**Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública**

**Pesquisa de genes de resistência a antimicrobianos
em filés de tilápia comercializados no município de
São Paulo-SP**

Vanessa Fernandes Bordon

**Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Saúde Pública
para obtenção do título de Mestre em
Ciências**

**Área de concentração: Serviços de
Saúde Pública**

**Orientador: Prof. Associado Glavur
Rogério Matté**

**São Paulo
2014**

Pesquisa de genes de resistência a antimicrobianos em filés de tilápia comercializados no município de São Paulo-SP

Vanessa Fernandes Bordon

**Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Saúde Pública
para obtenção do título de Mestre em
Ciências**

**Área de concentração: Serviços de
Saúde Pública**

**Orientador: Prof. Associado Glavur
Rogério Matté**

**São Paulo
2014**

É expressamente proibida a comercialização deste documento tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

Dedicatória

A Deus, por sempre me amparar,
aos meus pais, por apoiarem minhas escolhas e
ao Má, por estar sempre ao meu lado.

Agradecimentos

A Deus, por cuidar de mim, sempre me guardando, protegendo e abençoando meu caminho.

Aos meus pais, pelo amor incondicional, por sempre me apoiarem, rezarem por mim, incentivarem e acreditarem. Quero que sempre se orgulhem de mim. Amo muito vocês!

Ao Má, por ser meu grande amor, meu companheiro e amigo de todas as horas. Por me incentivar desde o primeiro dia desta jornada até o último, com muita paciência, palavras doces e ideias brilhantes. Obrigada por fazer parte da minha vida!

À minha avózinha, por rezar por mim, vibrar com minhas conquistas e ter sempre uma palavra certa no momento certo. Um exemplo que tento seguir.

À toda minha família, por rezar e torcer por mim e pela paciência de conviver menos comigo durante esta fase tão corrida.

Ao professor Glavur Rogério Matté, pela orientação, sugestões e principalmente por acreditar no meu projeto e apostar em mim mesmo não me conhecendo. Obrigada por esta oportunidade.

À professora Maria Helena Matté, que se transformou em minha orientadora também. Obrigada pela paciência, ensinamentos, dicas, ideias e por me receber tão bem no laboratório.

Às meninas do laboratório da Faculdade de Saúde Pública: Rafa, Marina, Livia, RONALDA, Milena, Miriam, Luiza, Bruna, Flávia. Vocês me ajudaram e me ensinaram tudo desde o início, com muita paciência e carinho. Não sei se fui boa aluna, mas são todas ótimas professoras!

À Marina Coan, por me socorrer diversas vezes, me ensinar muito e se transformar em uma amiga.

À Milena Dropa, pelas explicações, pelas revisões e correções maravilhosas, sempre com muita calma e carinho e por aceitar participar da banca examinadora, obrigada!

Ao professor Nilton Lincopan, pelas considerações e sugestões durante a fase de qualificação.

À turma da Prefeitura de Atibaia: Dr. Celso, Dr. Louzada, Monia, Sandro, Dra. Rita, Gorete e tantos outros que me incentivaram a iniciar o mestrado, ajudaram na confecção do pré-projeto e reduziram minha carga horária para conseguir fazer as disciplinas.

Ao Dr. Carlos Louzada, por trazer a Faculdade de Saúde Pública mais perto de mim e me incentivar a prestar a prova do mestrado.

Ao Dr. Celso Maruta, pela ajuda desde o início na confecção do pré-projeto até a defesa, sempre com muita disposição, dedicação e competência.

À turma de veterinários da Prefeitura de São Paulo, que no final do mestrado tiveram paciência comigo, com a minha ansiedade e inquietação.

A todos que ajudaram de alguma forma este sonho se tornar realidade...

Muito obrigada!

“DA MINHA ALDEIA vejo quanto da terra se pode ver no Universo...
Por isso a minha aldeia é tão grande como outra terra qualquer
Porque eu sou do tamanho do que vejo
E não, do tamanho da minha altura...”

Alberto Caeiro (heterônimo de Fernando Pessoa)

RESUMO

Bordon VF. Pesquisa de genes de resistência a antimicrobianos em filés de tilápia comercializados no município de São Paulo – SP [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2014.

Introdução – A utilização excessiva de antimicrobianos na medicina humana, veterinária e agricultura resultou no aparecimento da resistência bacteriana. Este fenômeno gera problemas de saúde pública que podem resultar na reemergência de doenças infecciosas. O uso de antibióticos, principalmente de forma profilática, tornou-se prática na aquicultura, como ocorre no Brasil, onde a regulamentação para o uso de medicamentos veterinários é ineficiente. Além disso, há evidências da transferência de organismos resistentes para humanos por meio do consumo de produtos de origem animal, quando, durante a fase de criação e produção destes foram administrados antibióticos. **Objetivo** – Pesquisar a ocorrência de genes de resistência a antibióticos em filés de tilápia comercializados em supermercados do município de São Paulo – SP. **Material e Métodos** – Foram coletadas 10 amostras de filé de tilápia e realizada a pesquisa de coliformes termotolerantes como indicadores das condições higiênico-sanitárias do alimento. Em seguida, as amostras foram inoculadas em Caldo Lúria 0,5% e o DNA total das bactérias cultivadas nesse meio foi extraído por meio de choque térmico para pesquisa de genes de resistência aos antibióticos β -lactâmicos e tetraciclina pela PCR. Os genes identificados pela PCR foram confirmados pelo sequenciamento. **Resultados** – Em 100% das amostras analisadas o resultado para coliformes termotolerantes foi $< 3 \text{ NMP.g}^{-1}$. Na pesquisa de genes de resistência a β -lactâmicos, o gene *bla*_{OXY-5} foi detectado em 90% das amostras, *bla*_{TEM-1b} em 20%, *bla*_{LEN-16} em 10%, *bla*_{SHV-28} em 10%, *bla*_{KPC-2} em 20%, *bla*_{MOX-6} em 10% e *bla*_{CphA} em 60%. Os genes de resistência a tetraciclina identificados foram *tetB* em 10% das amostras, *tetC* em 20%, *tetD* em 80%, *tetE* em 50%, *tetG* em 60%, *tetO* e *tetS* em 10% cada e *tetW* em 20%. **Conclusões** – Em 90% das amostras foi identificada a presença de genes de resistência aos antibióticos β -lactâmicos e tetraciclina, demonstrando uma grande circulação de resistência bacteriana na aquicultura e verificando a necessidade de legislação e fiscalização mais atuantes no controle do uso de antibióticos na aquicultura.

Descritores: resistência a antibióticos; genes de resistência; β -lactâmicos; tetraciclina; tilápia; aquicultura.

ABSTRACT

Bordon VF. Search for antimicrobial resistance genes in tilapia fillets commercialized in São Paulo city – SP [dissertation]. São Paulo (BR): Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2014.

Introduction – The excessive use of antimicrobials in human medicine, veterinary medicine and agriculture has resulted in the emergence of bacterial resistance. This phenomenon creates public health problems that may result in the re-emergence of infectious diseases. The use of antibiotics, mainly prophylactically, has become a practice in aquaculture, including Brazil, where the legislation for the use of veterinary drugs is inefficient. Furthermore, there is evidence of transmission of resistant organisms to humans through consumption of animal products, especially when the antibiotics have been administered during the raising and production of these animals. **Objective** – To search for the occurrence of antibiotics resistance genes in tilapia fillets commercialized in supermarkets in São Paulo city - SP. **Material and Methods** – 10 tilapia fillet samples were collected and submitted to fecal coliform search as an indicator of the sanitary conditions of the food. Then, the samples were inoculated into Luria broth 0,5% and the total DNA was extracted from growing bacteria by thermal shock for the search of resistance genes to β -lactam and tetracyclines antibiotics by PCR. The genes identified by PCR were confirmed by sequencing. **Results** – In 100% of samples the result was $< 3 \text{ NMP.g}^{-1}$ for fecal coliform organisms. In the study of β -lactam resistance genes, *bla*_{OXY-5} gene was detected in 90% of samples, *bla*_{TEM-1b} in 20%, *bla*_{LEN-16} in 10%, *bla*_{SHV-28} in 10%, *bla*_{KPC-2} in 20%, *bla*_{MOX-6} in 10% and *bla*_{CphA} in 60%. The tetracyclines resistance genes identified were *tetB* in 10% of samples, *tetC* in 20%, *tetD* in 80%, *tetE* in 50%, *tetG* in 60%, *tetO* and *tetS* in 10% each and *tetW* in 20%. **Conclusions** – 90% of the samples showed the presence of β -lactam and tetracyclines resistance genes, demonstrating a high circulation of bacterial resistance in aquaculture and verifying the need for more active law and surveillance in controlling the use of antibiotics in aquaculture.

Descriptors: antibiotic resistance; resistance genes; β -lactam; tetracyclines; tilapia; aquaculture.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Antimicrobianos.....	01
1.2. Resistência a antimicrobianos.....	02
1.3. Compostos β -lactâmicos.....	04
1.3.1. Mecanismo de resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos.....	05
1.3.2. β -lactamases.....	05
1.4. Tetraciclinas.....	11
1.4.1. Mecanismo de resistência às tetraciclinas.....	12
1.5. Aquicultura.....	13
1.5.1. Antibióticos na aquicultura.....	14
1.5.2. Resistência a antibióticos na aquicultura.....	18
1.5.3. Tilapicultura.....	20
1.5.4. Qualidade higiênico-sanitária do pescado.....	21
2. OBJETIVOS.....	24
2.1. Geral.....	24
2.2. Específicos.....	24
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1. Pesquisa de coliformes termotolerantes.....	25
3.2. Cultura e extração do DNA total.....	26
3.3. Reação em Cadeia pela Polimerase – PCR.....	26
3.4. Eletroforese.....	27
3.5. Sequenciamento.....	27
4. RESULTADOS.....	31
4.1. Pesquisa de coliformes termotolerantes.....	31
4.2. Detecção de genes de resistência a β -lactâmicos.....	31
4.2.1. Identificação dos grupos ESBL pela PCR.....	31
4.2.2. Identificação dos grupos KPC pela PCR.....	34

4.2.3.	Identificação dos grupos AmpC pela PCR.....	38
4.2.4.	Identificação dos grupos MBL pela PCR.....	38
4.3.	Detecção de genes de resistência a tetraciclinas.....	38
5.	DISCUSSÃO.....	41
5.1.	Qualidade higiênico-sanitária das amostras.....	41
5.2.	Genes de resistência.....	42
5.2.1.	Genes de resistência a β -lactâmicos.....	43
5.2.1.1.	Grupos ESBL.....	43
5.2.1.2.	Grupos KPC.....	45
5.2.1.3.	Grupos AmpC.....	46
5.2.1.4.	Grupos MBL.....	46
5.2.2.	Genes de resistência a tetraciclinas.....	48
5.3.	Considerações finais.....	50
6.	CONCLUSÕES.....	53
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

Lista de Tabelas

Tabela 1-	Sequência de iniciadores, condições de PCR e tamanho do fragmento obtido para a detecção de genes codificadores de resistência aos β -lactâmicos e tetraciclinas.....	28
Tabela 2-	Distribuição das amostras de filé de tilápia analisadas no estudo segundo a marca, tipo de refrigeração, local de produção, resultado da pesquisa de coliformes termotolerantes e presença de genes de resistência aos antibióticos β -lactâmicos e tetraciclinas nas 10 amostras analisadas.....	40

Lista de Figuras

- Figura 1-** Indicação geográfica dos principais países que realizaram estudos sobre resistência a antibióticos na aquicultura..... 20
- Figura 2-** Alinhamento das sequências de nucleotídeos de SHV-28, SHV amostra 5 (este estudo) e SHV-1. Gaps introduzidos para maximizar o alinhamento são indicados por traços..... 32
- Figura 3-** Alinhamento das sequências de aminoácidos de gene KPC amplificado da cepa 26 (Amostra 9) e cepa 29 (Amostra 10) e as sequências dos genes KPC-1 a KPC-17 disponíveis no banco de dados Lahey Clinic e GenBank. Gaps introduzidos para maximizar o alinhamento são indicados por traços..... 35

1. INTRODUÇÃO

1.1. Antimicrobianos

A história dos antimicrobianos teve seu início em 1921, quando Alexander Fleming, bacteriologista escocês, inoculou em placas de ágar sua própria secreção nasal para analisar sua flora bacteriana (STEFFEE, 1992). Ao realizar o estudo, observou que, não havia crescimento de colônias, sugerindo a existência de substância na secreção responsável por inibir o crescimento bacteriano. Essa substância foi denominada lisozima, enzima que age na parede celular de micro-organismos resultando na lise de bactérias (KONG et al., 2009).

Passados alguns anos, em 1928, Fleming estudou a relação entre colônias de *Staphylococcus* e sua virulência e observou que uma de suas culturas havia sido contaminada por um bolor, e que ao redor das colônias não havia crescimento bacteriano. Desta forma, verificou que o fungo produzia uma substância com efeito bactericida, denominada penicilina (KONG et al., 2009).

A penicilina foi o primeiro antibiótico introduzido na clínica médica e sua utilização como agente terapêutico no tratamento de infecções aconteceu efetivamente na década de 1940 (KONG et al., 2009).

Nos últimos 70 anos, houve melhoria na saúde da população mundial e principalmente no tratamento de doenças infecciosas e, conseqüentemente, uma redução significativa na morbidade e mortalidade associadas a essas doenças. Isto foi resultado da melhor compreensão dos mecanismos biológicos dessas doenças, e, sobretudo do rápido desenvolvimento de novos tratamentos por meio da utilização de antimicrobianos (ALANIS, 2005). A eficiência desses medicamentos foi tão expressiva, que entre os anos 1900 e 1980, nos Estados Unidos, a mortalidade por doenças infecciosas foi reduzida de 797 para 36 por 100.000 habitantes (ARMSTRONG et al., 1999).

Inicialmente, o acesso aos antibióticos sistêmicos (sulfonamidas e penicilinas) não era disponível para a população em geral. Esses medicamentos eram escassos, caros e reservados para tratamento de militares durante a Segunda Guerra Mundial (LERNER, 2004). Com o passar dos anos, a fabricação de antimicrobianos foi

simplificada e surgiram novas formulações, aumentando o acesso aos antibióticos e sua utilização (ALANIS, 2005). A disponibilidade e o sucesso dos antibióticos resultaram no aumento da confiança dos médicos em relação ao tratamento de doenças infecciosas, porém o aparecimento de surtos e epidemias mediados por micro-organismos resistentes a diversas classes de antimicrobianos resultaram na reavaliação dessa confiança (KONG et al., 2009).

1.2. Resistência a antimicrobianos

Do ponto de vista clínico, a resistência é definida como um estado em que, o paciente infectado por um patógeno, recebe tratamento adequado, com antibióticos específicos para esta finalidade, porém, a cura não é alcançada, ou seja, os micro-organismos resistem à ação dos medicamentos. Sob o aspecto microbiológico, a resistência ocorre quando um organismo apresenta um mecanismo de resistência que o torna menos susceptível à ação do antimicrobiano, se comparado a outras células bacterianas da mesma espécie (CANTÓN e MOROSINI, 2011).

Os primeiros casos de resistência a antimicrobianos ocorreram no final de 1930 e na década de 1940, logo após a administração das primeiras classes de antibióticos, as sulfonamidas e penicilinas (ALANIS, 2005). A partir desse período, pesquisas demonstraram que milhões de toneladas de antibióticos foram utilizados de forma generalizada na medicina, agricultura e pecuária, contribuindo para o fenômeno da resistência (ANDERSSON e HUGHES, 2010).

O surgimento de genes resistentes em bactérias patogênicas é considerado um fenômeno recente, contudo há estudos demonstrando que esses genes podem ser encontrados em amostras provenientes de um período pré-antibiótico (D'COSTA et al., 2011; BHULLAR et al., 2012; ROLAIN, 2013).

A resistência a antibióticos pode ser natural (intrínseca) ou adquirida, podendo ser transmitida de forma vertical ou horizontal, ou seja, bactérias sensíveis podem adquirir resistência aos agentes antimicrobianos por herança genética ou adquirindo genes de resistência a partir de outras bactérias (SEFTON, 2002). A resistência intrínseca é um fenômeno natural desenvolvido por bactérias para aumentar suas chances de sobrevivência em ambientes altamente competitivos

(D'COSTA et al., 2011; ROLAIN, 2013). Apesar de a mutação dentro de uma determinada linhagem celular ter um papel importante na resistência, a disseminação horizontal de genes é decisiva para selecionar bactérias com múltiplas resistências (HAWKEY e JONES, 2009).

Na transferência vertical, os elementos de resistência são transmitidos entre uma geração e outra de bactérias, devido à elevada multiplicação de cepas (WOODFORD et al., 2011).

A transferência horizontal de genes é mecanismo essencial para que muitas espécies de bactérias expressem sua variabilidade genética. Assim, as bactérias se adaptam com muita facilidade a novos ambientes por meio da aquisição de elementos genéticos móveis como: transposons que são sequências móveis de DNA que se movem para posições diferentes dentro do genoma de uma única célula, plasmídeos que são moléculas circulares dupla-fita de DNA que se replicam independentemente do DNA cromossômico e integrons que são sistemas de captura de genes encontrados em plasmídeos e cromossomos, onde cassetes de genes podem ser incorporados, expressos e disseminados (SYKES, 2010).

Além disso, estudos recentes de metagenômica demonstraram que é possível a transferência horizontal de genes de resistência entre bactérias da flora intestinal e bactérias potencialmente patogênicas, aumentando a disseminação da resistência (SCOTT, 2002; KAZIMIERCZAK e SCOTT, 2007).

Os mecanismos mais comuns de transferência genética horizontal são: conjugação, transdução e transformação.

As bactérias podem adquirir novo material genético por meio de transferência de plasmídeo por conjugação; por meio de um bacteriófago por transdução; ou pela passagem direta de DNA livre por transformação. A informação codificada nesse material genético possibilita a bactéria desenvolver resistência por meio de três mecanismos biológicos de resistência: produção de uma ou mais enzimas que degradam quimicamente ou modificam o antimicrobiano, bombas de efluxo e alteração do sítio alvo do antibiótico na célula bacteriana (SHLAES et al., 1997; ALANIS, 2005).

