desmedida, têm se tornado pouco eficientes, o que faz com que seja cada vez mais difícil tratar um número crescente de infecções. Existem inúmeros exemplos do aumento da resistência aos antimicrobianos em veterinária, em diversas espécies animais, sendo que muitos dos microrganismos apresentam resistência aos antimicrobianos de uso humano, o que é preocupante, pois as bactérias isoladas podem ser reservatórios de genes resistentes, com papel na disseminação desta resistência às bactérias patogênicas e comensais (UPPULURI, 2010). Antimicrobianos amplamente utilizados na medicina humana e veterinária são despejados em rios, lagos e solo em formas ativas e, com isso, a pressão antimicrobiana persistente e acumulada no ambiente pode favorecer alguns microrganismos ambientais a desenvolver RAM através da seleção natural, que pode então ser transmitido à vida selvagem, como aves selvagens, mamíferos e répteis, que acabam tendo papéis críticos de reservatórios, disseminadores e sentinelas, amplificando o potencial de transmissão de RAM na interação homem-animal-ambiente (LI, 2024).

4.2 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

Na atividade de piscicultura ornamental, são necessários estudos que promovam a pesquisa de bactérias resistentes aos antimicrobianos, pois, em propriedades rurais, a implicação dessa prática nos criatórios pode resultar em problemas ambientais. Na China, Au-Yeung et al. (2022) identificaram algumas espécies de bactérias isoladas de peixes ornamentais obtidos de lojas de revenda e, entre as espécies isoladas, *Aeromonas* e *Pseudomonas* foram resistentes frente a todos os antibióticos testados. A resistência aos antimicrobianos é uma condição ao qual o microrganismo é capaz de sobreviver à exposição ao antibiótico, podendo ser natural, quando há uma característica intrínseca e permanente de cepas de uma mesma espécie, ou adquirida, que podem acontecer por meio de quatro mecanismos onde: 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, 2012). O mecanismo mais frequente acontece quando a bactéria expressa genes que permitem a mediação no mecanismo de ação do antibiótico por transmutação espontânea de DNA ou por modificação e transmissão de plasmídeos (SANTOS, 2004).

Os genes de resistência são transmitidos de maneira intraespecífica e interespecífica, sendo ativados ao entrarem em contato com um antimicrobiano (LUPO, 2012; BARRIOS, 2015). O resistoma bacteriano é composto por diversos genes que codificam proteínas capazes de se ligar ao fármaco e torná-lo inativo, conferindo resistência. Esses genes representam uma pequena parte do material genético bacteriano e são a principal fonte de resistência aos antimicrobianos. (PERRY, 2014; HOBSON, 2021).

4.2.1 Genes de resistência a beta-lactâmicos

A resistência bacteriana a essa classe de antimicrobianos acontece principalmente através da produção das β -lactamases, enzimas capazes de hidrolisar o anel β -lactâmico dos fármacos, transformando-os em produtos inativos. Entre os genes codificadores de enzimas β -lactamases já identificados nas bactérias são descritos os genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, e *bla*_{CMY} (MICHAEL, 2006). Em 2019, os genes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV} foram detectados em ambientes aquáticos da Bahia, na região Nordeste do Brasil (BARTLEY, 2019).

Atualmente, muitos trabalhos vêm relatando a disseminação de cepas resistentes aos beta-lactâmicos, anteriormente eficazes no tratamento das infecções estafilocócicas. Nestas, a modificação das proteínas ligantes de penicilina (PBP's), sintetizadas pelo gene *mecA*, é um dos principais mecanismos de resistência descritos (AARESTRUP, 2001). A presença do gene *mecA* sugere a probabilidade de transferência horizontal de genes entre espécies distintas e foi considerada um “padrão ouro” para detecção das espécies resistentes (COELHO, 2007).

Entre as bactérias Gram-negativas, a resistência aos beta-lactâmicos se destaca, entre elas as enterobacteriáceas *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* spp., entre outras, além de *Pseudomonas aeruginosa*, que podem expressar genes específicos de resistência. *P. aeruginosa* é um bacilo aeróbio obrigatório, e a bactéria também é encontrada na água e no solo (KAZMIERCZAK, 2016; ALATOOM, 2024).

4.2.2 Genes de resistência a fenicóis

No Brasil, o florfenicol é um dos dois únicos antibióticos permitidos pela legislação para tratamento de enfermidades na piscicultura (SILVA, 2018). A resistência a essa classe de antibióticos é conferida através do mecanismo de efluxo ativo, conferido pelos genes *cmIA* e *floR* (MICHAEL, 2006), onde a proteína Flo, codificada pelo gene *floR*, é capaz de mobilizar tanto o cloranfenicol como o

florfenicol (TORTORA, 2017).

4.2.3 Genes de resistência a macrolídeos

Os genes *erm* codificam metilases, que modificam o alvo dos macrolídeos (como a eritromicina), prevenindo a ação do antibiótico (LEWIS, 2005). Em estudos realizados anteriormente, na China e na Alemanha, amostras de água foram analisadas, apresentando genes de resistência a macrolídeos, sendo eles *ermB* e *ermC* (STOLL, 2012; NIU, 2016).

4.2.4 Gene de resistência a aminoglicosídeos

O gene *aac(6')-Ib* codifica uma acetiltransferase que inativa os aminoglicosídeos (como a gentamicina), antibióticos utilizados frequentemente para tratar infecções bacterianas em peixes e camarões. Em estudos anteriores, o gene de resistência *aac(6')-Ib* foi identificado em amostras de água nos estados brasileiros Bahia e Paraná, além de países como Portugal e China (SU, 2012; VAZ-MOREIRA, 2016; CONTE, 2017; BARTLEY, 2019). Em peixes do Mar Mediterrâneo, na região da Argélia, também foram isoladas cepas de *A. baumannii* portadoras dos genes *aac(6')-Ib*, assim como em isolados de peixes provenientes de *E. coli* na china (JIANG, 2012; BRAHMI, 2016).

4.2.5 Genes de resistência a quinolonas

Os genes da família *qnr* codificam resistência às quinolonas e estão frequentemente relacionados a bactérias dos gêneros *Shewanella*, *Vibrio* e *Aeromonas* de ambientes aquáticos (POIREL, 2005; BAQUERO, 2008). A

presença dos genes *qnrD*, *qnrB*, *qnrS* em *E. coli* provenientes de peixes na China já foi observada, assim como plasmídios carregando o gene *qnrS2* em *Aeromonas spp.* provenientes de amostras de água em países como França, Suíça e Itália (CATTOIR, 2008; PICAIO, 2008; JIANG, 2012).

4.2.6 Genes de resistência a sulfonamidas

Os genes de resistência às sulfonamidas que podem ser adquiridos são *sul1*, *sul2* e *sul3*. A resistência ocorre pela codificação do gene em isoformas da enzima-alvo do fármaco na síntese do ácido fólico, as quais apresentam baixa afinidade às sulfonamidas (ANTUNES, 2005). Esses genes de resistência às sulfonamidas são frequentemente encontrados em bactérias Gram-negativas (BYRNE-BAILEY, 2009). Em 2016, na China, amostras de água e sedimentos da baía de Bohai bay foram analisadas, apresentando genes de resistência a sulfonamidas, sendo eles *sul1* e *sul2* (NIU, 2016).

4.2.7 Genes de resistência a tetraciclinas

Pelo fácil acesso, as tetraciclinas são antibióticos que têm sido comumente utilizados na profilaxia e terapia de infecção em humanos e animais, além da subterapia feita em animais de produção como promotores do crescimento (CHOPRA, 2001).

Três estratégias empregadas pelas bactérias causam a resistência à tetraciclina, sendo elas a limitação do acesso ao seu alvo pelo efluxo deste através da membrana celular (*tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD* e *tetE* são os mais frequentemente encontrados), alteração ribossomal que dificulta uma ligação efetiva do antimicrobiano ao seu respectivo alvo (*tetO* e *tetM*) e produção de enzimas de inativação da tetraciclina (ARENZ, 2015; DUTTA, 2016).

4.3 BIOFILME

A medicina moderna lida com um aumento de infecções relacionadas a patógenos formadores de biofilme, que são definidos como uma matriz de comunidade microbiana durável em polissacarídeos (CIOFU, 2022). Células destacadas de biofilmes estão associadas à mortalidade quando comparadas às células planctônicas (UPPULURI, 2010, PREDÁ e SĂNDULESCU, 2019). É importante ressaltar que a transferência horizontal de genes de resistência pode ser alcançada através da formação de biofilme (SAVAGE, 2013; MARINCOLA, 2021). Estima-se que mais de 65% das infecções bacterianas tenham associação com a produção de biofilme (GRAF, 2019). Biofilmes são compostos de bactérias (podendo ser de diferentes espécies) envoltas de EPS e permeados por canais de água, que funcionam como um sistema circulatório de entrega de nutrientes ao interior do biofilme e de remoção de restos metabólitos (HALL-STOODLEY, 2004; POZO 2007). A formação e acumulação de biofilme acontece quando há a fixação de células livres do meio líquido em uma superfície sólida. Em seguida, há a divisão dessas bactérias fixas e produção e excreção de EPS, juntamente com a fixação de novas bactérias flutuantes. Quando o ambiente não se encontra mais favorável ou, ainda, devido a uma programação celular para a virulência, ocorre o desprendimento de células planctônicas ou de grupos de células unidas pelo EPS que podem colonizar novo local (HALL-STOODLEY, 2005; BAYLES, 2007).

O *quorum sensing* é um mecanismo intercelular de sinalização importante para a formação de estrutura em biofilmes, regulando certas atividades celulares, como a produção de metabólitos secundários de um modo dependente da densidade celular, observado em culturas planctônicas (SALMOND, 1995, DAVIES, 1998),

Bactérias que vivem nessas comunidades são de 10 a 1000 vezes mais tolerantes aos antimicrobianos do que quando na forma planctônica (DAVIES, 2003). O EPS reduz a capacidade de penetração de antimicrobianos em todas as áreas do biofilme, podendo atuar como barreira física para difusão, retendo grande parte dos agentes antimicrobianos e, assim, reduzindo a quantidade do mesmo para agir sobre as células e interagindo, quimicamente, com esses agentes, sequestrando os antimicrobianos hidrofílicos e carregados positivamente, tais como

os aminoglicosídeos (NICHOLS, 1988).

Biofilmes são idealmente adequados para a troca de material genético devido à proximidade das células bacterianas. Dessa forma, a vida em comunidade facilita a transferência horizontal de genes, através de plasmídeos, os quais podem codificar resistência para múltiplos agentes antimicrobianos (MADSEN, 2012).

Ainda devido à presença do EPS, o sistema imune encontra dificuldade para reconhecer os biofilmes, tornando seu interior protegidas contra a ação de anticorpos, radicais livres e outros compostos reativos produzidos pelos fagócitos que são recrutados para o combate de infecções (BRYERS, 2008)

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ORIGEM DAS AMOSTRAS

Foram analisadas amostras coletadas anteriormente que fazem parte do acervo bacteriano do Laboratório de Sanidade Animal da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil, proveniente do projeto de Iniciação Científica realizado por pesquisadores envolvidos no presente estudo, assim como foram realizadas novas coletas. Todas as amostras têm origem em pisciculturas ornamentais de Campos dos Goytacazes e localidades da área do entorno de Patrocínio de Muriaé-MG (Figura 2), que, na maioria dos casos, representa a principal fonte de renda de piscicultura ornamental na área rural, coletadas durante o período de 2018-2025.



Figura 2: Propriedade localizada em Patrocínio de Muriaé - MG. (Fonte: arquivo pessoal).

5.2 COLETA DE AMOSTRAS

5.2.1 Amostras de animais

Amostras de peixes de diferentes espécies foram coletadas aleatoriamente, de acordo com a disponibilidade dos proprietários, e transportadas para o laboratório (Figura 3), e, em seguida, acondicionadas em caixas isotérmicas com uma camada de gelo sob os peixes, e acima, outra camada de gelo picado (TAVARES, 2014). Paralelamente, amostras foram coletadas com suabes da cavidades nasal, oral e anal de animais domésticos que têm contato ou apresentem-se próximos a áreas de piscicultura ornamental nas propriedades visitadas (Figura 4). A coleta do material é realizada através de suabe

acondicionado em meio de transporte Cary Blair (ANDRADE, 2010). Os suabes foram mantidos refrigerados e enviados ao Setor de Micologia Animal do Laboratório de Sanidade Animal da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) para o isolamento e identificação de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas resistentes. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de uso de animais da UENF (protocolo nº 647).

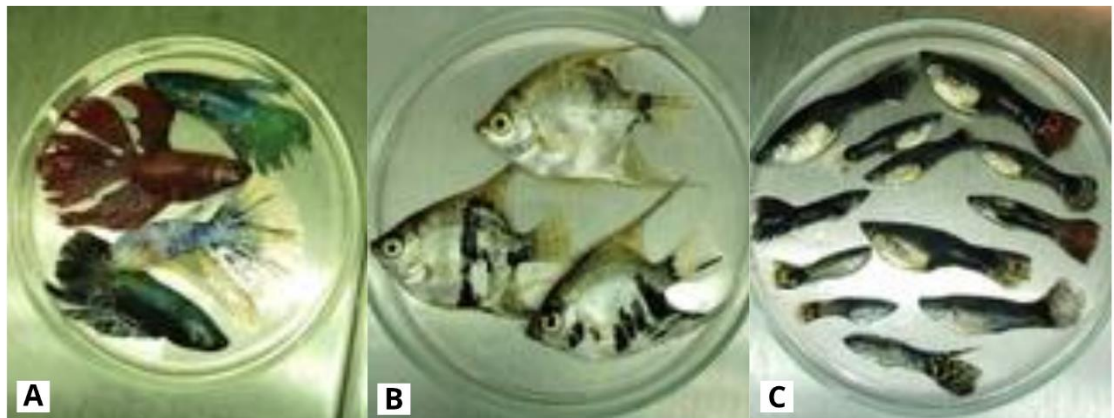


Figura 3: A: peixes da espécie Betta (*Betta splendens*); B: peixes da espécie Acará (*Pterophyllum*); C: Peixes da espécie Guppy (*Poecilia reticulata*). (Fonte: arquivo pessoal).

5.2.2 Amostras de água

Foi realizada a coleta de amostras de água dos tanques de piscicultura ornamental (Figura 4.A). Estas amostras foram coletadas em duplicata, sendo uma amostra processada para isolamento de bactérias Gram-positivas e outra para isolamento de Gram-negativas (Stoll et al., 2012).

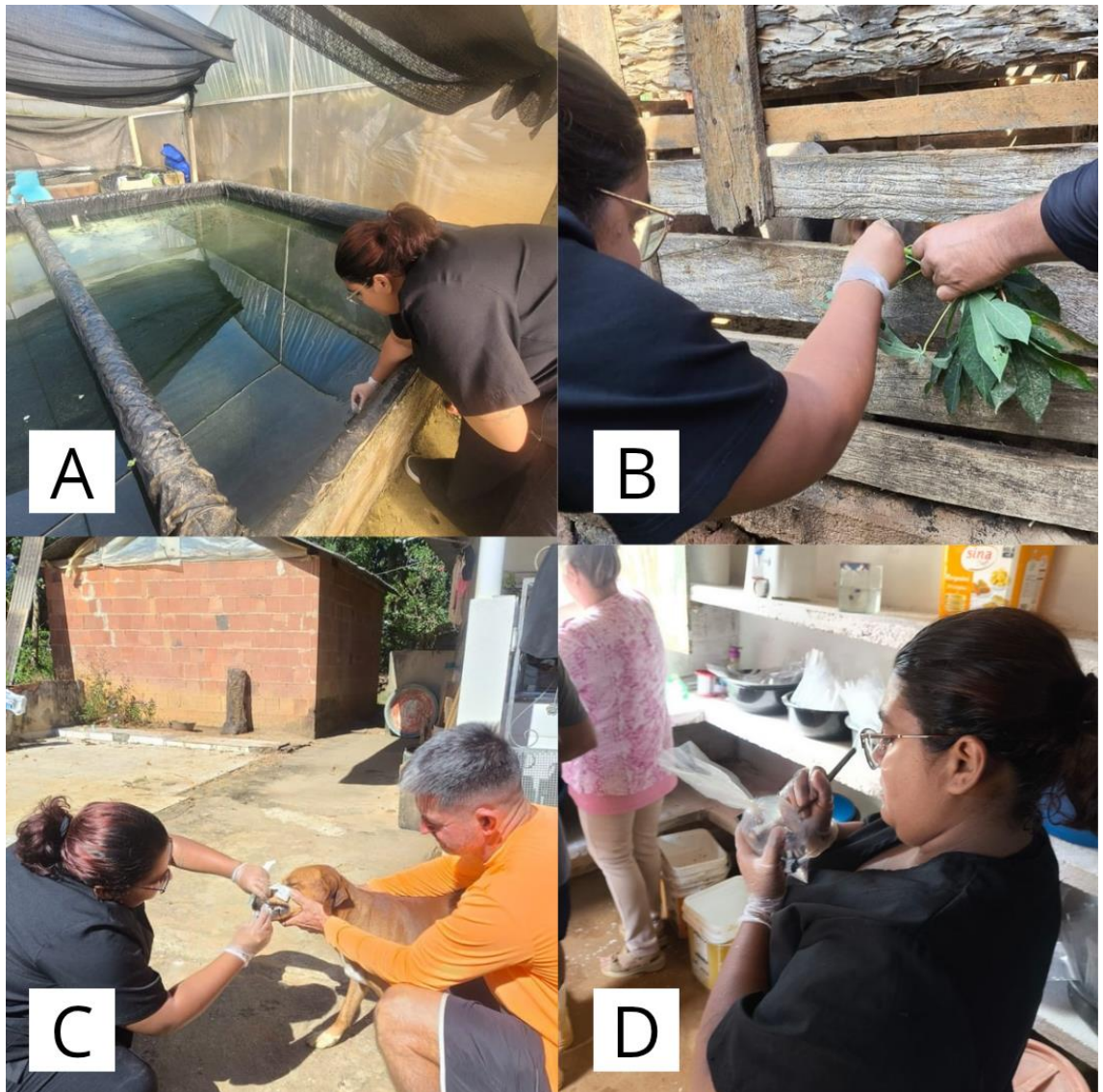


Figura 4: A: Coleta de amostras de água; B: Coleta de amostra de suíno; C: Coleta de amostra de cão; D: Coleta de amostra de peixes. (Fonte: arquivo pessoal).

5.3 PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS

5.3.1 Reativação de amostras coletadas anteriormente

As amostras foram reativadas em tubos do tipo falcon contendo 2mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion) (Kasvi, Espanha), que, após incubação em estufa bacteriológica a 37 °C por 24h, foram centrifugados a 2795xg por 5 minutos. O

sobrenadante foi descartado e os pellets contendo os microrganismos foram transferidos com alça de platina para placas de Petri com meio ágar Mueller Hinton (Kasvi, Espanha), com o objetivo de obter colônias puras após incubação a 37 °C por 24h, para seguir com as demais fases do experimento.

5.3.2 Amostras de animais

Em ambiente estéril na capela de fluxo laminar, foi realizada a separação do segmento intestinal dos peixes ornamentais, 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 com os respectivos meios de enriquecimento: Caldo BHI, Caldo BHI acrescido de 7,5% NaCl (ambos incubados em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas) e Caldo Rappaport Vassiliadis (submetido a banho-maria a 42°C por 24 horas) para exames bacteriológicos em meio de cultivo e sua identificação.

Os suabes acondicionados em meio de transporte Cary Blair (ANDRADE, 2009) das cavidades nasal e anal coletados de animais domésticos foram inoculados em tubos cônicos contendo Caldo BHI e Caldo BHI acrescido em 7,5% NaCl, para bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, respectivamente. Suabes da cavidade anal também foram inoculados tubos cônicos contendo 3mL/tubo de Caldo Rappaport Vassiliadis (submetido a banho- maria à 42°C por 24 horas) para exames bacteriológicos em meio de cultivo e sua identificação.

5.3.3 Amostras de água

As amostras de água coletadas foram fracionadas em duas partes, uma para isolamento de bactérias Gram-positivas e outra para isolamento de Gram-negativas. As amostras de água coletadas foram aliqüotadas (3 mL) e acondicionadas em tubos cônicos de 15mL contendo caldos nutritivos (2 mL/ tubo), sendo estes: caldo BHI, para isolamento de bactérias Gram-negativas e caldo BHI acrescido em 7,5% NaCl para seleção de *Staphylococcus spp.* Após acondicionadas nos tubos, as amostras foram encaminhadas para a estufa

bacteriológica a 37°C por 24 horas (ANDRADE, 2009).

5.4 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA

Retirados da estufa bacteriológica, os tubos cônicos contendo Caldo BHI e BHI acrescido de 7,5% de NaCl (Vetec®) foram centrifugados a 5.000g por 10 minutos. Após desprezar o sobrenadante, os pellets contendo os microrganismos foram transferidos dos tubos de BHI para Placas de Petri com meio Ágar MacConkey (Acumedia, EUA) para identificação de bactérias Gram-Negativas e transferidos dos tubos de BHI acrescido de 7,5% de NaCl para meio Manitol (Kasvi, Espanha) para Identificação de *Staphylococcus* spp.

Para a avaliação de características morfológicas e morfotintórias das colônias, foi utilizado o método de Gram (Laborclin, Brasil) e submetidas aos testes de Catalase (Peróxido de Hidrogênio a 3%) e Oxidase (Fluka, Chemika, Suíça).

As colônias isoladas observadas em Ágar MacConkey (Acumedia, EUA) foram identificadas por meio de testes bioquímicos convencionais, avaliando as características de fermentação de carboidratos (glicose, sacarose, e lactose), produção de indol, H₂S, urease, utilização de citrato, capacidade de descarboxilação dos aminoácidos lisina, arginina, ornitina e presença de motilidade (KONEMAN, 2001). A utilização do citrato como fonte de carbono é avaliada utilizando o meio Ágar citrato (Difco, EUA). A mudança de cor do meio para azul após o período de incubação indica positividade. A produção da enzima urease é verificada através da inoculação de uma amostra da colônia em caldo uréia (INLAB, Brasil), na qual a presença da degradação da uréia a amônia é evidenciada a partir da mudança de cor do meio para rosa. A capacidade de descarboxilação da lisina, arginina e ornitina são verificadas a partir da inoculação da amostra da colônia em caldo descarboxilase (Difco, EUA) com 1% de D-lisina, D-ornitina e L-arginina (INLAB, Brasil). A utilização desses aminoácidos é indicada pela mudança da coloração do meio para o roxo. As leituras dos resultados de todas as provas bioquímicas descritas acima foram realizadas após a incubação em estufa bacteriológica a 35±2°C, por 24 a 48 horas dos respectivos meios inoculados. O teste da Coagulase em tubo (EDTA Plasma rabbit, Difco, EUA) foi realizado a partir de colônias isoladas, onde a amostra é inoculada em microtubo

tipo eppendorf estéril contendo 0,5 mL de plasma de coelho e encaminhada à estufa bacteriológica a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$. Este teste é realizado a fim de verificar a presença da enzima que produz a coagulação do plasma. A leitura do teste deve ser realizada às 2 horas, 6 horas e finaliza após 24 horas em estufa bacteriológica. A ausência de coagulação após 24 horas de incubação caracteriza a prova negativa.

Para identificação de cepas do gênero *Aeromonas* e *Pseudomonas* foi realizado o teste OF-glucose (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 metálica (NEOGEN, 2011).

Após o crescimento no Ágar Manitol, foi avaliada a positividade da fermentação do açúcar manitol, com alteração da cor do meio. As características morfológicas e morfotintoriais das colônias foram analisadas e coradas pelo método de Gram (Laborclin, Brasil) para análise em microscopia. Também foram submetidas aos testes de Catalase, Oxidase (Fluka Chemika, Suíça) e todos os testes bioquímicos necessários para identificação, incluindo: prova de esculina, produção de urease e testes que conferem patogenicidade às amostras, como os testes DNase e coagulase. O teste de Voges-Proskauer (Figura 5) é um teste complementar utilizado na identificação de *Staphylococcus aureus*, que confere anel vermelho se positivo (KONEMAN, 2001), e utiliza-se o caldo VM/VP, no qual a acetoína é convertida a diacetil na presença de oxigênio atmosférico e hidróxido de potássio a 40%, sendo que o alfa-naftol atua como catalisador para produzir um complexo de cor vermelha. A acetoína é um subproduto inativo proveniente de uma das vias de degradação fermentativa da glicose, produzida por alguns grupos bacterianos.

