



Ciências Agrária

## **Prevalência e perfil de resistência de *Salmonella* spp. isoladas de tambaqui cultivados em tanques escavados**

Julia Paes Mota<sup>1</sup>, Cláudia Majolo<sup>2</sup>

### **Resumo**

Sabe-se que a produção nacional de peixes é crescente, com destaque para a região norte no cultivo de peixes nativos. No estado do Amazonas, o tambaqui (*Colossoma macropomum*) é a principal espécie cultivada, porém, bactérias do gênero *Salmonella* têm representado um entrave para a produção e representam um grande risco ao público consumidor. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a prevalência e o perfil de resistência de bactérias do gênero *Salmonella* spp. em tambaquis cultivados em tanques escavados no município de Manacapuru/AM. Para isto, foram coletados 15 tambaquis por propriedade, cinco por tanque escavado de um total de três propriedades (n: 45) de Manacapuru/AM. Desses peixes, fragmentos de fezes foram amostrados diretamente do intestino para isolamento e identificação bacteriana. Após a identificação, os isolados foram testados quanto a sua resistência à antibióticos convencionais por meio da técnica de disco-difusão. O presente trabalho detectou a presença de *Salmonella* spp. no intestino de três animais (prevalência de 6,67%). Os isolados demonstraram sensibilidade a todos os antibióticos testados pela técnica de disco-difusão (amicacina, ampicilina, cefotaxima, ciprofloxacina, cloranfenicol, gentamicina, imipenem, levofloxacina, meropenem, tetracilina).

**Palavras-chave:** *Colossoma macropomum*, patógeno alimentar, antibiótico, enterobactéria

**Prevalence and resistance profile of *Salmonella* spp. isolated from tambaqui cultivated in excavated tanks.** It is known that the national production of fish is growing, with emphasis on the northern region in the cultivation of native fish. In the state of Amazonas, tambaqui (*Colossoma macropomum*) is the main cultivated species, however, bacteria of the genus *Salmonella* have represented an obstacle to production and represent a great risk to the consuming public. Therefore, the objective of this work was to evaluate the prevalence and resistance profile of bacteria of the genus *Salmonella* spp. in tambaquis cultivated in excavated tanks in the municipality of Manacapuru/AM. For this, 15 tambaquis were collected per property, five per excavated tank from a total of three properties (n: 45) in Manacapuru/AM. From these fish, fecal fragments were sampled directly from the intestine for bacterial isolation and identification. After

<sup>1</sup> Graduanda em Ciências Biológicas Licenciatura, Universidade Nilton Lins, Manaus/Amazonas/Brasil.

[jpaessn@gmail.com](mailto:jpaessn@gmail.com)

<sup>2</sup> Analista da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/Embrapa Amazônia Ocidental. [claudia.majolo@embrapa.br](mailto:claudia.majolo@embrapa.br)\*



identification, the isolates were tested for resistance to conventional antibiotics using the disk-diffusion technique. The present work detected the presence of *Salmonella* spp. in the intestine of three animals (prevalence of 6.67%). The isolates demonstrated sensitivity to all antibiotics tested by the disk-diffusion technique (amikacin, ampicillin, cefotaxime, ciprofloxacin, chloramphenicol, gentamicin, imipenem, levofloxacin, meropenem, tetracycline).

**Keywords:** *Colossoma macropomum*, food pathogen, antibiotic, enterobacteria.

## 1. Introdução

Segundo a FAO (2020), o consumo mundial de pescado chegou a 20,5 kg per capita/ano em 2018, no entanto, o desenvolvimento da cadeia do pescado pode ser ameaçado em virtude de problemas sanitários, dentre eles, a salmonelose. Essa preocupação com a saúde pública afeta várias regiões do mundo, inclusive as autoridades do nosso país (SOARES e BELO, 2015). As salmoneloses são reconhecidas como causa comum de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) em humanos e representam um grave problema de saúde pública (DE MELO, 2018).