A seleção de cepas resistentes demanda um custo adaptativo, que poderia ser considerado ao longo dos anos, como possível fator que levaria à redução do

aparecimento da resistência bacteriana. Contudo, a evolução genética atenua esse custo e desta forma, as chances de reverter o fenômeno da resistência a antibióticos são mínimas (ANDERSSON e HUGHES, 2011).

A resistência bacteriana é um problema de saúde pública mundial, gerado pela pressão seletiva que ocorre nas populações bacterianas devido ao uso exacerbado da antibioticoterapia. Esse processo implica na limitação das possibilidades terapêuticas, exigindo a necessidade de novos tratamentos, aumentando os índices de morbidade e mortalidade e gerando grandes encargos financeiros para o sistema de saúde.

Desta forma, medidas rígidas no controle de infecções e no uso de antibióticos, além de evitar que estes medicamentos sejam lançados diretamente no meio ambiente, podem contribuir para a diminuição do desenvolvimento da resistência e a consequente propagação de micro-organismos resistentes.

1.3. Compostos β -lactâmicos

Os antibióticos β -lactâmicos representam uma classe ampla e apresentam o anel β -lactâmico em sua estrutura molecular. A classificação desses antimicrobianos é definida pela semelhança estrutural. São conhecidas 4 classes de β -lactâmicos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenens e monobactâmicos.

O primeiro antibiótico β -lactâmico descoberto foi a penicilina em 1928. Com o decorrer dos anos, químicos desenvolveram novos antibióticos devido à estrutura química diversa das moléculas β -lactâmicas e sua potência antibacteriana. A estrutura desse antibiótico apresenta como núcleo central o anel β -lactâmico, ligado a um anel tiazolidínico, dando origem ao ácido penicilânico, originando diferentes tipos de penicilinas de acordo com a ligação a radicais variáveis (TAVARES, 2009; SOLER, 2011). Posteriormente, os β -lactâmicos semissintéticos foram criados (KONG et al., 2009). Embora a geração de compostos semissintéticos seja promissora, fontes naturais continuaram sendo exploradas.

A cefalosporina foi descoberta por ABRAHAM e NEWTON (1961) por meio do isolamento da cefalosporina C a partir de uma cepa de *Cephalosporium acremonium*. Em sua estrutura, como núcleo central, apresenta um grupo cefém

formado por um anel β -lactâmico ligado a um anel hexacíclico não saturado (TAVARES, 2009; SOLER, 2011).

Os carbapenems foram isolados a partir de *Streptomyces* spp. (NAGARAJAN et al., 1971) e apresentam um anel pentagonal não saturado ligado ao anel β -lactâmico (TAVARES, 2009; SOLER, 2011).

Os monobactâmicos foram isolados de *Pseudomonas acidophila* (IMADA et al., 1981), *Chromobacterium violaceum* (SYKES et al., 1981) e *Agrobacterium radiobacter* (WELL et al., 1982) e apresentam em sua estrutura um anel monocíclico (TAVARES, 2009; SOLER, 2011).

O mecanismo de ação dos antimicrobianos β -lactâmicos resulta na inibição da síntese da parede celular bacteriana. O processo ocorre por meio da passagem de β -lactâmicos pelas porinas presentes na membrana externa e em seguida, ligam-se e inibem as proteínas ligadoras de penicilina (PLP) ou *penicillin-binding proteins* (PBP) responsáveis pela síntese da parede bacteriana, interferindo na síntese do peptidoglicano por meio do bloqueio da transpeptidação e resultando na morte da bactéria (SYKES, 2010).

1.3.1. Mecanismo de resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos

Atualmente foram descritos 4 tipos de mecanismos de resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos: degradação enzimática mediada por β -lactamases, alteração da permeabilidade da membrana, modificação das proteínas bacterianas que constituem o alvo da ação antimicrobiana (PBPs) e desenvolvimento de sistemas de efluxo. As β -lactamases hidrolisam o anel β -lactâmico e constituem o mecanismo de resistência mais comum e eficiente aos antibióticos β -lactâmicos (SYKES, 2010).

1.3.2. β -lactamases

Os β -lactâmicos foram os primeiros antibióticos descobertos, de tal modo que, a resistência a eles também foi a primeira a ser compreendida. A produção de β -lactamases é a forma mais comum de resistência bacteriana a esse composto, pois estas enzimas hidrolisam o anel β -lactâmico por hidroxilação irreversível da ligação

amida e desta forma, impedem a ligação do anel às PBPs, possibilitando a síntese da parede celular bacteriana (KONG et al., 2009).

As β -lactamases correspondem ao mecanismo de resistência mais importante entre as bactérias gram-negativas. Devido à descoberta de novas técnicas moleculares, houve aumento no número de enzimas caracterizadas de acordo com as sequências de aminoácidos e atividade hidrolítica (BUSH, 2010). A diversidade de enzimas β -lactamases, no que diz respeito à sua estrutura e perfil de substrato, criou vários esquemas de classificação propostos para categorizá-las desde os anos 1960.

Estas classificações envolvem três abordagens principais: a primeira e mais antiga é de 1973, quando RICHMOND e SYKES (1973) propuseram um sistema de classificação no qual cinco classes de β -lactamases de organismos gram-negativos foram descritas com base no perfil do substrato e na localização do gene codificador das β -lactamases. A segunda proposta foi realizada por AMBLER (1980), chamada de classificação molecular, a partir da sequência de nucleotídeos e aminoácidos, definindo quatro classes (A, B, C e D). As classes A, C, e D são serinas β -lactamases e possuem um aminoácido serina no sítio ativo da enzima, enquanto a classe B ou metalo- β -lactamases utiliza zinco para sua ação na quebra da ligação amida no anel β -lactâmico. O sistema de classificação mais recente e atualmente mais utilizado foi proposto por BUSH, JACOBY e MEDEIROS em 1995 e posteriormente revisado e atualizado por BUSH e JACOBY (2010). Esse esquema baseia-se em características bioquímicas e funcionais da enzima que incluem o perfil de substratos e seus inibidores (MITSUHASHI e INOUE, 1981; DROPA, 2013).

A classificação quanto à localização do gene codificador da β -lactamase (plasmidial ou cromossômico) não é mais utilizada com frequência, pois os genes *bla* cromossômicos podem ser integrados em plasmídeos ou transposons, como também o inverso está sendo cada vez mais descrito (TOLEMAN et al., 2006; COELHO et al., 2010; CANTÓN et al., 2012).

Os grupos de β -lactamases de maior importância na disseminação da resistência são: ESBL (β -lactamases de espectro estendido), KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemases), MBL (metalo- β -lactamases) e AmpC- β -lactamases.

ESBL - β -lactamases de espectro estendido

As ESBL são enzimas que contêm em seu sítio ativo um aminoácido serina e são capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas de primeira, segunda, terceira e quarta gerações (como cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima ou cefepima) e monobactâmicos (aztreonam). Elas são inibidas pelo ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam (PATERSON e BONOMO, 2005; OLIVEIRA et al., 2009; CANTÓN et al., 2012).

As ESBL estão disseminadas em diversas espécies bacterianas, pois são frequentemente codificadas por genes presentes em plasmídeos e são identificadas em patógenos clinicamente importantes como os da família *Enterobacteriaceae* (HAEGGMAN et al., 2004; JACOBY e MUNOZ-PRICE, 2005; TOLENTINO, 2009).

Os principais produtores dessa enzima são *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*, sendo o trato intestinal seu principal reservatório (HOSOGLU et al., 2007). As ESBL são codificadas por genes que podem estar localizados em plasmídeos e derivam principalmente de enzimas dos grupos: TEM, SHV e CTX-M (BONNET, 2004; BALSALOBRE, 2009; LIVERMORE, 2012). A maioria das ESBL evoluiu a partir de mutações genéticas em β -lactamases clássicas (TEM-1, TEM-2 e SHV-1), resultando na substituição do aminoácido terminal e do sítio ativo (PATERSON e BONOMO, 2005).

A família TEM foi descrita pela primeira vez nos anos 80, inicialmente com TEM-1 e TEM-2 e em 1987, a TEM-3, a primeira ESBL tipo TEM, foi detectada em amostras clínicas de *Klebsiella pneumoniae* (TOLENTINO, 2009). Essa família é constituída pelas β -lactamases mais amplamente distribuídas, que catalisam a hidrólise de ampicilina e antimicrobianos relacionados, tais como piperacilina e carbenicilina (HAWKEY, 2008).

A ESBL tipo SHV foi identificada primeiramente em amostras de *Klebsiella pneumoniae* e *Serratia marcescens* e denominada como SHV-2 (TOLENTINO, 2009).

O grupo CTX-M foi descrito pela primeira vez em 1989, na Alemanha, em amostras de *Escherichia coli* e foi denominada CTX-M-1 (PITOUT et al., 2004; TOLENTINO, 2009). As enzimas da família CTX-M são divididas em cinco grupos

com base na sequência de aminoácidos sendo: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 e CTX-M-25 (PITOUT et al., 2004).

As famílias TEM e SHV foram as ESBL mais predominantes nos anos 80 e 90, principalmente relacionadas a surtos em hospitais envolvendo *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*. Apesar de a descoberta da CTX-M ocorrer também nos anos 80, a dispersão acelerada desse grupo foi verificada apenas nos anos 2000, em ambiente hospitalar e fora dele, principalmente em *Escherichia coli* (PATERSON e BONOMO, 2005; CANTÓN e COQUE, 2006; CANTÓN et al., 2012).

KPC - Klebsiella pneumoniae carbapenemases

O grupo de enzimas *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC) possui a capacidade de inativar praticamente todos os antibióticos β -lactâmicos, incluindo carbapenems. Esse grupo de enzimas é inibido pelo ácido clavulânico, mas não por EDTA (ácido etilenodiaminotetracético).

No início, as enzimas KPC foram descritas em *K. pneumoniae*, porém subsequentemente foram identificadas em outros membros da família *Enterobacteriaceae* e em *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp. (QUEENAN e BUSH, 2007; WALTHER-RASMUSSEN e HOIBY, 2007).

Atualmente o grupo de enzimas KPC está disseminado mundialmente, sendo isolado em laboratórios de microbiologia de institutos de saúde em diversos países (PICÃO et al., 2013).

A rápida disseminação entre diferentes espécies bacterianas gram-negativas se deve, provavelmente, à localização dos genes *bla*_{KPC} em plasmídeos transmissíveis e sua associação a transposons (NAAS et al., 2008; SAMUELSEN et al., 2009; WALSH, 2010; PICÃO et al., 2013). Atualmente já foram descritas 19 variantes (KPC-2 a KPC-20) de acordo com o site www.lahey.org/studies (BUSH e JACOBY, 2014).

MBL – metalo-β-lactamases

As metalo-β-lactamases (MBL) são carbapenemases que apresentam no seu sítio ativo um átomo de zinco e hidrolisam quase todos os β-lactâmicos comercialmente disponíveis, sendo a única exceção o monobactâmico aztreonam. São inibidas pelo EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) ou compostos derivados do ácido tiolático (ex.: ácido 2-mercaptopropiônico). As MBL podem ser codificadas por genes cromossômicos ou plasmídeos (WALSH et al., 2005).

Os genes que codificam as MBL podem estar inseridos em estruturas genéticas que proporcionam mobilidade e devido a isso, essas enzimas podem ser nomeadas MBL móveis ou MBL adquiridas (MENDES et al., 2006). Atualmente, são conhecidas nove subclasses de MBL adquiridas e geralmente são nomeadas conforme a localização geográfica onde foram descobertas: Imipenemase (IMP) (OSANO et al., 1994), Verona imipenemase (VIM) (LAURETTI et al., 1999), São Paulo MBL (SPM-1) (TOLEMAN et al., 2002), German imipenemase (GIM-1) (CASTANHEIRA et al., 2004), Seoul imipenemase (SIM-1) (LEE et al., 2005), Australian imipenemase (AIM) (YONG et al., 2007), Kyorin University Hospital MBL (KHM) (SEKIGUCHI et al., 2008), Dutch imipenemase (DIM-1) (POIREL et al., 2009) e New Delhi MBL (NDM-1) (YONG et al., 2009).

Os genes desse grupo de enzimas são comumente transportados por elementos móveis e estão localizados em cassetes de genes, inseridos em integrons de classe 1. Estes podem ser encontrados em transposons, aumentando as chances de disseminação dos integrons e consequentemente gerando uma maior dispersão de genes entre os grupos de bactérias (SYKES, 2010).

As MBL são carbapenemases versáteis entre as β-lactamases, com espectro de ação único quando comparado às outras enzimas que hidrolisam β-lactâmicos e com grande capacidade de disseminação dos elementos genéticos móveis, pois pertencem a esse grupo diferentes enzimas produzidas por diversas espécies bacterianas (MENDES et al., 2006; SCHEFFER, 2008).

As enzimas IMP e VIM são as MBL mais comumente descritas em todo mundo. O gene *bla_{IMP}* frequentemente é encontrado em cassetes gênicos em integrons de classe 1 codificados por plasmídeos, embora também possa ser encontrado em integron de classe 3. Estudos demonstraram que o cassete do gene

bla_{IMP} é transferido entre diversas bactérias gram-negativas (ARAKAWA et al., 2000; WALSH et al., 2005; MENDES et al., 2006; MOURA, 2010).

O gene *bla_{VIM}* normalmente é carregado por um cassete gênico inserido em um integron de classe 1 (FRANCESCHINI et al., 2000; WALSH et al., 2005; SCHEFFER, 2008; MOURA, 2010). Esse gene pode ter sua localização cromossômica ou plasmidial (MENDES et al., 2006).

A enzima SPM é mais comumente encontrada no Brasil. O gene *bla_{SPM-1}* está associado ao elemento CR (região comum) que facilita a mobilidade desse gene e faz parte do genoma móvel de um plasmídeo de quase 180Kb (SCHEFFER, 2008; MOURA, 2010).

As MBL são divididas em 3 subgrupos, B1, B2 e B3, sendo a dependência de zinco o que difere esses subgrupos (BALSALOBRE, 2009). A enzima CphA pertence ao subgrupo B2 das MBL e é cromossomicamente codificada pela *Aeromonas hydrophila* e também por outras espécies do gênero *Aeromonas* (WALSH et al., 2005; BALSALOBRE, 2009).

AmpC- β -lactamases

As β -lactamases tipo AmpC são cefalosporinases de importância clínica que possuem um aminoácido serina no seu sítio ativo e são enzimas produzidas por genes de localização cromossômica ou plasmidial.

Conferem resistência às cefalosporinas de terceira geração, às cefamicinas e aos inibidores das β -lactamases (CHEN et al., 2007; JACOBY, 2009; TOLENTINO, 2009). Esta resistência é menos comum do que a conferida pelas enzimas ESBL na maior parte do mundo e sua detecção é mais difícil, contudo, o espectro de ação é maior (JACOBY, 2009).

Em bactérias do gênero *Aeromonas* a produção de enzima AmpC é constitutiva e cromossômica, porém nesse gênero já foi descrita a presença de genes inseridos em plasmídeos como *bla_{MOX-2}* e *bla_{MOX-4}*, os quais podem ser transferidos horizontalmente para outras bactérias (RASKINE et al., 2002; YE et al., 2010).

Atualmente já foram descritos nove grupos enzimáticos: CMY, MIR, MOX, LAT, FOX, DHA, ACT, ACC e CFE (JACOBY, 2009; TOLENTINO, 2009), sendo

9 variantes da enzima MOX e 121 variantes da enzima CMY (BUSH e JACOBY, 2014).

1.4. Tetraciclina

As tetraciclina são uma classe de antibióticos de ação de amplo espectro e apresentam em sua estrutura molecular núcleos tetracíclicos lineares com 4 anéis. As tetraciclina foram descobertas na década de 1940 a partir da fermentação natural de bactérias *Streptomyces* spp. Entre 1950 e 1970 vários membros da família das tetraciclina foram desenvolvidos como produtos naturais ou semissintéticos (CHOPRA e ROBERTS, 2001).

Os principais representantes dessa classe de antimicrobianos são: clortetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina, dimetilclortetraciclina, rolitetraciclina, limeciclina, clomociclina, metaciclina, doxiciclina, minociclina, tertiari butilglicilamidominociclina e glicilciclina (CHOPRA e ROBERTS, 2001; ROBERTS, 2005).

A minociclina foi introduzida nos Estados Unidos em 1972, e longo período se passou até a descoberta de uma nova geração de tetraciclina, as glicilciclina (tigeciclina), que foram desenvolvidas na tentativa de combater a resistência antimicrobiana (ROBERTS, 2005).

As tetraciclina são utilizadas de forma terapêutica, profilática ou como promotores de crescimento em animais, podendo ser administradas isoladamente ou em combinação com outros antibióticos. Devido ao seu amplo espectro de ação, são administradas para o tratamento de doenças causadas por bactérias gram-positivas, gram-negativas, aeróbias e anaeróbias, espiroquetas, riquetsias, micoplasma, clamídias e protozoários (ROBERTS, 2003).

A tetraciclina é considerada o antibiótico mais frequentemente utilizado em medicina veterinária e na aquicultura em todo o mundo (MIRANDA, 2012) de forma profilática, como promotor de crescimento e no tratamento de doenças.

O mecanismo de ação consiste na inibição da síntese de proteína bacteriana por meio da ligação das tetraciclina a um sítio na subunidade 30S do ribossomo bacteriano, bloqueando a ligação do aminoacil-t-RNA no sítio A do ribossomo a

adição de novos aminoácidos à cadeia peptídica. A ligação com o ribossomo é reversível determinando a ação bacteriostática desse antibiótico (SHLAES, 2006; THAKER et al., 2010).

1.4.1. Mecanismo de resistência às tetraciclinas

A resistência às tetraciclinas teve seu início na década de 1950, contudo a descoberta dos primeiros genes de resistência foi na década de 1970 e por isso é considerado um evento relativamente novo. A resistência surgiu com a administração das tetraciclinas no controle de doenças na medicina humana, na medicina veterinária e na agricultura (THAKER et al., 2010). A utilização como promotor de crescimento na veterinária é considerada um grande risco para o desenvolvimento de resistência, pois são administradas doses em níveis subterapêuticos (CHOPRA e ROBERTS, 2001). Além disso, há evidências do uso de antibióticos em animais de produção e o subsequente desenvolvimento de infecções em humanos, indicando a possibilidade de transferência de bactérias resistentes de animais para o homem (FEY et al., 2000; ROLAIN, 2013).

