

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Isolamento e caracterização de *Salmonella*
enterica em tambaqui (*Colossoma*
macropomum)**

Heidiane Nascimento Feitosa

Jaboticabal, SP

2025

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Isolamento e caracterização de *Salmonella*
enterica em tambaqui (*Colossoma*
macropomum)**

Heidiane Nascimento Feitosa

Orientadora: Dra. Fabiana Pilarski

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Aquicultura, do Centro de Aquicultura
da Unesp - CAUNESP, como parte
dos requisitos para a obtenção do
título de Mestre em Aquicultura

Jaboticabal, SP

2025

F311i

Feitosa, Heidiane Nascimento

Isolamento e caracterização de Salmonella enterica em
tambaqui (*Colossoma macropomum*) / Heidiane Nascimento

Feitosa. -- Jaboticabal, 2025

58 f.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
(UNESP), Centro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal

Orientadora: Fabiana Pilarski

1. Aquicultura. 2. Biossegurança. 3. Salmonella enteritidis. 4.
Saúde pública. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Isolamento e caracterização de *Salmonella enterica* em tambaqui (*Colossoma macropomum*)

AUTORA: HEIDIANE NASCIMENTO FEITOSA

ORIENTADORA: FABIANA PILARSKI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciências, Área de Aquicultura, pela Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 **FABIANA PILARSKI**
Data: 26/02/2025 11:20:08-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. FABIANA PILARSKI (Participação Virtual)
Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos / CAUNESP Jaboticabal/SP

Documento assinado digitalmente
 **JULIANA ANTUNES GALVAO**
Data: 26/02/2025 15:47:45-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Professora Doutora JULIANA ANTUNES GALVÃO (Participação Virtual)
Depto de Agroindústria Alimentos e Nutrição / ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA

Documento assinado digitalmente
 **MARITA VEDOVELLI CARDOZO**
Data: 26/02/2025 14:53:30-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. MARITA VEDOVELLI CARDOZO (Participação Virtual)
Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única, / FCAV UNESP Jaboticabal/SP

Jaboticabal, 26 de fevereiro de 2025

EPÍGRAFE

*Tudo posso
naquele que me fortalece.*

- Filipenses 4:13 -

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me iluminar e abençoar em todas as etapas do mestrado, me permitindo a conclusão desta pós-graduação de forma vitoriosa.

Agradeço, em especial, a minha filha Nathalia Chaussê Feitosa Magalhães e meu esposo Thiago Magalhães Silva, pelo apoio e amor incondicional, por sempre acreditarem em mim e o incentivo constante durante todo este período, inclusive durante as viagens e coleta das amostras.

A meus pais José Wilson Feitosa (*In memoriam*) e Celma Chaussê do Nascimento pela educação a mim dada e pelo exemplo de força, coragem, humildade e honestidade.

A família Magalhães, por todo suporte a minha família, pelas infinitas orações e incentivo durante minhas idas a São Paulo, e por sempre estarem presentes em minha vida.

A minha orientadora, Profa. Dra. Fabiana Pilarski, pela paciência, os ensinamentos, conselhos e principalmente por ter acreditado em mim e na realização desta pesquisa, além do enorme carinho e das injeções de positividade concedidas durante todo o período, muito obrigada.

Aos colegas do LAPOA, em especial a Daiane, Elielma, Daniel, Inácio, Zacarias, Amarildo, Gabriela e Alex por todo conhecimento compartilhado, paciência e parceria. Aos estagiários Maiara, Isis, Matheus, Eric e Bia por toda ajuda e companheirismo. A tia Lu, pela limpeza e cafezinhos. Estendo os agradecimentos ainda aos demais colegas do CAUNESP, que de alguma forma contribuíram com minha jornada.

A minha amiga e irmã Simone Medeiros, por sempre se fazer presente em minha vida, compartilhando nossas angústias e preocupações. Não nos deixando desanimar e desacreditar da profissão e dos nossos propósitos.

Agradeço ainda aos responsáveis pela piscicultura que autorizaram e se colocaram à disposição para a realização da coleta de amostras.