O pescado é um alimento rico em proteínas, caracterizado pela alta digestibilidade e valor biológico, além de elevado teor de ácidos graxos poli-insaturados, sendo considerado um alimento muito saudável do ponto de vista nutritivo. Apesar disso, é um alimento com alto poder de deterioração, devido ao seu pH próximo a neutralidade, alta concentração de nutrientes, que são usados por microrganismos e rápida ação das enzimas destrutivas presentes nos tecidos e vísceras do peixe (SOARES, 2012).

A *Salmonella* pode contaminar os alimentos de forma direta, através do uso de ingredientes contaminados, ou por contaminação cruzada

durante o processo de fabricação e armazenamento, onde vetores, como baratas ou ratos, servem de veículo deste agente, ou também no momento da evisceração na indústria podem ocorrer contaminações devido a cortes acidentais e extravasamento do conteúdo do trato gastrointestinal (SANTOS, 2015).

A contaminação de peixes em frigoríficos pode ocorrer durante todas as etapas do processamento, como transporte, lavagem com água hiperclorada, evisceração, descascamento, filetagem, contato com gelo usado para conservação, água contaminada, tábuas, facas, bandejas, caixas plásticas, manuseio dos alimentos durante a descarga, processamento ou etapas de preparação (MATAÇA, 2014). Outro grave problema é a prática de venda em todo país de peixes não eviscerados frescos ou congelados, além do consumo dos peixes em preparações cruas ou mal-cozidas. A recomendação da Legislação brasileira é ausência de *Salmonella* em 25g de pescado (ANVISA, 2019), e com isto, estratégias de controle para evitar doenças associadas ao consumo de peixes incluem a identificação e implementação dos controles higiênico-sanitários durante o processamento (AMAGLIANI; SCHIAVANO, 2012).



Devido a patogenicidade de salmonelas em peixes ser desconhecida, Santos (2015), desenvolveu um protocolo experimental de infecção para algumas espécies, como tambaqui (*Colossoma macropomum*), piaui (*Leporinus friderici*), pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) e concluiu que a *Salmonella* pode permanecer no trato gastrointestinal em peixes de forma transitória, sendo conseqüentemente, um fator importante para contaminação ambiental e propagação bacteriana (FERNANDES *et al.*, 2018).

A utilização de antimicrobianos na aquicultura é um importante recurso para o tratamento de doenças bacterianas de peixes, na manutenção da saúde e bem-estar dos animais e para garantir uma maior rentabilidade da produção (MIRANDA *et al.*, 2013). Gastalho e colaboradores (2014) afirmam que “a resistência aos antibióticos é um problema emergente em Enterobacteriaceae”. Diante dessa problemática, o presente trabalho teve como objetivo verificar a prevalência de *Salmonella* spp. em tambaquis cultivados em tanques escavados e identificar o perfil de resistência desses isolados.

## **2. Material e métodos**

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Piscicultura da Embrapa Amazônia Ocidental, situada na Rodovia AM 10, km 29, s/n, Manaus – AM. Os peixes foram coletados de três pisciculturas com criação de tambaqui (*Colossoma macropomum*) no município de Manacapuru, AM (45 peixes), quinze de cada produtor (cinco peixes por tanque, de um total de três tanques por propriedade).

A coleta foi realizada com a ajuda de uma rede de pesca ou tarrafa da própria propriedade amostrada. Os peixes foram transportados em sacos plásticos com água dos tanques e oxigênio para o laboratório da Embrapa Amazônia Ocidental para serem analisados. Os tambaquis foram introduzidos em balde com água e benzocaina (Sigma®) a (20mg L<sup>-1</sup>), para uma anestesia inicial, em seguida os peixes foi retirados do balde, e para a confirmação da eutanásia foi realizada a aspersão nas brânquias com benzocaina (Sigma®) (10 mg L<sup>-1</sup>), em seguida, higienização (água, detergente e álcool 70%), e foram encaminhados para o laboratório de microbiologia para manipulação em câmara de fluxo laminar.