Os 3 principais mecanismos de resistência são: bombas de efluxo, proteção ribossomal e inativação enzimática.

No mecanismo de efluxo, proteínas codificadas por genes *tet*, exportam a tetraciclina para fora da célula, resultando em diminuição do acesso das tetraciclinas ao ribossomo, devido à redução da concentração intracelular do antibiótico a um nível abaixo do necessário para a sua atividade. Esses genes são encontrados em bactérias gram-positivas e gram-negativas, conferindo resistência à tetraciclina, porém não à minociclina ou glicilciclinas (CHOPRA e ROBERTS, 2001).

A proteção ribossomal ocorre por meio de proteínas citoplasmáticas, codificadas por genes *tet*, que impedem a ligação das tetraciclinas aos ribossomos e conferem resistência à doxiciclina e minociclina (ROBERTS, 2005).

O terceiro mecanismo de resistência é a alteração enzimática da tetraciclina que ocorre na presença de oxigênio e NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) por meio do gene *tetX* (CHOPRA e ROBERTS, 2001). Além do *tetX*, os

genes *tet34* e *tet37* também são considerados associados a inativação enzimática das tetraciclinas (THAKER et al., 2010).

A resistência pode ser cromossômica, porém a maioria dos genes *tet* está associado a elementos genéticos móveis, os quais conferem aos genes a capacidade de se disseminar entre as espécies (ROBERTS, 2005).

1.5. Aquicultura

O Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA) define aquicultura como o cultivo de organismos cujo ciclo de vida, em condições naturais, se desenvolve total ou parcialmente em meio aquático. Esta atividade abrange várias especialidades, como é o caso da piscicultura, que compreende a criação de peixes em água doce ou marinha (MPA, 2012).

A aquicultura é prática exercida há milhares de anos pelo ser humano. Existem registros que chineses tinham o conhecimento dessas técnicas há muitos séculos e que inclusive, os egípcios criavam tilápias há mais quatro mil anos (RODRIGUES, 2012).

O desenvolvimento da aquicultura como fonte de alimento vem crescendo e se expandindo nos últimos anos em todo o mundo e especialmente no Brasil. A safra global de peixes selvagens, ou seja, aqueles que estão livres no ambiente, estagnou em cerca de 90 milhões de toneladas por ano, e não é esperado que haja crescimento desse número, visto que existe aumento constante da pesca predatória. Ao mesmo tempo, existe aumento constante da procura de peixe, o que levou ao crescimento da aquicultura mundial (FAO, 2006).

Devido ao contínuo desenvolvimento na produção aquícola e a facilidade de distribuição do produto, o fornecimento tem crescido significativamente nas últimas cinco décadas no mundo, com taxa média de crescimento de 3,2% ao ano no período de 1961 a 2009 (FAO, 2012).

O consumo per capita de peixes como fonte de alimento aumentou em média de 9,9 kg (peso vivo) em 1960 para 18,4 kg em 2009. Em 2010, houve crescimento no consumo de 18,6 kg e, neste mesmo ano, a produção mundial de peixes de aquicultura foi 59.800.000 toneladas, sendo que o Brasil foi o terceiro maior produtor

do continente americano, contribuindo com 480.000 toneladas. Enquanto a América do Norte deixou de expandir suas criações aquícolas nos últimos anos, a América do Sul demonstrou forte crescimento, particularmente no Brasil e no Peru (FAO, 2012).

Estima-se que em 2015 a aquicultura participe com aproximadamente 39% da produção mundial de frutos do mar, visto que a produção aquícola mais que triplicou nos últimos 15 anos (SAPKOTA et al., 2008; GRANADOS-CHINCHILLA et al., 2013).

A aquicultura evoluiu também em termos de inovação tecnológica e se adaptou para atender aos novos requisitos do mercado consumidor. Contudo, na tentativa de controlar as doenças infecciosas que acometem o pescado, os criadores utilizam diversos medicamentos, em especial antibióticos, para garantir uma produção eficaz.

1.5.1. Antibióticos na aquicultura

O uso indiscriminado de antibióticos nas criações geram consequências graves para a saúde humana. Nos últimos anos foi demonstrada cientificamente a existência de correlação entre o uso de antibióticos na criação de peixes, o aparecimento de resistência nos animais que foram medicados e a transferência dessa resistência a humanos por meio da cadeia alimentar (ANGULO et al., 2004).

Além disso, estudos mostram que elementos genéticos móveis, como plasmídeos, contendo múltiplos genes de resistência antimicrobiana, podem ser transferidos entre patógenos bacterianos de peixes, seres humanos e outros animais, por meio do consumo de produtos da pesca inadequadamente preparados ou por contaminação cruzada de outros alimentos por bactérias intestinais de peixes, sugerindo a difusão de genes de resistência de agentes patogênicos do peixe para patógenos humanos (SØRUM, 1998; PETERSEN e DALSGAARD, 2003; DASKALOV, 2006; JACOBS e CHENIA, 2007).

Há constante preocupação no que diz respeito ao uso de antimicrobianos na produção de alimentos de origem animal, devido ao surgimento de micro-organismos resistentes a antibióticos utilizados na medicina humana. Muitos destes são utilizados nas criações de animais e também pertencem a classes de antibióticos que são

administrados no tratamento de infecções bacterianas em humanos. (AKINBOWALE et al., 2006; ROLAIN, 2013). Com isso, alguns países, como Dinamarca, Suécia, Noruega, Canadá, EUA e Japão, implementaram programas de vigilância para o controle do uso de antibióticos em animais produtores de alimentos, alguns países têm a aquicultura incluída nesses programas (AKINBOWALE et al., 2007b).

No Brasil, há poucas informações sobre o uso de antibióticos, suas concentrações e como devem ser administrados na aquicultura. Os antimicrobianos são indiscriminadamente utilizados e lançados em grandes quantidades nos tanques de criação. Informações sobre o monitoramento da concentração e do impacto ambiental, especialmente em relação à toxicidade aguda, risco de intoxicação das criações e possíveis efeitos adversos são escassas (CARRASCHI, 2010). A regulamentação do uso de antimicrobianos na aquicultura é ineficiente no Brasil e na maioria dos países em desenvolvimento (CARNEIRO et al., 2007).

Embora a produção aquícola esteja crescendo rapidamente, a prevenção e o tratamento de doenças estão longe de ser padronizados ou regulamentados. Os medicamentos utilizados nas criações normalmente permanecem no meio ambiente e podem sair das instalações de produção em canais abertos ou por sistemas de esgoto, podendo interagir com outros contaminantes ambientais (BENBROOK, 2002). Além dos medicamentos, os genes de resistência também persistem em áreas de criação de peixes, podendo permanecer no ambiente, mesmo depois de vários anos sem o uso de antibióticos (TAMMINEN et al., 2011). A água é considerada um dos ambientes mais propícios para selecionar populações bacterianas resistentes, facilitando a troca de genes de resistência, por meio de elementos genéticos móveis (CARNEIRO et al., 2007). Além disso, estudos têm demonstrado que a ocorrência de bactérias resistentes a antibióticos é comum na água e em sedimentos de aquicultura (MIRANDA et al., 2002; AKINBOWALE et al., 2007a; DANG et al., 2007; NONAKA et al., 2007).

O uso profilático de antibióticos na aquicultura, principalmente em produções intensivas, como camarões, trutas e salmões, resulta no aumento de bactérias resistentes em peixes e no meio ambiente (CABELLO, 2006).

A administração profilática na aquicultura está sendo discutida, pois estudos realizados no Canadá, Chile, Noruega e Reino Unido, em que foram feitas substituições dos medicamentos por melhoria nas condições de higiene e nos métodos de criação, demonstraram que esta prática é desnecessária e totalmente dispensável. Além disso, erros de manejo podem causar estresse animal, e favorecer o surgimento de infecções oportunistas e sua disseminação (CABELLO, 2004, BURRIDGE et al., 2008).

A forma como os medicamentos são administrados na aquicultura pode variar, mas costuma-se adicioná-los à ração ou em banhos de imersão. A utilização no alimento é mais conveniente, pois a quantidade necessária de antimicrobiano é menor que a utilizada diretamente na água e o resíduo gerado para o ambiente também é menor (FERREIRA et al., 2007).

Alguns países, com o intuito de controlar a quantidade de medicamento veterinário que está sendo utilizado, elaboraram cartilhas indicando quais antibióticos são permitidos para o uso na aquicultura.

A FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) elaborou, em 2005, uma ficha técnica listando os antibióticos autorizados na aquicultura. Os produtos aprovados são: oxitetraciclina, florfenicol, sarafloxacin, eritromicina e sulfonamidas (FAO, 2005).

Nos Estados Unidos, há cinco medicamentos considerados legais para uso na aquicultura aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*). Destes apenas três são antimicrobianos: oxitetraciclina HCl, sulfamerazina e combinação contendo sulfadimetoxina e ormetoprim (BENBROOK, 2002).

No Reino Unido, os antimicrobianos autorizados são: oxitetraciclina, florfenicol, trihidrato de amoxicilina e trimetoprim/sulfadiazina (BURRIDGE et al., 2008).

No Canadá estão registrados para o tratamento do pescado: oxitetraciclina, trimetoprim/sulfadiazina, sulfadimetoxina/ormetoprim e florfenicol (BURRIDGE et al., 2008).

Estes dados demonstram que ainda existe divergência entre os países com relação aos antibióticos que podem ser utilizados na aquicultura. Com o objetivo de verificar os antimicrobianos que são administrados na aquicultura mundial, um

estudo realizado no Canadá pesquisou por meio de questionários a utilização e a resistência de antibióticos. Profissionais de diversas partes do mundo responderam que os antibióticos atualmente utilizados nas criações de tilápia são: tetraciclina, sulfonamidas potenciadas, quinolonas e sulfonamidas. Contudo, foi observada resistência aos seguintes antimicrobianos: tetraciclina, nitrofuranos, penicilinas, fenicóis, sulfonamidas potenciadas, quinolonas e sulfonamidas, sendo que 40% dos resultados correspondem a penicilinas (TUSEVLJAK et al., 2013).

No Brasil não existe uma lista dos antimicrobianos recomendados para a aquicultura, porém há dois programas para fiscalizar o uso de medicamentos nos produtos de origem animal: PNCRC/Animal (Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal) e PAMVet (Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal).

O PNCRC/Animal é administrado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), destinado ao controle de agrotóxicos e medicamentos veterinários em carnes (bovina, aves, suína e equina), leite, mel, ovos, pescado e avestruz (MAPA, 2014).

Na área da aquicultura, o objetivo do PNCRC é monitorar a exposição do pescado e dos produtos da pesca a contaminantes ambientais, aos resíduos de medicamentos veterinários e agroquímicos, conforme Anexo V da Instrução Normativa nº 42, de 20 de dezembro de 1999 (BRASIL, 1999). Os antibióticos listados como objeto de pesquisa do subprograma de monitoramento de controle de resíduos e contaminantes em pescado para o exercício de 2014 são: nitrofurazona, furazolidona, furaltadona, nitrofurantoina, cloranfenicol, tianfenicol, florfenicol, sulfametazina, sulfatiazol, sulfadimetoxina, oxitetraciclina, clortetraciclina, tetraciclina, sulfametazina, sulfatiazol, sulfadimetoxina, enrofloxacina, ciprofloxacina, sarafloxacina, difloxacina, ácido nalidixico, ácido oxolínico e flumequina, conforme Quadro 7 do Anexo I da Instrução Normativa SDA nº 11, de 07 de maio de 2014 (BRASIL, 2014a). Nas análises realizadas em 2013, publicadas no Anexo I da Portaria SDA nº 60, de 07 de maio de 2014 (BRASIL, 2014b), todas as amostras de pescado de cultivo foram consideradas conformes para consumo no grupo de análise dos antimicrobianos.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) criou em 2002 por meio da Resolução RDC nº 253, de 16 de setembro de 2003 (BRASIL, 2003a), o PAMVet. A proposta de criação do programa surgiu a partir da preocupação com a presença de resíduos de medicamentos em alimentos de origem animal e a resistência bacteriana. O objetivo do programa é avaliar a exposição do consumidor aos resíduos de medicamentos veterinários por meio da ingestão de alimentos de origem animal adquiridos no comércio. Atualmente, as análises são realizadas apenas no leite, mas o pescado está na lista dos alimentos a serem avaliados (ANVISA, 2014).

1.5.2. Resistência a antibióticos na aquicultura

A resistência a antimicrobianos nas criações aquícolas é um fato e este fenômeno está sendo observado pelos produtores em várias partes do mundo, conforme apontado na Figura 1 e com isso, constantemente os medicamentos administrados precisam ser substituídos. A grande mobilidade de pessoas, alimentos e outros produtos pelo mundo, aumenta a probabilidade de disseminação de clones resistentes de bactérias (HAWKEY, 2008).

Estudos fenotípicos realizados em diferentes espécies de peixes demonstram a existência de resistência a antibióticos em diferentes países como, por exemplo, Austrália (AKINBOWALE et al., 2007b), Índia (DAS et al., 2009) e República Checa (ČÍŽEK et al., 2010).

Um estudo em que foi realizada a pesquisa fenotípica de resistência a antibióticos em bactérias do gênero *Aeromonas*, isoladas de tilápias (*Oreochromis niloticus niloticus*) congeladas no México, demonstrou que 100% das amostras analisadas apresentaram resistência aos antibióticos β -lactâmicos (ampicilina, carbenicilina e penicilina), com exceção de imipenem (10,3%) e piperacilina (19,4%), e 44% eram resistentes à tetraciclina (CASTRO-ESCARPULLI et al., 2003).

Na África do Sul foram isoladas bactérias do gênero *Aeromonas* de peixes de aquicultura, onde foi observada resistência a diversos antibióticos β -lactâmicos como: ampicilina (86,5%), oxacilina (100%), amoxicilina (89,2%) augmentin (86,5%), cefuroxima (8,1%) e ceftriaxona (2,7%), sendo a maioria dos isolados

obtidos de tilápias (*Oreochromis mossambicus*). Também foram observados 78,3% de resistência à tetraciclina (JACOBS e CHENIA, 2007).

No município de Lavras (MG), um estudo realizado com tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) demonstrou, por meio de testes fenotípicos (antibiograma), que havia resistência aos antibióticos β -lactâmicos, principalmente ampicilina em filés frescos e congelados. Nas amostras de conteúdo intestinal, superfície de peixe e ração, os autores observaram valores significativos de isolados resistentes à tetraciclina. Contudo, os autores afirmam que os antibióticos testados não eram administrados na criação estudada, sugerindo que a resistência poderia ser promovida por outros fatores além do uso direto de antibióticos no ambiente aquático (LIMA et al., 2006).

Outro trabalho, também realizado em Lavras (MG) verificou a presença de bactérias resistentes a antimicrobianos em 3 sistemas de cultivo de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) sendo que a ampicilina (β -lactâmico) e a eritromicina (macrolídeo) apresentaram as maiores porcentagens (67 a 85%) e cerca de 50% das amostras foram resistentes à tetraciclina. Os tanques de cultivo não receberam previamente e nem durante o experimento, a administração de antimicrobianos, indicando que outros elementos, além da utilização dos mesmos, poderiam favorecer a manutenção e a disseminação de bactérias resistentes e que poderia ocorrer a disseminação de elementos genéticos móveis ou seleção de mutantes devido a algumas bactérias do estudo apresentarem resistência simultânea a alguns antibióticos (CARNEIRO et al., 2007).

Figura 1 – Indicação geográfica dos principais países que realizaram estudos sobre resistência a antibióticos na aquicultura.

1.5.3. Tilapicultura

O consumo de peixe vem crescendo consideravelmente em substituição à carne vermelha. Algumas características desse produto atraem novos consumidores, pois o peixe representa valiosa fonte de nutrientes fundamentais que são importantes para uma dieta diversificada e saudável. Com algumas exceções, a carne do peixe é baixa em gorduras saturadas, carboidratos e colesterol. Apresenta alto valor de proteínas e uma grande variedade de micronutrientes essenciais, incluindo vitaminas (D, A e B), minerais (cálcio, iodo, zinco, ferro e selênio) e ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 (ácido docosaenoico e ácido eicosapentaenoico) (FAO, 2012).

Atualmente, depois da carpa, a tilápia é o peixe mais cultivado no mundo, sendo que a Ásia contribui com a produção de 72%, a África com 19% e continente americano com 9% (FAO, 2012).

A tilápia tem origem no continente africano e na Ásia Menor (FAO, 2006) e apresenta características que estimularam a criação, principalmente no Brasil, como a facilidade reprodutiva, baixo investimento, rápido crescimento, espécie de fácil

adaptação ao confinamento, que suporta variações ambientais, limites extremos de temperatura e oxigênio, e até a presença de poluentes (BEYRUTH et al., 2004; PUPO, 2006; GAMA, 2008).

O manejo inadequado dessa espécie pode levar à susceptibilidade para infecções provocadas por diversos tipos de bactérias, dentre essas infecções se destacam as causadas por *Aeromonas hydrophila*, *Flavobacterium columnare*, *Edwardsiella tarda*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio mimicus* e gêneros *Streptococcus* e *Rickettsia* (KUBITZA, 2005).

Em busca do melhoramento genético das tilápias, os produtores brasileiros adquiriram espécies da África e de países Asiáticos, que têm a tradição de cultivar essas espécies há décadas. Contudo, por meio da importação dessas tilápias, podem ser introduzidas no Brasil bactérias que contêm resistência a antimicrobianos devido à larga administração de medicamentos nesses países (KUBITZA, 2005).

Devido à característica de peixes filtradores, as tilápias consomem plâncton que cresce nos tanques de criação, porém, na tentativa de aumentar a formação deste plâncton e visando a redução de gastos, alguns produtores utilizam dejetos de animais para alimentá-las, podendo trazer resíduos de antibióticos ou mesmo bactérias resistentes a antimicrobianos para dentro do ambiente aquático (CARNEIRO et al., 2007).