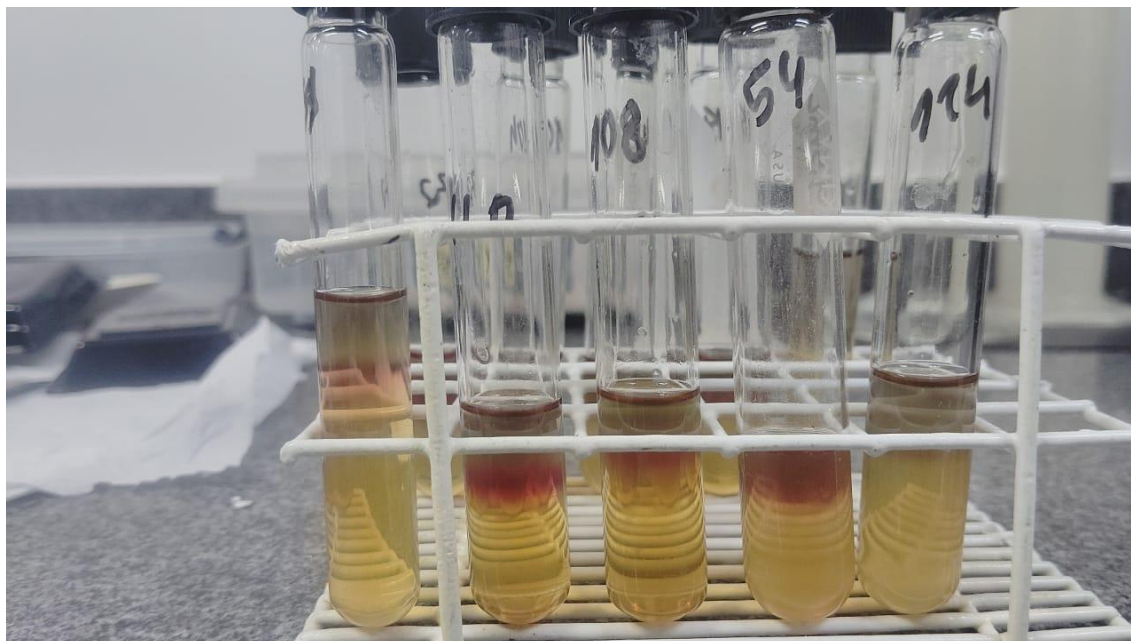


Figura 5: Realização do teste de Voges-Proskauer. (Fonte: arquivo pessoal).

5.5 PESQUISA DE BACTÉRIAS RESISTENTES

5.5.1 Avaliação de resistência a antimicrobianos

Nesta etapa, as amostras foram caracterizadas de acordo com o perfil de sensibilidade a antimicrobianos (Figura 6). O teste é realizado através da técnica de difusão em Ágar Mueller Hinton (kavis, Alemanha), de acordo com as normas da CLSI (2024), utilizando-se discos impregnados (Cefar, SP, Brasil). A técnica de difusão em Ágar Mueller Hinton (kavis, Alemanha) consiste em colônias puras cultivadas em estufa bacteriológica por 24 horas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$, onde são inoculadas em solução salina (0,85% NaCl), de modo a obter turbidez igual a 0,5 de acordo com a escala de Macfarland (1×10^6 UFC/mL) medida em fotômetro com leitura de DO_{530} nm (Densimat, bioMérieux, França) e semeada com auxílio de suabe estéril em placa de Petri com meio Ágar Mueller Hinton (Acumedia, EUA). Em seguida, os discos de cada antibiótico (Cefar, SP, Brasil) são adicionados ao Ágar com auxílio de uma pinça, e incubada a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas em estufa bacteriológica.

Para bactérias Gram-positivas, foi avaliado o perfil de susceptibilidade aos seguintes antibióticos: Amoxicilina (AMO, $30\mu\text{g}$), Ampicilina (AMP, $10\mu\text{g}$),

Clindamicina (CLI, 2 μ g), Sulfazotrim (SUT, 25 μ g), Eritromicina (ERI, 15 μ g), Oxacilina (OXA, 1 μ g), Penicilina G (PEN, 10U), Tetraciclina (TET, 30 μ g).

Para bactérias Gram-negativas, o teste de susceptibilidade foi realizado frente aos antibióticos: Amoxicilina (AMO, 30 μ g), Cefoxitina (CFO, 30 μ g), Ciprofloxacina (CIP, 5 μ g), Enrofloxacina (ENO, 5 μ g), Tetraciclina (TET, 30 μ g), Tobramicina (TOB, 30 μ g) e Florfenicol (FLF, 30 μ g).

Posteriormente, realizou-se a leitura do teste através da mensuração dos halos formados por paquímetro, determinando o perfil de resistência, resistência intermediária ou sensibilidade da bactéria frente ao fármaco testado. A interpretação dos resultados foi realizada de acordo com a tabela padrão do fabricante.



Figura 6: Realização do teste de sensibilidade a antimicrobianos pelo método de difusão em disco. (Fonte:arquivo pessoal).

5.6 ANÁLISE MOLECULAR

5.6.1 Extração e quantificação de DNA

Para a extração do material genético microbiano foi empregado o kit PREPMAN ULTRA® (Applied Biosystems, Life Technologies, EUA) conforme instruções do fabricante. A técnica de extração de DNA foi realizada a partir de isolados bacterianos, cultivados em Ágar Mueller Hinton (Kavis, Alemanha), meio de cultura no qual não contém aditivos que possam interferir na reação de PCR. Os isolados são incubados por 24 horas a $35\pm 2^\circ\text{C}$ em estufa bacteriológica. Após, para a realização da extração do material genético, utiliza-se 100 μl do kit PREPMAN ULTRA® (Applied Biosystems, Life Technologies, EUA), sendo dispensado assepticamente para microtubos tipo eppendorf estéreis e identificados, onde serão depositadas as colônias. As amostras, após devidamente fechadas e identificadas, são agitadas no Vortex (MOD QL901 - Biomixer) durante 10 a 30 segundos. Posteriormente, os microtubos tipo eppendorf devem ser acondicionados a placas aquecedoras Thermomixer R Confort® (Eppendorf AG, Hamburg 2007) em temperatura a 100°C durante 10 minutos. Os microtubos são retirados em alta temperatura e permanecem em temperatura ambiente durante dois minutos. Após isso, são transferidos para a Microcentrífuga 5415D EPPENDORF® durante dois minutos a 22672 g. Após, transferido 50 μl do sobrenadante do DNA extraído para um segundo conjunto de eppendorfs estéreis e identificados, armazenados a -20°C para uso posterior na reação de PCR, e o pellet, que contém as proteínas bacterianas e restos de parede celular, é desprezado.

Para quantificar o DNA, utiliza-se um espectrofotômetro (Thermo Scientific™ NanoDrop ND-2000, UVVis).

5.6.2 Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) e Eletroforese

A amplificação do DNA de cepas foi realizada de acordo com Aranda (2007), utilizando os primers correspondentes para a pesquisa dos genes citados na tabela

1. Foram utilizados controles negativos e positivos para avaliar a ocorrência de contaminação de reagentes e a sensibilidade da reação, respectivamente. A incubação foi realizada em Termociclador apropriado TC – 412 (Techne®).

Tabela 1: Sequências de nucleotídeos dos conjuntos de iniciadores utilizados para amplificar genes de resistência bacteriana.

Genes	Primers	Iniciadores (5'-3')	Fragmento (pb)	Referências
<i>Tet(M)</i>	<i>Tet(M)</i>	F: GTAAATAGTGTTCT TGGAG R: CTAAGATATGGCTCT AACAA	576pb	Aarestrup, 2000
<i>mecA</i>	M- mec A	F: ATCGATGGTAAAGGT TGGC R: AGTTCTGCAGTACCG GATTTG	147pb	ZHANG <i>et al.</i> , 2005
<i>blaCTX-M</i>	L- CTX- M-15	F: CGCTTTGCGATGTGC AG R: ACCGCGATATCGTTG GT	550pb	Jiang <i>et al.</i> 2006

<i>blaSHV</i>	<i>B-SHV</i>	F: TGGTTATGCGTTATA TTCGCC R: GCTTAGCGTTGCCA GTGCT	867pb	Jiang et al. 2006
<i>AAC(6')-IB</i>	<i>aac(6')-IB</i>	F: TATGAGTGGCTAAAT CGAT R: CCCGCTTTCTCGTAG CA	482pb	Park et al. (2006)
<i>floR</i>	<i>floR</i>	GACGCCCGCTATGA TCCAAC CCTGCCATCCCAAGA ACTCG	351	Maynard et al. (2003)
<i>qnrS</i>	<i>QnrS</i>	F: ACGACATTCGTCAAC TGCAA R: TAAATTGGCACCCTG TAGGC	417pb	Jacoby et al. (2009)
<i>Enterotoxina A</i>	<i>B-SEA-</i>	GGTTATCAATGTGCG GGTGG CGGCACTTTTTTCTC TTCGG	120pb	Johnson et al. (1991)
<i>Enterotoxina B</i>	<i>B-SEB</i>	GTATGGTGGTGTAAAC TGAGC CCAAATAGTGACGAG TTAGG	478	Johnson et al. (1991)

<i>tet(A)</i>	GTGAAACCCAACATA CCCC GAAGGCAAGCAGGA TGTAG	888	Maynard et al. (2003)
<i>tet(B)</i>	CCTTATCATGCCAGT CTTGC ACTGCCGTTTTTTCG CC	774	Maynard et al. (2003)

As amostras foram submetidas à técnica de PCR de acordo com Jiang (2006), utilizando volume final de 25 µL, contendo 10 pmol/ µL de cada primer (1 µL de cada primer), 12,5 µL de GoTaq® Green Master Mix 2x (Promega Corporation®), 2 µL de DNA molde e 8,5 µL água ultrapura (Thermo Scientific®) (tabela 2).

Tabela 2: Volume dos componentes utilizados para a realização das PCR, utilizando o MasterMix: ThermoScientific MasterMix 2X, com total de 25 µL.

	PCR E CONTROLE +	CONTROLE -
Master Mix	12,5	12,5
Água	6,5-9,5	10,5
Primers R e F	1-2	1-2
DNA	1-2	0
Total	25	25

Para a análise dos genes, a mistura foi submetida em um Termociclador TC – 412 (Techne®) e foram adotadas as condições de amplificação necessárias para cada gene.

Tabela 3: Protocolos de realização das PCR para a pesquisa dos genes de resistência a antibióticos utilizados, utilizando o MasterMix ThermoScientific MasterMix 2X.

GENE	Desnaturaçã Inicial	Desnaturaçã	Anelamento	Extensã	Extensã Final	Nº De Ciclos
<i>tet(M)</i>	3'	20"	1'	90"	7'	35
	94°C	94°C	55°C	72°C	72°C	
<i>mecA</i>	2'	30"	2'	1'	7'	34
	95°C	95°C	58°C	72°C	72°C	
<i>bla</i> CTX-M <i>bla</i> SHV <i>bla</i> TEM	3'	30"	60"	60"	4'	35
	94°C	95°C	52°C	72°C	72°C	
<i>aac(6')ib-cr</i>	2'	45"	45"	45"	30"	34
	94°C	94°C	55°C	72°C	72°C	
<i>floR</i>	4'	1'	30"	1'	10'	35
	94°C	94°C	61°C	72°C	72°C	
<i>qnrS</i>	6'	45"	45"	1'	7'	35
	94°C	94°C	53°C	72°C	72°C	
<i>sea</i> <i>seb</i>	5'	30"	30"	30" 72°C	4'	34
	94°C	94°C	57°C		72°C	
<i>tet(A)</i>	5'	45"	1'	1'	5'	35
<i>tet(B)</i>	94°C	94°C	55 °C	72 °C	72°C	

Após a execução das etapas de amplificação dos fragmentos de DNA, os produtos amplificados (amplicons) foram submetidos a alíquotas. Posteriormente, aplicados nos poços do gel de agarose a 1% e submetidos à eletroforese em cuba contendo tampão TBE (1X), ligada a uma fonte de

corrente elétrica em voltagem de 100V, durante aproximadamente 60 minutos, 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 Sistem). O tamanho dos fragmentos de DNA das amostras foi comparado com o marcador padrão de peso molecular, utilizando 4 µL de 1Kb Plus DNA Ladder 250 µg (0.5 µg/ µL) (Invitrogen™ by Termo Fisher Scientific) e 10µL de tampão de amostra, aplicado no poço do gel. 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.

5.7 ENSAIO DA PRODUÇÃO DE BIOFILME

Foi realizado o ensaio de quantificação da produção de biofilme de cepas que tiveram genes de resistência amplificados, utilizando técnica já descrita (STEPANOVIC, 2007) com o uso de caldo BHI. Os isolados bacterianos foram cultivados em caldo BHI por 24 horas a 37°C. Para microtitulação foram utilizadas placas de 96 poços, adicionando 200µL das suspensões bacterianas, em triplicata, sendo utilizado como controle negativo o caldo BHI sem inóculo bacteriano e, como controle positivo, as cepas padrão ATCC correspondente à cepa clínica utilizada. As placas foram incubadas a 37°C durante 24 horas. Após este período, as suspensões bacterianas foram removidas e cada poço foi lavado por três vezes com 250µL de solução fisiológica (0,9% NaCl) estéril. Posteriormente, foi realizada a fixação com 200µL de metanol p.a. (pureza absoluta) por 15 minutos. O metanol foi removido; as placas deixadas em temperatura ambiente para secar e coradas com 200µL de solução de cristal violeta durante cinco minutos. Em seguida, as placas foram lavadas com água corrente e secas em temperatura ambiente. Após este processo, foi realizada a leitura da absorbância em leitor de ELISA (BioRad, modelo 550), em comprimento de onda de 570nm, e as amostras classificadas segundo Stepanovic (2000). O valor das densidades ópticas para cada isolado (DO_i) foi obtido pela média dos três poços, sendo este valor comparado com a densidade ótica do controle negativo (DO_c). Os isolados foram classificados em quatro

categorias, de acordo com a média das densidades óticas (DO) relacionada com os resultados obtidos para a DOc. As categorias são baseadas nos critérios da tabela 4.

Tabela 4: Interpretação dos resultados de capacidade de formação de biofilme conforme descrito por Stepanovic (2007).

4x DOc < Doi	Fortemente aderente (+++)
2 x DOc < DOi ≤ 4 x Doc	Moderadamente aderente (++)
se DOc < DOi ≤ 2 x Doc	Fracamente aderente (+)
se DOi ≤ Doc	Não aderente

DOc = Densidade Óptica do *cutoff*. valor que corresponde à média dos poços do controle negativo; DOi = Densidade Óptica da amostra.

5.8 SEQUENCIAMENTO DE SANGER

Os amplicons de cepas que apresentaram genes de resistência foram submetidos à sequenciamento em colaboração com a Unidade de experimentação animal – UEA (UENF) para confirmação da presença dos mesmos.

As sequências de DNA amplificadas por PCR foram purificadas com Exosap-IT express (Thermo Fisher Scientific), e, em seguida, um microlitro da amostra purificada foi adicionado a um poço da placa de 96 poços, juntamente com 1µL do respectivo primer forward ou reverse e 8µL do master mix do BigDye Terminator v3.1 (Thermo Fisher Scientific, 2019). Depois, essa reação realizada no termociclador Veriti (Thermo Fisher Scientific) com o seguinte protocolo: 95°C por um minuto, 25 ciclos de (96°C por 15 segundos, 50°C por 15 segundos, 60°C por quatro minutos) e, por fim, mantida a 4°C até a remoção do equipamento. A purificação da reação de sequenciamento foi realizada pelo método de precipitação com etanol, adicionando-se 2,5 µL de EDTA 125 mM e 30 µL de etanol absoluto em cada poço. A placa foi incubada a temperatura ambiente por

15 minutos e, em seguida, centrifugada a 4000 rpm durante 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e a placa foi centrifugada de cabeça para baixo a 1160 rpm por 1 minuto para secagem dos poços. Depois, foram adicionados 30 μ L de etanol 70% (preparado no momento) a cada poço, seguido de uma nova centrifugação a 4000 rpm por 15 minutos. O conteúdo foi novamente descartado e a placa passou por mais uma centrifugação de cabeça para baixo (a 1160 rpm por 1 minuto). Após a remoção completa do etanol, 10 μ L de formamida foram adicionados a cada poço e a placa foi, então, levada ao termociclador para a etapa de desnaturação a 95°C por cinco minutos e, depois, 4°C por três minutos. As amostras foram analisadas por eletroforese capilar no analisador genético automático (ABI 3500), utilizando o polímero POP-7 e capilares de 50 cm. As sequências obtidas foram analisadas no software Geneious (Dotmatics).

5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise considerou três etapas a seguir:

Etapa 1: Análise descritiva simples (frequência) das características de sensibilidade ou resistência a antibióticos em grupos de bactérias (Gram positiva e Gram negativa). A Associação foi testada a partir do teste Qui-Quadrado considerando significância de 5%. Mesma análise de frequência foi realizada para verificar a associação dos grupos bacterianos com genes de resistência a antibióticos.

Etapa 2: Para avaliar as relações entre as os antibióticos avaliados e os grupos bacterianos (Gram positiva e Gram negativa), foi realizada análise fatorial (A_F) incluindo cada grupo bacteriano em um modelo único. O número de fatores extraído seguiu o critério de Kaiser segundo o ponto de inflexão dos autovalores (autovalores acima de 1), (KASIER, 1960). Utilizou-se a rotação ortogonal (modelo varimax) na análise dos fatores. A significância dos fatores foi estabelecida de acordo aos pesos fatoriais das variáveis em cada fator. A adequação do modelo composto foi avaliada através da estatística de Kaiser-Meyer-Olkin ($KMO > 0,50$) e do teste de esfericidade de Bartlett ($< 0,05$), mostrando-se adequado de acordo com (CERNY e KAISER, 1977).

Foi utilizada a matriz de correlações da análise fatorial para investigar o grau

e a magnitude de associação das variáveis entre os fatores identificados. Foram consideradas significativas as correlações com $P < 0,05$.

Etapa 3: A fim de avaliar o agrupamento das diferentes variáveis no fenômeno de resistência bacteriana em propriedades dedicadas à piscicultura, foi utilizada a técnica de Análise de Correspondência Múltipla (ACM). A plotagem bidimensional desta análise foi utilizada na avaliação das relações entre as variáveis, considerando a proximidade dos centroides das variáveis em avaliação. O Coeficiente alfa de Cronbach (α) foi considerado na avaliação da confiabilidade do modelo bidimensional. Adotou-se a classificação sugerida por Matthiensen (2011), onde $0,60 < \alpha \leq 0,75$ - Moderada ; $0,75 < \alpha \leq 0,90$ – Alta, e $\alpha > 0,90$ – Muito alta.

Os dados coletados foram processados e analisados utilizando o software SPSS® (SPSS, 2012).

6 RESULTADOS

6.1 IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA E PERFIL DE SUCEPTIBILIDADE

Foram reativadas bactérias do acervo do LSA provenientes de amostras de animais e água coletadas das propriedades no período de 2018-2022 e novas coletas foram realizadas em seis propriedades localizadas nas regiões de Campos dos Goytacazes e Patrocínio de Muriaé. Foram analisadas ao todo 164 cepas bacterianas, sendo 101 Gram-negativas (61,6%) e 63 Gram-positivas (38,4%). Dessas, 55 cepas bacterianas foram isoladas de amostras de água (33,5%), 34 cepas foram isoladas de amostras de peixes (20,7%) e 75 cepas foram isoladas de amostras de animais com acesso direto à água dos tanques (45,7%). Entre as bactérias Gram-negativas, os principais gêneros identificados foram *Aeromonas* (11 cepas; 10,9%), *Pseudomonas* (7 cepas; 6,9%) e membros da família *Enterobacteriaceae* (83 cepas; 82,2%).

A resistência observada nas bactérias Gram-negativas variou conforme a classe de antimicrobianos testada (Figura 7). Entre os β -lactâmicos, 68 cepas (67,6%) apresentaram resistência à amoxicilina e 28 cepas (27,7%) à cefotaxima, indicando a presença de mecanismos associados à produção de β -lactamases. Nos aminoglicosídeos, 16 cepas (15,8%) foram resistentes à tobramicina, enquanto entre

as tetraciclinas a resistência foi a mais elevada, com 41 cepas (40,6%) resistentes à tetraciclina. Para os fenicois, observou-se baixa ocorrência de resistência, com apenas três cepas (3,0%) resistentes ao florfenicol, o que demonstra manutenção de sensibilidade nessa classe. Já entre as fluoroquinolonas, a resistência à ciprofloxacina foi observada em quatro cepas (4,0%), enquanto 20 cepas (19,8%) apresentaram resistência à enrofloxacin, o que sugere possível resistência cruzada entre os fármacos dessa classe. De modo geral, as maiores taxas de resistência foram observadas frente às tetraciclinas e β -lactâmicos, enquanto a sensibilidade se manteve elevada para fenicois e fluoroquinolonas. Todas as amostras gram-negativas estão descritas no Apêndice B.

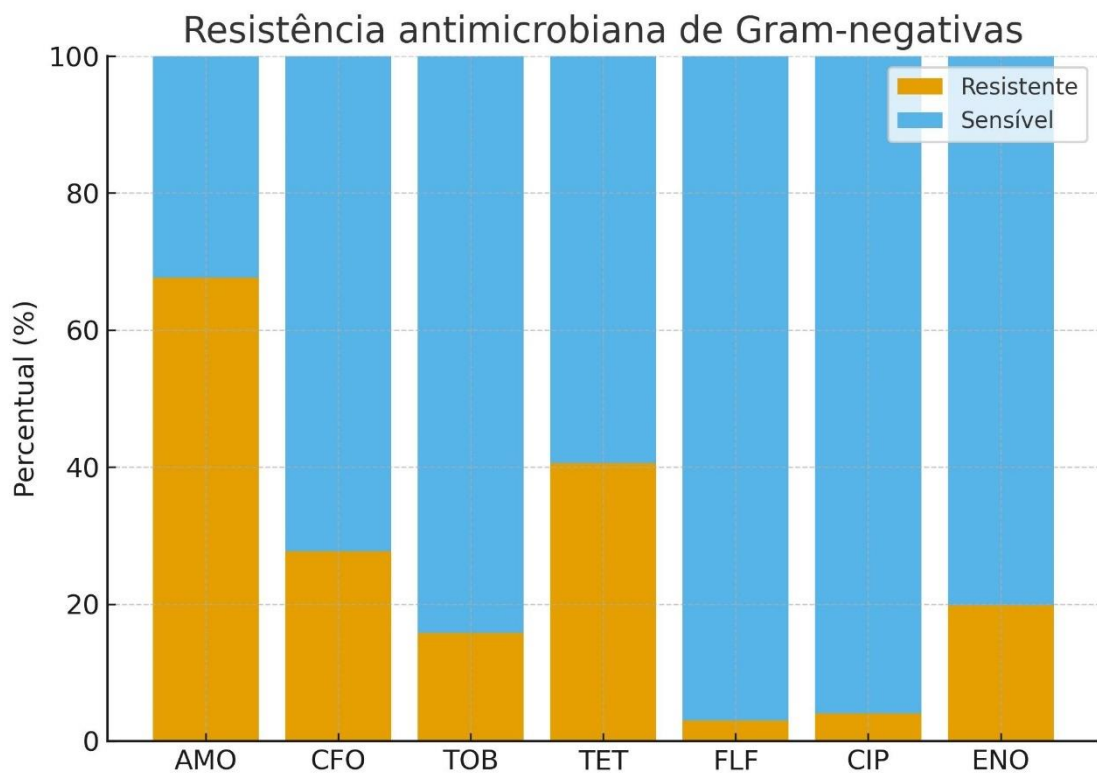


Figura 7: Resistência e sensibilidade a bactérias Gram-negativas.

Entre as bactérias Gram-positivas, foram identificados três grupos principais: 2 *Enterococcus* (1,6%), 33 *Staphylococcus* coagulase negativa (54,0%) e 28 *Staphylococcus* coagulase positiva (44,4%). A resistência também variou conforme a classe de antimicrobianos avaliada (Figura 8). Dentre os β -lactâmicos, observou-se resistência à penicilina em 27 cepas (42,9%), à oxacilina em 23 cepas (36,5%), à

amoxicilina em 19 cepas (30,2%) e à ampicilina em 10 cepas (15,9%), indicando ampla disseminação de resistência a essa classe entre os estafilococos. Entre os macrolídeos e lincosamidas, 27 cepas (42,9%) foram resistentes à eritromicina e 17 cepas (27,6%) à clindamicina, o que pode estar relacionado à presença de mecanismos de resistência cruzada mediados por metilação ribossômica. Em relação às tetraciclinas, seis cepas (9,5%) apresentaram resistência à tetraciclina, enquanto entre as sulfonamidas 15 cepas (23,8%) foram resistentes ao sulfametoxazol-trimetoprim. De maneira geral, as Gram-positivas apresentaram maior resistência aos β -lactâmicos e macrolídeos, especialmente entre os *Staphylococcus* spp., o que reforça a importância do monitoramento contínuo desses agentes em sistemas de produção animal. Todas as amostras gram-positivas estão descritas no Apêndice A.