No fluxo laminar foi realizado o enriquecimento seletivo da porção terminal das fezes de cada animal feito em meio Rappaport-Vassiliadis (Difco®) (RV) que demonstra eficácia na detecção de *Salmonella* spp (BRASIL, 2011), incubado a 43°C por 24 horas. Logo após esse período, foi realizado um estriamento em meio seletivo Ágar *Salmonella-Shigella* (Kasvi®) (SS) para o isolamento de colônias negras características.

Para selecionar e isolar espécies de *Salmonella*, as colônias características foram inoculadas em meio não seletivo Tryptone Soya Agar (Difco®) (TSA), sendo então incubadas a 35 °C por 24 horas para visualização do formato e textura das colônias, assim como sua pureza para posteriores provas bioquímicas visando a confirmação do gênero. As colônias características foram submetidas ao exame de coloração de Gram, motilidade, oxidase e catalase.



As avaliações bioquímicas foram feitas com os meios de cultura Ureia (Oxoid), Triple Sugar Iron Agar (Oxoid®) (TSI), Agar Lisina Ferro (Oxoid®) (LIA) e Sulfato, Indol, Motilidade (Neon®) (SIM) que são usados para identificar a *Salmonella* spp. (BRASIL, 2011). Em seguida foram realizados testes pelo kit BacTray® da Laborclin® (provas bioquímicas miniaturizadas) para comprovar a identificação da *Salmonella* spp.

A susceptibilidade dos isolados bacterianos aos antibióticos convencionais foi avaliada através da técnica de disco-difusão conforme recomendações do "Clinical and Laboratory Standards Institute" NCCLS (M7-A6) (NCCLS, 2003).

Para avaliar a ocorrência de susceptibilidade dos isolados bacterianos foram utilizados os antibióticos (Laborclin®): amicacina (AMI 30 µg), ampicilina (AMP 10 µg), cefotaxima (CTX 30 µg), ciprofloxacina (CIP 5 µg), cloranfenicol (CLO 30 µg), gentamicina (GEN 10 µg), imipenem (IPM 10 µg), levofloxacina (LVX 5 µg), meropenem (MER 10 µg), tetraciclina (TET 30 µg). Para cada antibiótico, de acordo com o halo de inibição de crescimento bacteriano, conforme o diâmetro alcançado foram mensurados e avaliados como: Sensível, Intermediário ou Resistente.

Já a prevalência foi considerada como: [o número de eventos existentes (presença de *Salmonella* spp.) entre os indivíduos observados/número total de indivíduos observados] x 100.

### **Princípios éticos:**

A Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Amazônia Ocidental aprovou as atividades pertinentes a este trabalho

sob o protocolo nº 04/2018, emitido em 01/10/2018.

A autorização do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGen) para uso de patrimônio genético foi a de nº A229774.

### **3. Resultados e discussão**

Dos 45 animais avaliados, apenas três amostras (Prevalência de 6,67%) foram confirmadas e identificadas como *Salmonella* spp., já quanto à susceptibilidade aos antimicrobianos, todas foram sensíveis a todos antimicrobianos testados. Um dado importante observado foi que os três isolados obtidos pertenceram à mesma propriedade e ao mesmo tanque escavado.

No Brasil, existem poucos estudos sobre salmonelas em peixes. Contudo, Duarte *et al.*, (2010) ao verificarem a ocorrência de *Salmonella* spp. em peixes na região Nordeste do país, observaram que das 50 amostras coletadas de peixes, 4% apresentaram-se positivas para o gênero. A prevalência comparada fica próxima da encontrada neste trabalho, apesar do número menor de animais amostrados.