1.5.4. Qualidade higiênico-sanitária do pescado

Os peixes estão em contato direto com a água e por isso podem albergar naturalmente diversos micro-organismos, entre eles bactérias dos gêneros *Aeromonas* e *Vibrio* que são organismos ubiqüitários dos ambientes aquáticos, podendo dessa forma ser encontrados na superfície desses animais. Os gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* são bactérias que também se adaptam na água, e outros exemplos de organismos que podem estar presentes na água doce são membros da família *Enterobacteriaceae* e gêneros como *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* e bactérias anaeróbias como o gênero *Clostridium* (PUPO, 2006).

Alimentos de origem aquática, como os peixes, podem causar danos à saúde da população quando ingeridos crus, mal cozidos ou sem que tenham sido adequadamente processados devido à presença de bactérias patogênicas e potencialmente patogênicas, como é o caso das bactérias do gênero *Vibrio*, *Aeromonas*, entre outras (SILVA, 2007).

Além da contaminação pelo contato com o ambiente, o peixe pode ser contaminado durante a manipulação inadequada em toda a cadeia produtiva, inclusive sob refrigeração (SILVA, 2007). As bactérias do gênero *Aeromonas*, por exemplo, são capazes de sobreviver, se multiplicar e produzir fatores de virulência mesmo em temperaturas baixas (CASTRO-ESCARPULLI et al., 2003).

A utilização de coliformes termotolerantes como indicadores fornecem informações sobre as condições higiênicas do alimento e a possível presença de patógenos (GATTI, 2011).

Na resolução RDC nº 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2001), os parâmetros microbiológicos para o pescado *in natura* compreendem a contagem de *Staphylococcus* coagulase positivo e a pesquisa de *Salmonella* sp em 25 g de amostra. Contudo, no item “pratos prontos para consumo” na mesma resolução, os produtos a base de carnes, pescados e similares crus apresentam um limite de 10^2 NMP.g⁻¹ para coliformes a 45°C/g e para os produtos a base de carnes, pescados, ovos e similares cozidos o limite é 2×10 NMP.g⁻¹ para coliformes a 45°C/g.

Estudo realizado por GATTI (2011) em filés de tilápia frescos verificou a presença de coliformes totais e termotolerantes acima do limite estabelecido pela legislação nas amostras provenientes de supermercados no interior do estado de São Paulo. Outra pesquisa realizada no município de Toledo (PR) mostrou que as amostras de filé de tilápia comercializadas congeladas apresentaram coliformes totais acima do limite estabelecido, porém nenhuma amostra se apresentou positiva para coliformes termotolerantes (LIBRELATO e SHIKIDA, 2005).

O estado microbiológico do ambiente está diretamente relacionado com a qualidade do pescado, pois o mesmo permanece em contato direto com a água.

A contaminação do produto pode ocorrer em diversos estágios da cadeia produtiva como: água dos tanques de criação, despesca, transporte, temperatura de

armazenamento, estocagem, qualidade do gelo, superfícies, equipamentos, manipulação e comercialização (CARDOSO et al., 2003; LIBRELATO e SHIKIDA, 2005; GATTI, 2011).

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Pesquisar a ocorrência de genes de resistência a antibióticos em filés de tilápia comercializados no município de São Paulo-SP.

2.2. Específicos

1. Verificar nos filés de tilápia a contagem de coliformes termotolerantes para estimar a qualidade higiênico-sanitária das amostras.
2. Pesquisar a ocorrência de genes de resistência aos antibióticos β -lactâmicos em amostras de filés de tilápia.
3. Pesquisar a ocorrência de genes de resistência aos antibióticos tetraciclinas em amostras de filés de tilápia.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Durante o estudo, foram analisadas 10 amostras de filé de tilápia, sendo 5 congeladas e 5 frescas, provenientes de 8 marcas diferentes e produzidas em diversos estados do Brasil, conforme descrito na Tabela 2. Foram realizadas a pesquisa de coliformes termotolerantes e a detecção de genes resistentes a β -lactâmicos (grupos ESBL, KPC, AmpC e MBL) e tetraciclinas.

Os β -lactâmicos e as tetraciclinas foram os antibióticos de eleição para o presente estudo em função da frequente administração destes em criações de peixes e a pesquisas e relatos de criadores a respeito da ocorrência de resistência bacteriana, principalmente a β -lactâmicos.

Todas as amostras foram compradas em hipermercados no município de São Paulo – SP.

3.1. Pesquisa de coliformes termotolerantes

A pesquisa de coliformes termotolerantes foi realizada por meio da técnica de tubos múltiplos, sendo utilizados 3 tubos em cada diluição até 10^{-8} .

Para a primeira diluição (10^{-1}), uma amostra de 25 gramas foi adicionada a 225 mL de água peptonada 0,1% e após a homogeneização foram feitas as diluições seriadas até 10^{-8} .

Em seguida, foi transferido 1 mL de cada diluição para os 3 tubos correspondentes com 9 mL de Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST), com tubo de Durham invertido. Os tubos foram incubados a 35°C em estufa por 24 e 48 horas.

A primeira leitura foi realizada 24 horas após a incubação e a segunda após 48 horas. Dos tubos positivos, ou seja, que apresentaram formação de gás, foram transferidos por meio de alça microbiológica cerca de 30 μL para os tubos com 9 mL de Caldo *Escherichia coli* (EC), com tubo de Durham invertido. Estes tubos foram incubados em estufa a 45°C , sendo a primeira leitura com 24 horas e a segunda após 48 horas. Os tubos que revelaram formação de gás foram considerados positivos para coliformes termotolerantes.

Para obtenção do resultado foi utilizado o cálculo do número mais provável (NMP) de organismos por grama por meio da tabela de Hoskins (SILVA et al., 2001).

3.2. Cultura e extração do DNA total

A extração por choque-térmico foi realizada segundo CHAPMAN et al. (2001) que permitiu a obtenção do material genético cromossômico e plasmidial.

Primeiramente, 3 filés de tilápia foram retirados de cada embalagem, colocados em um saco plástico tipo Ziploc® e misturados com 300 mL de Caldo Lúria 0,5%. O homogeneizado foi despejado em um frasco estéril e incubado em estufa a 35°C por 18 a 24 horas.

Em seguida, o caldo cultivado foi homogeneizado e distribuído em 10 microtubos tipo eppendorf® com 1 mL cada. Os microtubos foram centrifugados a 14000 rpm, a 24°C por 5 minutos e após esse processo o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensão em 1mL de água mQ® estéril e homogeneizado. Os microtubos foram centrifugados novamente a 14000 rpm, a 24°C por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado, sendo que o sedimento foi ressuspensão em 200µL de água mQ® estéril.

Os microtubos foram incubados a 95°C por 10 minutos e em seguida foram mantidos em freezer a -20°C por 30 minutos. Decorrido esse tempo, os microtubos foram retirados do freezer e colocados em temperatura ambiente para descongelar. A seguir, eles foram centrifugados a 14000 rpm, a 24°C por 5 minutos e o sobrenadante contendo o DNA foi transferido para novos tubos de eppendorf® que foram armazenados em freezer a -20°C.

3.3. Reação em Cadeia pela Polimerase - PCR

As PCR foram realizadas em um volume total de 25µL cada. Os reagentes utilizados foram: DNA total 5µL, tampão 1X, MgCl₂ 1,5mM, dntp 200µM, iniciadores 0,3 µM e Taq DNA polimerase 1,25U (Go Taq® DNA Polymerase, Promega, WI, EUA).

As reações foram feitas em termociclador Mastercycler Thermocycler (Eppendorf - Hamburgo, Alemanha), sendo que os iniciadores, as condições e os ciclos estão descritos na Tabela 1.

Em relação às enzimas CTX-M, a pesquisa foi realizada com iniciadores genéricos para os genes *bla*_{CTX-M}, e com iniciadores específicos para seus grupos *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-8}, *bla*_{CTX-M-9} e *bla*_{CTX-M-25}, que apresentam 158 enzimas distribuídas nestes cinco grupos, de acordo com a similaridade das sequências de aminoácidos, conforme descrito no site www.lahey.org/studies (BUSH e JACOBY, 2014).

3.4. Eletroforese

Os produtos amplificados na PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, a 6V/cm. O gel foi corado com brometo de etídio para visualização das bandas sob fonte de luz ultravioleta em um sistema de aquisição de imagens Epi Chemi Darkroom II e software Labworks (UVP). A medida das bandas foi determinada por comparação com o marcador de peso molecular MassRuler™ 100bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific Inc.) adicionado em cada gel.

3.5. Sequenciamento

O sequenciamento foi utilizado para confirmação dos fragmentos obtidos na PCR.

Os produtos de PCR foram purificados utilizando Kit comercial Illustra GFX PCR DNA e Gelband Purification Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) de acordo com as instruções do fabricante e em seguida, enviados para sequenciamento. Os resultados obtidos do sequenciamento foram alinhados manualmente utilizando o software BioEdit Sequence Alignment Editor (HALL, 1999), e comparados com as sequências padrão de cada um dos genes descrita do banco de dados www.lahey.org/studies (BUSH e JACOBY, 2014) e disponíveis no banco de dados GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/).

Tabela 1 – Sequência de iniciadores, condições de PCR e tamanho do fragmento obtido para a detecção de genes codificadores de resistência aos β -lactâmicos e tetraciclinas.

	Gene	Sequência de iniciadores	Condições de PCR						Tamanho da banda	Referência
			DI	NC	D	A	E	EF		
β-lactâmicos										
ESBL	bla _{CTX-M} F	SCSATGTGCAGYACCAGTAA	94°C	30	94°C	52°C	72°C	72°C	543pb	CAO et al. (2002)
	bla _{CTX-M} R	CCGCRATATGRTTGGTGGTG	2 min		45 seg	1 min	1 min	10 min		
	bla _{CTX-M1} F	AAATCACTGCGYCAGTTCA	94°C	30	94°C	60°C	72°C	72°C	854pb	
	bla _{CTX-M1} R	GGTGACGATTTTAGCCGCCG	2 min		45 seg	45 seg	1 min	10 min		
	bla _{CTX-M2} F	GACTCAGAGCATTGCGCCG							870pb	
	bla _{CTX-M2} R	TCAGAAACCGYGGGTTACGA								
	bla _{CTX-M8} F	GATGAGACATCGCGTTAAG							861pb	
	bla _{CTX-M8} R	GGTGACGATTTTCGCGGCA								
	bla _{CTX-M9} F	TGACAAAGAGARTGCAACGG							867pb	DROPA (2013)
	bla _{CTX-M9} R	CGATGATTCTCGCCGCTGAA	94°C	30	94°C	55°C	72°C	72°C		
	bla _{CTX-M25} F	ATGAGAAAAAGCGTAAGGCGGG	2 min		45 seg	45 seg	1 min	10 min	865pb	
	bla _{CTX-M25} R	CCGTCGGTGACWATTCTG								
	bla _{TEM} F	TAAAAAATTCTTGAAGACGAA							1066pb	
	bla _{TEM} R	CCAAWGCTTAATCAGTGAG								
	bla _{SHV} F	TTATCTCCCTGTTAGCCRCC							838pb	
	bla _{SHV} R	TTAGCGTTGCCAGTGYTCGA								
	bla _{PER} F	ATGAATGTCATTATAAAAGC	94°C	30	94°C	55°C	72°C	72°C	580pb	Comunicação pessoal
	bla _{PER} R	AATTTGGGCTTAGGGCAGAA	2 min		45 seg	45 seg	1 min	10 min		
	bla _{GES1} F	ATGCGCTTCATTACGCAC	94°C	30	94°C	55°C	72°C	72°C	860pb	CAO et al. (2002)
	bla _{GES1} R	CTATTTGTCCGTGCTCAGG	2 min		45 seg	45 seg	1 min	10 min		
KPC	bla _{KPC} F	CTGTCTTGCTCTCATGGCC	94°C	30	94°C	58°C	72°C	72°C	795pb	NAAS et al. (2008)
	bla _{KPC} R	CCTCGCTGTGCTTGTCATCC	5 min		45 seg	45 seg	1 min	10 min		
AmpC	bla _{MOX} F	AGCACAGGATCCCGGGCA							947pb	MOURA (2010)
	bla _{MOX} R	CATGACGAYGCCGATCC	95°C	24	95°C	60°C	72°C	72°C		
	bla _{CMY} F	ATGATGAAAAAATCGTTATGC	7 min		45 seg	30 seg	1min	5min	1149pb	
	bla _{CMY} R	GCTTTTCAAGAATGCGCCA								

DI – Denaturação Inicial; **NC** – Número de Ciclos; **D** – Denaturação; **A** – Anelamento; **E** – Extensão; **EF** – Extensão Final

Tabela 1 – Sequência de iniciadores, condições de PCR e tamanho do fragmento obtido para a detecção de genes codificadores de resistência aos β -lactâmicos e tetraciclinas. (Continuação)

	Gene	Sequência de iniciadores	Condições de PCR						Tamanho da banda	Referência					
			DI	NC	D	A	E	EF							
β-lactâmicos															
MBL	<i>bla</i> _{IMP} F	GGAATAGRRRTGGCTTAAYT	94°C	30	94°C	40°C	72°C	72°C	232pb	BALSALOBRE et al. (2009)					
	<i>bla</i> _{IMP} R	GGTTTAAYAAAARCAMCCACC	5 min		1 min	1 min	1 min	5 min							
	<i>bla</i> _{VIM} F	GTTTGGTCGCATATCGCAAC	94°C	30	94°C	55°C	72°C	72°C	648pb						
	<i>bla</i> _{VIM} R	GAGCAAKTCTYAGACCGCCC													
	<i>bla</i> _{SPM} F	CCTACAATCTAACGGCGACC													
	<i>bla</i> _{SPM} R	TCGCCGTGTCCAGGTATAAC													
	<i>bla</i> _{CphA} F	TCTATTTTCGGGGCCAAGGG													
	<i>bla</i> _{CphA} R	TCTCGGCCCAGTCGCTCTTCA									230pb				
Tetraciclinas															
	<i>tetA</i> F	GCGCGATCTGGTTCACTCG	94°C	24	94°C	60°C	72°C	72°C	164pb	AMINOV et al. (2002)					
	<i>tetA</i> R	AGTCGACAGYRGC GCCGGC													
	<i>tetB</i> F	TACGTGAATTTATTGCTTCGG							206pb						
	<i>tetB</i> R	ATACAGCATCCAAAGCGCAC													
	<i>tetC</i> F	GCGGGATATCGTCCATTCCG							207pb						
	<i>tetC</i> R	GCGTAGAGGATCCACAGGACG													
	<i>tetD</i> F	GGAATATCTCCCGGAAGCGG							187pb						
	<i>tetD</i> R	CACATTGGACAGTGCCAGCAG							94°C		30 seg	15 seg	15 seg	5 min	199pb
	<i>tetE</i> F	GTTATTACGGGAGTTTGTTGG							5 min						
	<i>tetE</i> R	AATACAACACCCACACTACGC													
	<i>tetG</i> F	GCAGAGCAGGTCGCTGG							134pb						
	<i>tetG</i> R	CCYGCAAGAGAAGCCAGAAG													
	<i>tetH</i> F	CAGTGAAAATTCACTGGCAAC							185pb						
	<i>tetH</i> R	ATCCAAAGTGTGGTTGAGAAT													
	<i>tetJ</i> F	CGAAAACAGACTCGCCAATC							184pb						
	<i>tetJ</i> R	TCCATAATGAGGTGGGGC													
	<i>tetM</i> F	ACAGAAAGCTTATTATATAAC							94°C		30 seg	15 seg	15 seg	5 min	171pb
	<i>tetM</i> R	TGGCGTGTCTATGATGTTCAC							5 min						

DI – Denaturação Inicial; **NC** – Número de Ciclos; **D** – Denaturação; **A** – Anelamento; **E** – Extensão; **EF** – Extensão Final

Tabela 1 – Sequência de iniciadores, condições de PCR e tamanho do fragmento obtido para a detecção de genes codificadores de resistência aos β -lactâmicos e tetraciclinas. (Continuação)

Gene	Sequência de iniciadores	Condições de PCR						Tamanho da banda	Referência
		DI	NC	D	A	E	EF		
Tetraciclinas									
tetO F	ACGGARAGTTTATTGTATACC	94°C	24	94°C	46°C	72°C	72°C	171pb	AMINOV et al. (2002)
tetO R	TGGCGTATCTATAATGTTGAC	5 min		30 seg	15 seg	15 seg	5 min		
tetQ F	AGAATCTGCTGTTTGCCAGTG	94°C	24	94°C	55°C	72°C	72°C	169pb	
tetQ R	CGGAGTGTCAATGATATTGCA	5 min		30 seg	15 seg	15 seg	5 min		
tetS F	GAAAGCTTACTATACAGTAGC		24					169pb	
tetS R	AGGAGTATCTACAATATTTAC	94°C		94°C	46°C	72°C	72°C		
tetT F	AAGGTTTATTATATAAAAAGTG	5 min	24	30 seg	15 seg	15 seg	5 min	169pb	
tetT R	AGGTGTATCTATGATATTTAC								
tetW F	GAGAGCCTGCTATATGCCAGC	94°C	24	94°C	55°C	72°C	72°C	168pb	
tetW R	GGGCGTATCCACAATGTTAAC	5 min		30 seg	15 seg	15 seg	5 min		
tetZ F	CCTTCTCGACCAGGTCGG	94°C	24	94°C	60°C	72°C	72°C	184pb	
tetZ R	ACCCACAGCGTGTCCGTC	5 min		30 seg	15 seg	15 seg	5 min		
tetB/P F	AAAACCTATTATATTATAGTG	94°C	24	94°C	46°C	72°C	72°C	169pb	
tetB/P R	TGGAGTATCAATAATATTCAC	5 min		30 seg	15 seg	15 seg	5 min		
tetOTR F	GGCATYCTGGCCACGT	94°C	24	94°C	55°C	72°C	72°C	212pb	
tetOTR R	CCCGGGGTGTCGTASAGG	5 min		30 seg	15 seg	15 seg	5 min		
tet30 F	CATCTTGGTCGAGGTGACTGG	94°C	24	94°C	60°C	72°C	72°C	210pb	
tet30 R	ACGAGCACCCAGCCGAGC	5 min		30 seg	15 seg	15 seg	5 min		

DI – Denaturação Inicial; **NC** – Número de Ciclos; **D** – Denaturação; **A** – Anelamento; **E** – Extensão; **EF** – Extensão Final

4. RESULTADOS

4.1. Pesquisa de coliformes termotolerantes

Das 10 amostras analisadas, nenhuma apresentou formação de gás nos tubos de Caldo EC, verificando resultado $< 3 \text{ NMP.g}^{-1}$ para coliformes termotolerantes, conforme descrito na Tabela 2.