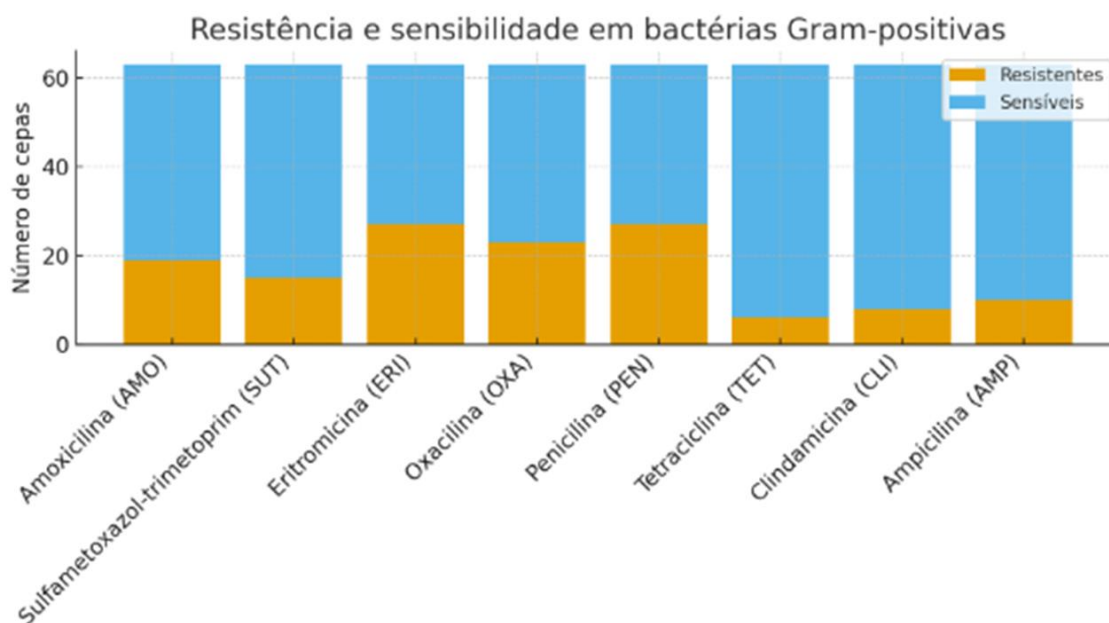


Figura 8: Resistência e sensibilidade a bactérias Gram-positivas.

6.2 ANÁLISE MOLECULAR

6.2.1 Detecção de *mecA* em *Staphylococcus* spp.

Das cepas de *staphylococcus* testadas, apenas uma (1,64%) apresentou o gene *mecA*, sendo indentificada como *Staphylococcus warneri*, proveniente de amostra 178, com origem de água. Como controle positivo foi utilizada a cepa *S. aureus* ATCC 33591 (Figura 9).

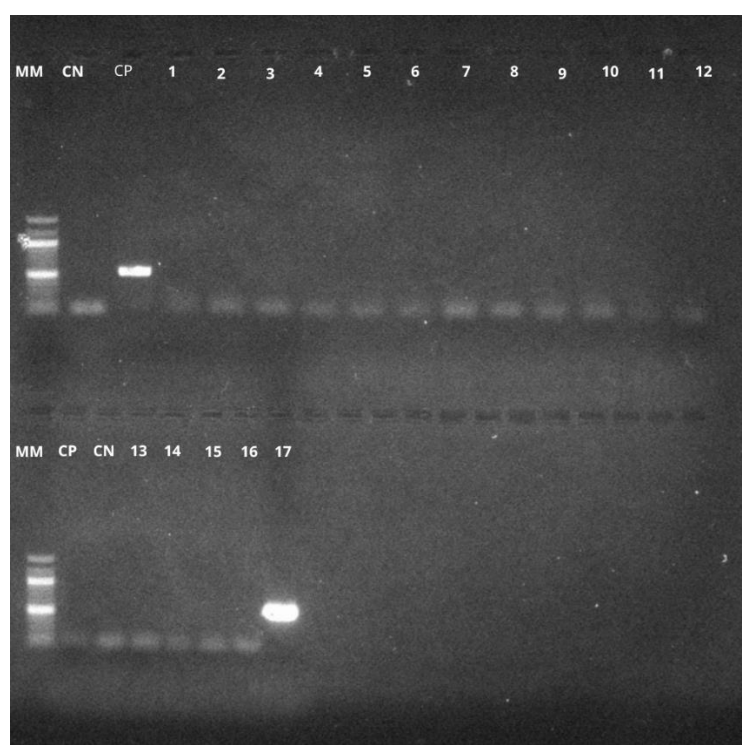


Figura 9: Gel de agarose 1% resultante da eletroforese de produtos de amplificação de PCR para gene *mecA*. MM: marcador de peso molecular; CP: controle positivo; CN: controle negativo; poços 1-12, 13-16: negativos; poço 17: amostra 78.

6.2.2 Detecção de genes de tetraciclina

Todas as cepas Gram-positivas foram submetidas à técnica de PCR para identificação do gene de resistência *tetM*, tendo amplificado quatro cepas (6,35%) : 251 (*Enterococcus faecalis*), 272 (*Staphylococcus aureus*), 2210 (*Staphylococcus*

aureus) e 2118 (*Enterococcus faecalis*). A cepa controle utilizada foi *S. pseudintermedius* LB1611, cedida pela UFF (Figura 10).

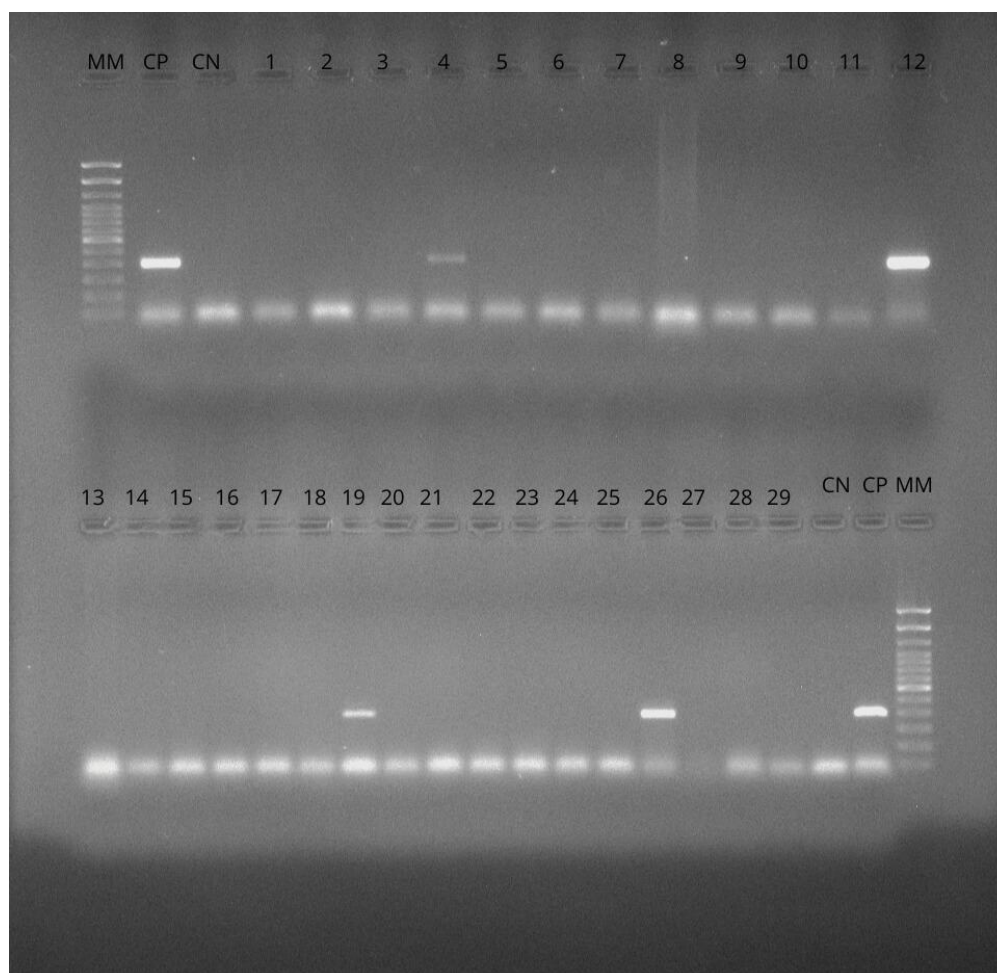


Figura 10: Gel de agarose 1% resultante da eletroforese de produtos de amplificação de PCR para gene *tetM*. MM: marcador de peso molecular; CP: controle positivo; CN: controle negativo; poços 4, 12, 19, 26: positivos.

Todas as cepas Gram-negativas foram submetidas à técnica de PCR para identificação do gene de resistência *tetA*, tendo amplificado três cepas (2,97): 223 (*Klebsiella pneumoniae*), 278 (*Aeromonas hydrophyla*) e 297 (*Escherichia coli*). As cepas positivas foram submetidas a sequenciamento genético para comprovar a presença desse gene (Figura 11).

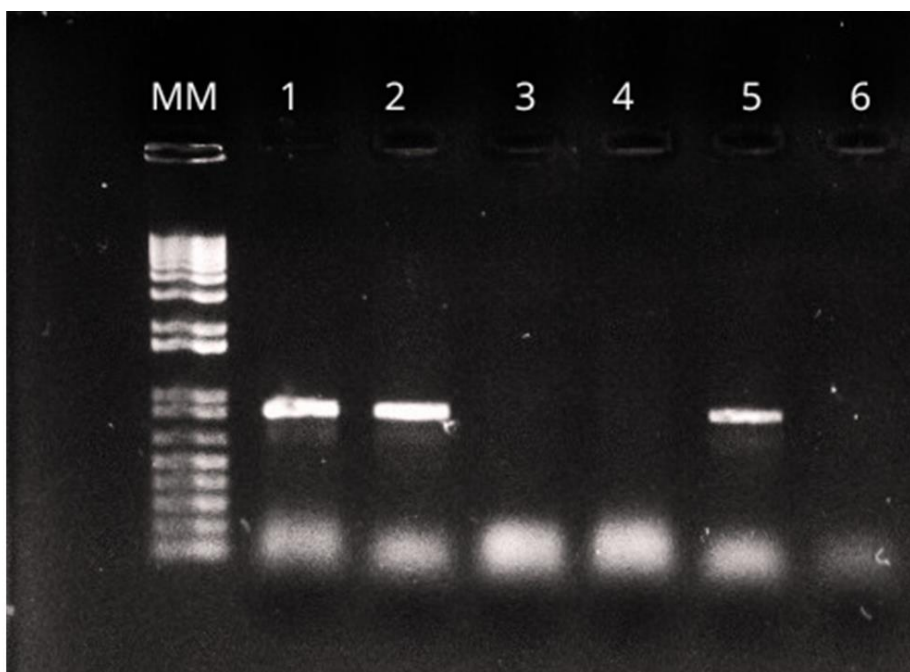


Figura 11: Gel de agarose 1% resultante da eletroforese de produtos de amplificação de PCR para gene *tetA*. MM: marcador de peso molecular; poços 1, 2 e 5: positivos.

Todas as cepas Gram-negativas foram submetidas à técnica de PCR para identificação do gene de resistência *tetB*, tendo amplificado uma cepa (0,99%): 2100 (*Escherichia coli*). A cepa positiva foi submetida a sequenciamento genético para comprovar a presença desse gene (Figura 12).

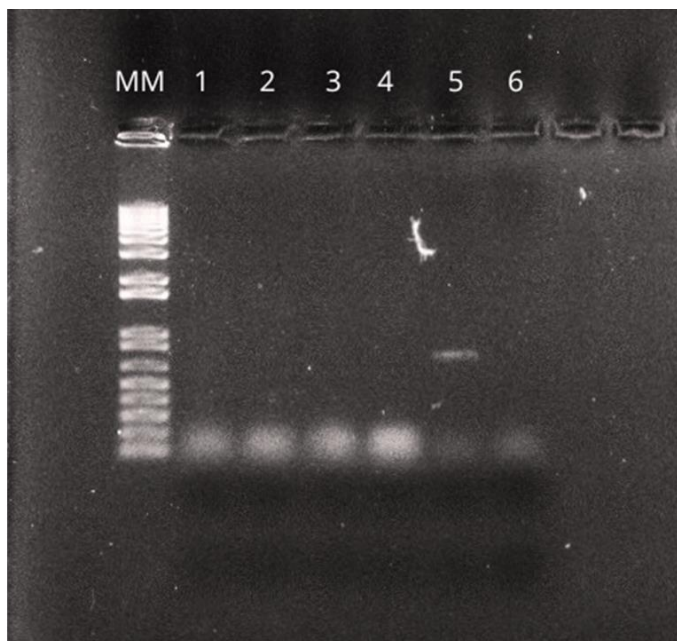


Figura 12: Gel de agarose 1% resultante da eletroforese de produtos de amplificação de PCR para gene *tetB*. MM: marcador de peso molecular; poço 5: positivo.

6.2.3 Detecção de enterotoxinas em *Staphylococcus spp.*

As cepas foram submetidas a técnica de PCR para amplificação das enterotoxinas A e B, sendo amplificadas sete (11,11%) (Figuras 13 e 14) e 23 amostras (36,51%) (Figura 15 e 16), respectivamente. Controles positivos ATCC 13565 (*sea*) e ATCC 14458 (*seb*).

Tabela 5: Cepas positivas para o gene *sea*.

Amostra	Identificação	Origem
126	<i>S. aureus</i>	Canino
2106	<i>S. pseudintermedius</i>	Canino
2109	<i>S. pseudintermedius</i>	Canino
2110	<i>S. aureus</i>	Água
2113	<i>S. pseudintermedius</i>	Suíno

2115	<i>S. pseudintermedius</i>	Canino
2118	<i>Enterococcus faecalis</i>	Canino

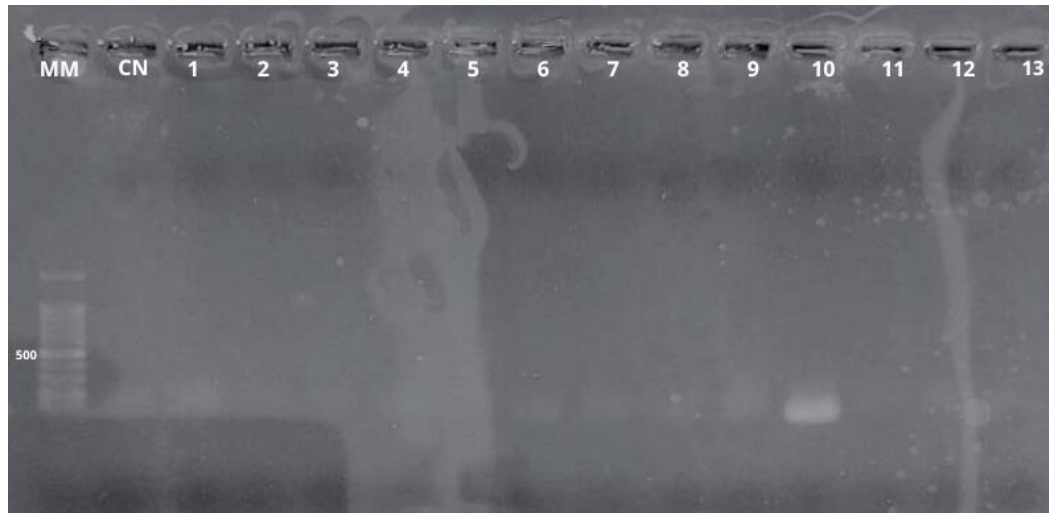


Figura 13: Gel de agarose 1% resultante da eletroforese de produtos de amplificação de PCR para gene *sea*. M: marcador de peso molecular; CN: controle negativo; poços 1-9, 12-13: negativos; poço 10: amostra 126.

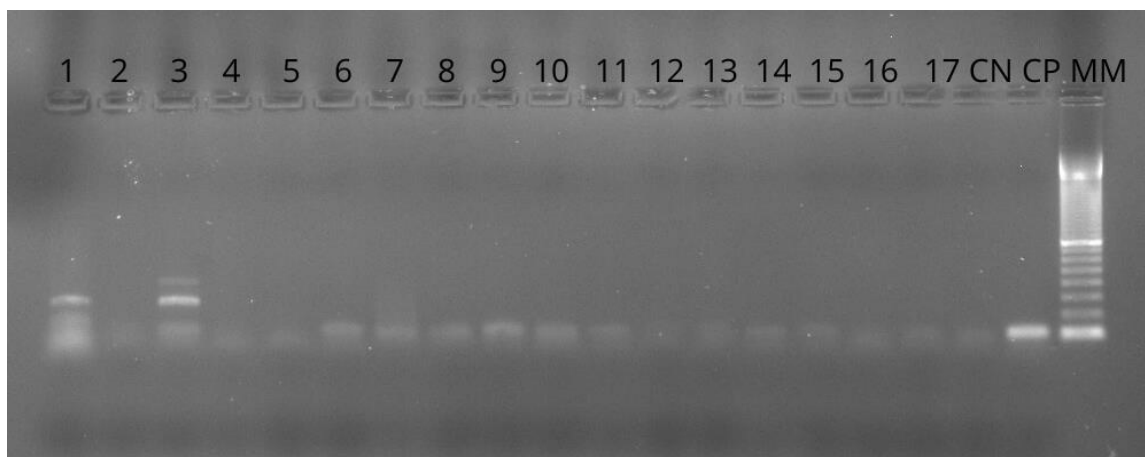


Figura 14: Gel de agarose 1% resultante da eletroforese de produtos de amplificação de PCR para gene *sea*. M: marcador de peso molecular; CN: controle negativo; poços 3, 6, 7, 8, 9 e 14 positivos.

Tabela 6: Cepas positivas para o gene *seb*.

Amostra	Identificação	Origem
12	<i>S. pseudintermedius</i>	Canino
145	<i>S. pseudintermedius</i>	Canino
168	<i>S. spp</i>	Água
170	<i>S. aureus</i>	Canino
248	<i>S. pseudintermedius</i>	Peixe
249	<i>S. pseudintermedius</i>	Peixe
250	<i>S. pseudintermedius</i>	Peixe
251	<i>S. pseudintermedius</i>	Peixe
252	<i>S. pseudintermedius</i>	Peixe
253	<i>S. pseudintermedius</i>	Peixe
259	<i>S. spp</i>	Água
269	<i>S. spp</i>	Água
272	<i>S. aureus</i>	Peixe
2105	<i>S. pseudintermedius</i>	Canino
2107	<i>S. pseudintermedius</i>	Canino
2108	<i>S. aureus</i>	Canino
2110	<i>S. aureus</i>	Peixe
2113	<i>S. pseudintermedius</i>	Suíno
2114	<i>S. pseudintermedius</i>	Canino
2115	<i>S. pseudintermedius</i>	Canino
2116	<i>S. pseudintermedius</i>	Canino
2117	<i>S. spp</i>	Canino
2118	<i>Enterococcus faecalis</i>	Canino



Figura 15: Gel de agarose 1% resultante da eletroforese de produtos de amplificação de PCR para gene *seb*. MM: marcador de peso molecular; CP: controle positivo; CN: controle negativo; poços: 1, 4, 6 e 7: amostras 2, 45, 68 e 70 positivos.

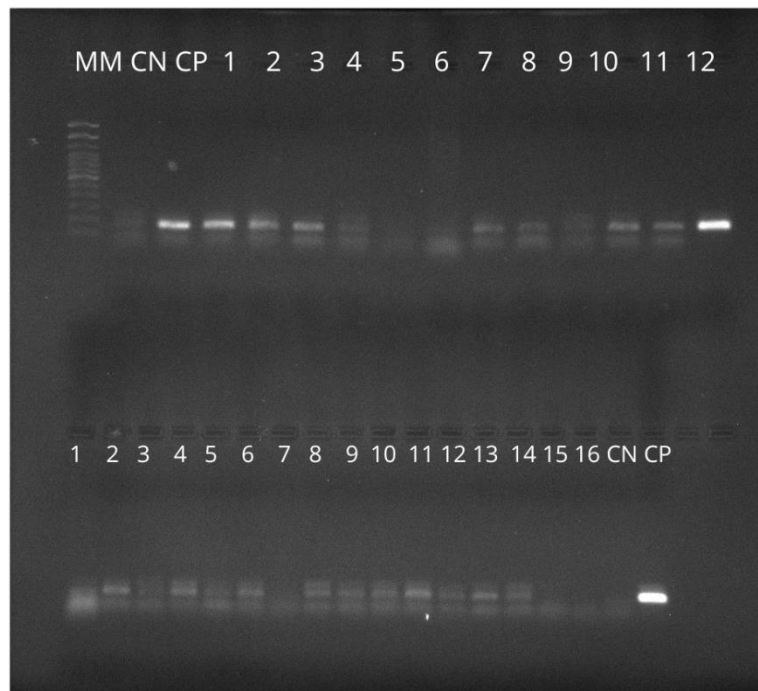


Figura 16 Gel de agarose 1% resultante da eletroforese de produtos de amplificação de PCR para gene *seb*. MM: marcador de peso molecular; CP: controle positivo; CN: controle negativo; poços 1-3a, 7-8b, 10-12a, 2b, 4-6b, 8-14b positivos.

6.2.4 Detecção de genes de resistência betalactâmicos em bactérias gram-negativas

Todas as cepas gram-negativas foram submetidas à análise molecular. Duas cepas (1,98%) apresentaram o gene *bla*CTX-M: 2110 (*Klebsiella pneumoniae*) e 2100 (*Escherichia coli*). Controle positivo *Salmonella enteritidis* IOC 376/14 (Figura 17).

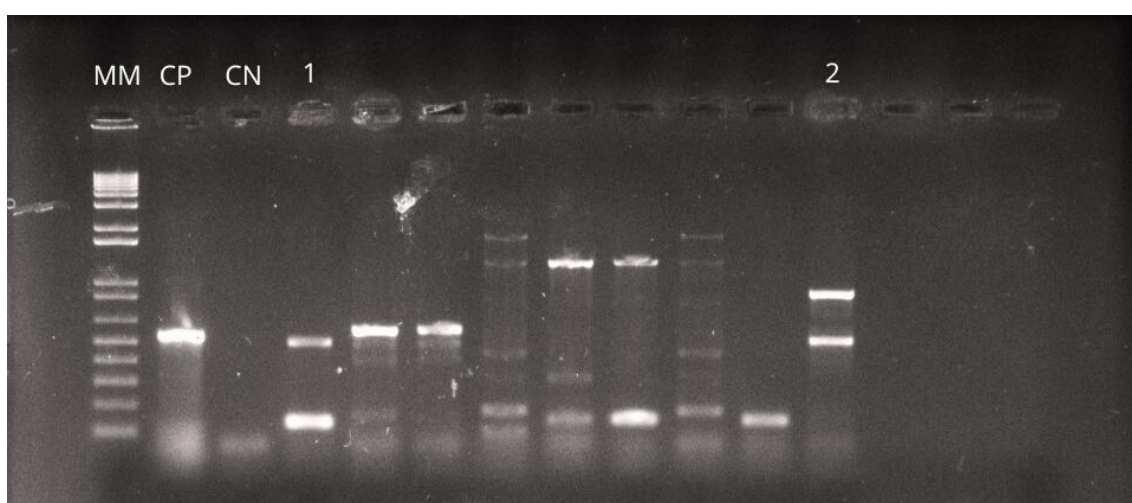


Figura 17: Gel de agarose 1% resultante da eletroforese de produtos de amplificação de PCR para gene *bla*CTXM. MM: marcador de peso molecular; CP: controle positivo; CN: controle negativo; Poço 1 e 2: positivos.

Todas as cepas gram-negativas foram submetidas à análise molecular. Quatro cepas (3,96%) apresentaram o gene *bla*SHV: 196, 215, 221 e 222, todas identificadas como *Klebsiella pneumoniae*. Controle positivo *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (Figuras 18 e 19).

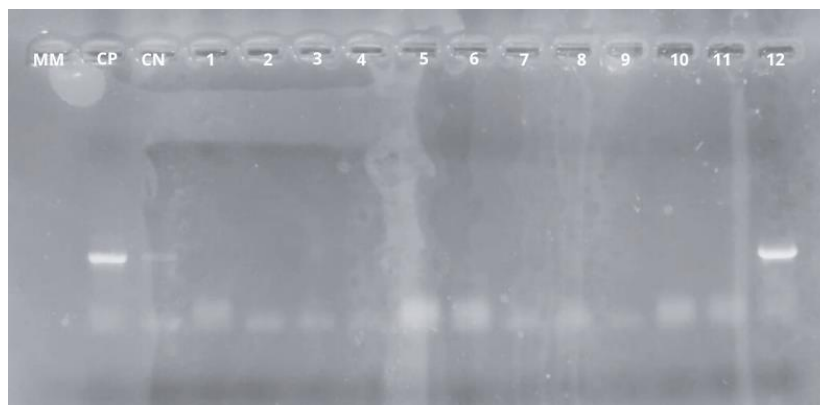


Figura 18: Gel de agarose 1% resultante da eletroforese de produtos de amplificação de PCR para gene *blaSHV*. MM: marcador de peso molecular; CP: controle positivo; CN: controle negativo; poços 1-11: negativos; Poço 12: amostra 196.