De Carvalho *et al.*, (2009) isolaram 103 cepas de *Salmonella* spp. em águas de cultivo de camarão e 4% dos isolados foram resistentes à tetraciclina, 2% ao ácido nalidíxico e 2% ao sulfamethoxazol. Resultados diferentes deste estudo apesar do percentual baixo de resistência, usando apenas a tetraciclina de antibiótico de uso comum, mostrando que seu uso por agricultores de crustáceos e sua descarga em rios próximos a pontos comerciais pode representar um risco para a seleção de bactérias resistentes a antimicrobianos.



Já em estudo realizado por Costa *et al.*, (2016), foi determinada a susceptibilidade antimicrobiana de 21 linhagens de *Salmonella* spp. obtidas de Tilápia (*Oreochromis* spp.), inteiras e em filés, no estado de São Paulo. Os isolados foram sensíveis à gentamicina (95%), amicacina (66%) e ciprofloxacina (66%), demonstrando a elevada sensibilidade assim como neste estudo, e resistentes ao florfenicol (80%), o que é fogue do esperado, considerando que seu uso é relativamente recente na medicina veterinária no Brasil. Essa sensibilidade maior valida as informações obtidas pelos mesmos antibióticos relatados neste trabalho.

Os dados obtidos em nossa pesquisa revelam que a resistência da *Salmonella* spp. encontrada em tambaquis é ainda inexistente para os antibióticos recomendados para toxinfecções causadas pelo gênero, entretanto, a vigilância deve ser constante quanto ao uso indiscriminado de antibióticos na piscicultura e a fonte de água destes tanques escavados, visando evitar futuros problemas com o possível desenvolvimento de cepas multirresistentes (FERNANDES *et al.*, 2018) além da contaminação ambiental.

Segundo Gazal (2018) a crescente expansão da aquicultura como fonte de alimentos reforça a importância de um sistema de controle em todas as etapas necessárias para a produção e processamento de pescados. E diante dessa constatação os cuidados devem começar na propriedade, com boas práticas de manejo, uso controlado de antibióticos e finalizando no processamento em frigoríficos para posterior distribuição ao consumidor, já que a evisceração de um animal

contaminado sem controles sanitários adequados pode tornar-se fonte de contaminação para os outros animais ali processados, contaminando muitas vezes um lote inteiro e servindo de risco biológico potencial ao consumidor final.

#### **4. Conclusão**

Foram isoladas e caracterizadas bioquimicamente como *Salmonella* spp. um total de três amostras (prevalência de 6,67%) isoladas de 45 tambaquis cultivados em tanques escavados do município de Manacapuru/AM. Quanto à susceptibilidade aos antimicrobianos, todos isolados mostraram-se sensíveis a todos antimicrobianos testados: amicacina (AMI 30 µg), ampicilina (AMP 10 µg), cefotaxima (CTX 30 µg), ciprofloxacina (CIP 5 µg), cloranfenicol (CLO 30 µg), gentamicina (GEN 10 µg), imipenem (IPM 10 µg), levofloxacina (LVX 5 µg), meropenem (MER 10 µg), tetraciclina (TET 30 µg).

#### **Agradecimentos**

À Embrapa Amazônia Ocidental pela infraestrutura, ao CNPq e à Fapeam por meio da concessão das bolsas de Iniciação Científica, e pelo apoio financeiro por meio da aprovação do Processo: 062.01097/2017 do Edital N° 016/2014 – PPP-CNPq.

#### **Divulgação**

Esta nota é inédita e não está sendo considerado para qualquer outra publicação. Os autores e revisores não relataram qualquer conflito de interesses durante sua avaliação. Logo, a revista *Scientia Amazonia* detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação deste artigo por meio eletrônico.