4.2. Detecção de genes de resistência a β -lactâmicos

A identificação de genes de resistência a β -lactâmicos foi realizada por meio da PCR para os grupos ESBL, KPC, AmpC e MBL. A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos para esses genes.

4.2.1. Identificação dos grupos ESBL pela PCR

As 10 amostras analisadas tiveram seu DNA total avaliado quanto à presença dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{PER}, *bla*_{GES1}, *bla*_{CTX-M}, e os grupos *bla*_{CTX-M1}, *bla*_{CTX-M2}, *bla*_{CTX-M8}, *bla*_{CTX-M9} e *bla*_{CTX-M25}.

A pesquisa genérica dos genes *bla*_{CTX-M} revelou a presença de fragmentos com tamanho esperado (543pb) em 9 amostras. O sequenciamento dos fragmentos revelou a amplificação do gene *bla*_{OXY-5} em todas as amostras positivas.

A pesquisa dos genes *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV} revelou a presença dos fragmentos de 1066pb e 863pb respectivamente em 2 amostras cada. A confirmação dos genes pelo sequenciamento demonstrou que as duas amostras positivas para o gene *bla*_{TEM} (amostras 5 e 10), foram classificadas como *bla*_{TEM-1b}, e a confirmação pelo sequenciamento do gene *bla*_{SHV}, demonstrou a presença do gene *bla*_{LEN-16} na amostra 4 e *bla*_{SHV-28} na amostra 5 (Tabela 2). A Figura 2 apresenta o alinhamento das sequências de nucleotídeos do gene *bla*_{SHV-28}.

Os genes *bla*_{CTX-M1}, *bla*_{CTX-M2}, *bla*_{CTX-M8}, *bla*_{CTX-M9}, *bla*_{CTX-M25}, *bla*_{PER} e *bla*_{GES1} não foram detectados em nenhuma das amostras de filé de tilápia submetidas ao estudo.

SHV-28 (AF299299) ATGCGTTTTATTGCGCTGTGTA.....
 SHV amostra V5 -----TTATCTCCCTGTTAGCCACCCTGCCGCTGGCGGTACACGCCAGCCCGCAGCCGCTTGAGCAAATTAACTAAGCGAAA
 SHV1 (AF148850) ATGCGTTATATTGCGCTGTGTA.....

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200

SHV-28 (AF299299)
 SHV amostra V5 GCCAGCTGTCGGGCCGCTAGGCATGATAGAAATGGATCTGGCCAGCGGCCGCACGCTGACCGCTGGCGCGCCGATGAACGCTTCCCATGATGAGCAC
 SHV1 (AF148850)

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300

SHV-28 (AF299299)
 SHV amostra V5 CTTTAAAGTAGTGCTCTGCGGCGCAGTGCTGGCGCGGGTGGATGCCGGTGACGAACAGCTGGAGCGAAAGATCCACTATCGCCAGCAGGATCTGGTGGAC
 SHV1 (AF148850)

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400

SHV-28 (AF299299)
 SHV amostra V5 TACTCGCCGGTCAGCGAAAAACATCTTGCCGACGGCATGACGGTCGGCGAACTCTGCGCCGCCGCCATTACCATGAGCGATAACAGCGCCGCCAATCTGC
 SHV1 (AF148850)C.....

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500

SHV-28 (AF299299)
 SHV amostra V5 TGCTGGCCACCGTCGGCGGCCCCGCAGGATTGACTGCCTTTTGGCGCCAGATCGGCGACAACGTCACCCGCCCTTGACCGCTGGGAAACGGAACCTGAATGA
 SHV1 (AF148850) .A.....

Figura 2 – Alinhamento das sequências de nucleotídeos de SHV-28, SHV amostra 5 (este estudo) e SHV-1. Gaps introduzidos para maximizar o alinhamento são indicados por traços. (Continuação)

	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
SHV-28 (AF299299)										
SHV amostra V5	GGCGCTTCCCGGCGACGCCGCGACACCACTACCCCGGCCAGCATGGCCGCGACCCTGCGCAAGCTGCTGACCAGCCAGCGTCTGAGCGCCCGTTCGCAA									
SHV1 (AF148850)										
	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
SHV-28 (AF299299)										
SHV amostra V5	CGGCAGCTGCTGCAGTGGATGGTGGACGATCGAGTCGCCGGACCGTTGATCCGCTCCGTGCTGCCGGCGGGCTGGTTTATCGCCGATAAGACCGGAGCTG									
SHV1 (AF148850)										
	G.....									
	710	720	730	740	750	760	770	780	790	800
SHV-28 (AF299299)										
SHV amostra V5	GCGAACGGGGTGCGCGCGGGATTGTCGCCCTGCTTGGCCCGAATAACAAAGCAGAGCGCATCGTGGTGATTTATCTGCGGGATACGCCGGCGAGCATGGC									
SHV1 (AF148850)										
	G.....T.....C.....									
	810	820	830	840	850	860				
SHV-28 (AF299299)										
SHV amostra V5	CGAGCGAAATCAGCAAATCGCCGGGATCGGCGCGGCGCTGATCGAGCACTGGCAACGCTAA									
SHV1 (AF148850)										

4.2.2. Identificação dos grupos KPC pela PCR

O fragmento de 795pb correspondente ao gene *bla*_{KPC} foi observado em 2 amostras de filé de tilápia analisadas. A confirmação do fragmento foi realizada por sequenciamento e revelou a presença do gene *bla*_{KPC-2} nas amostras 9 e 10, conforme demonstrado no alinhamento da Figura 3. Após o término da parte experimental do presente estudo foi possível fazer isolamento de uma cepa KPC positiva na amostra 9 que foi identificada como *Stenotrophomonas beteli* e na amostra 10 identificada como *Stenotrophomonas maltophilia* (dados não apresentados).

4.2.3. Identificação dos grupos AmpC pela PCR

No grupo AmpC os genes pesquisados foram *bla_{MOX}* e *bla_{CMY}*.

A presença dos fragmentos correspondentes ao gene *bla_{MOX}* foi observado em em 1 amostra, contudo o fragmento correspondente ao gene *bla_{CMY}* não foi observado.

O sequenciamento do fragmento de 947pb correspondente ao gene *bla_{MOX}*, revelou a presença do gene *bla_{MOX-6}* na amostra identificada como 10.

4.2.4. Identificação dos grupos MBL pela PCR

Os genes *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, *bla_{SPM}* e *bla_{CphA}* foram pesquisados nas 10 amostras submetidas ao estudo, sendo que o fragmento esperado para o gene *bla_{CphA}*, de 230 pb, foi detectado em 6 amostras, enquanto os fragmentos referentes aos genes *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}* e *bla_{SPM}* não foram observados em nenhuma das amostras.

O sequenciamento do fragmento correspondente ao gene *bla_{CphA}*, confirmou a identificação desse gene nas 6 amostras positivas para o mesmo (Tabela 2).

4.3. Detecção de genes de resistência a tetraciclinas

A identificação de genes de resistência a tetraciclinas foi realizada por meio da PCR com iniciadores específicos para a detecção dos genes *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetE*, *tetG*, *tetH*, *tetJ*, *tetM*, *tetO*, *tetQ*, *tetS*, *tetT*, *tetW*, *tetZ*, *tetB/P*, *tetOTR* e *tet30* nas 10 amostras de filé de tilápia submetidas ao estudo. A Tabela 2 apresenta o resultado da pesquisa de genes *tet*.

A presença dos fragmentos com tamanhos esperados para os diferentes genes codificadores de resistência a tetraciclinas foi observada em diferentes amostras estudadas e revelaram que o gene *tetB* foi detectado em 1 amostra, o gene *tetC* em 2 amostras, o gene *tetD* em 8 amostras, o gene *tetE* em 5 amostras, o gene *tetG* em 6 amostras, o gene *tetO* em 1 amostra, o gene *tetS* em 1 amostra e o gene *tetW* em 2 amostras.

Não foram detectados os fragmentos correspondentes aos genes *tetA*, *tetH*, *tetJ*, *tetM*, *tetQ*, *tetT*, *tetZ*, *tetB/P*, *tetOTR* e *tet30* nas amostras analisadas.

A confirmação dos resultados foi realizada por meio do sequenciamento dos fragmentos obtidos, o que confirmou a presença dos genes alvo nas 9 amostras de filé de tilápia positivas para os diferentes genes *tet* estudados.

Tabela 2 – Distribuição das amostras de filé de tilápia analisadas no estudo segundo a marca, tipo de refrigeração, local de produção, resultado da pesquisa de coliformes termotolerantes e presença de genes de resistência aos antibióticos β -lactâmicos e tetraciclinas nas 10 amostras analisadas.

Amostra	Marca	Tipo de Refrigeração	Produção no Estado de São Paulo	Pesquisa de Coliformes Termotolerantes	Genes de resistência
1	A	Congelado	Sim	$< 3 \text{ NMP.g}^{-1}$	<i>bla</i> _{OXY-5} , <i>bla</i> _{CphA} , <i>tetD</i> , <i>tetS</i>
2	B	Congelado	Não	$< 3 \text{ NMP.g}^{-1}$	
3	C	Congelado	Não	$< 3 \text{ NMP.g}^{-1}$	<i>bla</i> _{OXY-5} , <i>tetD</i> , <i>tetG</i>
4	D	Congelado	Não	$< 3 \text{ NMP.g}^{-1}$	<i>bla</i> _{OXY-5} , <i>bla</i> _{LEN-16} , <i>tetB</i> , <i>tetD</i>
5	E	Congelado	Sim	$< 3 \text{ NMP.g}^{-1}$	<i>bla</i> _{OXY-5} , <i>bla</i> _{TEM-1b} , <i>bla</i> _{SHV-28} , <i>tetC</i>
6	F	Fresco	Sim	$< 3 \text{ NMP.g}^{-1}$	<i>bla</i> _{OXY-5} , <i>bla</i> _{CphA} , <i>tetD</i> , <i>tetE</i> , <i>tetG</i>
7	G	Fresco	Sim	$< 3 \text{ NMP.g}^{-1}$	<i>bla</i> _{OXY-5} , <i>bla</i> _{CphA} , <i>tetD</i> , <i>tetE</i> , <i>tetG</i>
8	C	Fresco	Não	$< 3 \text{ NMP.g}^{-1}$	<i>bla</i> _{OXY-5} , <i>bla</i> _{CphA} , <i>tetD</i> , <i>tetE</i> , <i>tetG</i> , <i>tetW</i>
9	H	Fresco	Não	$< 3 \text{ NMP.g}^{-1}$	<i>bla</i> _{OXY-5} , <i>bla</i> _{KPC-2} , <i>bla</i> _{CphA} , <i>tetD</i> , <i>tetE</i> , <i>tetG</i>
10	H	Fresco	Não	$< 3 \text{ NMP.g}^{-1}$	<i>bla</i> _{OXY-5} , <i>bla</i> _{TEM-1b} , <i>bla</i> _{KPC-2} , <i>bla</i> _{CphA} , <i>bla</i> _{MOX-6} , <i>tetC</i> , <i>tetD</i> , <i>tetE</i> , <i>tetG</i> , <i>tetO</i> , <i>tetW</i>

Congelado – Filé de tilápia conservado sob temperatura abaixo de -12°C; **Fresco** – Filé de tilápia conservado sob temperatura entre 0 e 10°C;

Sim – Filé de tilápia produzido e embalado no estado de São Paulo; **Não** – Filé de tilápia produzido e embalado fora do estado de São Paulo;

5. DISCUSSÃO

A rápida expansão da aquicultura em todo mundo e a administração de antibióticos de forma indiscriminada nessa atividade podem favorecer o surgimento de resistência a antibióticos em peixes, fator de grande interesse para a saúde pública e para o controle de doenças infecciosas (CABELLO, 2004; BURRIDGE et al., 2008).

Algumas bactérias que são importantes agentes de infecções em humanos, também podem estar presentes em peixes e no ambiente aquático, e carrear genes de resistência a antibióticos, como os gêneros: *Aeromonas*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Klebsiella*.

O presente estudo estimou a qualidade higiênico-sanitária de filés de tilápia e verificou a circulação de genes de resistência aos antibióticos β -lactâmicos e tetraciclina.

5.1. Qualidade higiênico-sanitária das amostras

A pesquisa de coliformes termotolerantes foi utilizada como indicador das condições higiênico-sanitárias das amostras com o intuito de avaliar a qualidade do produto de acordo com as especificações da RDC nº 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2001) e verificar se um alimento que apresenta bactérias que carregam genes de resistência está satisfatório para consumo.

No presente estudo, as análises realizadas por meio da técnica dos tubos múltiplos para a pesquisa de coliformes termotolerantes demonstraram ausência (< 3 NMP.g⁻¹) desses indicadores em todas as amostras de filé de tilápia, tanto congeladas quanto frescas.

Um fator que pode ter contribuído para esse resultado é que, todas as marcas de filé de tilápia adquiridas em hipermercados, foram filetadas dentro da propriedade que cria os peixes e industrializa o produto, reduzindo desta forma a manipulação e consequentemente a contaminação do mesmo.

Os resultados do presente estudo corroboram os achados da pesquisa conduzida no município de Toledo (PR) com filés de tilápia congelados

(LIBRELATO e SHIKIDA, 2005) e em estudo com pintados (*Pseudoplatystoma fasciatum*) comercializados em supermercados de Cuiabá (MT) (ALMEIDA et al., 2002).

Outro experimento, realizado com peixes comercializados frescos no município de Botucatu (SP), revelou índices de coliformes termotolerantes com variação entre < 3 e 93 NMP.g^{-1} (RALL et al., 2008). Na região nordeste do estado de São Paulo foi determinada a contagem de coliformes termotolerantes com variação entre < 3 e 6 NMP.g^{-1} na musculatura de peixes de pesque-pagues (LORENZON, 2009).

Contudo, valores mais elevados foram observados em filés de tilápia frescos comercializados no interior do estado de São Paulo em que o NMP de coliformes termotolerantes variou entre $< 3,0$ e 460 NMP.g^{-1} (GATTI, 2011).

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que todas as amostras de tilápia analisadas estavam próprias para consumo, de acordo com as especificações da RDC nº 12 da ANVISA para coliformes termotolerantes, considerando o item 22 “pratos prontos para o consumo”, letra b “a base de carnes, pescados e similares crus” que determina um limite de 10^2 NMP.g^{-1} para coliformes a 45°C/g (BRASIL, 2001).

5.2. Genes de resistência

A resistência antimicrobiana é consequência do mau uso desses fármacos e se tornou um problema crescente de saúde pública que pode resultar na reemergência de doenças infecciosas.

Na aquicultura o uso de antibióticos, principalmente de forma profilática, tornou-se prática comum, especialmente as classes de antimicrobianos β -lactâmicos e tetraciclina. Estas classes foram escolhidas para o presente estudo devido à administração excessiva, e também porque pesquisas demonstraram a presença de genes de resistência a esses antibióticos em pescados.

5.2.1. Genes de resistência a β -lactâmicos

5.2.1.1. Grupos ESBL

Neste estudo, o resultado do sequenciamento do grupo CTX-M em 9 amostras revelou a presença do gene *bla*_{OXY-5} que codifica a β -lactamase de espectro restrito OXY, que é intrínseco a bactéria *Klebsiella oxytoca* (ANDRADE, 2008). Este gene confere resistência a alguns antibióticos, como a amoxicilina (FEVRE et al., 2005) que é muito utilizada nas criações de tilápia (*Oreochromis niloticus*) no combate a infecções causadas por *Streptococcus agalactiae* (LEMOS et al., 2006). O gene *bla*_{OXY-5} foi descrito pela primeira vez em 2005, contudo há relatos de sua disseminação em diversos países (FEVRE et al., 2005). Apesar disso, a resistência conferida por esse gene é cromossômica, reduzindo desta forma a possibilidade de transferência de material genético (FEVRE et al., 2005).

No presente estudo foi verificado que 20% das amostras de filé de tilápia continham o gene *bla*_{TEM} e outros 20% das amostras o gene *bla*_{SHV}, sendo que em uma amostra foram identificados os dois genes simultaneamente.

As enzimas dos grupos TEM e SHV estão disseminadas mundialmente, sendo encontradas, por exemplo, na China em um estudo com peixes provenientes de aquicultura, onde foi verificado que 53% dos genes de resistência a β -lactâmicos isolados de *Escherichia coli* resistentes a ampicilina eram *bla*_{TEM} e 26% eram *bla*_{SHV} (JIANG et al., 2012).

O sequenciamento do gene *bla*_{TEM}, nas amostras 5 e 10, revelou o gene *bla*_{TEM-1b}. Este gene não é codificador de ESBL e apesar de poder estar associado a elementos genéticos móveis, como o transposon Tn2, está geralmente localizado no cromossomo bacteriano (DROPA, 2013; BLEICHER et al., 2013). O gene *bla*_{TEM-1b} é frequentemente identificado em bactérias da família *Enterobacteriaceae*, incluindo o gênero *Salmonella*, em que estudos demonstraram a presença do gene *bla*_{TEM-1b} em isolados desse gênero em amostras clínicas e alimentos (LIEBANA et al., 2004; BLEICHER et al., 2013; TORO et al., 2014). A *Salmonella* spp. pode ser encontrada em peixes crus, principalmente devido a falta de boas práticas de manipulação durante o processamento do peixe (SILVA, 2007). O gene *bla*_{TEM-1b} confere

resistência aos antibióticos penicilinas e cefalosporinas de primeira geração, sendo que as penicilinas foram muito utilizadas em criações de tilápia, mas aos poucos estão sendo substituídas por outros antimicrobianos por causa da diminuição da eficácia observada pelos criadores (TUSEVLJAK et al., 2013). Há poucos relatos a respeito da administração de cefalosporinas na aquicultura, contudo há estudos demonstrando a presença de resistência a cefalosporinas de primeira geração em *Aeromonas* spp. isoladas de peixes (CASTRO-ESCARPULLI et al., 2003; SAAVEDRA et al., 2004).