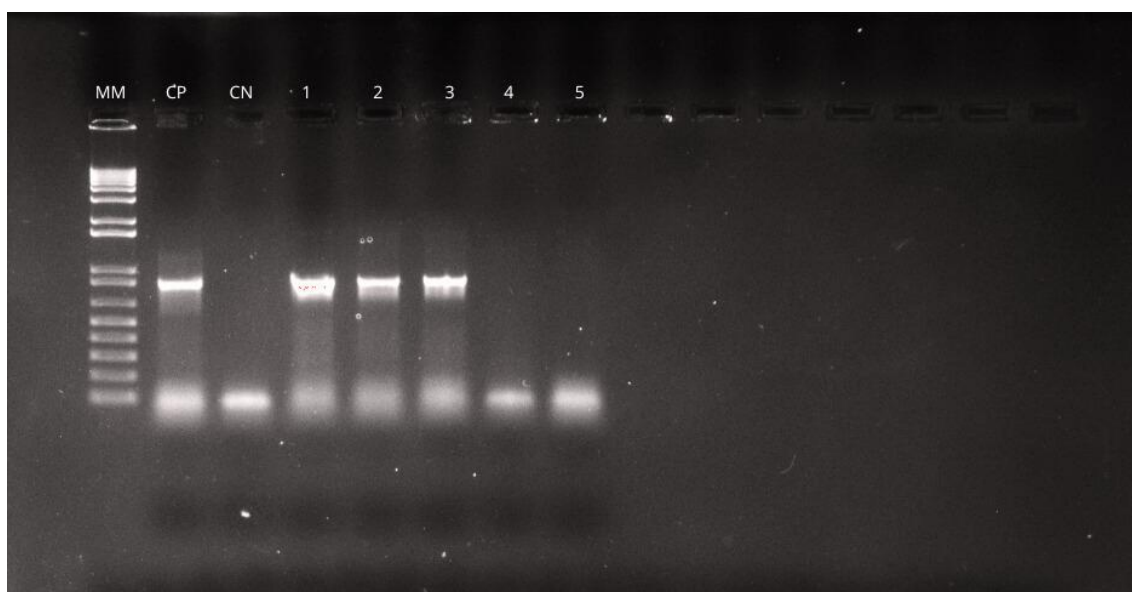


Figura 19: Gel de agarose 1% resultante da eletroforese de produtos de amplificação de PCR para gene *blaSHV*. MM: marcador de peso molecular; CP: controle positivo; CN: controle negativo; poços 1, 2 e 3: positivos.

Todas as cepas gram-negativas foram submetidas à análise molecular. Quatro cepas (3,96%) apresentaram o gene *blaTEM*: 25 (*Klebsiella oxytoca*), 26 (*Escherichia coli*), 278 (*Aeromonas hydrophyla*) e 280 (*Aeromonas spp.*). Controle

positivo *S. pseudintermedius* LB1612, cedida pela UFF. (Figura 20).

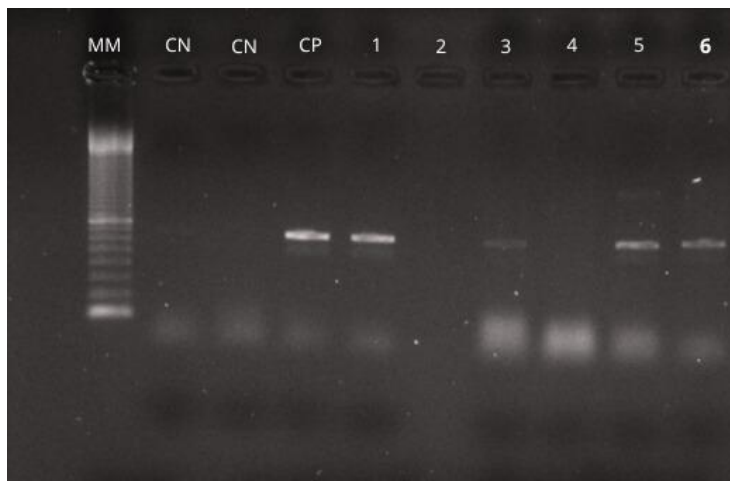


Figura 20: Gel de agarose 1% resultante da eletroforese de produtos de amplificação de PCR para gene *bla*TEM. MM: marcador de peso molecular; CP: controle positivo; CN: controle negativo; poços 1, 3, 5 e 6: positivos.

6.2.5 Detecção de genes de resistência a aminoglicosídeos em bactérias gram-negativas

Todas as cepas gram-negativas foram submetidas à análise molecular. Duas cepas (1,98%) apresentaram o gene *aac(6)'Ib-cr. 223* (*Klebsiella pneumoniae*) e 278 (*Aeromonas hydrophyla*) (Figura 21).

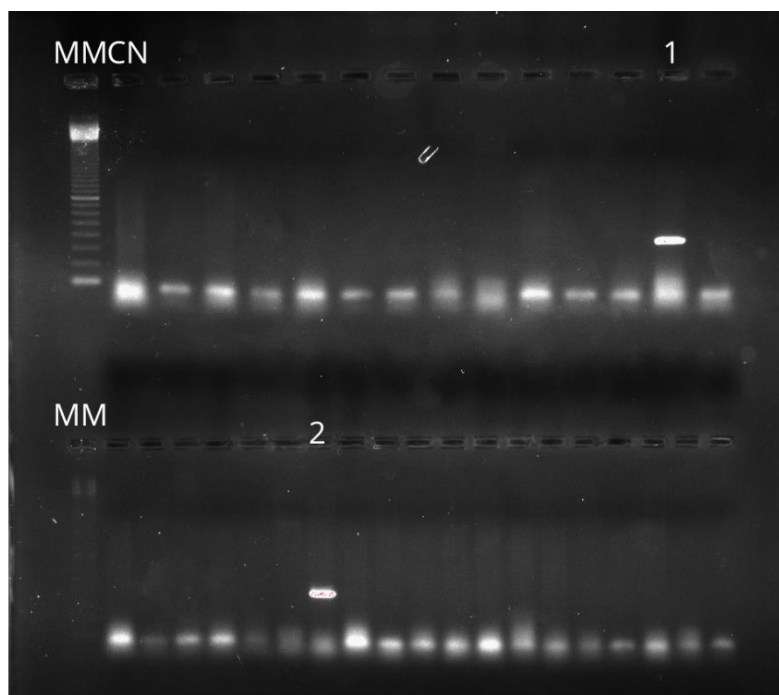


Figura 21: Gel de agarose 1% resultante da eletroforese de produtos de amplificação de PCR para gene *aac(6)Ib-cr*. MM: marcador de peso molecular; CP: controle positivo; CN: controle negativo; poços 2 e 3: negativos; poços 1 e 6: positivos.

6.2.6 Detecção de genes de resistência a quinolonas em bactérias gram-negativas

Todas as cepas gram-negativas foram submetidas à análise molecular. Três cepas (2,97%) apresentaram o gene *qnrS*: 279 (*Aeromonas spp.*), 295 (*Escherichia coli*) e 297 (*Escherichia coli*) (Figura 22).

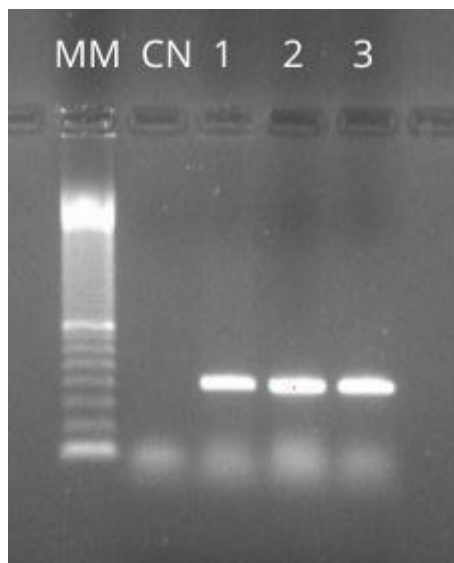


Figura 22: Gel de agarose 1% resultante da eletroforese de produtos de amplificação de PCR para gene *qnrS*. MM: marcador de peso molecular; CP: controle positivo; CN: controle negativo; poços 1, 2 e 3: positivos.

6.3 ENSAIO DA PRODUÇÃO DE BIOFILME

Das amostras testadas para a produção de biofilme, a maior parte (10 amostras) se apresentou fracamente aderente (55,6%), seguida por cinco amostras não aderentes, (27,8%), duas amostras moderadamente aderentes (11,1%) e apenas uma fortemente aderente (5,6%). Esse ensaio mostra que a presença de genes de resistência e virulência podem não interferir na produção de biofilme de uma cepa bacteriana.

Tabela 7: Ensaio de produção de biofilme.

AMOSTRA	CLASSIFICAÇÃO	GENE
126	Moderadamente aderente	<i>Sea</i>
168	Fracamente aderente	<i>Seb</i>
178	Fortemente aderente	<i>mecA</i>
196	Moderadamente aderente	<i>blaSHV</i>

25	Não aderente	<i>blaTEM</i>
26	Fracamente aderente	<i>blaTEM</i>
215	Não aderente	<i>blaSHV</i>
220	Não aderente	<i>blaCTXM</i>
221	Fracamente aderente	<i>blaSHV</i>
222	Fracamente aderente	<i>blaSHV</i>
223	Fracamente aderente	<i>tetA, aac(6')Ib-cr</i>
278	Fracamente aderente	<i>blaTEM, tetA, aac(6')Ib-cr,</i>
279	Fracamente aderente	<i>qnrS</i>
280	Fracamente aderente	<i>blaTEM, tetA</i>
295	Fracamente aderente	<i>qnrS</i>
297	Não aderente	<i>qnrS</i>
298	Não aderente	<i>blaSHV</i>
2101	Fracamente aderente	<i>blaSHV</i>
251	Fracamente aderente	<i>tetM, seb</i>
272	Fracamente aderente	<i>tetM, seb</i>
2110	Não aderente	<i>tetM, sea, seb</i>
2118	Fracamente aderente	<i>tetM, sea, seb</i>

6.4 SEQUENCIAMENTO

A presença dos genes foi confirmada por meio de sequenciamento genético, enquanto a identificação das cepas foi realizada utilizando o BLAST, comparando as sequências obtidas com aquelas disponíveis em bancos de dados públicos. Alguns amplicons, embora tenham sido amplificados com sucesso, não resultaram em sequenciamento adequado (Figuras 23 a 36).

Staphylococcus aureus strain NCH16-69 PBP2a, IS1182 family transposase, delta MecR1, and truncated IS1272 family transposase genes, complete cds

Sequence ID: [MF278653.1](#) Length: 6761 Number of Matches: 1

Range 1: 238 to 751 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
950 bits(514)	0.0	514/514(100%)	0/514(0%)	Plus/Minus
Query 1	ATGGTAAAGGTTGGCAAAAAGATAAATCTTGGGGTGGTTACAACGTTACAAGATATGAAG	60		
Sbjct 751	ATGGTAAAGGTTGGCAAAAAGATAAATCTTGGGGTGGTTACAACGTTACAAGATATGAAG	692		
Query 61	TGGTAAATGGTAATATCGACTTAAAAAAGCAATAGAATCATCAGATAACATTTTCTTTG	120		
Sbjct 691	TGGTAAATGGTAATATCGACTTAAAAAAGCAATAGAATCATCAGATAACATTTTCTTTG	632		
Query 121	CTAGAGTAGCACTCGAATTAGGCAGTAAGAAATTTGAAAAAGGCATGAAAAAATAGGTG	180		
Sbjct 631	CTAGAGTAGCACTCGAATTAGGCAGTAAGAAATTTGAAAAAGGCATGAAAAAATAGGTG	572		
Query 181	TTGGTGAAGATATACCAAGTGATTATCCATTTTATAATGCTCAAATTTCAACAAAAATT	240		
Sbjct 571	TTGGTGAAGATATACCAAGTGATTATCCATTTTATAATGCTCAAATTTCAACAAAAATT	512		
Query 241	TAGATAATGAAATATTATTAGCTGATTCAGGTTACGGACAAGGTGAAATACTGATTAACC	300		
Sbjct 511	TAGATAATGAAATATTATTAGCTGATTCAGGTTACGGACAAGGTGAAATACTGATTAACC	452		
Query 301	CAGTACAGATCCTTTCAATCTATAGCGCATTAGAAAAATAGGCAATATTACGCACCTC	360		
Sbjct 451	CAGTACAGATCCTTTCAATCTATAGCGCATTAGAAAAATAGGCAATATTACGCACCTC	392		
Query 361	ACTTATTTAAAAGACAGAAAAACAAGTTTGGAAAGAAAAATATTATTTCCAAAGAAAAATA	420		
Sbjct 391	ACTTATTTAAAAGACAGAAAAACAAGTTTGGAAAGAAAAATATTATTTCCAAAGAAAAATA	332		
Query 421	TCAATCTATTAAGTATGATGATGCAACAAGTCGTAATAAAAAACACATAAAGAAGATATTT	480		
Sbjct 331	TCAATCTATTAAGTATGATGATGCAACAAGTCGTAATAAAAAACACATAAAGAAGATATTT	272		
Query 481	ATAGATCTTATGCAAACTTAATTGGCAATCCGG 514			
Sbjct 271	ATAGATCTTATGCAAACTTAATTGGCAATCCGG 238			

Figura 23: Sequenciamento da amostra 178, para o gene *mecA*.

Enterococcus faecalis strain CQJXZ21-076 plasmid pJXZ076-85K, complete sequence

Sequence ID: [CP117505.1](#) Length: 85315 Number of Matches: 1

Range 1: 9120 to 9465 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
625 bits(338)	2e-174	343/346(99%)	1/346(0%)	Plus/Minus
Query 1	GGACAAAGGTACAACGAGGACGGATAAATACGCTTTTAGAACGYAGAGAGGAATTACAAT	60		
Sbjct 9465	GGACAAAGGTACAACGAGGACGGATAAATACGCTTTTAGAACGTCAGAGAGGAATTACAAT	9406		
Query 61	TCAGACAGGAATAACCTCTTTTCAGTGGGAAAAATACGAAGGTGAACATCATAGACACGCC	120		
Sbjct 9405	TCAGACAGGAATAACCTCTTTTCAGTGGGAAAAATACGAAGGTGAACATCATAGACACGCC	9346		
Query 121	AGGACATATGGATTTCTTAGCAGAAGTATATCGTTTCATTATCAGTTTTAGATGGGGCAAT	180		
Sbjct 9345	AGGACATATGGATTTCTTAGCAGAAGTATATCGTTTCATTATCAGTTTTAGATGGGGCAAT	9286		
Query 181	TCTACTGATTTCTGCAAAAGATGGCGTACAAGCACAACTCGTATATTATTTTCATGCACT	240		
Sbjct 9285	TCTACTGATTTCTGCAAAAGATGGCGTACAAGCACAACTCGTATATTATTTTCATGCACT	9226		
Query 241	TAGGAAAAATGGGGATCCCAACAATCTTTTTATCAATAAGATTGACCAAAATGGAATTGA	300		
Sbjct 9225	TAGGAAAAATGGGGATCCCAACAATCTTTTTATCAATAAGATTGACCAAAATGGAATTGA	9166		
Query 301	TTTATCAACGGTTTATCAGGATATTAAGAGAAMCTT-CTATGGAA 345			
Sbjct 9165	TTTATCAACGGTTTATCAGGATATTAAGAGAAMCTTCTATGGAA 9120			

Figura 24: Sequenciamento da amostra 251, para o gene *tetM*.

Download ▾ GenBank Graphics ▾ Next ▲ Prev

Streptococcus pyogenes tet(M) gene for tetracycline resistance ribosomal protection protein Tet(M), complete CDS
 Sequence ID: [NG_048245.1](#) Length: 2120 Number of Matches: 1

Range 1: 208 to 609 GenBank Graphics ▾ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
728 bits(394)	0.0	398/402(99%)	0/402(0%)	Plus/Plus
Query 1	GGACAAAGGTACAACGAGGACGGATAATACGCTTTT	AGAACGTYAGAGAGGAATTACAAT	60	
Sbjct 208	GGACAAAGGTACAACGAGGACGGATAATACGCTTTT	AGAACGTCAGAGAGGAATTACAAT	267	
Query 61	TCAGACAGGAATAACCTCTTTTCAGTGGGAAAAATACGAAGGTGAACATCATAGACACGCC	120		
Sbjct 268	TCAGACAGGAATAACCTCTTTTCAGTGGGAAAAATACGAAGGTGAACATCATAGACACGCC	327		
Query 121	AGGACATATGGATTTCTTAGCAGAAGTATATCGTTTATTATCAGTTTTAGATGGGGCAAT	180		
Sbjct 328	AGGACATATGGATTTCTTAGCAGAAGTATATCGTTTATTATCAGTTTTAGATGGGGCAAT	387		
Query 181	TCTACTGATTTCTGCAAAAAGATGGCGTACAAGCACAAACTCGTATATTTTTCATGCACT	240		
Sbjct 388	TCTACTGATTTCTGCAAAAAGATGGCGTACAAGCACAAACTCGTATATTTTTCATGCACT	447		
Query 241	TAGGAAAAATGGGGATCCCAACAATCTTTTTTATCAATAAGATTGACCAAAATGGAATTGA	300		
Sbjct 448	TAGGAAAAATGGGGATCCCAACAATCTTTTTTATCAATAAGATTGACCAAAATGGAATTGA	507		
Query 301	TTTATCAACGGTTTATCAGGATATTAAGAGAAAACCTTCTGCGGAAATTTGTAATCAAACA	360		
Sbjct 508	TTTATCAACGGTTTATCAGGATATTAAGAGAAAACCTTCTGCGGAAATTTGTAATCAAACA	567		
Query 361	RAAGGTAGAAGTGTATCCTAATATGTGTGTGACRAAYTTTAC	402		
Sbjct 568	GAAAGTAGAGCTGTATCCTAATATGTGTGTGACGAACCTTAC	609		

Figura 25: Sequenciamento da amostra 272, para o gene *tetM*.

Download ▾ GenBank Graphics ▾ Next ▲ Prev

Enterococcus faecalis TetM (tetM) gene, partial cds
 Sequence ID: [KR270482.1](#) Length: 406 Number of Matches: 1

Range 1: 3 to 404 GenBank Graphics ▾ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
725 bits(392)	0.0	397/402(99%)	0/402(0%)	Plus/Plus
Query 1	GGACAAAGGTACAACGAGGACGGATAATACGCTTTT	AGAACGTYAGAGAGGAATTACAAT	60	
Sbjct 3	GGACAAAGGTACAACGAGGACGGATAATACGCTTTT	AGAACGTCAGAGAGGAATTACAAT	62	
Query 61	TCAGACAGGAATAACCTCTTTTCAGTGGGAAAAATACGAAGGTGAACATCATAGACACGCC	120		
Sbjct 63	TCAGACAGGAATAACCTCTTTTCAGTGGGAAAAATACGAAGGTGAACATCATAGACACGCC	122		
Query 121	AGGACATATGGATTTCTTAGCAGAAGTATATCGTTTATTATCAGTTTTAGATGGGGCAAT	180		
Sbjct 123	AGGACATATGGATTTCTTAGCAGAAGTATATCGTTTATTATCAGTTTTAGATGGGGCAAT	182		
Query 181	TCTACTGATTTCTGCAAAAAGATGGCGTACAAGCACAAACTCGTATATTTTTCATGCACT	240		
Sbjct 183	TCTACTGATTTCTGCAAAAAGATGGCGTACAAGCACAAACTCGTATATTTTTCATGCACT	242		
Query 241	TAGGAAAAATGGGGATCCCAACAATCTTTTTTATCAATAAGATTGACCAAAATGGAATTGA	300		
Sbjct 243	TAGGAAAAATGGGGATCCCAACAATCTTTTTTATCAATAAGATTGACCAAAATGGAATTGA	302		
Query 301	TTTATCAACGGTTTATCAGGATATTAAGAGAAAACCTTCTATGGAAATTTAATCAAACA	360		
Sbjct 303	TTTATCAACGGTTTATCAGGATATTAAGAGAAAACCTTCTATGGAAATTTAATCAAACA	362		
Query 361	RAAGGTARAGCTGACCCTAATATGTGTGTGACRAAYTTTAC	402		
Sbjct 363	GAAAGTAGAGCTGACCCTAATATGTGTGTGACGAACCTTAC	404		

Figura 26: Sequenciamento da amostra 2110, para o gene *tetM*.

100 sequences selected

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Next](#) [Previous](#) [Descriptions](#)

Enterococcus faecalis isolate 28157_4#363 genome assembly, chromosome: 1
 Sequence ID: [LR962509.1](#) Length: 2933254 Number of Matches: 1

Range 1: 2502093 to 2502494 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
725 bits(392)	0.0	397/402(99%)	0/402(0%)	Plus/Minus
Query 1		GGACAAAGGTACAACGAGGACGGATAATACGCTTTTAGAACGTYAGAGGGAATTACAAT		60
Sbjct 2502494		GGACAAAGGTACAACGAGGACGGATAATACGCTTTTAGAACGTYAGAGGGAATTACAAT		2502435
Query 61		TCAGACAGGAATAACCTCTTTTCAGTGGGAAAATACGAAGGTGAACATCATAGACACGCC		120
Sbjct 2502434		TCAGACAGGAATAACCTCTTTTCAGTGGGAAAATACGAAGGTGAACATCATAGACACGCC		2502375
Query 121		AGGACATATGGATTTCTAGCAGAAGTATATCGTTCAATTATCAGTTTTAGATGGGCAAT		180
Sbjct 2502374		AGGACATATGGATTTCTAGCAGAAGTATATCGTTCAATTATCAGTTTTAGATGGGCAAT		2502315
Query 181		TCTACTGATTTCTGCAAAAGATGGCGTACAAGCACAAACTCGTATATTATTCATGCACT		240
Sbjct 2502314		TCTACTGATTTCTGCAAAAGATGGCGTACAAGCACAAACTCGTATATTATTCATGCACT		2502255
Query 241		TAGGAAAATGGGGATTCCCAACATCTTTTATCAATAAGATTGACCAAAATGGAATTGA		300
Sbjct 2502254		TAGGAAAATGGGGATTCCCAACATCTTTTATCAATAAGATTGACCAAAATGGAATTGA		2502195
Query 301		TTTATCAACGGTTTATCAGGATATTAAGAGAAAACCTTTCGCCGAAATGTAATCAAACA		360
Sbjct 2502194		TTTATCAACGGTTTATCAGGATATTAAGAGAAAACCTTTCGCCGAAATGTAATCAAACA		2502135
Query 361		RAAGGTAGAACTGTATCCTAATRTGTGTGTGACRAAYTTTAC	402	
Sbjct 2502134		GAAGGTAGAACTGTATCCTAATRTGTGTGTGACRAAYTTTAC	2502093	

Figura 27: Sequenciamento da amostra 2118, para o gene *tetM*.

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Next](#) [Previous](#) [Descriptions](#)

Escherichia coli strain RHB13-SO-C01 chromosome, complete genome
 Sequence ID: [CP099237.1](#) Length: 4860370 Number of Matches: 1

Range 1: 4499250 to 4499751 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
917 bits(496)	0.0	500/502(99%)	0/502(0%)	Plus/Minus
Query 5		GCGATGTGCAGCTGTTTCAGTCCGGAACGGTGAAGATGTTACCACCAAGCTCTAAGGAAG		64
Sbjct 4499751		GCGATGTGCAGCTGTTTCAGTCCGGAACGGTGAAGATGTTACCACCAAGCTCTAAGGAAG		4499692
Query 65		ATGCCACTTTTGGCCTCGGCTGGCGCGTGAATGGTAATGCCACCATGACGCCGACGTTTTG		124
Sbjct 4499691		ATGCCACTTTTGGCCTCGGCTGGCGCGTGAATGGTAATGCCACCATGACGCCGACGTTTTG		4499632
Query 125		GCACGCTGGCAAGCCCGCAAACCTACGGTCACTGGCTGGACGGAAACGGTACCCGTTA		184
Sbjct 4499631		GCACGCTGGCAAGCCCGCAAACCTACGGTCACTGGCTGGACGGAAACGGTACCCGTTA		4499572
Query 185		TCGATCCGGTGAATCATATGGCGATTGTGATGTTAAGCAACAAGCCACATTCGCCGTTG		244
Sbjct 4499571		TCGATCCGGTGAATCATATGGCGATTGTGATGTTAAGCAACAAGCCACATTCGCCGTTG		4499512
Query 245		CCGATCCGCAAAAAGATCCCAATATGTTGAAAGCGGTGAGTCCGATGCAACGATATG		304
Sbjct 4499511		CCGATCCGCAAAAAGATCCCAATATGTTGAAAGCGGTGAGTCCGATGCAACGATATG		4499452
Query 305		GTTGGGTAGTTGATCAGGTGTATGCGCGTTAAAGCAAAAAGTAATAAAAAGGCCAGTCAG		364
Sbjct 4499451		GTTGGGTAGTTGATCAGGTGTATGCGCGTTAAAGCAAAAAGTAATAAAAAGGCCAGTCAG		4499392
Query 365		TAATGTTACTGCCTGGCCTTTAATCAATGAATCAGAAACGCTTACAGCGCCATCAACTTG		424
Sbjct 4499391		TAATGTTACTGCCTGGCCTTTAATCAATGAATCAGAAACGCTTACAGCGCCATCAACTTG		4499332
Query 425		TCAGCGACGGTGCAGAAATAATAGCCCGGTTACCGGTTTGGTGAACGCAACATCGCA		484
Sbjct 4499331		TCAGCGACGGTGCAGAAATAATAGCCCGGTTACCGGTTTGGTGAACGCAACATCGCA		4499272
Query 485		TCACGCTTACCAACGATATCGC	506	
Sbjct 4499271		TCACGCTTACCAACGATATCGC	4499250	

Figura 28: Sequenciamento da amostra 2100, para o gene *blaCTX-M*.