## Referências

- AMAGLIANI, G; BRANDI, G; SCHIAVANO, G. F. Incidence and role of *Salmonella* in sea food safety. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 780-788, 2012.
- BRASIL. Agência de Vigilância Sanitária ANVISA. Resolução - RDC nº 255, de 10 de dezembro de 2018. **Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**. Brasília, dez 2019.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Manual técnico de diagnóstico laboratorial de *Salmonella* spp.: diagnóstico laboratorial do gênero *Salmonella***. 2011.
- COSTA, T. D. et al. Qualidade microbiológica de tilápias obtidas de pesqueiros no interior do Estado de São Paulo, Brasil. **Ciência & Tecnologia: FATEC-JB, Jaboticabal (SP)**, v. 8, 2016.
- DE CARVALHO, F. C. T; BARRETO, N. S. E; DOS REIS, C. M. F; HOFER, E; DOS FERNANDES VIEIRA, R. H. S. Susceptibilidade antimicrobiana de *Salmonella* spp. isoladas de fazendas de carciniculturas no Estado do Ceará. **Revista Ciência Agronômica**, v. 40, n. 4, p. 549-556, 2009.
- DE MELO, E. S; DE AMORIM, W. R; PINHEIRO, R. E. E; DO NASCIMENTO CORRÊA, P. G; DE CARVALHO, S. M. R; SANTOS, A. R. S. S; DE SOUSA, F. V. Doenças transmitidas por alimentos e principais agentes bacterianos envolvidos em surtos no Brasil. **PUBVET**, v. 12, p. 131, 2018.
- DUARTE, D. A. M; RIBEIRO, A. R; VASCONCELOS, A. M. M; SILVA, J. V. D; ANDRADE, P. L. A; SANTANA, A. A. P. Ocorrência de *Salmonella* spp. e *Staphylococcus coagulase positiva* em pescado no Nordeste, Brasil. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 77, n. 4, p. 711-713, 2010.
- DUARTE, S; KUCHIISHI, S; ALMEIDA, F. D. S; OSOWSKI, G. Guia ilustrado para isolamento de *Salmonella* spp de origem avícola. **Embrapa Suínos e Aves-Documentos (INFOTECA-E)**, 2016.
- FAO. **Situação Mundial da Pesca e Aquicultura 2020. Sustentabilidade em ação**. Roma. Disponível em: <http://www.fao.org/brasil/noticias/detail-events/pt/c/1279825/>
- FERNANDES, D.V.G.S; CASTRO, V.S; CUNHA, N.A.D; FIGUEIREDO, E.E.D.S. *Salmonella* spp. in the fish production chain: a review. **Ciência Rural**, v. 48, n. 8, 2018.
- GASTALHO, S.; SILVA, G. J.; RAMOS, F. Antibiotics in aquaculture and bacterial resistance: health care impact. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, v. 3, p. 28-44, 2014.
- GAZAL, L. E. de S.; DE BRITO, K. C. T.; CAVALLI, L. S.; KOBAYASHI, R. K. T.; NAKAZATO, G.; OTUTUMI, L. K.; DA CUNHA, A. C.; PIRES NETO, J. A. S.; DE BRITO, B. G. *Salmonella* sp. em peixes – qual a importância para sanidade em pescado?. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 24, n. 1/2, p.55-64, 28 dez. 2018.
- MATACA, A.R. **Estudo da frequência de *Salmonella* ssp. no pescado comercializado no Brasil**. 2014. 34p. Dissertação (mestrado) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, 2014.
- MIRANDA, C.D.; TELLO, AI; KEEN, P.L. Mechanisms of antimicrobial resistance in finfish aquaculture environments. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 233, 2013.
- NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**, Information Supplement. Approved Standard M2-A7 and M7- A6. Wayne, PA, U.S.A. 2003.
- SANTOS, R.R. D. **Ocorrência, tipagem molecular e capacidade de colonização de amostras de *Salmonella enterica* em peixes nativos**. 2015. 86p. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, 2015.
- SOARES, K.M.D.P; GONÇALVES,A.A. Qualidade e segurança do pescado. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 71, n. 1, p. 1-10, 2012.