O resultado do sequenciamento do gene *bla*_{SHV} na amostra 4 revelou a presença do gene *bla*_{LEN-16}. A enzima LEN é uma β -lactamase cromossômica comumente encontrada em isolados de *Klebsiella pneumoniae* (CHEN et al., 2005; SIEBOR et al., 2005). Os genes *bla*_{LEN} conferem resistência a alguns antibióticos como ampicilina, amoxicilina, entre outros (CHEN et al., 2005). A amoxicilina é administrada em criações de tilápia para o tratamento de algumas infecções (LE MOS et al., 2006), contudo, em relação ao uso da ampicilina, apesar de ainda ser utilizada em criações de peixes, diversos estudos demonstraram que bactérias comumente encontradas em cultivos de tilápias são resistentes a esse antimicrobiano (CASTRO-ESCARPULLI et al., 2003; LIMA et al., 2006; CARNEIRO et al., 2007; JACOBS e CHENIA, 2007).

Na amostra 5, o sequenciamento revelou o gene *bla*_{SHV-28}. Este codifica uma ESBL que foi descrita em isolados de *Klebsiella pneumoniae* e *Klebsiella oxytoca* em amostras clínicas e ambientais (NIELSEN et al., 2011; DROPA, 2013; DONATI et al., 2014), corroborando com os achados deste estudo. As ESBL são codificadas por genes que podem estar localizados em plasmídeos e desta forma, o resultado da circulação do gene *bla*_{SHV-28} em peixes de cultivo serve de alerta para disseminação da resistência no ambiente aquático.

5.2.1.2. Grupos KPC

O gene *bla*_{KPC} foi detectado nas amostras 9 e 10 de filé de tilápia neste estudo, sendo que o resultado do sequenciamento revelou o gene *bla*_{KPC-2} nas 2 amostras.

No caso da pesquisa do gene *bla*_{KPC}, embora a proposta do trabalho era fazer a pesquisa de genes de resistência sem o isolamento de micro-organismos, com o adequado acondicionamento da amostra original e com enriquecimento com antibiótico específico foi possível isolar os agentes carreadores do gene pesquisado, uma vez que estes eram cultiváveis.

Houve aumento na detecção de micro-organismos carreadores de gene *bla*_{KPC} no Brasil entre os anos de 2008 a 2010, e as bactérias produtoras desse grupo ainda estavam restritas ao ambiente hospitalar (GALES et al., 2012; PICÃO et al., 2013). Porém, em 2013 os estudos realizados por OLIVEIRA et al., demonstraram que *Klebsiella pneumoniae* isoladas de amostras ambientais carregavam o gene *bla*_{KPC-2} indicando o início da disseminação ambiental desses genes no Brasil e corroborando os achados deste estudo.

Outras pesquisas têm descrito a presença do gene *bla*_{KPC-2} em amostras clínicas de *Klebsiella pneumoniae* e em outras bactérias gram-negativas, inclusive em *Aeromonas* spp., que são comuns no ambiente aquático (ANDRADE et al., 2011; SEKI et al., 2011; ALMEIDA et al., 2013; PEREIRA et al., 2013; PICÃO et al., 2013).

Esta é a primeira vez que o gene *bla*_{KPC-2} está sendo descrito em peixes. Existe a possibilidade das amostras de filé de tilápia que apresentaram esse gene serem originárias de criações que utilizam água proveniente de esgoto tratado, principalmente esgoto hospitalar, visto que no Brasil, o gene *bla*_{KPC-2} está mais disseminado no ambiente clínico. O esgoto, mesmo depois de passar por tratamento, pode apresentar número significativo de bactérias, inclusive resistentes a antibióticos (OLIVEIRA, 2011; PICÃO et al., 2013).

Outro aspecto interessante é que as 2 amostras positivas para o *bla*_{KPC-2} são da mesma marca, ou seja, foram criadas pelo mesmo fornecedor, contudo, foram compradas em hipermercados diferentes.

A identificação desse gene é de grande preocupação para a saúde pública, visto sua localização frequente em plasmídeos transmissíveis e inseridos em transposons, como Tn4401 (NAAS et al., 2008).

5.2.1.3. Grupos AmpC

A presença do gene *bla*_{MOX} foi observada em 10% das amostras neste estudo. Os resultados do sequenciamento demonstraram o gene *bla*_{MOX-6}, e se tratando de amostras de peixes, poderia ser oriundo de bactérias do gênero *Aeromonas* que carregam esses elementos naturalmente em seu cromossomo, conforme demonstrado em pesquisa com amostras provenientes do ambiente aquático, onde foi observado que 20,8% destas foram positivas para o gene *bla*_{MOX} em isolados de *Aeromonas*, sendo também identificado o gene *bla*_{MOX-6} (MOURA, 2010).

Bactérias do gênero *Aeromonas* compõem a microbiota de diferentes espécies de peixes, inclusive da tilápia (CASTRO-ESCARPULLI et al., 2003; KUBITZA, 2005), sendo que, COSTA (2003) demonstrou a presença de bactérias do gênero *Aeromonas* em diferentes órgãos de tilápias (*Oreochromis niloticus*). Outros estudos também demonstraram a presença desses micro-organismos em outras espécies de peixe (SILVA, 2007). Quanto à pesquisa de genes de resistência aos antimicrobianos, vários estudos demonstraram a produção de enzima AmpC em bactérias do gênero *Aeromonas*, inclusive naquelas isoladas de amostras de peixes (REISBIG e HANSON, 2004; MOURA, 2010).

O presente estudo não encontrou o gene *bla*_{CMY}, sendo que resultado semelhante foi verificado em pesquisa de resistência em peixes marinhos (pescada branca, sardinha e tainha) em São Paulo (SOLER, 2011).

5.2.1.4. Grupos MBL

Neste estudo, os genes *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} e *bla*_{SPM} não foram identificados. Resultado semelhante foi observado por SOLER (2011) em São Paulo para pesquisa de resistência a antibióticos em bactérias provenientes de peixes marinhos, onde os genes *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} e *bla*_{SPM-1} também não foram obtidos. O mesmo resultado foi

observado em isolados do gênero *Aeromonas* de amostras de diferentes ambientes aquáticos (BALSALOBRE, 2009; MOURA, 2010).

O único gene codificado do grupo MBL detectado neste estudo foi *bla_{CphA}*, constitutivo principalmente em espécies do gênero *Aeromonas*.

As bactérias do gênero *Aeromonas* são ubiqüitárias do ambiente aquático e consideradas importantes agentes patogênicos para peixes. A presença destas bactérias em pescados pode ser considerada um problema de saúde pública devido ao seu potencial patogênico ao homem causando diarreias e gastroenterite (CASTRO-ESCARPULLI et al., 2003).

Diversas pesquisas demonstram que o gene *bla_{CphA}* está amplamente disseminado em bactérias desse gênero isoladas de diferentes ambientes aquáticos e, a partir dessas informações é possível sugerir que esse gene pode estar presente em bactérias isoladas de peixes oriundos desses ambientes (BALSALOBRE, 2009; MOURA, 2010).

O gene *bla_{CphA}* foi detectado em 60% das amostras avaliadas neste estudo, contudo, a detecção de genes codificadores de resistência a antibióticos foi feita a partir de uma cultura mista, sem o isolamento de micro-organismo específico, não nos permitindo afirmar se os genes obtidos são provenientes de bactérias do gênero *Aeromonas*.

Pesquisas realizadas em São Paulo demonstraram a presença do gene *bla_{CphA}* em isolados de *Aeromonas* provenientes de ambientes aquáticos. Um estudo com cepas de *Aeromonas jandaei* e *Aeromonas hydrophila*, provenientes de ambientes aquáticos, identificou o gene *bla_{CphA}* em 97,6% e 100% das amostras respectivamente (BALSALOBRE, 2009). MOURA (2010) observou que 84% dos isolados provenientes de amostras de ambiente aquático foram positivas para o gene *bla_{CphA}*.

O potencial dano à saúde devido à administração de antibióticos de forma indiscriminada foi reforçado com um estudo na Tailândia, que revelou em 2013, a presença de um plasmídeo de múltipla resistência a drogas (MDR), chamado pR148, isolado de *A. hydrophila*, obtido de uma fazenda de tilápias (*Oreochromis niloticus*) (CASTILLO et al., 2013).

Os antibióticos β -lactâmicos estão aos poucos sendo substituídos por outros antimicrobianos para o tratamento de enfermidades em peixes devido à presença de resistência a esses compostos. A larga administração dos β -lactâmicos contribuiu para o aparecimento do fenômeno da resistência. A circulação de genes que conferem resistência a essa classe de antibióticos, como foi demonstrado no presente estudo, comprova o risco da disseminação dessa resistência.

5.2.2. Genes de resistência a tetraciclinas

Neste estudo foram identificados os genes *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetE*, *tetG*, *tetO*, *tetS* e *tetW* nas amostras.

Pesquisas corroboram com este achado, como na Austrália, onde os pesquisadores identificaram em todas as amostras de trutas de água doce o gene *tetC* (NDI e BARTON, 2011). Outro estudo realizado por JACOBS e CHENIA (2007) na África do Sul com tilápia (*Oreochromis mossambicus*), truta (*Oncorhynchus mykiss*) e carpa (*Cyprinus carpio*), resultou na identificação do *tetB* em 10,8% e *tetE* em 43,2%. Os autores verificaram que a maioria dos isolados foram obtidos a partir de tilápias (*O. mossambicus*), que não foram previamente expostas a antibióticos, tanto para fins terapêuticos, como para alimentação.

No mar Báltico, uma pesquisa com sedimentos provenientes de fazendas de peixes, revelou um número elevado dos genes *tet*, inclusive *tetC*, mesmo depois de vários anos sem a utilização de antibióticos nas criações, sugerindo assim que os genes de resistência a tetraciclina são altamente persistentes no meio ambiente (TAMMINEN et al., 2011). GAO et al. (2012) observaram a presença de genes *tetO* e *tetW* em peixes provenientes de fazendas na China.

Todos estes estudos corroboram o fato de que as tetraciclinas estão entre os antibióticos mais administrados na indústria aquícola (SAPKOTA et al., 2008; GRANADOS-CHINCHILLA et al., 2013).

Em relação ao mecanismo de resistência dos genes identificados no estudo, os genes *tetO*, *tetS* e *tetW* estão relacionados com a proteção ribossomal, conferindo elevado nível de resistência, enquanto os genes *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetE* e *tetG* estão

envolvidos com o mecanismo de efluxo, que é caracterizado por baixo nível de resistência (CHOPRA e ROBERTS, 2001; CESARE et al., 2013).

O genes *tetO* e *tetS* podem ser encontrados em plasmídeos conjugativos ou no cromossomo. O gene *tetE* difere dos genes *tetB*, *tetC* e *tetD*, pois está associado com grandes plasmídeos que não são móveis e nem conjugativos. Isto pode explicar sua distribuição limitada, a predominância em ambientes aquáticos e sua prevalência em sedimentos marinhos poluídos. Contudo, o gene *tetE* também pode estar localizado no cromossomo (CHOPRA e ROBERTS, 2001). No entanto, a maioria dos genes *tet* está associado a elementos genéticos móveis que conferem a capacidade de se disseminar entre as espécies (ROBERTS, 2005).

A distribuição generalizada de genes *tet* específicos, como o *tetB* ou *tetE* confirma a teoria de que esses genes são trocados por bactérias a partir de diversos ecossistemas, e também entre os seres humanos e animais de estimação e de produção, como no ambiente aquícola, além de serem identificados em amostras clínicas e em alimentos (CHOPRA e ROBERTS, 2001; BALASSIANO et al., 2007).

Entre os gêneros de bactérias relacionadas com pescados e que carregam os genes identificados neste estudo estão: *Yersinia* (*tetD*), *Edwardsiella* (*tetD*), *Plesiomonas* (*tetB* e *tetD*), *Providencia* (*tetB* e *tetE*), *Enterobacter* (*tetB*, *tetC* e *tetD*), *Proteus* (*tetB* e *tetC*), *Pseudomonas* (*tetC*, *tetE* e *tetG*), *Serratia* (*tetB*, *tetC* e *tetE*), *Citrobacter* (*tetB*, *tetC* e *tetD*), *Klebsiella* (*tetB*, *tetC* e *tetD*), *Shigella* (*tetB*, *tetC* e *tetD*), *Salmonella* (*tetB*, *tetC*, *tetD* e *tetG*), *Aeromonas* (*tetB*, *tetD* e *tetE*), *Vibrio* (*tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetE* e *tetG*), *Escherichia* (*tetB*, *tetC*, *tetD* e *tetE*), *Staphylococcus* (*tetO*), *Streptococcus* (*tetO*), *Enterococcus* (*tetO* e *tetS*) e *Bacillus* (*tetW*) (DEPAOLA e ROBERTS, 1995; CHOPRA e ROBERTS, 2001; BALASSIANO et al., 2007; GAO et al., 2012). O gênero *Bacillus*, por exemplo, é comumente encontrado na aquicultura, pois é amplamente utilizado como probiótico, inclusive na tilapicultura (MELLO, 2012).

A resistência às tetraciclinas é comum entre as bactérias gram-negativas que são colonizadoras de pescados. TAVARES (2001) descreveu a presença dos *tet A*, *B*, *C* e *D* em bactérias gram-negativas entéricas portadoras de plasmídeos.

Outros estudos revelaram que, além da alta prevalência de resistência a tetraciclina em *Aeromonas* (JACOBS e CHENIA, 2007), há ocorrência de elementos

genéticos móveis, incluindo plasmídeos e transposons, em isolados de *Aeromonas* não apenas em ambientes hospitalares, mas também na aquicultura (SON et al., 1997; RHODES et al., 2000; SCHMIDT et al., 2001; JACOBS e CHENIA, 2007).

Apesar deste estudo não ter identificado *tetA*, este gene é comumente encontrado na aquicultura (NDI e BARTON, 2011). Uma possível explicação para este fato é a correlação entre a ocorrência do gene *tetA* em bactérias do gênero *Escherichia* (CHOPRA e ROBERTS, 2001) e a ausência de indicadores da presença de coliformes termotolerantes neste trabalho.

5.3. Considerações finais

Neste estudo, 90% das amostras apresentaram pelo menos 3 genes de resistência e a ambas as classes de antimicrobianos testados (β -lactâmicos e tetraciclinas), sendo que a maioria dos genes foi identificada em tilápias frescas (amostras 6 a 10). Este resultado pode ser explicado pela maior quantidade de micro-organismos que colonizam naturalmente os produtos refrigerados quando comparados aos congelados.

Considerando a elevada presença de genes de resistência aos antimicrobianos observados no presente estudo, e o uso indiscriminado de β -lactâmicos e tetraciclinas na aquicultura, é possível sugerir que as falhas que ocorrem no tratamento desses animais possam ser devido à disseminação desses genes nos diferentes ambientes em que os peixes são cultivados. Na aquicultura, os diagnósticos de doenças são frequentemente presuntivos e as medidas terapêuticas adotadas ocorrem na ausência de dados confiáveis a respeito da resistência antimicrobiana de organismos patogênicos.

Todas as amostras analisadas continham genes de resistência, com exceção da amostra 2. Existem diversas possibilidades para que esta amostra não tenha apresentado genes, uma delas é que o filé de tilápia era congelado, desta forma, a carga bacteriana no produto era menor quando comparado ao filé fresco e consequentemente diminuindo as chances de identificar genes de resistência.

Outra possibilidade é que a empresa produtora deste filé de tilápia é a única entre as 8 marcas analisadas, que produz produtos orgânicos com certificação

orgânica. Embora a amostra 2 não possa ser considerada um produto orgânico, pois não havia nenhuma indicação na rotulagem, esse produto possivelmente é produzido em condições de ausência de antibióticos, conforme estabelece a legislação brasileira para o sistema de produção orgânico aquícola, como também, a administração de uma quantidade reduzida de antibióticos, possa ter diminuído as chances de identificar tais genes.

Desta forma, é plausível sugerir que com o manejo adequado e o controle da produção é possível diminuir a administração de medicamentos, especialmente antimicrobianos, ou até eliminá-los da criação e assim reduzir a incidência de genes que conferem resistência, os quais se tornaram uma ameaça à saúde pública nas últimas décadas.

Contudo, é importante lembrar que há estudos demonstrando que existem genes de resistência em produtos da aquicultura, mesmo sem a prévia exposição destes aos antibióticos (LIMA et al., 2006; CARNEIRO et al., 2007; JACOBS e CHENIA, 2007).

Em relação aos orgânicos, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), juntamente com o Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA), publicaram em 08 de junho de 2011, a Instrução Normativa Interministerial nº 28, que estabelece critérios para produção orgânica de organismos aquáticos (BRASIL, 2011). Entretanto, a base legal que rege o sistema de produção orgânica é a Lei Federal nº 10.831, de 23 de dezembro de 2003, que dispõe sobre agricultura orgânica e dá outras providências (BRASIL, 2003b).

A aquicultura orgânica tem grandes possibilidades de expansão, visto sua importância não apenas econômica para o Brasil, mas também na preservação do ecossistema, com a diminuição do uso de antibióticos e outros medicamentos, contribuindo assim para a redução da resistência bacteriana.

A redução progressiva na utilização de medicamentos nas criações de peixes será possível por meio de medidas mais rígidas quanto ao uso de antibióticos na aquicultura com legislações rigorosas e fiscalizações mais ativas por parte das autoridades governamentais. Além disso, a vigilância de genes de resistência em produtos de origem animal, ainda não faz parte da rotina dos órgãos fiscalizadores e

o monitoramento do resíduo de antibióticos no pescado pronto para consumo ainda é escasso.