Klebsiella pneumoniae strain dm740a plasmid p_dm740a_NDM1, complete sequence

Sequence ID: [CP095646.1](#) Length: 215581 Number of Matches: 1

Range 1: 115200 to 115550 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
619 bits(335)	8e-173	343/351(98%)	0/351(0%)	Plus/Minus
Query 4	TGAGKGGSTAAATYGATYTCAMATYGTGAGTGGTGGGSGGAGAAGAAGCACGCCCGAC	63		
Sbjct 115550	TGAGTGGCTAAATCGATCTCATATCGTCGAGTGGTGGGCGGAGAAGAAGCACGCCCGAC	115491		
Query 64	ACTTGCTGACGTACAGGAACAGTACTTGCCAAGCGTTTTAGCGCAAGAGTCCGTCACCTCC	123		
Sbjct 115490	ACTTGCTGACGTACAGGAACAGTACTTGCCAAGCGTTTTAGCGCAAGAGTCCGTCACCTCC	115431		
Query 124	ATACATTGCAATGCTGAATGGAGAGCCGATTGGGTATGCCAGTCGTACGTTGCTCTTGG	183		
Sbjct 115430	ATACATTGCAATGCTGAATGGAGAGCCGATTGGGTATGCCAGTCGTACGTTGCTCTTGG	115371		
Query 184	AAGCGGGGACGGATGGTGGGAAGAAGAACCGATCCAGGAGTACGCGGAATAGACCAGTC	243		
Sbjct 115370	AAGCGGGGACGGATGGTGGGAAGAAGAACCGATCCAGGAGTACGCGGAATAGACCAGTC	115311		
Query 244	ACTGGCGAATGCATCACAACGGGCAAAGGCTTGGGAACCAAGCTGGTTCGAGCTCTGGT	303		
Sbjct 115310	ACTGGCGAATGCATCACAACGGGCAAAGGCTTGGGAACCAAGCTGGTTCGAGCTCTGGT	115251		
Query 304	TGAGTTGCTGTTCAATGATCCCAGGTCACCAAGATCAAACGGACCCGTC	354		
Sbjct 115250	TGAGTTGCTGTTCAATGATCCCAGGTCACCAAGATCAAACGGACCCGTC	115200		

Figura 29: Sequenciamento da amostra 223, para o gene *aac(6')Ib-cr*.

Klebsiella pneumoniae strain dm740a plasmid p_dm740a_NDM1, complete sequence

Sequence ID: [CP095646.1](#) Length: 215581 Number of Matches: 1

Range 1: 115158 to 115550 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
691 bits(374)	0.0	385/394(98%)	1/394(0%)	Plus/Minus
Query 4	TGAGKGGSTAAATYGATYTCAMATYGTGAGTGGTGGGSGGAGAAGAAGCACGCCCGAC	63		
Sbjct 115550	TGAGTGGCTAAATCGATCTCATATCGTCGAGTGGTGGGCGGAGAAGAAGCACGCCCGAC	115491		
Query 64	ACTTGCTGACGTACAGGAACAGTACTTGCCAAGCGTTTTAGCGCAAGAGTCCGTCACCTCC	123		
Sbjct 115490	ACTTGCTGACGTACAGGAACAGTACTTGCCAAGCGTTTTAGCGCAAGAGTCCGTCACCTCC	115431		
Query 124	ATACATTGCAATGCTGAATGGAGAGCCGATTGGGTATGCCAGTCGTACGTTGCTCTTGG	183		
Sbjct 115430	ATACATTGCAATGCTGAATGGAGAGCCGATTGGGTATGCCAGTCGTACGTTGCTCTTGG	115371		
Query 184	AAGCGGGGACGGATGGTGGGAAGAAGAACCGATCCAGGAGTACGCGGAATAGACCAGTC	243		
Sbjct 115370	AAGCGGGGACGGATGGTGGGAAGAAGAACCGATCCAGGAGTACGCGGAATAGACCAGTC	115311		
Query 244	ACTGGCGAATGCATCACAACGGGCAAAGGCTTGGGAACCAAGCTGGTTCGAGCTCTGGT	303		
Sbjct 115310	ACTGGCGAATGCATCACAACGGGCAAAGGCTTGGGAACCAAGCTGGTTCGAGCTCTGGT	115251		
Query 304	TGAGTTGCTGTTCAATGATCCCAGGTCACCAAGATCAAACGGACCCGTCGCGCGAGCAA	363		
Sbjct 115250	TGAGTTGCTGTTCAATGATCCCAGGTCACCAAGATCAAACGGACCCGTCGCGCGAGCAA	115191		
Query 364	CTTGCGAGCGATCCGATGCTACGAGAAAAGCGGG	397		
Sbjct 115190	CTTGCGAGCGATCCGATGCTACGAGAAA-GC GGG	115158		

Figura 30: Sequenciamento da amostra 278, para o gene *aac(6')Ib-cr*.

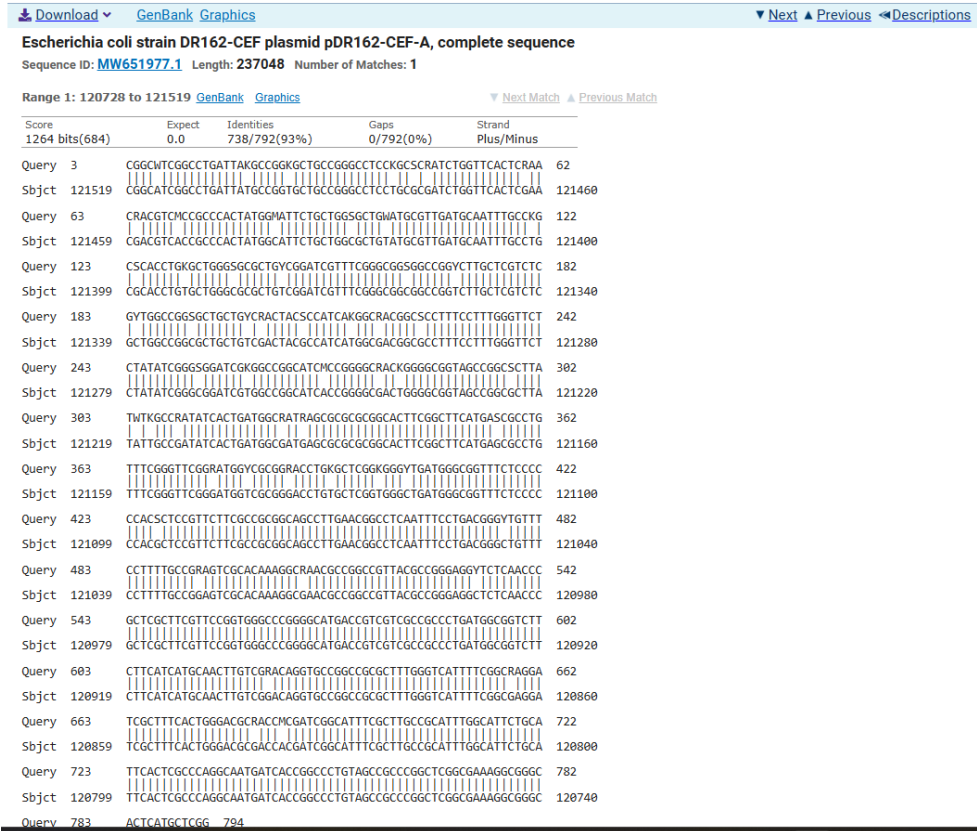


Figura 31: Sequenciamento da amostra 223, para o gene *tetA*.

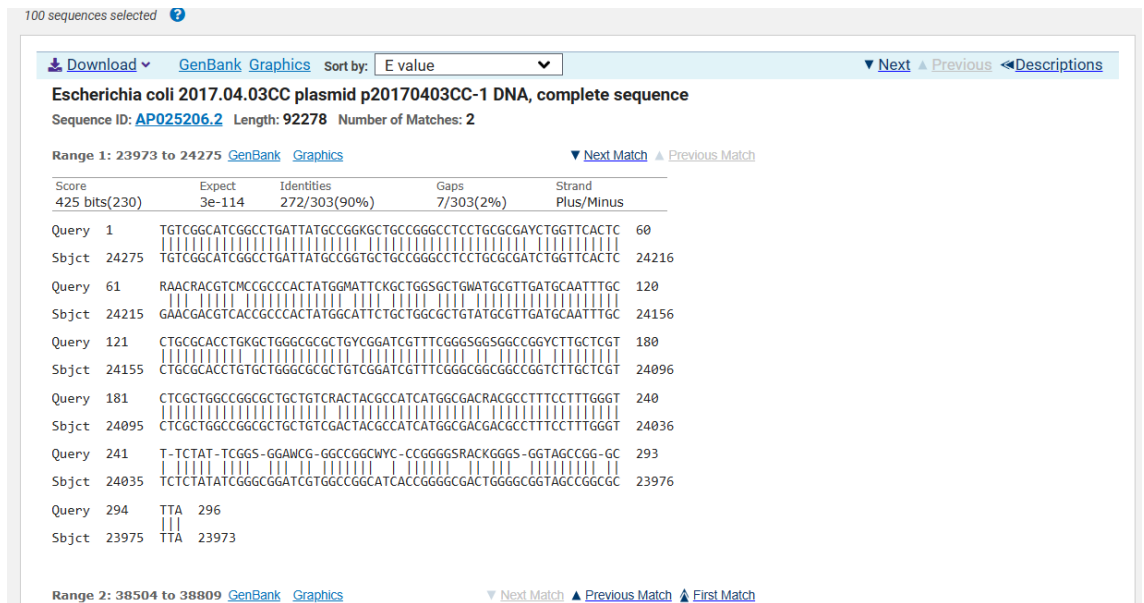


Figura 32: Sequenciamento da amostra 297, para o gene *tetA*.

Escherichia coli strain TUM1223 chromosome, complete genome
 Sequence ID: [CP135722.1](#) Length: 5012486 Number of Matches: 1

Range 1: 4998548 to 4999254 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1240 bits(671)	0.0	689/707(97%)	0/707(0%)	Plus/Minus
Query 1	TTGCCAACGTTATTACGTGAATTTATGCTTCGGAAGATATCGCTAACCACTTTGGCGTA			60
Sbjct 4999254	TTGCCAACGTTATTACGTGAATTTATGCTTCGGAAGATATCGCTAACCACTTTGGCGTA			4999195
Query 61	TTGCTTGCACCTTATGCGTTAATGCGGTTATCTTGGCTTGGCTTGGAAAAAGTYT			120
Sbjct 4999194	TTGCTTGCACCTTATGCGTTAATGCGGTTATCTTGGCTTGGCTTGGAAAAAGTYT			4999135
Query 121	GACCGATTTGGTYGGCGCCAGTGTCTTTGTCATTAATAGGCGCATCGCTGGATTAC			180
Sbjct 4999134	GACCGATTTGGTYGGCGCCAGTGTCTTTGTCATTAATAGGCGCATCGCTGGATTAC			4999075
Query 181	TTATTGCTGGCTTTTTCAMGTGCGCTTTGGATGCTGATTAGGCGCTTGGCTTTCAGGG			240
Sbjct 4999074	TTATTGCTGGCTTTTTCAMGTGCGCTTTGGATGCTGATTAGGCGCTTGGCTTTCAGGG			4999015
Query 241	ATCACAGGAGCTACTGGGGTGTGCGGCGCATCGTATTGCCGATACCMCTCAGCTTYT			300
Sbjct 4999014	ATCACAGGAGCTACTGGGGTGTGCGGCGCATCGTATTGCCGATACCMCTCAGCTTYT			4998955
Query 301	CAACCGTGAAGTGGTYGGTTAGGGGCAAGTTTGGGCTGGTTAATAGCGGGG			360
Sbjct 4998954	CAACCGTGAAGTGGTYGGTTAGGGGCAAGTTTGGGCTGGTTAATAGCGGGG			4998895
Query 361	CCTATTATTGGTGGTTTTCAGGAGAGATTTCCMCGCATAGCTTTTTCGCTGGC			420
Sbjct 4998894	CCTATTATTGGTGGTTTTCAGGAGAGATTTCCMCGCATAGCTTTTTCGCTGGC			4998835
Query 421	TTGCTAAATATTGCTCGCTTCTTGKGGTTATGTTTGGTTCGCGAAACCAAAATACM			480
Sbjct 4998834	TTGCTAAATATTGCTCGCTTCTTGKGGTTATGTTTGGTTCGCGAAACCAAAATACM			4998775
Query 481	CGTGATAATACAGATACCAGGATAGGGGTGAGAGCGCAATYGAATCGGTATACATCMCT			540
Sbjct 4998774	CGTGATAATACAGATACCAGGATAGGGGTGAGAGCGCAATYGAATCGGTATACATCMCT			4998715
Query 541	TTATTTAAAACGATGCCMHTTTTGTGATTATTTATTTTCAGCGCAATTGATAGGCCAA			600
Sbjct 4998714	TTATTTAAAACGATGCCMHTTTTGTGATTATTTATTTTCAGCGCAATTGATAGGCCAA			4998655
Query 601	ATTTCCGCAACGGKGGTGGTGTATTACCGAAAATCGTTTGGATGAAATARCATGATG			660
Sbjct 4998654	ATTTCCGCAACGGKGGTGGTGTATTACCGAAAATCGTTTGGATGAAATARCATGATG			4998595
Query 661	GTTGGCTTTTCATTAGCGGGTYTGGTYTTTACMCTCAGTATTCCA			707
Sbjct 4998594	GTTGGCTTTTCATTAGCGGGCTTGGTCTTTTACACTCAGTATTCCA			4998548

Figura 33: Sequenciamento da amostra 2100, para o gene *tetB*.

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Next](#) [Previous](#) [Descriptions](#)

Klebsiella pneumoniae isolate 211 LEN-3 beta-lactamase gene, partial cds
 Sequence ID: [AY130286.1](#) Length: 823 Number of Matches: 1

Range 1: 34 to 781 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1334 bits(722)	0.0	735/748(98%)	0/748(0%)	Plus/Plus
Query 6	GGTATACGCCGGTCCACAGCCGCTTGAGCAGATTAAACAAGCGAAAGCCAGCTGTCCGG			65
Sbjct 34	GGTATACGCCGGTCCACAGCCGCTTGAGCAGATTAAACAAGCGAAAGCCAGCTGTCCGG			93
Query 66	CCGCGTGGGGATGTTGAAATGGATCTGGCCAGCGGCGCACGCTGGCCGCTGGCGCGC			125
Sbjct 94	CCGCGTGGGGATGTTGAAATGGATCTGGCCAGCGGCGCACGCTGGCCGCTGGCGCGC			153
Query 126	CGATGAACGCTTTCCCATGGTGAGCACCTTAAAGTGTCTGTGCGGCGCGGTGCTGGC			185
Sbjct 154	CGATGAACGCTTTCCCATGGTGAGCACCTTAAAGTGTCTGTGCGGCGCGGTGCTGGC			213
Query 186	GCGGGTGGATGCCGGGCTCGAACCACTGGATCGGCGGATCCACTACCGCCAGCAGGATCT			245
Sbjct 214	GCGGGTGGATGCCGGGCTCGAACCACTGGATCGGCGGATCCACTACCGCCAGCAGGATCT			273
Query 246	GGTGGACTACTCCCAGTGGTAAACCACTTGTGACGGGATGACGATCGGCGAACT			305
Sbjct 274	GGTGGACTACTCCCAGTGGTAAACCACTTGTGACGGGATGACGATCGGCGAACT			333
Query 306	CTGCGCCGCCCATCACCTTGAGCGATAACAGCGCTGGCAATCTGCTGTGGCCACCGT			365
Sbjct 334	CTGCGCCGCCCATCACCTTGAGCGATAACAGCGCTGGCAATCTGCTGTGGCCACCGT			393
Query 366	CGCGGGCCCCGGGATTAATGCTCTTTCGCGCCAGATCGGTGACAACTCMCCCGTYT			425
Sbjct 394	CGCGGGCCCCGGGATTAATGCTCTTTCGCGCCAGATCGGTGACAACTCMCCCGTYT			453
Query 426	TGACCGCTGGGAAACGGCTGAATGAGGCGCTTCCCGCGACGCGCGGACACCAACMC			485
Sbjct 454	TGACCGCTGGGAAACGGCTGAATGAGGCGCTTCCCGCGACGCGCGGACACCAACMC			513
Query 486	CCCGGCCAGCATGGCCGCMCGTGCACAAAMTACTGACCGCGCAGCATYTGAGCGCCCG			545
Sbjct 514	CCCGGCCAGCATGGCCGCMCGTGCACAAAMTACTGACCGCGCAGCATYTGAGCGCCCG			573
Query 546	TTGCAACAGCAAMTCTGCAAGTGGATGGAGGATCGGGTTGCCCGCCGCTGATYCG			605
Sbjct 574	TTGCAACAGCAAMTCTGCAAGTGGATGGAGGATCGGGTTGCCCGCCGCTGATYCG			633
Query 606	CGCCGTGCTGCCGCGGGCTGGTTATYGCCGACAAAACCGGGCTGGCGAACGGGGTGC			665
Sbjct 634	CGCCGTGCTGCCGCGGGCTGGTTATYGCCGACAAAACCGGGCTGGCGAACGGGGTGC			693
Query 666	GCGCGGCAATTGTCGCCCTGCTCGGCCCGGACGGCAAAACGGAGCGCATTGTGGTGATCTA			725
Sbjct 694	GCGCGGCAATTGTCGCCCTGCTCGGCCCGGACGGCAAAACGGAGCGCATTGTGGTGATCTA			753
Query 726	TYTGGGGATACCCGGCGAGTATGCC			753
Sbjct 754	TCTGCGGATACCCGGCGAGTATGCC			781

Figura 34: Sequenciamento da amostra 215, para o gene *blaSHV*.

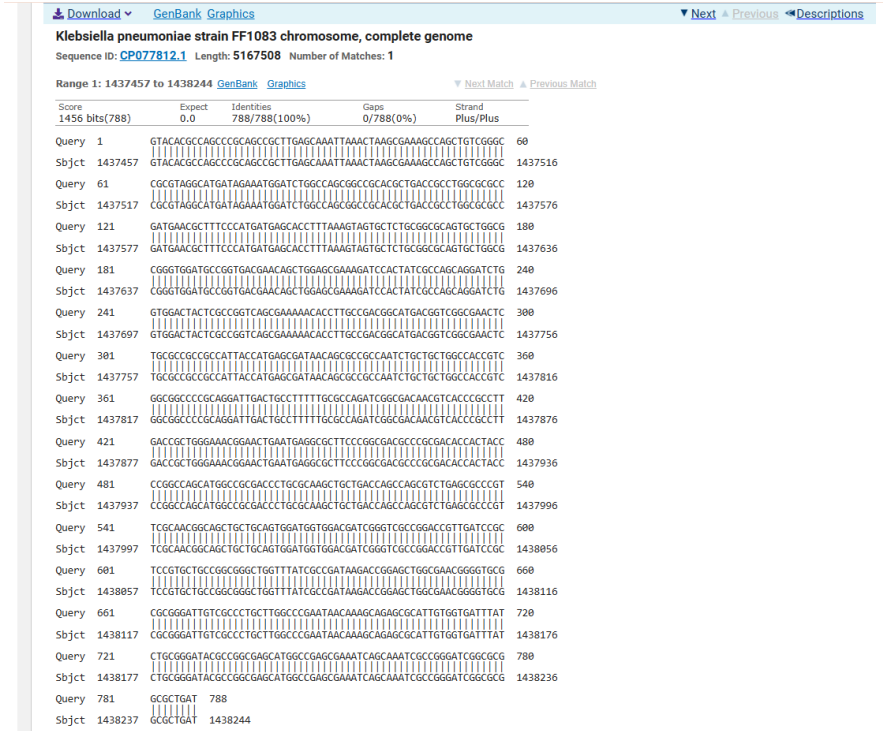


Figura 35: Sequenciamento da amostra 221, para o gene *blaSHV*.

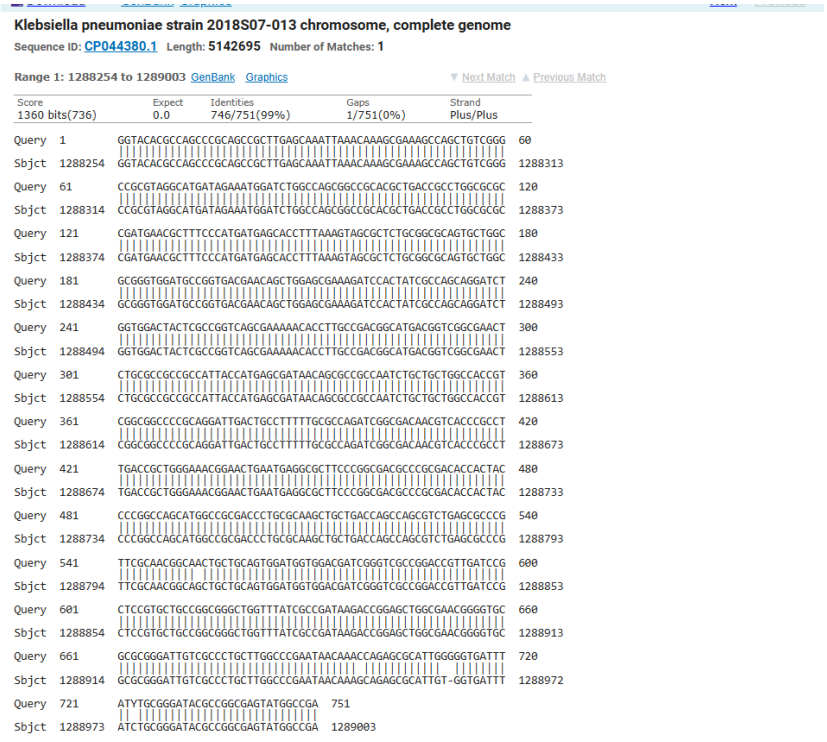


Figura 36: Sequenciamento da amostra 222, para o gene *blaSHV*.

6.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

6.5.1 Análise descritiva simples

A tabela 9 mostra os percentuais de sensibilidade e resistência aos antibióticos testados, além da presença dos principais genes de resistência. Entre as bactérias Gram-positivas, as maiores taxas de resistência foram observadas para ERI (42,9%) e PEN (42,9%), seguidas por OXA (36,5%), TET (20,7%), SUT (23,8%), AMP (15,9%) e AMO (30,2%). Nas gram-negativas, destacaram-se AMO (67,6%) e TET (41,6%) como os antibióticos com maior resistência, enquanto CFO (27,7%), ENO (19,8%), TOB (15,8%), CIP (4,0%) e FLF (3,0%) apresentaram menores índices.

Entre os genes, as Gram-positivas apresentaram *tetM* (6,3%), *mecA* (1,6%), *sea* (11,3%) e *seb* (36,5%). Já nas Gram-negativas, os genes *blaCTX-M* (2,0%), *blaSHV* (5,9%), *blaTEM* (4,0%), *tetA* (3,0%), *tetB* (1,0%), *aac(6)-Ib-cr* (2,0%) e *qnrS* (3,0%) mostraram baixa frequência.

Tabela 8: Análise de frequências da resistência bacteriana em amostras provenientes de diferentes fontes na piscicultura ornamental.

Indicadores	Variáveis		Tipo Bactéria		
			Gram Positiva	Gram Negativa	
Antibiótico	AMO	Sensível	69,8 ^a	32,4 ^b	
		Resistente	30,2 ^b	67,6 ^a	
	AMP	Sensível	84,1	-	
		Resistente	15,9	-	
	SUT	Sensível	76,2	-	
		Resistente	23,8	-	

	<i>ERI</i>	Sensível	57,4	-
		Resistente	42,9	-
	<i>OXA</i>	Sensível	63,5	-
		Resistente	36,5	-
	<i>PEN</i>	Sensível	57,1	-
		Resistente	42,9	-
	<i>CFO</i>	Sensível	-	72,3
		Resistente	-	27,7
	<i>CIP</i>	Sensível	-	96,0
		Resistente	-	4,0
	<i>ENO</i>	Sensível	-	80,2
		Resistente	-	19,8
	<i>TET</i>	Sensível	79,3a	58,4b
		Resistente	20,7b	41,6a
	<i>TOB</i>	Sensível	-	84,2
		Resistente	-	15,8
	<i>FLF</i>	Sensível	-	97,0
		Resistente	-	3,0
	<i>CLI</i>	Sensível	72,4	-
		Resistente	27,6	-
Genes				
	<i>blaCXTM</i>	Ausente	-	98,0
		Presente	-	2,0

	<i>blaSHV</i>	Ausente	-	94,1	
		Presente	-	5,9	
	<i>blaTEM</i>	Ausente	-	96,0	
		Presente	-	4,0	
	<i>tetA</i>	Ausente	-	97,0	
		Presente	-	3,0	
	<i>tetB</i>	Ausente	-	99,0	
		Presente	-	1,0	
	<i>tetM</i>	Ausente	93,7	-	
		Presente	6,3	-	
	<i>mecA</i>	Ausente	98,4	-	
		Presente	1,6	-	
	<i>Sea</i>	Ausente	88,7	-	
		Presente	11,3	-	
	<i>Seb</i>	Ausente	63,5	-	
		Presente	36,5	-	
	<i>Aac(6')Ib-cr</i>	Ausente	-	98,0	
		Presente	-	2,0	
	<i>Qnrs</i>	Ausente	-	97,0	
		Presente	-	3,0	

6.5.2 ANÁLISE FATORIAL

6.5.2.1 Gram-positivas

A análise de componentes principais (PCA) foi realizada para as bactérias Gram-positivas, com o objetivo de identificar correlação entre padrões de resistência e presença de genes. A variância total explicada indicou que os três primeiros componentes explicam aproximadamente 65,7% da variância dos dados, sendo que o primeiro componente explicou 27,2%, o segundo 22,3% e o terceiro 16,2% após rotação, evidenciando que a maior parte da informação pode ser resumida nesses três fatores. A adequação da amostra para PCA foi avaliada pelo teste de Kaiser-Meyer-Olkin (KMO = 0,619), considerado aceitável, e o teste de esfericidade de Bartlett foi significativo ($\chi^2 = 48,483$; $df = 28$; $p = 0,010$).

A matriz de componentes rotacionados revelou que o componente 1 está mais fortemente associado aos antibióticos OXA, CLI, ERI, *tetM* e TET, sugerindo um padrão de resistência múltipla a macrolídeos, penicilinas e tetraciclina. O componente 2 apresentou maior carga no gene *seb* e associação negativa com PEN. O componente 3 destacou o gene *sea*, associado a resistência a ERI e *tetM*.

A análise de correlação mostrou associações significativas entre alguns antibióticos: ERI e CLI ($r = 0,602$; $p = 0,000$), OXA e *tetM* ($r = 0,533$; $p = 0,002$), OXA e CLI ($r = 0,503$; $p = 0,003$) e PEN e OXA ($r = 0,382$; $p = 0,022$). Além disso, o gene *tetM* apresentou correlação positiva com TET ($r = 0,343$; $p = 0,037$), indicando co-resistência entre tetraciclina. Por outro lado, os genes *sea* e *seb* mostraram correlações baixas ou não significativas com a maioria dos antibióticos, sugerindo que sua presença está mais relacionada à virulência do que à resistência.

1	2,74	34,279	34,279	2,74	34,279	34,279	2,17	27,225	27,225
2	1,29	16,179	50,458	1,29	16,179	50,458	1,78	22,272	49,497
3	1,22	15,264	65,722	1,22	15,264	65,722	1,29	16,225	65,722
4	,995	12,433	78,155						
5	,607	7,590	85,745						
6	,512	6,400	92,144						
7	,377	4,711	96,855						
8	,252	3,145	100,000						

Tabela 10: Teste de Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) e Esfericidade de Bartlett.

Teste de KMO e Bartlett^a

Medida Kaiser-Meyer-Olkin de adequação de amostragem.		,619
Teste de esfericidade de Bartlett	Aprox. Qui-quadrado	48,483
	Df	28
	Sig.	,010

Tabela 11: Matriz de componentes.

	Componente		
	1	2	3
ERI	,639	,190	-,545
OXA	,809	-,227	,111
PEN	,490	-,668	-,166
tetM	,649	,104	,568

Seb	,315	,841	,088
CLI	,747	,060	-,383
TET	,552	,097	,149
Sea	,238	-,172	,620

Tabela 12: Matriz de correlações entre antibióticos e genes.

		ERI	OXA	PEN	tetM	Seb	CLI	TET	sea
Correlação	ERI	1,000	,337	,224	,122	,244	,602	,236	-,026
	OXA	,337	1,000	,382	,533	,026	,503	,438	,152
	PEN	,224	,382	1,000	,189	-,224	,333	,140	,101
	tetM	,122	,533	,189	1,000	,304	,236	,343	,284
	seb	,244	,026	-,224	,304	1,000	,258	,153	,026
	CLI	,602	,503	,333	,236	,258	1,000	,162	,101
	TET	,236	,438	,140	,343	,153	,162	1,000	-,016
	sea	-,026	,152	,101	,284	,026	,101	-,016	1,000
Sig. (1 extremidade)	ERI		,040	,126	,269	,105	,000	,113	,448
	OXA	,040		,022	,002	,448	,003	,010	,221
	PEN	,126	,022		,168	,126	,042	,239	,305
	tetM	,269	,002	,168		,058	,114	,037	,071
	seb	,105	,448	,126	,058		,092	,219	,448
	CLI	,000	,003	,042	,114	,092		,206	,305
	TET	,113	,010	,239	,037	,219	,206		,467
	sea	,448	,221	,305	,071	,448	,305	,467	

6.5.2.2 Gram-negativas

A análise de componentes principais (PCA) foi realizada com o objetivo de

investigar padrões de associação entre antibióticos e genes de resistência em bactérias Gram-negativas. Antes da extração dos componentes, a adequação da amostra foi avaliada pelo teste de Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) e pelo teste de esfericidade de Bartlett. A medida KMO apresentou valor de 0,547, indicando adequação da amostra, enquanto o teste de Bartlett foi significativo (Qui-quadrado aproximado = 319,534; df = 66; $p < 0,001$).

A variância total explicada mostra que os três primeiros componentes concentram quase metade da variabilidade dos dados, com 46,9% da variância acumulada. O primeiro componente explica 19,62% da variância, seguido pelo segundo (14,25%) e pelo terceiro (13,04%). Após a rotação varimax, que facilitou a interpretação, a variância explicada pelos três primeiros componentes manteve-se significativa, com 19,16%, 13,86% e 12,16%, respectivamente, totalizando 45,18% cumulativamente.

A matriz de componentes quais variáveis influenciam mais cada componente. O primeiro componente é fortemente influenciado pelos genes *tetA* (0,884), *aac(6')/lb-cr* (0,855) e *blaTEM* (0,634), sugerindo uma relação entre esses genes plasmidiais. O segundo componente apresenta associação com *blaCXT-M* (0,808) e *tetB* (0,807). O terceiro componente destaca fluoroquinolonas, com *CIP* (0,736) e *ENO* (0,603).

A análise das correlações entre antibióticos e genes de resistência mostra correlação elevada e significativa entre *tetA* e *aac(6')/lb-cr* ($r = 0,812$; $p < 0,001$), assim como entre *tetB* e *blaCXT-M* ($r = 0,704$; $p < 0,001$), indicando agrupamentos de genes associados à resistência plasmidial e tetraciclina. Entre antibióticos, fluoroquinolonas como *CIP* e *ENO* apresentaram correlação moderada ($r = 0,409$; $p < 0,001$), sugerindo resistência cruzada.

1	2,55	19,624	19,624	2,55	19,624	19,624	2,49	19,162	19,162
	1			1			1		
2	1,85	14,246	33,870	1,85	14,246	33,870	1,80	13,863	33,025
	2			2			2		
3	1,69	13,038	46,908	1,69	13,038	46,908	1,58	12,157	45,182
	5			5			0		
4	1,22	9,450	56,359	1,22	9,450	56,359	1,33	10,276	55,458
	9			9			6		
5	1,20	9,254	65,613	1,20	9,254	65,613	1,32	10,155	65,613
	3			3			0		
6	,950	7,305	72,918						
7	,816	6,276	79,194						
8	,721	5,550	84,744						
9	,642	4,936	89,680						
10	,519	3,990	93,670						
11	,409	3,144	96,814						
12	,285	2,189	99,002						
13	,130	,998	100,000						

Tabela 14: Teste de Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) e Esfericidade de Bartlett.

Teste de KMO e Bartlett^a

Medida Kaiser-Meyer-Olkin de adequação de amostragem.		,547
Teste de esfericidade de Bartlett	Aprox. Qui-quadrado	319,534
	Df	66
	Sig.	,000

Tabela 15: Matriz de correlações entre antibióticos e genes de resistência em bactérias Gram-negativas.

	CFO	CIP	ENO	TET	TOB	FLF	Bla CXTM	Bla SHV	Bla TEM	tetA	tetB	ac(6') lbc	qnrS
Correlação CFO	1,000	,214	,136	-,029	,155	,022	,229	-,156	,101	-,108	,161	-,088	,163
CIP	,214	1,000	,409	,241	,190	-,036	-,029	-,051	-,041	-,036	-,020	-,029	,025
ENO	,136	,409	1,000	,034	,057	,059	-,071	-,125	,154	,059	-,050	-,071	-,014
TET	-,029	,241	,034	1,000	,184	,207	,024	-,042	-,068	-,029	,119	,024	-,048
TOB	,155	,190	,057	,184	1,000	,244	-,062	-,109	,051	,244	-,043	,328	,215
FLF	,022	-,036	,059	,207	,244	1,000	-,025	-,044	,264	,313	-,017	,394	-,022
blaCXTM	,229	-,029	-,071	,024	-,062	-,025	1,000	-,036	-,029	-,025	,704	-,020	-,018
blaSHV	-,156	-,051	-,125	-,042	-,109	-,044	-,036	1,000	-,051	-,044	-,025	-,036	-,032
blaTEM	,101	-,041	,154	-,068	,051	,264	-,029	-,051	1,000	,563	-,020	,336	-,026
tetA	-,108	-,036	,059	-,029	,244	,313	-,025	-,044	,563	1,000	-,017	,812	-,022
tetB	,161	-,020	-,050	,119	-,043	-,017	,704	-,025	-,020	-,017	1,000	-,014	-,013
Aac(6')lbc	-,088	-,029	-,071	,024	,328	,394	-,020	-,036	,336	,812	-,014	1,000	-,018
qnrS	,163	,025	-,014	-,048	,215	-,022	-,018	-,032	-,026	-,022	-,013	-,018	1,000
Sig. (CFO extremidade		,016	,087	,387	,060	,414	,010	,060	,157	,140	,053	,191	,051
CIP	,016		,000	,008	,029	,362	,387	,306	,341	,362	,420	,387	,404
ENO	,087	,000		,366	,287	,278	,241	,107	,062	,278	,311	,241	,444
TET	,387	,008	,366		,033	,019	,405	,338	,249	,386	,119	,405	,316
TOB	,060	,029	,287	,033		,007	,270	,139	,306	,007	,333	,000	,015
FLF	,414	,362	,278	,019	,007		,403	,331	,004	,001	,431	,000	,412
blaCXTM	,010	,387	,241	,405	,270	,403		,361	,387	,403	,000	,421	,428
blaSHV	,060	,306	,107	,338	,139	,331	,361		,306	,331	,402	,361	,374
blaTEM	,157	,341	,062	,249	,306	,004	,387	,306		,000	,420	,000	,398
tetA	,140	,362	,278	,386	,007	,001	,403	,331	,000		,431	,000	,412
tetB	,053	,420	,311	,119	,333	,431	,000	,402	,420	,431		,444	,449
aaclbc	,191	,387	,241	,405	,000	,000	,421	,361	,000	,000	,444		,428
qnrS	,051	,404	,444	,316	,015	,412	,428	,374	,398	,412	,449	,428	

Tabela 16: Matriz de componentes rotacionados para bactérias Gram-negativas.**Matriz de componente^{a,b}**

	Componente				
	1	2	3	4	5
CFO	-,027	,539	,297	,332	,327
CIP	,038	,284	,736	,052	-,233
ENO	,117	,145	,603	,443	-,339
TET	,104	,266	,306	-,667	-,340
TOB	,466	,184	,377	-,353	,386
blaCXTM	-,120	,808	-,406	,042	-,045
blaTEM	,634	,029	-,097	,482	-,092
tetA	,884	-,022	-,198	,144	-,041
tetB	-,100	,807	-,382	-,044	-,104
aacIbcr	,855	-,003	-,196	-,096	,038
qnrS	,018	,112	,217	-,013	,792
FLF	,600	,089	,027	-,268	-,092

6.5.3 Análise de Correspondência Múltipla

A análise de correspondência, de acordo com a figura 39, permitiu visualizar a relação entre as espécies bacterianas isoladas e suas respectivas fontes de origem. As duas primeiras dimensões explicaram praticamente toda a variação observada (Dimensão 1 = 87,2%; Dimensão 2 = 82,3%), indicando um alto ajuste do modelo ($\alpha = 0,85$ e $\alpha = 0,79$) (coeficiente alfa de Cronbach (α) $0,60 < \alpha \leq 0,75$ - Moderada ; $0,75 < \alpha \leq 0,90$ – Alta, e $\alpha > 0,90$ – Muito alta).

As cepas de *Staphylococcus lentus* apresentaram forte associação com a fonte ave, sugerindo que essa espécie é mais comum em amostras aviárias. A fonte suíno apareceu próxima ao mesmo agrupamento, indicando similaridade no perfil bacteriano entre amostras de aves e suínos, com presença de espécies de *Staphylococcus* semelhantes.

O grupo formado por *Pseudomonas spp.*, *Enterobacteriaceae* e *Proteus*

vulgaris mostrou-se relacionado à fonte água, indicando afinidade dessas bactérias com ambientes aquáticos. Já *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.* e *Citrobacter freundii* agruparam-se próximos às fontes bovino e felino, o que indica que essas enterobactérias são comuns na microbiota intestinal desses animais.

As espécies *Staphylococcus pseudintermedius* e *Staphylococcus simulans* apresentaram associação direta com a fonte canino e são espécies frequentemente isoladas de cães. Além disso, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* e *Klebsiella oxytoca* apareceram próximas entre si e relacionadas a múltiplas fontes, sugerindo uma distribuição mais ampla e um potencial de disseminação entre diferentes ambientes e hospedeiros.

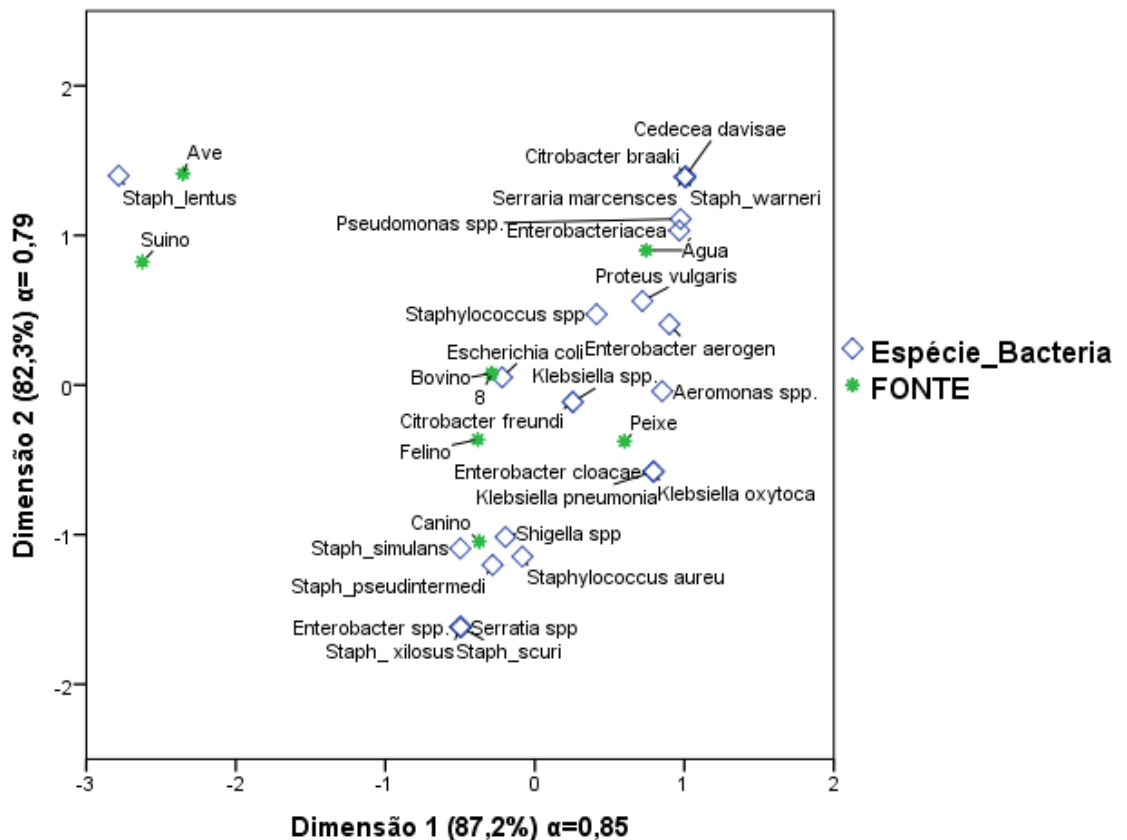


Figura 39: Plotagem bidimensional da Análise de Correspondência Múltipla entre Espécie bacteriana identificada e fonte de obtenção. Proximidade entre centroides (médias multivariadas com formatos de asterisco e diamante) indica maior associação.

Na figura 40, foi realizada a análise de correspondência para a relação entre diferentes espécies de *Staphylococcus* e a presença ou ausência dos genes de enterotoxinas *sea* e *seb*. As duas dimensões principais explicaram parte da variabilidade total dos dados (Dimensão 1 = 55,3% e Dimensão 2 = 37,2%), indicando uma boa representação das associações observadas, sendo classificada baixa para a dimensão 2 e alta para a dimensão 1 (coeficiente alfa de Cronbach (α) $0,60 < \alpha \leq 0,75$ - Moderada ; $0,75 < \alpha \leq 0,90$ – Alta, e $\alpha > 0,90$ – Muito alta).

O gene *seb* apresentou forte associação com *Staphylococcus pseudintermedius*, sugerindo que essa espécie foi a principal portadora desse gene entre as amostras analisadas. Já o gene *sea* mostrou-se relacionado a *Staphylococcus aureus*, espécie normalmente descrita como o principal produtor da enterotoxina A.

As condições de ausência dos genes *sea* e *seb* agruparam-se próximas às espécies *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus xylosum*, *Staphylococcus lentus* e *Staphylococcus scuri*, indicando que a presença de genes de enterotoxinas estão relacionadas a cepas coagulase positivas.

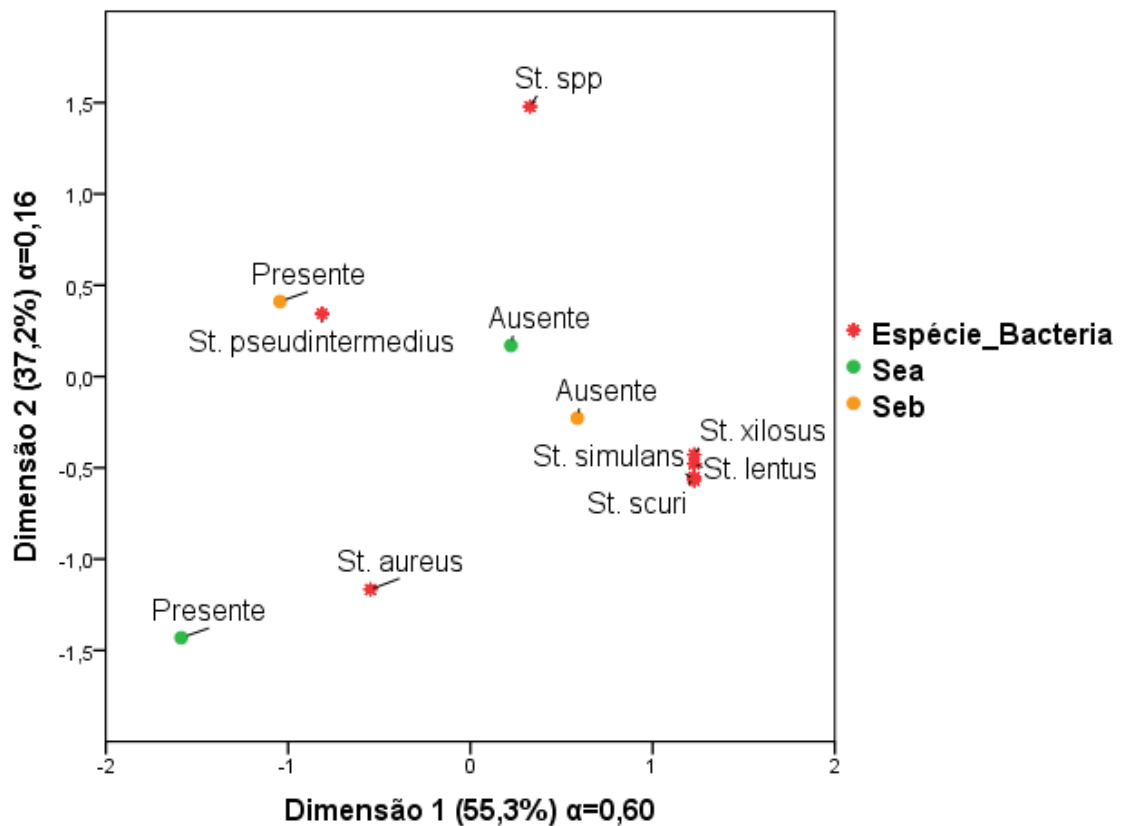


Figura 40: Plotagem bidimensional da Análise de Correspondência Múltipla entre Espécie de *Staphylococcus* e genes *sea* e *seb*. Proximidade entre centroides (médias multivariadas com formatos de asterisco e círculo colorido) indica maior associação.

7 DISCUSSÃO

Dentre os antibióticos testados, a tetraciclina foi o que apresentou a alta taxa de resistência entre as bactérias Gram-negativas (40,6%), resultado que pode ser atribuído ao uso frequente e, por vezes, em altas concentrações desse antimicrobiano tanto para tratamento quanto para profilaxia de infecções bacterianas em sistemas aquícolas. Essa prática contribui para a presença de resíduos de antibióticos em produtos da piscicultura e, conseqüentemente, para o estabelecimento de forte pressão seletiva no ambiente aquático, favorecendo a disseminação de genes de resistência (BOJARSKI, 2020). Tal cenário é especialmente relevante, considerando que a oxitetraciclina é uma das poucas

drogas autorizadas para uso terapêutico na aquicultura brasileira, juntamente com o florfenicol (EMBRAPA, 2023), o que reforça a importância do monitoramento contínuo do uso dessas substâncias e da implementação de estratégias de manejo que reduzam a dependência de antimicrobianos. Resultados semelhantes foram observados por Dewi et al. (2022), que relataram resistência à tetraciclina em até 70% das cepas bacterianas isoladas de amostras de água e peixes, e por Araújo et al. (2024), que identificaram a tetraciclina entre os três antimicrobianos com maiores índices de resistência.

Apesar do alto índice de resistência fenotípica, apenas três cepas apresentaram o gene *tetA*, um apresentou *tetB*, e três apresentaram *tetM*. Esses são alguns dos genes de resistência à tetraciclina mais estudados e cada um é associado a um mecanismo distinto. O gene *tetM* atua por proteção ribossomal, impedindo que o antibiótico se ligue ao ribossomo, fazendo com que a síntese proteica prossiga mesmo na presença da droga. *tetA* e *tetB* são mais comuns em Gram-negativas, apresentando mecanismos bomba efluxo ativo, responsável por expulsar a tetraciclina da célula (GROSSMAN, 2016). Assim, a baixa prevalência desses genes, apesar de divergir de estudos como Araújo (2025), onde *tetA* foi detectado em mais de 73% dos casos, sugere que é possível que outros genes ou mecanismos não investigados estejam contribuindo para a resistência observada.

Mesmo sendo um dos dois únicos antibióticos autorizados para uso na piscicultura no Brasil, ao contrário da tetraciclina, o florfenicol apresentou a menor taxa de resistência, com apenas três cepas resistentes e sem detecção do gene *floR* em nenhuma delas. A presença de resistência ao florfenicol e sua associação ao gene *floR* já foi relatada em cepas de *Aeromonas spp.* isoladas de ambientes aquáticos por Silva et al. (2018). De forma semelhante, Verner-Jeffreys et al. (2009) detectaram o gene *floR* em 16 dos 93 isolados provenientes de peixes ornamentais. Por outro lado, Carraschi (2011) identificou que a concentração eficaz de oxitetraciclina é significativamente maior do que a de florfenicol, corroborando os achados do presente estudo, que demonstrou uma alta taxa de resistência à tetraciclina, enquanto a resistência ao florfenicol permaneceu baixa. Em 2019, Sáenz concluiu, através da administração de florfenicol em peixes, que a administração de antibióticos induz um aumento nos genes responsáveis pela resistência a esse antibiótico, sugerindo que a baixa presença de resistência na região do presente estudo pode estar relacionada ao uso ainda restrito do florfenicol.