Em relação aos produtos de origem animal, há uma grande variedade de estudos nessa área, contudo há carência de pesquisas na aquicultura. Existe elevada demanda sobre esse assunto, visto a rápida expansão do Brasil na produção de pescados nos últimos anos.

Portanto, este estudo contribui para reforçar a existência da circulação de genes que conferem resistência a antibióticos no ambiente aquícola e serve como alerta do risco da disseminação da resistência, pois foram encontrados genes que podem estar localizados em plasmídeos transmissíveis e desta forma, difundir cada vez mais a transferência horizontal de genes que é mecanismo essencial para muitas bactérias expressarem sua variabilidade genética.

6. CONCLUSÕES

- Conforme os parâmetros para pesquisa de coliformes termotolerantes da RDC n° 12/2001 (BRASIL, 2001), os produtos analisados estavam de acordo com as exigências, entretanto cabe frisar que o presente trabalho não teve por objetivo determinar se as amostras eram próprias ou impróprias para o consumo, mas demonstrar que há genes de resistência mesmo em um alimento com qualidade higiênico-sanitária satisfatória;
- A presença de genes de resistência aos antibióticos β -lactâmicos e tetraciclinas foi observada em 90% das amostras analisadas, verificando que há circulação de genes que conferem resistência aos antibióticos no ambiente aquícola, apesar de alguns serem constitutivos de bactérias da flora dos peixes e da água;
- A circulação de genes de resistência a antibióticos no ambiente verificada neste estudo, como os genes *bla*_{KPC-2}, *bla*_{SHV-28} e *tet*, demonstra o risco da transferência de resistência, visto a localização frequente destes em plasmídeos transmissíveis.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abraham EP, Newton GGF. The structure of cephalosporin C. *Biochem J*. 1961;79(2):377–393.

Akinbowale OL, Peng H, Barton MD. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. *J Appl Microbiol*. 2006;100:1103–1113.

Akinbowale OL, Peng H, Barton MD. Diversity of tetracycline resistance genes in bacteria from aquaculture sources in Australia. *J Appl Microbiol*. 2007a;103:2016–2025.

Akinbowale OL, Peng H, Grant P, Barton MD. Antibiotic and heavy metal resistance in motile aeromonads and pseudomonads from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Australia. *Int J Antimicrob Agents*. 2007b;30:177–182.

Alanis AJ. Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era? *Arch Med Res*. 2005;36:697–705.

Almeida Filho ES, Sigarini CO, Ribeiro JN, Delmondes EC, Stelatto E, Araujo Jr A. Características microbiológicas de "pintado" (*Pseudoplatystoma fasciatum*) comercializado em supermercados e feira livre, no município de Cuiabá - MT. *Revista Higiene Alimentar*. 2002;16(99):84–88.

Almeida ACS, Cavalcanti FLS, Martins WMB, Vilela MA, Gales AC, Morais Jr MA, Morais MMC. First description of KPC-2-producing *Klebsiella oxytoca* in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(8):4077–4078.

Ambler RP. The structure of β -lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1980;289:321–331.

Aminov RI, Chee-Sanford JC, Garrigues N, Teferedegne B, Krapac IJ, White BA, Mackie RI. Development, validation, and application of PCR primers for detection of tetracycline efflux genes of gram-negative bacteria. 2002;68(4):1786-1793.

Andersson DI, Hughes D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? Nat Rev Microbiol. 2010;8:260–271.

Andersson DI, Hughes D. Persistence of antibiotic resistance in bacterial populations. FEMS Microbiol Rev. 2011;35:901–911.

Andrade LN. Estudo fenotípico e molecular de beta-lactamases de espectro estendido e AmpC em enterobactérias isoladas de pacientes com suspeita de meningite [dissertação de mestrado]. Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da USP; 2008.

Andrade LN, Curiao T, Ferreira JC, Longo JM, Clímaco EC, Martinez R, Rodrigues FB, Filho AB, Evaristo MA, Peloso PFD, Ribeiro VB, Barth AL, Paula MC, Baquero F, Cantón R, Darini ALC, Coque TM. Dissemination of *bla*_{KPC-2} by the spread of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 258 clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among *Enterobacteriaceae* species in Brazil. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55:3579–3583.

Angulo FJ, Nargund VN, Chiller TC. Evidence of an association between use of antimicrobial agents in food animals and antimicrobial resistance among bacteria isolated from humans and the human health consequences of such resistance. J Vet Med B. 2004;51:374–379.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária [homepage na Internet] [acesso em 21 mai 2014]. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/>

Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, Kurokawa H, Yagi T, Fujiwara H, Goto M. Convenient test for screening metallo- β -lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J Clin Microbiol*. 2000;38(1):40-43.

Armstrong GL, Conn LA, Pinner RW. Trends in infectious disease mortality in the United States during the 20th century. *JAMA*. 1999;281:61–66.

Balassiano IT, Bastos MCF, Madureira DJ, Silva IG, Freitas-Almeida AC, Oliveira SS. The involvement of *tetA* and *tetE* tetracycline resistance genes in plasmid and chromosomal resistance of *Aeromonas* in Brazilian strains. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102(7):861-866.

Balsalobre LC. Pesquisa de genes codificadores de enterotoxinas e β -lactamases em *Aeromonas jandaei* e *Aeromonas hydrophila* provenientes de ambientes aquáticos [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2009.

Balsalobre LC, Dropa M, Lincopan N, Mamizuka EM, Matté GR, Matté MH. Detection of metallo- β -lactamases-encoding genes in environmental isolates of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas jandaei*. *Lett Appl Microbiol*. 2009;49:142-145.

Benbrook CM. Antibiotic Drug Use in U.S. Aquaculture. The Northwest Science and Environmental Policy Center Sandpoint, Idaho. 2002 [acesso em 23 ago 2012]. Disponível em: http://m.iatp.org/files/421_2_37397.pdf

Beyruth Z, Mainardes-Pinto CSR, Fusco SM, Faria FC, Silva AL. Utilização de alimentos naturais por *Oreochromis niloticus* em tanques de terra com arraçoamento. *B Inst Pesca*, São Paulo (SP). 2004;30(1):9-24.

Bhullar K, Waglechner N, Pawlowski A, Koteva K, Banks ED, Johnston MD, Barton HA, Wright GD. Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *PLoS One*. 2012;7(4):1-11.

Bleicher A, Schöfl G, Rodicio MDR, Saluz HP. The plasmidome of a *Salmonella enterica* serovar Derby isolated from pork meat. *Plasmid*. 2013;69(3):202-210.

Bonnet R. Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents and Chemother*. 2004;48(1):1-14.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. *Diário Oficial da União*, Brasília (DF), 10 jan 2001 [acesso em 21 mai 2014]. Disponível em www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RDC nº 253, de 16 de setembro de 2003a. Criação do Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal – PAMVet. *Diário Oficial da União*, Brasília (DF), 18 set 2003 [acesso em 21 mai 2014]. Disponível em www.anvisa.gov.br

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Instrução Normativa nº 42, de 20 de dezembro de 1999. Altera o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal - PNCR e os Programas de Controle de Resíduos em Carne - PCRC, Mel – PCRM, Leite – PCRL e Pescado – PCRP. *Diário Oficial da União*, Brasília (DF), 22 dez 1999 [acesso em 21 mai 2014]. Disponível em www.agricultura.gov.br/

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Lei nº 10.831, de 23 de dezembro de 2003b. Dispõe sobre a agricultura orgânica e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília (DF), 23 dez 2003 [acesso em 24 jan 2014]. Disponível em www.agricultura.gov.br/

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Instrução Normativa nº 28, de 8 de junho de 2011. Estabelecer normas técnicas para os

sistemas orgânicos de produção aquícola a serem seguidos por toda a pessoa física ou jurídica responsável por unidades de produção em conversão ou por sistemas orgânicos de produção, na forma desta Instrução Normativa Interministerial e seus Anexos de I a VI. Diário Oficial da União, Brasília (DF), 9 jun 2011 [acesso em 24 jan 2014]. Disponível em www.agricultura.gov.br/

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Instrução Normativa SDA nº 11, de 07 de maio de 2014a. Publicar o Subprograma de Monitoramento em Carnes (Bovina, Aves, Suína e Equina), Leite, Pescado, Mel e Ovos para o exercício de 2014, referente ao Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes - PNCRC, na forma dos Anexos I e II à presente Instrução Normativa. Diário Oficial da União, Brasília (DF), 07 mai 2014 [acesso em 21 mai 2014]. Disponível em www.agricultura.gov.br/

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Portaria SDA nº 60, de 07 de maio de 2014b. Publicar os resultados do acompanhamento dos Programas de Controle de Resíduos e Contaminantes dos subprogramas de monitoramento e exploratório em Carnes (Bovina, Suína, de Aves, de Avestruz e Equina), em Leite, Ovos, Mel e Pescado do exercício de 2013, na forma dos Anexos à presente Portaria, em conformidade com a Instrução Normativa nº 17, de 29 de maio de 2013. Diário Oficial da União, Brasília (DF), 07 mai 2014 [acesso em 21 mai 2014]. Disponível em www.agricultura.gov.br/

Burridge L, Weis J, Cabello F, Pizarro J. Chemical use in salmon aquaculture: a review of current practices and possible environmental effects; 2008 [acesso em 20 ago 2012]. Disponível em: www.worldwildlife.org/what/globalmarkets/aquaculture/WWFBinaryitem8842.pdf

Bush K. Alarming β -lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. Curr Opin Microbiol. 2010;13:558-564.

Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39:1211-1233.

Bush K, Jacoby GA. Amino acid sequences for TEM, SHV and OXA extended-spectrum and inhibitor resistant β -lactamases. Lahey Clinic [homepage na internet] 2014. [acesso em 25 jul 2014]. Disponível em: <http://www.lahey.org/studies>

Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob Agents and Chemother*. 2010;54(3):969-976.

Cabello FC. Antibióticos y acuicultura en Chile: consecuencias para la salud humana y animal. *Rev Méd Chile*. 2004;132:1001-1006.

Cabello FC. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ Microbiol*. 2006;8(7):1137-1144.

Cantón R, Coque TM. The CTX-M β -lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol*. 2006;9:466–475.

Cantón R, Morosini M-I. Emergence and spread of antibiotic resistance following exposure to antibiotics. *FEMS Microbiol Rev*. 2011;35:977–991.

Cantón R, González-Alba JM, Galán JC. CTX-M enzymes: origin and diffusion. *Front Microbiol*. 2012;3(110):1-19.

Cao V, Lambert T, Nhu DQ, Loan HK, Hoang NK, Arlet G, Courvalin P. Distribution of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Vietnam. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46:3739-3743.

Cardoso NLC, André MCDPB, Serafini AB. Avaliação microbiológica de carne de peixe comercializada em supermercados da cidade de Goiânia (GO). *Revista Higiene Alimentar*. 2003;17(109):81-87.

Carneiro DO, Figueiredo HCP, Pereira Jr DJ, Leal CAG, Logato PVR. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas em diferentes sistemas de cultivo de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2007;59(4):869-876.

Carraschi SP. Ecotoxicidade e eficácia da oxitetraciclina e do florfenicol contra infecção experimental por *Aeromonas hydrophila* e aspectos histopatológicos em pacu (*Piaractus mesopotamicus*) [dissertação de mestrado]. Jaboticabal: Centro de Aquicultura da UNESP; 2010.

Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR. Molecular characterization of a β -lactamase gene, *bla*_{GIM-1}, encoding a new subclass of metallo- β -lactamase. *Antimicrob Agents and Chemother*. 2004;48:4654-4661.

Castillo CSdel, Hikima JJ, Jang HB, Nho SW, Jung TS, Wongtavatchai J, Kondo H, Hirano I, Takeyama H, Aoki T. Comparative sequence analysis of a multidrug-resistant plasmid from *Aeromonas hydrophila*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2013;57(1):120-129.

Castro-Escarpulli G, Figueras MJ, Aguilera-Arreola G, Soler L, Fernández-Rendón E, Aparicio GO, Guarro J, Chacón MR. Characterization of *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. *Int J Food Microbiol*. 2003;84:41–49.

Cesare AD, Luna GM, Vignaroli C, Pasquaroli S, Tota S, Paroncini P, Biavasco F. Aquaculture can promote the presence and spread of antibiotic-resistant Enterococci in marine sediments. *PLoS One*. 2013;8(4):1-8.

Chapman PA, Ellin M, Ashton R, Shafique W. Comparison of culture, PCR and immunoassays for detecting *Escherichia coli* O157 following enrichment culture and immunomagnetic separation performed on naturally contaminated raw meat products. *Int J Food Microbiol*. 2001;68:11-20.

Chen SW, Zhang RZ, Lu YM, He L, Wang SY, Mu XK. A novel LEN-derived beta-lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Chin Med J (Engl)*. 2005;118(16):1380-1383.

Chen YT, Lauderdale TL, Liao TL, Shiau YR, Shu HY, Wu KM, Yan JJ, Su IJ, Tsai SF. Sequencing and comparative genomic analysis of pK29, a 269-kilobase conjugative plasmid encoding CMY-8 and CTX-M-3 β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents and Chemother*. 2007;51(8):3004-3007.

Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2001;65(2):232-260.

Čížek A, Dolejská M, Sochorová R, Strachotová K, Piačková V, Veselý T. Antimicrobial resistance and its genetic determinants in aeromonads isolated in ornamental (koi) carp (*Cyprinus carpio koi*) and common carp (*Cyprinus carpio*). *Vet Microbiol*. 2010;142:435–439.

Coelho A, González-López JJ, Miró E, Alonso-Tarrés C, Mirelis B, Larrosa MN, Bartolomé RM, Andreu A, Navarro F, Jonson JR, Prats G. Characterization of the CTX-M-15-encoding gene in *Klebsiella pneumoniae* strains from the Barcelona metropolitan area: plasmid diversity and chromosomal integration. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;36:73-78.

Costa AB. Caracterização de bactérias do complexo *Aeromonas* isoladas de peixes de água doce e sua atividade patogênica [tese de doutorado]. Piracicaba (SP): Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da USP; 2003.

D'Costa VM, King CE, Kalan L, Morar M, Sung WWL, Schwarz C, Froese D, Zazula G, Calmels F, Debruyne R, Golding GB, Poinar HN, Wright GD. Antibiotic resistance is ancient. *Nature*. 2011;477:457–461.

Dang H, Zhang X, Song L, Chang Y, Yang G. Molecular determination of oxytetracycline-resistant bacteria and their resistance genes from mariculture environments of China. *J Appl Microbiol*. 2007;103:2580-2592.

Das A, Saha D, Pal J. Antimicrobial resistance and in vitro gene transfer in bacteria isolated from the ulcers of EUS-affected fish in India. *Lett Appl Microbiol*. 2009;49:497-502.

Daskalov H. The importance of *Aeromonas hydrophila* in food safety. *Food Control*. 2006;6:474–483.

DePaola A, Roberts MC. Class D and E tetracycline resistance determinants in gram-negative bacteria from catfish ponds. *Mol Cell Probes*. 1995;9:311-313.

Donati V, Feltrin F, Hendriksen RS, Svendsen CA, Cordaro G, Fernández AG, Lorenzetti S, Lorenzetti R, Battisti A, Franco A. Extended-spectrum-beta-lactamases, AmpC beta-lactamases and plasmid mediated quinolone resistance in *Klebsiella* spp. from companion animals in Italy. *PLoS One*. 2014;9(3):1-7.

Dropa M. Disseminação da resistência a antimicrobianos em cepas clínicas e ambientais de *Enterobacteriaceae*: identificação e mapeamento do ambiente genético de genes codificadores de ESBL [dissertação de doutorado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2013.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Responsible use of antibiotics in aquaculture, 2005:8 [acesso em 15 set 2012]. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0282e/a0282e00.pdf>

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Aquaculture Production Statistics 2006 [acesso em 28 out 2012]. Disponível em: <http://www.fao.org>

FAO, The state of world fisheries and aquaculture 2012. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. 2012:209 [acesso em 27 out 2012]. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/016/i2727e/i2727e00.htm>

Ferreira CSG, Nunes BA, Henriques-Almeida JMM, Guilhermino L. Acute toxicity of oxytetracycline and florfenicol to the microalgae *Tetraselmis chuii* and to the crustacean *Artemia parthenogenetica*. Ecotox Environ Safety. 2007;67:452–458.

Fey PD, Safranek TJ, Rupp ME, Dunne EF, Ribot E, Iwen PC, Bradford PA, Angulo FJ, Hinrichs SH. Ceftriaxone-resistant *Salmonella* infection acquired by a child from cattle. N Engl J Med. 2000;342:1242–1249.

Franceschini N, Caravelli B, Docquier JD, Galleni M, Frère JM, Amicosante G, Rossolini GM. Purification and biochemical characterization of the VIM-1 metallo- β -lactamase. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44(11):3003-3007.

Fevre C, Jbel M, Passet V, Weill F-X, Grimont PAD, Brisse S. Six groups of the OXY β -lactamase evolved over millions of years in *Klebsiella oxytoca*. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(8):3453–3462.

Gales AC, Castanheira M, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial resistance among gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008–2010). Diagn Microbiol Infect Dis. 2012;73(4):354-360.

Gama CS. A criação de tilápia no estado do Amapá como fonte de risco ambiental. Acta Amazônica. 2008;38(3):525-530.

Gatti Jr P. Qualidade higiênica e sanitária de tilápias provenientes de cultivo, comercializadas no varejo [dissertação de mestrado]. Jaboticabal: Centro de Aquicultura da UNESP; 2011.

Gao P, Mao D, Luo Y, Wang L, Xu B, Xu L. Occurrence of sulfonamide and tetracycline-resistant bacteria and resistance genes in aquaculture environment. *Water Res.* 2012;46(7):2355-2364.

Granados-Chinchilla F, Arias-Andres M, Rodriguez C. Tetracycline and 4-epitetracycline modified the *in vitro* catabolic activity and structure of a sediment microbial community from a tropical tilapia farm idiosyncratically. *J Environ Sci Health B.* 2013;48(4):291-301.

Haeggman S, Lofdahl S, Paauw A, Verhoef J, Brisse S. Diversity and evolution of the class A chromosomal β -lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents and Chemother.* 2004;48(7):2400-2408.

Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser.* 1999;41:95-98.

Hawkey PM. Molecular epidemiology of clinically significant antibiotic resistance genes. *Br J Pharmacol.* 2008;153:406-413.

Hawkey PM, Jones AM. The changing epidemiology of resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2009;64:3-10.

Hosoglu S, Gundes S, Kolayli F, Karadenizli A, Demirdag K, Gunaydin M, Altindis M, Caylan R, Ucmak H. Extended-spectrum β -lactamases in ceftazidime-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in Turkish hospitals. *Indian J Med Microbiol.* 2007;25(4):346-350.

Imada A, Kitano K, Kintaka K, Muroi M, Asai M. Sulfazecin and isosulfazecin, novel β -lactam antibiotics of bacterial origin. *Nature*. 1981;289(5798):590–591.

Jacobs L, Chenia HY. Characterization of integrons and tetracycline resistance determinants in *Aeromonas* spp. isolated from South African aquaculture systems. *Int J Food Microbiol*. 2007;114:295–306.

Jacoby GA, Munoz-Price LS. The new β -lactamases. *N Engl J Med*. 2005;352:380–391.

Jacoby GA. AmpC β -lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22(1):161–182.

Jiang HX, Tang D, Liu YH, Zhang XH, Zeng ZL, Xu L, Hawkey PM. Prevalence and characteristics of β -lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Escherichia coli* isolated from farmed fish in China. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67:2350-2353.

Kazimierczak KA, Scott KP. Antibiotics and resistance genes: influencing the microbial ecosystem in the gut. *Adv Appl Microbiol*. 2007;62:269–292.

Kong K-F, Schneper L, Mathee K. β -lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. *The Authors Journal Compilation 2009 APMIS*. 2009;118:1–36.

Kubitza F. Antecipando-se às doenças na tilapicultura. *Panorama da Aquicultura*. 2005;15(89):15-23.

Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, Rossolini GM. Cloning and characterization of *bla_{VIM}*, a new integron borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents and Chemother*. 1999;43:1584-1590.

Lee K, Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier JD, Rossolini GM, Chong Y. Novel acquired metallo- β -lactamase gene, *bla*_{SIM-1}, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob Agents and Chemother*. 2005;49:4485-4491.

Lemos JB, Rodrigues MEB, Lopes JP. Diagnóstico de ectoparasitas e bactérias em tilápias (*Oreochromis niloticus*) cultivadas na região de Paulo Afonso, Bahia. *Rev Bras Eng Pesca*. 2006;1(1):75-90.

Lerner PI. Producing penicillin. *N Engl J Med*. 2004;351:524.

Librelato FR, Shikida SARL. Segurança alimentar: um estudo multidisciplinar de qualidade do filé de tilápia comercializado no município de Toledo-PR. *Revista Informe GEPEC (Grupo de Pesquisa em Agronegócio e Desenvolvimento Regional)*. 2005;9(2).

Liebana E, Batchelor M, Torres C, Brinas L, Lagos LA, Abdalhamid B, Hanson ND, Martinez-Urtaza J. Pediatric infection due to multiresistant *Salmonella enterica* serotype infantis in Honduras. *J Clin Microbiol*. 2004;42:4885-4888.

Lima RMS, Figueiredo HCP, Faria FC de, Picolli RH, Filho JS de SB, Logato PVR. Resistência a antimicrobianos de bactérias oriundas de ambiente de criação e filés de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Ciênc agrotec, Lavras (MG)*. 2006;30(1):126-132.

Livermore DM. Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens. *Korean J Intern Med*. 2012;27:128-142.

Lorenzon CS. Perfil microbiológico de peixes e água de cultivo em pesque-pagues situados na região nordeste do Estado de São Paulo [dissertação de mestrado]. Jaboticabal: Centro de Aquicultura da UNESP; 2009.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento [homepage na Internet] [acesso em 21 mai 2014]. Disponível em: www.agricultura.gov.br/animal/qualidade-dos-alimentos/residuos-e-contaminantes

Mello H. *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis* na suplementação dietária de juvenis de tilápias-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) e seu efeito probiótico [dissertação de mestrado]. Jaboticabal: Centro de Aquicultura da UNESP; 2012.

Mendes RE, Castanheira M, Pignatari ACC, Gales AC. Metallo- β -lactamases. J Bras Patol Med Lab. 2006;42(2):103-113.

Miranda CD, Kehrenberg C, Ulep C, Schwarz S, Roberts MC. Diversity of tetracycline resistance genes in bacteria from Chilean salmon farms. Antimicrob Agents Chemother. 2002;47:883-888.

Miranda CD. Antimicrobial resistance associated with salmonid farming. In: Keen PL, Montforts MHHM. Antimicrobial Resistance in the Environment. Hoboken (NJ): Wiley-Blackwell; 2012:29.

Mitsuhashi S, Inoue M. Mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics. New York: Springer-Verlag. 1981.

MPA - Ministério da Pesca e Aquicultura [homepage na Internet] [acesso em 15 dez 2012]. Disponível em: www.mpa.gov.br

Moura EMM. Análise do perfil de resistência a antibióticos e detecção dos genes de virulência e resistência em *Aeromonas* provenientes de amostras ambientais [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2010.

Naas T, Cuzon G, Villegas M-V, Lartigue M-F, Quinn JP, Nordmann P. Genetic structures at the origin of acquisition of the β -lactamase *bla*_{KPC} gene. Antimicrob Agents and Chemother. 2008;52(4):1257-1263.

Nagarajan R, Boeck LD, Gorman M, Hamill RL, Higgins CE, Hoehn MM, Stark WM, Whitney JG. β -lactam antibiotics from *Streptomyces*. J Am Chem Soc 1971;93(9):2308–2310.

Ndi OL, Barton MD. Incidence of class 1 integron and other antibiotic resistance determinants in *Aeromonas* spp. from rainbow trout farms in Australia. J Fish Dis. 2011;34:589–599.

Nielsen JB, Skov MN, Jørgensen RL, Heltberg O, Hansen DS, Schønning K. Identification of CTX-M15-, SHV-28-producing *Klebsiella pneumoniae* ST15 as an epidemic clone in the Copenhagen area using a semi-automated Rep-PCR typing assay. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2011;30:773–778.

Nonaka L, Ikeno K, Suzuki S. Distribution of tetracycline resistance gene, *tet*(M), in gram-positive and gram-negative bacteria isolated from sediment and seawater at a coastal aquaculture site in Japan. Microbes Environ. 2007;22:355-364.

Oliveira CF, Forno NLFD, Alves IA, Horta JA, Rieger A, Alves SH. Prevalência das famílias TEM, SHV e CTX-M de β -lactamases de espectro estendido em *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp no Hospital Universitário de Santa Maria, (RS). Rev Soc Bras Med Trop. 2009;42(5):556-560.

Oliveira DE. Caracterização, pesquisa dos genes de virulência e β -lactamases em *Aeromonas hydrophila* provenientes de esgoto e lodo tratados [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2011.

Oliveira S, Moura RA, Silva KC, Pavez M, McCulloch JA, Dropa M, Matté MH, Mamizuka EM, Sato MIZ, Castro AFP, Lincopan N. Isolation of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains belonging to the high-risk multiresistant clonal complex 11 (ST437 and ST340) in urban rivers. J Antimicrob Chemother. 2014;69(3):849-852.

Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R, Ohta M, Horii T, Ito H, Yoshimura F, Kato N. Molecular characterization of an enterobacterial metallo- β -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob Agents and Chemother.* 1994;38:71-78.

Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18:657-686.

Pereira PS, de Araujo CFM, Seki LM, Zahner V, Carvalho-Assef APDA, Asensi MD. Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). *J Antimicrob Chemother.* 2013;68:312–316.

Petersen A, Dalsgaard A. Antimicrobial resistance of intestinal *Aeromonas* spp. and *Enterococcus* spp. in fish cultured in integrated broiler-fish farms in Thailand. *Aquaculture.* 2003;219:71–82.

Picão RC, Cardoso JP, Campana EH, Nicoletti AG, Petrolini FVB, Assis DM, Juliano L, Gales AC. The route of antimicrobial resistance from the hospital effluent to the environment: focus on the occurrence of KPC-producing *Aeromonas* spp. and *Enterobacteriaceae* in sewage. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013;76:80-85.

Pitout JD, Hossain A, Hanson ND. Phenotypic and molecular detection of CTX-M- β -lactamases produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *J Clin Microbiol.* 2004;42(12):5715-5721.

Poirel L, Rodríguez-Martínez J, Al Naiemi N, Debets-Ossenkopp Y, Nordmann P. Characterization of *bla*_{DIM-1}, a novel an integron-located metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas stutzeri* clinical isolate in the Netherlands. In: *Anais do 19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID).* Helsinki, Finland. 2009:16-19.

Pupo, HDD. Diversidade da microbiota gram-negativa em sistemas de cultivo de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) [dissertação de mestrado]. Lavras: Universidade Federal de Lavras; 2006.

Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. Clin Microbiol Rev. 2007;20:440–458.

Rall VLM, Cardoso KFG, Xavier C. Enumeração de coliformes termotolerantes em pescados frescos e congelados. Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia, Londrina, 2008;2(39):1-8.

Raskine L, Borrel I, Barnaud G, Boyer S, Hanau-Berçot B, Gravis J, Labia R, Arlet G, Sanson-Le-Pors MJ. Novel plasmid-encoded class C β -lactamase (MOX-2) in *Klebsiella pneumoniae* from Greece. Antimicrob Agents Chemother. 2002;46(7):2262-2265.

Reisbig MD, Hanson ND. Promoter sequences necessary for high-level expression of the plasmid-associated AmpC β -lactamase gene *bla_{MIR-1}*. Antimicrob Agents Chemotherapy. 2004;48(11):4177-4182.

Rhodes G, Huys G, Swings J, McGann P, Hiney M, Smith P, Pickup RW. Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between aeromonads in hospital and aquaculture environments: Implication of Tn1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant *tetA*. Appl Environ Microbiol. 2000;66:3883–3890.

Richmond MH, Sykes RB. The β -lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. Adv Microb Physiol. 1973;9:31–88.

Roberts MC. Tetracycline therapy: update. Clin Infect Dis. 2003;36:462–467.

Roberts MC. Update on acquired tetracycline resistance genes. FEMS Microbiol Lett. 2005;245:195-203.

Rodrigues SCB. Certificação orgânica: uma alternativa para a aquicultura no Brasil [monografia de especialização]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2012.

Rolain JM. Food and human gut as reservoirs of transferable antibiotic resistance encoding genes. Front Microbiol. 2013;4(173):1-10.

Saavedra MJ, Guedes-Novais S, Alves A, Rema P, Tação M, Correia A, Martínez-Murcia A. Resistance to β -lactam antibiotics in *Aeromonas hydrophila* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Int Microbiol. 2004;7(3):207-211.

Samuelsen Ø, Naseer U, Tofteland S, Skutlaberg DH, Onken A, Hjetland R, Sundsfjord A, Giske CG. Emergence of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates of sequence type 258 producing plasmid-mediated KPC carbapenemase in Norway and Sweden. J Antimicrob Chemother. 2009;63:654–658.

Sapkota AR, Kucharski M, Burke J, McKenize S, Walker P, Lawrence R. Aquaculture practices and potential human health risks: current knowledge and future priorities. Environ Int. 2008;34(8):1215–1226.

Scheffer MC. Genotipagem e pesquisa de metalo- β -lactamases em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos [dissertação de mestrado]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2008.

Schmidt AS, Bruun MS, Dalsgaard I, Larsen JL. Incidence, distribution and spread of tetracycline resistance determinants and integrin-associated antibiotic resistance genes among motile aeromonads from a fish farming environment. Appl Environ Microbiol. 2001;67:5675–5682.

Scott KP. The role of conjugative transposons in spreading antibiotic resistance between bacteria that inhabit the gastrointestinal tract. *Cell Mol Life Sci.* 2002;59(12):2071–2082.

Sefton AM. Mechanisms of antimicrobial resistance: their clinical relevance in the new millennium. *Drugs.* 2002;62(4):557–566.

Seki LM, Pereira PS, de Souza MPAH, Conceição MS, Marques EA, Porto CO, Colnago EML, Alves CFM, Gomes D, Assef APDAC, Samuelsen Ø, Asensi MD. Molecular epidemiology of KPC-2- producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Brazil: the predominance of sequence type 437. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011;70:274–277.

Sekiguchi J-I, Morita K, Kitao T, Watanabe N, Okazaki M, Miyoshi-Akiyama T, Kanamori M, Kirikae T. KHM-1, a novel plasmid-mediated metallo- β -lactamase from a *Citrobacter freundii* clinical isolate. *Antimicrob Agents and Chemother.* 2008;54(11):4194-4197.

Shlaes DM. An update on tetracyclines. *Curr Opin Investig Drugs.* 2006;7(2):167-171.

Shlaes DM, Gerding DN, John Jr JF, Craig WA, Bornstein DL, Duncan RA, Eckman MR, Farrer WE, Greene WH, Lorian V, Levy S, McGowan Jr JE, Paul SM, Ruskin J, Tenover FC, Watanakunakorn C. SHEA position paper: Society for Healthcare Epidemiology of America and Infectious Diseases Society of America Joint Committee on the prevention of antimicrobial resistance: guidelines for the prevention of antimicrobial resistance in hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1997;18(4):275-291.

Siebor E, Péchinot A, Duez JM, Neuwirth C. One new LEN enzyme and two new OKP enzymes in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates and proposed nomenclature

for chromosomal beta-lactamases of this species. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(7):3097-3098.

Silva ML. Pesquisa de *Aeromonas* spp., *Vibrio* spp. e da qualidade sanitária de peixes comercializados na cidade de São Paulo [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2007.

Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. 2ª ed. São Paulo (SP): Varela; 2001:259-267.

Soler KAGS. Isolamento e identificação molecular de *Vibrio metschnikovii* em amostras ambientais e análise do perfil de suscetibilidade a antibióticos [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2011.

Son R, Rusul G, Sahilah AM, Zainuri A, Raha AR, Salmah I. Antibiotic resistance and plasmid profile of *Aeromonas hydrophila* isolates from cultured fish, telapia (*Telapia mossambica*). *Lett Appl Microbiol.* 1997;24:479–482.

Sørum H. Mobile drug resistance genes among fish bacteria. *APMIS Suppl.* 1998;84: 74–76.

Steffee CH. Alexander Fleming and penicillin. The chance of a lifetime? *N C Med J.* 1992;53:308–310.

Sykes R. The 2009 Garrod lecture: the evolution of antimicrobial resistance: a Darwinian perspective. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65:1842–1852.

Sykes RB, Cimarusti CM, Bonner DP, Bush K, Floyd DM, Georgopapadakou NH, Koster WH, Liu WC, Parker WL, Principe PA, Rathnum ML, Slusarchyk WA, Trejo WH, Wells JS. Monocyclic β -lactam antibiotics produced by bacteria. *Nature.* 1981;291:489–491.

Tamminen M, Karkman A, Lõhmus A, Muziasari WI, Takasu H, Wada S, Suzuki S, Virta M. Tetracycline resistance genes persist at aquaculture farms in the absence of selection pressure. *Environ Sci Technol*. 2011;45(2):386-391.

Tavares W. Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos. São Paulo: Atheneu, 2001.

Tavares W. Antibióticos e quimioterápicos para o clínico. 2^a ed. São Paulo: Atheneu, 2009.

Thaker M, Spanogiannopoulos P, Wright GD. The tetracycline resistome. *Cell Mol Life Sci*. 2010;67:419–431.

Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ, Jones RN, Walsh TR. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother*. 2002;50:673-679.

Toleman MA, Bennett PM, Walsh TR. ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? *Microbiol Mol Biol Rev*. 2006;70:296-316.

Tolentino FM. Detecção e identificação dos genes de β -lactamases *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}* e *bla_{CTX-M}* em *Klebsiella pneumoniae* isoladas em um Hospital Terciário do Estado de São Paulo [dissertação de mestrado]. São José do Rio Preto: Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da UNESP; 2009.

Toro M, Seral C, Rojo-Bezares B, Torres C, Castillo FJ, Sáenz Y. Resistencia a antibióticos y factores de virulencia en aislados clínicos de *Salmonella enterica*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2014;32(1):4-10.

Tusevliak N, Dutil L, Rajic A, Uhland FC, McClure C, St-Hilaire S, Reid-Smith RJ, McEwen SA. Antimicrobial use and resistance in aquaculture: findings of a globally

administered survey of aquaculture-allied professionals. *Zoonoses Public Health*; 2013;60(6):426-436.

Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev*. 2005;18(2):306-325.

Walsh TR. Emerging carbapenemases: a global perspective. *Int J Antimicrob Agents* 2010;36(Suppl 3):S8-S14.

Walther-Rasmussen J, Hoiby N. Class A carbapenemases. *J Antimicrob Chemother*. 2007;60:470–482.

Well JS, Trejo WH, Bush K, Georopadakou NH, Bonner DP, Sykes RB. EM5400, a family of monobactam antibiotics produced by *Agrobacterium radiobacter*. I. Taxonomy, fermentation and biological properties. *J Antibiot*. 1982;35(3):295-299.

Woodford N, Turton JF, Livermore DM. Multiresistant gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS (Federation of European Microbiological Societies) Microbiol Rev*. 2011;35:736-755.

Ye Y, Xu XH, Li JB. Emergence of CTX-M-3, TEM-1 and a new plasmid-mediated MOX-4 AmpC in a multiresistant *Aeromonas caviae* isolate from a patient with pneumonia. *J Med Microbiol*. 2010;59:843-847.

Yong D, Bell JM, Ritchie B, Pratt R, Toleman MA, Walsh TR. A novel sub-group metallo- β -lactamase (MBL), AIM-1 emerges in *Pseudomonas aeruginosa* (PSA) from Australia, abstr. C1-593, p. 75. Abstr. 47th Intersci Cof Antimicrob Agents Chemother American Society for Microbiology, Washington, DC, 2007.

Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, Walsh TR. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, *bla*_{NDM-1}, and a novel

erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. Antimicrob Agents and Chemother. 2009;53(12):5046-5054.