A presença de resistência fenotípica elevada mas com baixa detecção dos genes de resistência pesquisados foi um resultado recorrente no presente estudo. Essa divergência entre o fenótipo e o genótipo também foi relatada por outros autores, como Bolkenov et al. (2024) e Wistrand-Yuen et al. (2018), que encontraram perfis semelhantes em cepas resistentes sem a presença dos genes clássicos. Os autores sugerem que essa discrepância pode ocorrer por diversos fatores, como mutações cromossômicas, expressão de bombas de efluxo, exposição a subdoses de antibióticos, regulação gênica ou até limitações dos primers utilizados, que não abrangem todos os determinantes possíveis. Assim, a resistência observada nem sempre está diretamente ligada à presença dos genes pesquisados.

Em *Staphylococcus spp.*, a resistência à oxacilina está diretamente relacionada à presença do gene *mecA*, considerado um determinante genético que torna os microrganismos intrinsecamente resistentes também a outras drogas β -lactâmicas (MIMICA e MENDES, 2007). No entanto, das 23 (36,5%) cepas de *Staphylococcus* que apresentaram resistência fenotípica à oxacilina, apenas uma amostra foi positiva para o gene *mecA*. Esse resultado sugere que as demais cepas podem ser classificadas como BORSA (*Borderline Oxacillin-Resistant Staphylococcus aureus*), caracterizadas por apresentarem resistência intermediária à oxacilina (MIC entre 1 e 8 $\mu\text{g/mL}$) devido à hiperprodução de β -lactamase ou alterações em PBPs nativas, mas sem a presença do gene *mecA* ou *mecC* que codificam a proteína PBP2a (Hryniewicz e Garbacz, 2017). Além disso, observou-se que muitas das cepas Gram-positivas apresentaram resistência à penicilina (42,9%), seguida de amoxicilina (30,2%) e ampicilina (15,9%). Algumas dessas cepas, no entanto, permanecerem sensíveis à oxacilina e a outros antibióticos do mesmo grupo, podendo ser classificadas como MSSA (*Methicillin-Susceptible S. aureus*), nas quais a resistência se limita à ação enzimática da β -lactamase, sem envolvimento de genes específicos de resistência à meticilina (AIRES-DE-SOUSA, 2007).

A única cepa *mecA* positiva foi também a única que apresentou forte aderência no teste de produção de biofilme em placas, sugerindo uma possível relação entre esse gene e a formação de biofilme. Essa associação se torna ainda mais evidente quando se comparam as demais cepas portadoras de genes de resistência e virulência, como *tetM*, *seb* e *sea*, que apresentaram apenas aderência fraca ou moderada, indicando que esses fatores não estão diretamente relacionados

ao aumento da formação de biofilme. Múltiplos estudos corroboram a associação entre a produção de biofilme e a presença do gene *mecA*. Shan (2019) demonstrou que isolados de *S. aureus mecA* positivos de mastite bovina apresentaram biofilme forte ou moderado, com correlação significativa entre a presença do gene e a aderência in vitro. De forma semelhante, Leshem (2022) avaliou a capacidade de produção de biofilme de cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de pacientes hospitalizados em Israel, observando que as cepas de MRSA tenderam a ser maiores produtoras de biofilme do que as cepas de MSSA, associando a presença de *mecA* à produção de biofilme.

No presente estudo, também foi pesquisada a presença de enterotoxinas estafilocócicas, sendo que, entre as cepas analisadas, 23 apresentaram o gene *seb*, enquanto sete apresentaram o gene *sea*, considerada a mais frequente na literatura (LIM, 2023). As enterotoxinas são conhecidas por estarem associadas à intoxicação alimentar em humanos (LER, 2006). Embora esse efeito seja mais relevante na piscicultura destinada à alimentação, a presença desses genes de virulência na piscicultura ornamental chama atenção devido ao seu potencial de transferência horizontal, podendo ser transferidos entre diferentes linhagens de *S. aureus* através de fagos residentes, facilitando sua disseminação (MCCARTHY, 2014), podendo contaminar o meio ambiente e a água, com possível exposição a humanos. Além disso, estudos anteriores sugerem uma associação entre a presença de genes de enterotoxinas estafilocócicas e a resistência antimicrobiana. Wang et al. (2017) observaram que cerca de 50% das cepas de MRSA carregavam pelo menos um gene de enterotoxina, enquanto Ibrahim et al. (2023) concluíram que a presença desses genes apresentou associação significativa com a resistência aos antibióticos testados.

O sequenciamento realizado neste estudo utilizou primers específicos para cada gene para confirmar a presença dos mesmos nas cepas-alvo. No entanto, foram observadas divergências entre os resultados dos testes de identificação fenotípicos e genotípicos, como no caso da cepa resistente à oxacilina, positiva para o gene *mecA*, mas com resultado negativo no teste de coagulase e de uma cepa positiva para o gene *tetM*, que apresentou morfologia e testes bioquímicos compatíveis com *Staphylococcus* (catalase e coagulase positivas, cocos em cachos), porém o sequenciamento indicou identificação como *Enterococcus*. Essas inconsistências podem decorrer de falhas pontuais nos testes bioquímicos,

contaminação dos isolados durante o cultivo ou extração do DNA, ou ainda de eventos de transferência horizontal de genes, que é um fenômeno frequente em bactérias e contribui para a rápida disseminação de determinantes de resistência e virulência entre espécies distintas; assim, o DNA amplificado pode ser proveniente de um plasmídeo originalmente pertencente a outra espécie bacteriana (OCHMAN, 2000; JUHAS, 2009; LAND, 2015). Além disso, o sequenciamento para a identificação bacteriana geralmente é feito a partir do gene 16S rRNA, que é considerado uma ferramenta de referência por conter regiões conservadas e variáveis que permitem a diferenciação taxonômica (CLARRIDGE, 2004), diferentemente do presente estudo, onde o sequenciamento realizado foi plasmidial, tornando a análise restrita a fragmentos extracromossômicos de DNA, não permitindo a determinação exata da espécie de origem do gene. A identificação tradicional de bactérias baseada em características fenotípicas, embora útil, apresenta limitações de precisão quando comparada aos métodos moleculares (JANDA e ABBOTT, 2007). Ainda assim, variações genéticas como duplicações, deleções e eventos de recombinação podem levar a resultados divergentes entre a caracterização fenotípica e o sequenciamento (YARZA, 2014).

8 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que as bactérias isoladas de propriedades de piscicultura ornamental apresentam elevados percentuais de resistência aos antimicrobianos, quando avaliado o perfil de susceptibilidade, especialmente eritromicina e penicilina para Gram-positivas e amoxicilina e tetraciclina em Gram-negativas. Esse percentual de resistência observado deve ser considerado, visto que interfere diretamente no tratamento terapêutico, seja em animais ou em humanos, já que muitos dos antibióticos usados são comuns nas áreas veterinária e humana.

Apesar disso, a frequência de todos os genes de resistência analisados foi baixa, indicando que, embora haja potencial para disseminação de resistência, a presença desses genes específicos ainda é limitada na região estudada e que a resistência fenotípica encontrada se deve a outros mecanismos ou genes não investigados.

No ensaio de produção de biofilme em cepas com presença de genes de resistência, a maioria das amostras se mostrou fracamente aderente, sugerindo que não há associação clara entre esses genes e a produção de biofilme nessas cepas.

Observou-se também alta frequência dos genes *seb* e *sea*, que, na piscicultura ornamental, não são relevantes para intoxicação alimentar em humanos, mas podem indicar contaminação ambiental e possibilidade de transferência horizontal.

Os dois antibióticos permitidos na piscicultura brasileira, tetraciclina e florfenicol, apresentaram resultados opostos. Enquanto a tetraciclina apresentou grande número de amostras resistentes, o florfenicol apresentou baixa resistência, com apenas três amostras, sugerindo que seu uso ainda não é tão disseminado na região.

Esses resultados destacam a importância do uso controlado de antimicrobianos e da vigilância contínua, visando reduzir a disseminação de resistência antimicrobiana e proteger tanto espécies domésticas quanto o ambiente aquático.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP, F. M.; SEYFARTH, A. M.; EMBORG, H.-D.; PEDERSEN, K.; HENDRIKSEN, R. S.; BAGER, F. Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal *Enterococci* from food animals in Denmark. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, p.2054-2059, 2001.

AARESTRUP, F. M.; AGERSØ, Y.; GERNER-SMIDT, P.; MADSEN, M.; JENSEN, L. B. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.37, p.127– 137, 2000.

ABINPET. *Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação. Mercado PET Brasil 2022*. **Abinpet**, 2023.

AIRES-DE-SOUZA, M.; PARENTE, C. E. S.; VIEIRA-DA-MOTTA, O.; BONNA, I. C. F.; SILVA, D. A.; DE 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.

ALATOOM, A., ALATTAS, M., ALRADDADI, B., MOUBARECK, C. A., HASSANIEN, A., JAMAL, W., KURDI, A., MOHAMED, N., SENOK, A., SOMILY, A. M., ZIGLAM, H. Antimicrobial Resistance Profiles of *Pseudomonas aeruginosa* in the Arabian Gulf Region Over a 12-Year Period (2010-2021). **Journal of Epidemiology and Global Health**. v. 14, n. 3, p. 529–548, 2024.

ALI ABADI, F.S., LEES, P. Antibiotic treatment for animals: effect on bacterial population and dosage regimen optimization. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 14, p.307-313, 2000.

ANATOLE, H.; BOSCH, T. M.; PINHEIRO, C. Diagnóstico geral das práticas de controle ligadas à exploração, captura, comercialização, exportação e uso de peixes para fins ornamentais e de aquarofilia. Brasília, DF: **IBAMA**. 217 p. Relatório técnico. 2008.

ANDRADE, G. I., SANTOS, E. L. DE S., COURA, F. C., CUNHA, A. A. S., BARBOSA, A. F., FALCÃO, M. M., MOL, J. P. DA S., FERREIRS, M. G., FREITAS, M. D., FILHO, E. F., DE CARVALHO, A. U., FERREIRA, P. M., HEINEMANN, M. B., LAGE, A. P. PCR Multiplex para determinação de marcadores de virulência em *Escherichia coli* isoladas de bovinos com diarreia em Minas Gerais. **Ciência Animal Brasileira**, p.436-441, 2009.

ANTUNES, P.; MACHADO, J.; PEIXE, L. Dissemination of sulfonamide resistance genes (*sul1*, *sul2*, and *sul3*) in Portuguese *Salmonella enterica* strains and relation with integrons. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 2, p. 836–839, 2005.

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, M. G. M. de; SILVA, J. R.; SOUZA, L. P.; OLIVEIRA, R. T.; LIMA, F. S.; COSTA, A. M.; PEREIRA, H. F.; RODRIGUES, C. M.; BARBOSA, D. R.; MORAES, E. A.; GOMES, T. L.; ALMEIDA, F. A. de; SANTOS, P. C. dos; LUCAS, V. S.; MOREIRA, R. S.; FERREIRA, L. B.; CARDOSO, M. A. R. Prevalence and diversity of resistance genes identified in *Escherichia coli* isolated from raw bovine milk: a multicontinental systematic review. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 46, n. 4, p. 1243–1260, 2025.

ARAÚJO, R. P.; DANTAS, F. G. da S.; DE ALMEIDA-APOLONIO, A. A.; DA ROCHA, M. P.; CRISPIM, B. A.; BARUFATTI, A.; RODRIGUES, D. dos P.; DOS SANTOS, J. V. de A.; DE OLIVEIRA, K. M. P.. Presence and antimicrobial susceptibility profile of *Salmonella spp.* isolated from fish farms. **Evidência**, v. 24, e33034, 2024.

ARENZ, S.; ABDULLAH, M.; FRANK, T.; KAPPE, T.; SATTELBERG, T.; SCHÄFER, P.; RAMOS, J. A.; MATEU, M. G.; WILSON, D. N.; BROCHIER-ARMANET, C.; JAMIESON, F.; ZAYTSEVA, N.; RATTEI, T.; ÖZBAYKAL, G.; GÜNTHER, S.; BECHER, D.; ORTH, P.; DIMMER, J.; MULLER, C. W.; HANSEN, H. A. Cryo-EM structure of the tetracycline resistance protein *TetM* in complex with a translating ribosome at 3.9-Å resolution. **PNAS**, v. 112, n. 17, p. 5401–5406, 2015.

AU-YEUNG, C., KIT-LING LAM, KA-WAI CHAN AND WING-YIN MO. Uses of antibiotics in ornamental fish in Hong Kong and the antibiotic resistance in the associated zoonotic pathogens. **J. Xenobiot.** v. 12, p. 365–377, 2022.

BAQUERO, F., MARTÍNEZ, J. L., CANTÓN, R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. **Current Opinion in Biotechnology**, v.19, p.260–265, 2008.

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

BARRIOS, R. L. A., SIERRA, C. A. S., MORALES, J. D. C. J. Bacterias resistentes a antibióticos en ecosistemas acuáticos. **Producción + Limpia**, v. 10, n. 2, p. 160–172, 2015.

BARTLEY, P. S., DOMITROVIC, N., MORETTO, V. T., SANTOS, C. S., PONCE TERASHIMA, R., REIS, M. G., BARBOSA, L. M., BLANTON, R. E., BONOMO, R. A., PEREZ, F. Antibiotic resistance in *Enterobacteriaceae* from surface waters in urban Brazil highlights risks of poor sanitation. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 6, p. 1369–1377, 2019.

BAYLES, K.W. The biological role of death and lysis in biofilm development. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5; p. 721-726, 2007.

BOJARSKI, B.; KOT, B.; WITESKA, M. Antibacterials in aquatic environment and their toxicity to fish. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 8, art. 189, 2020.

BRAHMI, S., TOUATI, A., CADIÈRE, A., DJAHMI, N., PANTEL, A., SOTTO, A., LAVIGNE, J., DUNYACH-REMY, C. First Description of Two Sequence Type 2 *Acinetobacter baumannii* Isolates Carrying OXA-23 Carbapenemase in *Pagellus acarne* Fished from the Mediterranean Sea near Bejaia, Algeria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.60, n. 4, p. 2513-2515, 2016.

BRASIL. Governo do Brasil. Proibições de aditivos na alimentação animal. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/resistencia-aos-antimicrobianos/legislacao/proibicoes-de-aditivos-na-alimentacao-animal>. Acesso em: jan. 2025.

BRYERS, J. D. Medical biofilms. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 100, p. 1-18, 2008.

BYRNE-BAILEY, K. G.; GIBBS, M.; DUNCAN, A.; SMITH, R. P.; SHERLOCK, K.; LEVY, S. B.; WRIGHT, G. D.; ENGLISH, M. R.; MAXWELL, A.; ANDERSON, R. C.; CHANDLER, J.; DAVIES, J.; HUGHES, D. T.; PHILLIPS, I.; MUNCK, L.; ROSS, K.;

ROBERTS, M. C. Prevalence of sulfonamide resistance genes in bacterial isolates from manured agricultural soils and pig slurry in the United Kingdom. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 2, p. 696–702, 2009.

CARRASCHI, S. P.; CRUZ, C.; MACHADO NETO, J. G.; CASTRO, M. P.; BORTOLUZZI, N. L.; GÍRIO, A. C. F. Eficácia do florfenicol e da oxitetraciclina no controle de *Aeromonas hydrophila* em pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 3, p. 579–583, 2011.

CATTOIR, V.; POIREL, L.; NORDMAN, P. Plasmid-mediated quinolone resistance pump *QepA2* in an *Escherichia coli* isolate from France. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.52, p.3.801-3804, 2008.

CERNY, B. A., & KAISER, H. F. A study of a measure of sampling adequacy for factor-analytic correlation matrices. **Multivariate Behavioral Research**, v.12, n.1, p. 43–47, 1977.

CHAO, N. L.; PRANG, G.; ZUBKOV, M. V.; SANDOVAL-CASTAÑEDA, J.; VALENTE, L. M. P.; MACHADO-ALLISON, A. Conservation and Management of Ornamental Fish Resources of the Rio Negro Basin, Amazonia, Brasil: (Project Piaba). **Editora da Universidade Federal do Amazonas**. 2001.

CHAPMAN, F. A. Ornamental fish culture, freshwater. **Encyclopedia of Aquaculture**, n. 3, p. 602-610, 2000.

CHOPRA, I., ROBERTS, M. C. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 65, p. 232-60, 2001.

CIOFU, O., MOSER, C., JENSEN, P. O., HOIBY, N. Tolerance and resistance of microbial biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, n. 10, p. 621-635, 2022.

CLARRIDGE, J. E. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. **Clinical Microbiology**

Reviews, v. 17, n. 4, p. 840–862, 2004.

COELHO, S. M. O., MORAES, R. A. M., SOARES, L. C., PEREIRA, I. A., GOMES, L. P., SOUZA, M. M. S. Resistance pattern and detection of *mecA* gene in oxacillin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius* from animal and human samples. **Ciência Rural**, v.37, n.1, 2007.

CONTE, D., PALMEIRO, J. K., NOGUEIRA, K. S., LIMA, T. M. R., CARDOSO, M. A., PONTAROLO, R., PONTES, F. L. D., DALLA-COSTA, L. M. Characterization of CTX-M enzymes, quinolone resistance determinants, and antimicrobial residues from hospital sewage, wastewater treatment plant, and river water. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 136, p. 62-69, 2017.

CREPALDI, D. V.; TEIXEIRA, E. A.; FARIA, P. M. C.; RIBEIRO, L.; MELO, D. C.; CARVALHO, D.; SOUSA, A. B.; SATURNINO, H. M.. Sistemas de produção na piscicultura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 30, n. ¾, p. 86-99, 2006.

DAVIES, D. G. Understanding biofilm resistance to antimicrobial agents. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, p. 114-122, 2003.

DAVIES, D. G., R. PARSEK M., PEARSON J. P., COSTERTON J. W., GREENBERG E. P. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. **Science** v. 280, p. 295- 298. 1998.

DEWI, R. R.; HASSAN, L.; DAUD, H. M.; MATORI, M. F.; NORDIN, F.; AHMAD, N. I.; ZAKARIA, Z. Prevalence and antimicrobial resistance of *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Vibrio* derived from farm-raised red hybrid tilapia (*Oreochromis spp.*) and Asian sea bass (*Lates calcarifer*) on the west coast of Peninsular Malaysia. **Antibiotics (Basel)**, v. 11, n. 2, art. 136, 2022.

DOOLITTLE, W. F.; ZHAXYBAYEVA, O. On the origin of prokaryotic species. **Genome Research**, v. 19, n. 5, p. 744–756, 2009.

DUTTA, A.; SINGH, P.; CHAUHAN, P.; MEHTA, S.; SHARMA, R.; KUMAR, V.;

JOSHI, M.; GUPTA, A.; PANDEY, K. Multi-Drug Resistance Pattern of *Escherichia coli* Isolated from Hospital Effluent and Determination of Tetracycline Resistance Gene. **Journal of Infection and Molecular Biology**, v. 4, n. 3, p. 49-53, 2016.

FAO. Antimicrobial Use in Aquaculture: Risks and Regulations. 2021. Disponível em: <https://www.fao.org/antimicrobial-resistance/resources/en/>. Acesso em: jan. 2025.

FARROKH, C.; JORDAN, K.; AUVRAY, F.; GLASS, K.; OPPEGAARD, H.; RAYNAUD, S.; THEVENOT, D.; CONDRON, R.; DE REU, K.; GOVARIS, A.; HEGGUM, K.; HEYNDRICKX, M.; HUMMERJOHANN, J.; LINDSAY, D.; MISZCZYCHA, S.; MOUSSIEGT, S.; VERSTRAETE, K.; CERF, O. Review of Shiga toxin-producing *E.Coli* (STEC) n their significance in dairy production. **International Journal of Food Microbiology**, v.162, n.2, p.190-212, 2013.

FERNANDES DA SILVA, B.; DELÉO RODRIGUES, A. Economic Potential of Ornamental Fish Production in Brazil. **Revista Interface Tecnológica**, Taquaritinga, SP, v. 21, n. 2, p. 517–530, 2025.

GASTALHO, S., DA SILVA, G. J., RAMOS, F. Antibiotics in aquaculture and bacterial resistance: Health care impact. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, v.3, n.1, p.27-45, 2014.

GOÑI-URRIZA, M.; ARPIN, C.; CAPDEPUY, M.; DUBOIS, V.; CAUMETTE, P.; QUENTIN, C. Type II Topoisomerase Quinolone Resistance Determining Regions of Mutations Associated with Quinolone Resistance. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 2, p. 350–359, 2002.

GRAF, A. C.; LEONARD, A.; SCHÄUBLE, M.; RIECKMANN, L. M.; HOYER, J.; MAASS, S.; LALK, M.; BECHER, D.; PANÉ-FARRÉ, J.; RIEDEL, K. Virulence factors produced by *Staphylococcus aureus* biofilms have a moonlighting function contributing to biofilm integrity. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 18, n. 6, p. 1036–1053, 2019.

GREGORY, A.; LEWBART, M. S. Bacteria and ornamental fish. **Seminars in Avian**

and Exotic Pet Medicine, v. 10, n. 1, p. 48-56, 2001.

GROSSMAN, T. H. Tetracycline antibiotics and resistance. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, n. 4, a025387, 2016.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J.W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 95-108, 2004.

HALL-STOODLEY, P. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. **Trends in Microbiology**, v. 13, p. 7-10, 2005.

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.

HIRSCH, D.; JUNIOR, D. J. P.; LOGATO, P. V. R.; PICCOLI, R. H.; FIGUEIREDO, H. C. P. Identification and antimicrobial resistance of motile *Aeromonas* isolated from fish and aquatic environment. **Revista de Ciências e Agrotecnologia**. v. 30, n. 6, p. 1211-1217, 2006.

HOBSON, C., CHAN, A. N., WRIGHT, G. D. The Antibiotic Resistome: A Guide for the Discovery of Natural Products as Antimicrobial Agents. **Chemical Reviews**, 121: 3464–3494, 2021.

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.

INFOTECA EMBRAPA. Métodos de avaliação de antibióticos em aquicultura. 2023. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br>. Acesso em: jan. 2025.

JACOBY, G. A.; GACHARNA, N.; BLACK, T. A.; MILLER, G. H.; HOOPER, D. C. Temporal Appearance of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 53, n. 4, p. 1665–1666, 2009.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 9, p. 2761–2764, 2007.

JIANG, H. X., TANG, D., LIU, Y. H., ZHANG, X. H., ZENG, Z. L., XU, L., HAWKEY, P. M. Prevalence and characteristics of β -lactamase and plasmid mediated quinolone resistance genes in *Escherichia coli* isolated from farmed fish in China. **J Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 67, p.2350-2353, 2012.

JIANG, X., ZHANG, Z., LI, M., ZHOU, D., RUAN, F., AND LU, Y. Detection of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**., v. 50, n. 9, p. 2990-2995, 2006.

JIEMIN CHEN, RUNXIA SUN, CHANG-GUI PAN, YUE SUN, BI-XIAN MAI, QING X. LI. Antibiotics and Food Safety in Aquaculture, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, p. 1- 34, 2020.

JOHNSON, W. M.; LUCEY, J. A.; BAYNE, C. A.; EMMANUEL, A.; FRANK, L.; SCHMALZER, K.; HARKINS, C.; NATHAN, C. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. **Journal of clinical microbiology** v. 29, n.3 p. 426-430.1991.

JUHAS, M.; VAN DER MEER, J. R.; VAN BOXTEL, R.; LILLEY, A. K.; FORSYTHE, J.; STODDARD, P.; MILLER, C.; WALSH, F.; O'CONNOR, S.; DOOLITTLE, W. F.; DUNN, S. D.; MURRAY, N. E.; LEPAGE, C.; BOYER, H. W.; KAPPLER, U.; ZWAAGSTRA, J.; ALLARD, G.; MCNEILL, A. Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 33, n. 2, p. 376–393, 2009.

KASIER, H. F. The application of electronic computers to factor analysis. **Educational and Psychological Measurement**. v. 1, p.141–151, 1960.

KAZMIERCZAK, K. M.; RABINE, S.; HACKEL, M.; McLAUGHLIN, R. E.; BIEDENBACH, D. J.; BOUCHILLON, S. K.; SAHM, D. F.; BRADFORD, P. A. Multiyear, multinational survey of the Incidence and global distribution of metallo- β -Lactamase-producing *enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60n. 2, p. 1067-78, 2016.

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.

LAND, M.; HAUSER, L.; JUN, S.-R.; NOOKAEW, I.; LEUZE, M. R.; AHN, T.-H.; KARPINETS, T.; LUND, O.; KORA, G.; WASSENAAR, T.; POUDEL, S.; USSERY, D. W. Insights from 20 years of bacterial genome sequencing. **Functional & Integrative Genomics**, v. 15, p. 141–161, 2015.

LER, S. G.; LEE, F. K.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Trends in detection of warfare agents: detection methods for ricin, Staphylococcal enterotoxin B and T-2 toxin. **Journal of Chromatography A**, v. 1133, p. 1–12, 2006.

LESHEN, T.; SCHNALL, B.; AZRAD, M.; BAUM, M.; ROKNEY, A.; PERETZ, A. Incidence of biofilm formation among MRSA and MSSA clinical isolates from hospitalized patients in Israel. **Journal of Applied Microbiology**, v. 133, n. 2, p. 922–929, 2022.

LI, X., MOWLABOCCUS, S., JACKSON, B., CAI, C., COOMBS, G. W. Antimicrobial resistance among clinically significant bacteria in wildlife: An overlooked one health concern. **International Journal of Antimicrobial Agents**. 2024.

LIM, K. L.; KHOR, W. C.; ONG, K. H.; TIMOTHY, L.; AUNG, K. T. Occurrence and patterns of enterotoxin genes, spa types and antimicrobial resistance patterns in *Staphylococcus aureus* in food and food contact surfaces in Singapore. **Microorganisms**, v. 11. 2023.

LUPO, A., COYNE, S., BERENDONK, T. U. Origin and evolution of antibiotic resistance: the common mechanisms of emergence and spread in water bodies. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 18. 2012.

MADSEN, J. S.; BURMØLLE, M.; HESTBJERG HANSEN, L.; SØRENSEN, S. J. The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 65, p. 183-195, 2012.

MARINCOLA, G., JASCHKOWITZ, G., KIENINGER, A. K., WENCKER, F. D., FEBLER, A. T., SCHWARZ, S., ZIEBUHR, W. Plasmid-Chromosome Crosstalk in *Staphylococcus aureus*: A horizontally acquired transcription regulator controls polysaccharide intercellular adhesin-mediated biofilm formation. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. v. 11, p. 660- 702. 2021.

MARSHALL, B. M.; LEVY, S. B. Food animals and antimicrobials: impacts on human health. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 718–733. 2011.

MATTHIENSEN A. Uso do Coeficiente Alfa de Cronbach em Avaliações por Questionários. **Embrapa Roraima**. 2011.

MAYNARD, C.; FAIRBROTHER, J. M.; BEKAL S, et al. Antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic *Escherichia coli* O149:K91 isolates obtained over a 23- year period from pigs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**; v. 47, p. 3214-3221. 2003.

MCCARTHY, A. J.; ROOK, G. A. W.; YACONO, D.; ROBERTS, L. S.; PATERSON, G. K.; WEBSTER, D.; MORGAN, J. A. T.; PEREIRA, R. R.; STEVENS, C.; WILLIS, C. L.; HOGG, D.; SNARY, D.; HARDY, K. J.; O'NEILL, A. J.; PENADÉS, J. R. Extensive horizontal gene transfer during *Staphylococcus aureus* co-colonization in vivo. **Genome Biology and Evolution**, v. 6, n. 10, p. 2697–2708, 2014.

MICHAEL, G. B.; CUMMINS, M. L.; ROBERTS, M. C.; WILLIAMS, R. J.; HUGHES, C. M.; JONES, P. W.; SMITH, A. J.; THOMPSON, G. R.; BROWN, D. J.; TAYLOR, L. H.; CLARKE, S. T.; MILLER, N. A.; EVANS, P.; WALKER, D. Genes and mutations

conferring antimicrobial resistance in *Salmonella*: an update. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 7, p. 1898-1914, 2006.

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

MOON, B. Y.; PARK, J. Y.; HWANG, S. Y.; ROBINSON, D. A.; THOMAS, J. C.; FITZGERALD, J. R.; PARK, Y. H.; SEO, K. S. Phage-mediated horizontal transfer of a *Staphylococcus aureus* virulence-associated genomic island. **Scientific Reports**, v. 5. 2015.

MORAES, F. R.; MARTINS, M. L. Condições predisponentes e principais enfermidades de teleósteos em piscicultura intensiva. In: CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALLOSSI, D. M.; CASTANGNOLLI, N. (ed.). Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. **TecArt**. p. 343-386. 2004.

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>

NICHOLS, W. W.; COOKSON, B. D.; ROBINS-BROWNE, R. M.; SNELL, J. C.; RICHARDS, A. B.; WILSON, R. Inhibition of tobramycin diffusion by binding to alginate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 32, p. 518-523, 1988.

NIU, Z., ZHANG, K., ZHANG, Y. Occurrence and distribution of antibiotic resistance genes in the coastal area of the Bohai Bay, China. **Marine Pollution Bulletin**. 107: 245– 250, 2016.

OCHMAN, H.; LAWRENCE, J. G.; GROISMAN, E. A. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. **Nature**, v. 405, p. 299–304, 2000.

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 CH, ROBICSEK A, JACOBY GA, SAHM D, HOOPER DC. Prevalence in the United States of *aac(6)-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 50, p. 3953–3955. 2006.

PERRY, J. A., WESTMAN, E. L., WRIGHT, G. D. The antibiotic resistome: what's new? **Current Opinion in Microbiology**. v. 21, p. 45–50. 2014.

PICÃO, R. C.; POIREL, L.; DEMARTA, A.; SILVA, C. S.; CORVAGLIA, A. R.; PETRINI, O.; NORDMANN, P. Plasmid-mediated quinolone resistance in *Aeromonas allosaccharophila* recovered from a Swiss lake. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.62, p. 948-950, 2008.

POIREL, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, J. M.; MAMMERI, H.; LIARD, A.; NORDMANN, P. Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant *QnrA*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 3523-3525, 2005.

POZO, J.L.; PATEL, R. The challenge of treating biofilm-associated bacterial infections. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 82, p. 204-209, 2007.

PREDA. V. G., SĂNDULESCU, O. Communication is the key: biofilms, quorum sensing, formation and prevention. **Discoveries**, v. 7, n. 3, p. e100, 2019.

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**, Lausanne, v. 5. 2014.

REIS, R. E.; ALBERT, J. S.; DI DARIO, F.; MINCARONE, M. M.; PETRY, P.; ROCHA, L. A. Fish biodiversity and conservation in South America. **Fish Biology**, v. 89,n. 1, p. 12-47, 2016.

REZENDE, F. P.; FUJIMOTO, R. Y. Peixes ornamentais no Brasil: mercado, legislação, sistemas de produção e sanidade. v.1. **Embrapa**, 2021.

REZENDE, F. P.; FUJIMOTO, R. Y. Peixes ornamentais no Brasil: mercado, legislação, sistemas de produção e sanidade. Brasília, DF: **Embrapa**, 2021. 297 p.

RIBEIRO, F. A. S.; CARVALHO JUNIOR, J. R.; FERNANDES, J. B. K.; NAKAYAMA, L. Cadeia produtiva do peixe ornamental **Panorama da Aquicultura**. v.19, n.112 p.36- 45, 2009.

RIBEIRO, F. de A. S.; JORGE, P. H.; KOCHENBORGER FERNANDES, J. B.; SAKOMURA, N. K. Densidade de estocagem para produção de Acará-bandeira em viveiros escavados em policultivo com Camarão da-amazônia. **Revista Caatinga**, v. 23, n. 4, p. 129-134, 2010.

RIGOS, G.; TROISI, G. M. Antibacterial agents in Mediterranean finfish farming: A synopsis of drug pharmacokinetics in important euryhaline fish species and possible environmental implications. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**. v. 15, n. 1, p.53-73, 2005.

SÁENZ, J. S.; MARQUES, T. V.; BARONE, R. S. C.; CYRINO, J. E. P.; KUBLIK, S.; NESME, J.; SCHLOTTER, M.; RATH, S.; VESTERGAARD, G. Oral administration of antibiotics increased the potential mobility of bacterial resistance genes in the gut of the fish *Piaractus mesopotamicus*. **Microbiome**, v. 7. 2019.

SALMOND, G. P. C., BYCROFT B. W., LAZDUNSKI AB. STEWARD., G. S. A., WILLIAMS P. Multiple N-acyl-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*. **PNAS**. v. 64, p. 3480-3485. 1995.

SANTOS, N. Q. Bacterial resistance in the context of hospital infection. **Texto & Contexto Enfermagem**; v. 13, p. 64-70, 2004.

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.

SAVAGE, V. J., CHOPRA, I., O'NEILL, A. J. *Staphylococcus aureus* biofilms promote horizontal transfer of antibiotic resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** . v. 57, p. 1968–1970. 2013.

SEAFOOD WATCH. Antibiotics in Aquaculture: State of Affairs. 2022. Disponível em: <https://www.seafoodwatch.org/globalassets/sfw/pdf/projects/antibiotics-in-aquaculture/seafood-watch-antibiotics-in-aquaculture-state-of-affairs.pdf>. Acesso em: jan. 2025.

SHAH, M. S.; SINGH, R.; KUMAR, V.; SINGH, B. K.; RAI, A.; SHARMA, R.; GUPTA, M.; SINGH, J.; PANDEY, S. Methicillin resistance genes and in vitro biofilm formation among *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in India. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 64, p. 117–124, 2019.

SILVA, N. C. S. L.; NOGUEIRA, J. F.; GOUVEIA, J. J. S.; COSTA, M. M.; GOUVEIA, G. V. Gene *floR* and resistance to florfenicol in isolated *Aeromonas spp.* indigenous aquatic organisms. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 3, p. 357–366, 2018.

SINDAN. **Compêndio de Produtos Veterinários**, 2018.

SMITH, J. L., FRATAMICO, P. M., GUNTHER IV, N. W. Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. **Advances in Applied Microbiology**, v.86, n.3, p.145-197, 2014.

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

SPARBROD, M.; GAGER, Y.; KOEHLER, A.-K.; JENTSCH, H.; STINGU, C.-S. Relationship between phenotypic and genotypic resistance of subgingival biofilm samples in patients with periodontitis. **Antibiotics**, v. 12, n. 1, p. 68, 2023.

SPSS. *SPSS Software*. IBM; 2012. Disponível em:

<https://www.ibm.com/products/spss-statistics>. Acesso em: 06.01.2026.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DINIC, M.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. Quantification of Biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by Staphylococci. **APMIS**, v.115, p.891-899, 2007.

STEPANOVIC, S., VUKOVIC, D., DAKIC, I., SAVIC, B., SVABIC-VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of *staphylococcal* biofilm formation. **J Microbiol Methods**. ;v. 40, n. 2, p.175-9, 2000.

STOLL, C., SIDHU, J. P. S., TIEHM, A., TOZE, S. Prevalence of Clinically Relevant Antibiotic Resistance Genes in Surface Water Samples Collected from Germany and Australia. **Environmental Science & Technology**, v. 46, p. 9716–9726, 2012.

SU, H., YING, G., TAO, R., ZHANG, R., ZHAO, J., LIU, Y. Class 1 and 2 integrons, *sul* resistance genes and antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolated from Dongjiang River, South China. **Environmental Pollution**, v. 169, p. 42 49, 2012.

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, 2014.

Thermo Fisher Scientific. *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit: User Guide*. Thermo Fisher Scientific, ano da última versão. Disponível em: <https://documents.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN1000355-BDTv3-1CycleSeqKit-UG.pdf>. Acesso em: 06.01.2026.

TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C. L. Microbiologia 10^a ed. **Artmed**, p. 113-295; p. 328-445; p. 553-580; p. 776- 809; 2012.

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

UPPULURI, P., CHATURVEDI, A. K., SRINIVASAN, A., BANERJEE, M., RAMASUBRAMANIAM, A. K., KÖHLER, J. R., KADOSH, D. & LOPEZ-RIBOT, J.L. Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle. **PloS Pathogens**, v. 6, n. 3, p. e1000828. 2010.

VAZ-MOREIRA, I., NUNES, O. C., MANAIA, C. M. Bacterial diversity and antibiotic resistance in water habitats: searching the links with the human microbiome. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 38, p. 761-778, 2014.

VERNER-JEFFREYS, D. W.; WELCH, T. J.; SCHWARZ, T.; POND, M. J.; WOODWARD, M. J.; HAIG, S. J.; RIMMER, G. S. E.; ROBERTS, E.; MORRISON, V.; BAKER-AUSTIN, C. High prevalence of multidrug-tolerant bacteria and associated antimicrobial resistance genes isolated from ornamental fish and their carriage water. **PLoS One**, v. 4, n. 12, p. e8388, 2009.

WANG, Y.; DAVIES, J. E.; HARMON, M.; GREEN, S. I.; MURRAY, C. J.; SAUNDERS, M. R.; COLE, S.; JOHNSON, L. E.; ROBERTS, A. P.; BROWN, D.; SMITH, S. G.; LEWIS, K.; JONES, R. M.. Evolution of high-level resistance during low-level antibiotic exposure. **Nature Communications**, v. 9, 2018.

YARZA, P.; YILMAZ, P.; PRUESSE, E.; GLÖCKNER, F. O.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.-H.; WHITMAN, W. B.; EUZÉBY, J.; AMANN, R.; ROSSELLÓ-MÓRA, R. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, p. 635–645, 2014.

ZHANG, K.; MCCLURE, J.-A.; ELMORE, C.; FRANK, L.; GOLDBERG, S. B.; BARRETT, J. B.; EDGEWORTH, J. D.; TOLLEFSON, G.; HILL, B. C.; LOW, D. E.; YEUNG, S.; CONNORS, G. A.; ZHANG, Y.; HOOPER, D. C.; PELLEGRINI, C. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome mec types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 5026–5033, 2005.

APÊNDICE

APÊNDICE A – AMOSTRAS GRAM-POSITIVAS

Tabela 17: Identificação das amostras Gram-positivas.

Amostra	Bactéria	Origem da Amostra	ATB Resistentes	Genes Presentes
11	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	Canino	ERI	
12	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	Canino	ERI	<i>seb</i>
13	<i>Staphylococcus xilosus</i>	Canino	PEN	
14	<i>Staphylococcus aureus</i>	Canino	AMO,PEN	
18	<i>Staphylococcus lentus</i>	Ave	ERI,PEN	
19	<i>Staphylococcus lentus</i>	Ave	ERI	
110	<i>Staphylococcus lentus</i>	Ave	ERI,OXA,PEN	
111	<i>Staphylococcus simulans</i>	Felino	PEN	
126	<i>Staphylococcus aureus</i>	Canino		<i>sea</i>
127	<i>Staphylococcus lentus</i>	Ave	AMO,ERI,PEN	
128	<i>Staphylococcus lentus</i>	Ave	AMO	
131	<i>Staphylococcus lentus</i>	Ave		

134	<i>Staphylococcus lentus</i>	Ave	ERI,OXA,PEN	
136	<i>Staphylococcus simulans</i>	Canino	AMO,PEN	
137	<i>Staphylococcus aureus</i>	Canino	AMO	
140	<i>Staphylococcus lentus</i>	Ave	ERI	
142	<i>Staphylococcus aureus</i>	Canino	AMO,PEN	
144	<i>Staphylococcus lentus</i>	Canino	ERI,PEN	
145	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	Canino	AMO,AMP,PEN	seb
146	<i>Staphylococcus lentus</i>	Suíno	OXA	
147	<i>Staphylococcus lentus</i>	Canino	OXA,PEN	
149	<i>Staphylococcus scuri</i>	Canino	AMO,ERI,OXA,P EN	
150	<i>Staphylococcus lentus</i>	Suíno	AMO,ERI,OXA,P EN	
151	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	Canino	AMP	
167	<i>Staphylococcus spp.</i>	Água	AMO,AMP,ERI,O XA,PEN	
168	<i>Staphylococcus spp.</i>	Água	AMO,AMP,ERI,O XA,PEN	seb
169	<i>Staphylococcus spp.</i>	Água	AMO,AMP,ERI,O XA,PEN	
170	<i>Staphylococcus aureus</i>	Canino	AMO,AMP,ERI,O XA,PEN	seb
171	<i>Staphylococcus</i>	Canino	AMO,OXA,PEN	

	<i>aureus</i>			
172	<i>Staphylococcus</i> <i>spp.</i>	Ave	AMO,AMP,ERI,O XA,PEN	
173	<i>Staphylococcus</i> <i>spp.</i>	Peixe	AMO,AMP,ERI,O XA,PEN	
175	<i>Staphylococcus</i> <i>spp.</i>	Peixe	AMO,OXA,PEN	
176	<i>Staphylococcus</i> <i>spp.</i>	Peixe	AMO,AMP,OXA,P EN	
178	<i>Staphylococcus</i> <i>warneri</i>	Água	AMO,AMP,OXA,P EN	<i>mecA</i>
248	<i>Staphylococcus</i> <i>pseudintermedius</i>	Peixe		<i>seb</i>
249	<i>Staphylococcus</i> <i>pseudintermedius</i>	Peixe	ERI	<i>seb</i>
250	<i>Staphylococcus</i> <i>pseudintermedius</i>	Peixe	ERI,CLI	<i>seb</i>
251	<i>Enterococcus</i> <i>faecalis</i>	Peixe	TET	<i>tetM,seb</i>
252	<i>Staphylococcus</i> <i>pseudintermedius</i>	Peixe	ERI	<i>seb</i>
253	<i>Staphylococcus</i> <i>pseudintermedius</i>	Peixe	ERI,CLI	<i>seb</i>
254	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>	Peixe	ERI,OXA,TET	
257	<i>Staphylococcus</i> <i>spp.</i>	Peixe		
259	<i>Staphylococcus</i> <i>spp.</i>	Água	ERI,OXA,CLI	<i>seb</i>
269	<i>Staphylococcus</i> <i>spp.</i>	Água		<i>seb</i>
271	<i>Staphylococcus</i> <i>pseudintermedius</i>	Peixe	ERI,PEN	

272	<i>Staphylococcus aureus</i>	Peixe	ERI,OXA,TET,CLI	<i>tetM,seb</i>
2104	<i>Staphylococcus aureus</i>	Canino	OXA,PEN,CLI	
2105	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	Canino	TET	<i>seb</i>
2106	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	Canino		<i>sea</i>
2107	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	Canino		<i>seb</i>
2108	<i>Staphylococcus aureus</i>	Canino		<i>seb</i>
2109	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	Canino		<i>sea</i>
2110	<i>Staphylococcus aureus</i>	Água	ERI,OXA,PEN,TE T,CLI	<i>tetM,sea,seb</i>
2112	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	Canino		
2113	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	Suíno		<i>sea,seb</i>
2114	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	Canino	OXA,TET,CLI	<i>seb</i>
2115	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	Canino	ERI,CLI	<i>sea,seb</i>
2116	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	Canino		<i>seb</i>
2117	<i>Staphylococcus spp.</i>	Canino	TET	<i>seb</i>
2118	<i>Enterococcus faecalis</i>	Canino	OXA	<i>tetM,sea,seb</i>
2119	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	Canino		
2120	<i>Staphylococcus</i>	Canino		

pseudintermedius

2121	<i>Staphylococcus</i> <i>pseudintermedius</i>	Canino
-------------	--	--------

APÊNDICE B – AMOSTRAS GRAM-NEGATIVAS

Tabela 18: Identificação das amostras Gram-negativas.

Amostra	Bactéria	Origem da Amostra	ATB Resistentes	Genes Presentes
112	<i>Escherichia coli</i>	Canino		
113	<i>Escherichia coli</i>	Felino	CFO	
114	<i>Escherichia coli</i>	Ave	TET	
115	<i>Escherichia coli</i>	Água		
116	<i>Escherichia coli</i>	Canino		
119	<i>Escherichia coli</i>	Ave	TET	
122	<i>Escherichia coli</i>	Bovino	CFO	
124	<i>Escherichia coli</i>	Canino		
152	<i>Escherichia coli</i>	Água	TET	
153	<i>Escherichia coli</i>		TET,CFO	
154	<i>Escherichia coli</i>	Canino	TET	
155	<i>Escherichia coli</i>		TET	
156	<i>Escherichia coli</i>	Canino		
157	<i>Escherichia coli</i>	Canino		
158	<i>Escherichia coli</i>	Canino	TET	
159	<i>Escherichia coli</i>	Canino	TET,ENO,FLF	
160	<i>Escherichia coli</i>	Felino		
161	<i>Escherichia coli</i>	Felino	TET	
162	<i>Escherichia coli</i>	Canino		
164	<i>Escherichia coli</i>	Canino		
165	<i>Escherichia coli</i>	Canino		

166	<i>Escherichia coli</i>	Canino	
181	<i>Citrobacter freundii</i>	Água	CFO
182	<i>Cedecea davisae</i>	Água	CFO
186	<i>Citrobacter braaki</i>	Água	CFO
187	<i>Escherichia coli</i>	Água	
188	<i>Escherichia coli</i>	Água	
189	<i>Escherichia coli</i>	Peixe	
191	<i>Citrobacter mulinae</i>	Água	
196	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Água	<i>blaSHV</i>
197	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Peixe	CFO
198	<i>Citrobacter freundii</i>	Canino	CFO
1100	<i>Escherichia coli</i>	Água	TET
1101	<i>Escherichia coli</i>	Água	ENO
1102	<i>Escherichia coli</i>	Água	TET
1104	<i>Escherichia coli</i>	Água	
1106	<i>Escherichia coli</i>	Água	TET
1110	<i>Proteus vulgaris</i>	Água	TET,CIP,ENO,C FO
1111	<i>Enterobacteriaceae</i>	Água	TET,ENO
1112	<i>Proteus vulgaris</i>	Água	TET
1113	<i>Kluyvera ascorbata</i>	Água	TET
1114	<i>Escherichia coli</i>	Água	TET
1116	<i>Proteus vulgaris</i>	Água	TET
1117	<i>Enterobacteriaceae</i>	Água	TET
1118	<i>Proteus vulgaris</i>	Água	TET,CFO
1119	<i>Enterobacteriaceae</i>	Água	
1120	<i>Edwardsiella tarda</i>	Água	TET,ENO,CFO
1121	<i>Enterobacteriaceae</i>	Água	TET
1122	<i>Citrobacter diversus</i>	Água	TET
1123	<i>Enterobacteriaceae</i>	Água	TET,CIP,ENO,C FO
1124	<i>Enterobacteriaceae</i>	Água	

1125	<i>Enterobacter taylorae</i>	Água		
1126	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Água	ENO	
1127	<i>Enterobacteriaceae</i>	Água	ENO	
1128	<i>Enterobacteriaceae</i>	Água	TET	
1129	<i>Escherichia coli</i>	Água	TET	
1130	<i>Enterobacteriaceae</i>	Água	TET,CFO,FLF	
1132	<i>Enterobacteriaceae</i>	Peixe	ENO,CFO	
1133	<i>Proteus vulgaris</i>	Peixe	TET,CFO	
1134	<i>Escherichia coli</i>	Ave	TET	
1135	<i>Escherichia coli</i>	Ave	TET	
1136	<i>Pseudomonas spp.</i>	Água	ENO	
1139	<i>Pseudomonas spp.</i>	Água	ENO	
1144	<i>Pseudomonas spp.</i>	Peixe		
21	<i>Enterobacter cloacae</i>	Peixe	AMO,CFO	
25	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Peixe	ENO,CFO	<i>blaTEM</i>
26	<i>Enterobacteriaceae</i>	Peixe	AMO,CFO	<i>blaTEM</i>
211	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Peixe	AMO	
215	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Peixe	AMO	<i>blaSHV</i>
216	<i>Escherichia coli</i>	Peixe		
220	<i>Klebsiella spp.</i>	Água	CFO	<i>blaCXTM</i>
221	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Peixe	AMO	<i>blaSHV</i>
222	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Água	AMO,TET	<i>blaSHV</i>
223	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Peixe	AMO	<i>tetA,aac(6')Ib-cr</i>
228	<i>Aeromonas spp.</i>	Peixe	AMO	
229	<i>Aeromonas spp.</i>	Peixe	AMO	
230	<i>Aeromonas spp.</i>	Água	AMO,TET,CFO	

243	<i>Pseudomonas spp.</i>	Água	TET,CFO	
245	<i>Aeromonas spp.</i>	Água	AMO,ENO,CFO	
247	<i>Pseudomonas spp.</i>	Água		
277	<i>Shigella spp.</i>	Água		
278	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Peixe	AMO,TET,FLF	<i>blaTEM,tetA,aac(6')lb-cr</i>
279	<i>Aeromonas spp.</i>	Peixe	AMO,TET,CIP,E NO,CFO	<i>qnrS</i>
280	<i>Aeromonas spp.</i>	Peixe	AMO,ENO	<i>blaTEM</i>
281	<i>Aeromonas spp.</i>	Água	AMO,ENO,CFO	
282	<i>Pseudomonas spp.</i>	Água	AMO,ENO	
283	<i>Aeromonas spp.</i>	Peixe	AMO,CFO	
284	<i>Aeromonas spp.</i>	Peixe	AMO,CFO	
285	<i>Aeromonas spp.</i>	Peixe		
287	<i>Serratia spp.</i>	Canino	AMO,CFO	
288	<i>Enterobacter spp.</i>	Canino	TET	
291	<i>Shigella spp.</i>	Canino		
295	<i>Escherichia coli</i>	Água	TET,ENO	<i>qnrS</i>
296	<i>Klebsiella spp.</i>	Água	AMO,TET,CIP,E NO	
297	<i>Escherichia coli</i>	Canino	AMO,TET	<i>qnrS, tetA</i>
298	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Canino	AMO,TET	<i>blaSHV</i>
299	<i>Shigella spp.</i>	Canino	AMO,TET,ENO	
2100	<i>Escherichia coli</i>	Canino	AMO,TET,CFO	<i>blaCXTM,tetB</i>
2101	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Canino	AMO	<i>blaSHV</i>
2102	<i>Klebsiella spp.</i>	Canino		
2103	<i>Shigella spp.</i>	Canino		