Agradeço a CAPES pelo apoio financeiro concedido, a Universidade Estadual de São Paulo e ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura em especial ao David, Antônio e Prof. Dr. Diogo, pela receptividade e oportunidade.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	9
ÍNDICE DE TABELAS	11
 CAPÍTULO 1: CONSIDERAÇÕES GERAIS	12
RESUMO	13
ABSTRACT	14
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1. Características do gênero <i>Salmonella</i> spp.	17
2.2. Salmonelose e Saúde Pública	19
2.3. Aquicultura e prevalência de <i>Salmonella</i>	21
2.4. Tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>)	22
2.5. Métodos de Detecção e Genotipagem de <i>Salmonella</i>	23
2.6. Análise filogenética	24
2.7. One Health	25
3. OBJETIVOS	27
3.1. Geral	27
3.2. Específicos	27
 CAPÍTULO 2: DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE	
<i>Salmonella enterica</i> ISOLADA DE TAMBAQUI (<i>Colossoma macropomum</i>) ..	28
RESUMO	29
ABSTRACT	30
1. INTRODUÇÃO	31
2. MATERIAL E MÉTODOS	32
2.1. Coleta de amostras	32
2.2. Cultivo e identificação de <i>Salmonella</i>	34
2.3. Confirmação genotípica	36
2.4. Caracterização genotípica: análise filogenética	38
3. RESULTADOS	39
3.1. Amostras	39
3.2. Cultivo e identificação de <i>Salmonella</i>	39

3.3.	Confirmação genotípica	41
4.	DISCUSSÃO	45
5.	CONCLUSÃO.....	49
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 2 – DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE *Salmonella enterica* ISOLADA DE TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)

Figura 1. Esquema de amostragem.....	33
Figura 2. Coleta das amostras. (A) Uso da sonda multiparâmetros (YSI® Pro20) para aferição de temperatura e oxigênio dissolvido. (B) Peixes embalados em sacos plásticos estéreis, lacrados e identificados. (C) Peixes em congelamento (-25 °C). (D) Caixa térmica com os peixes embalados para envio ao laboratório.....	33
Figura 3. Isolamento bacteriano. (A) Preparo dos materiais e meio líquido para autoclavagem. (B) Medição do comprimento padrão e comprimento total dos peixes. (C) Pesagem dos peixes. (D) Peixes sendo levados para a sala de microbiologia após assepsia. (E) Pesagem das amostras. (F) Coleta de músculo em cabine de segurança biológica.....	34
Figura 4. Esquema geral das análises microbiológicas realizadas para isolamento da bactéria.....	36
Figura 5. Cultivo em Ágar XLD e Ágar MacConkey, obtidas após enriquecimento em Caldo Selenito Cistina e Caldo Rappaport. Repique em Ágar XLD para pureza da bactéria.....	40
Figura 6. Coloração de Gram das amostras para caracterização inicial das bactérias.....	40
Figura 7. Interpretação dos tubos contendo meio TSI e LIA inclinado. (A) Amostra controle contendo meio TSI sem inoculação de bactérias; (B) Amostra Positivo - produção de H ₂ S; (C) Amostra Positivo – produção de H ₂ S e aparência de meio amarelado; (D) Amostra Negativo – todo o meio na cor amarelo, sem produção de H ₂ S e alta produção de CO ₂ ; (E) Amostra Negativo – sem produção de H ₂ S, amarelo na parte inferior e avermelhado na superior; (F) Amostra controle contendo meio LIA sem inoculação de bactérias; (G) Amostra Positivo – cor púrpura; (H) Amostra Positivo – cor púrpura; (I) Amostra Negativo – cor esverdeada; (J) Amostra Positivo – cor púrpura.....	41

Figura 8. Eletroforese em gel agarose 1,5% com visualização de produto amplificado com o gene *invA* e com o gene 16S rRNA para identificação de *Salmonella* spp. PM: Marcador de Peso Molecular Ladder 1 kb Plus (Invitrogen); CN: Controle Negativo; CP: Controle Positivo (S. Dublin); (pb) pares de base.....43

Figura 9. Árvore filogenética enraizada construída pelo método de Máxima Verossimilhança (ML) com base em análises individuais de sequências de gene *invA* de dois isolados clínicos deste estudo (59IT e 76IT), juntamente com a cepa CP (S. Dublin) usada como controle positivo, 24 cepas de *Salmonella* isoladas de diferentes hospedeiros. A cepa *Citrobacter freundii* foi usada como referência para enraizamento da árvore. O conjunto de dados final foi de 1.827 pb. As análises evolutivas foram realizadas no MEGA 7.....45

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Características dos grupos filogenéticos do gênero <i>Salmonella</i>	19
Tabela 2. Sequências dos genes para reações de PCR.....	37
Tabela 3. Parâmetros físico-químicos da água dos viveiros em relação aos parâmetros estabelecidos pela Resolução CONAMA n° 357/2005.....	39
Tabela 4. Relação das amostras submetidas a extração de DNA.....	42
Tabela 5. Identificação das amostras encaminhadas para sequenciamento genético e resultados obtidos.....	43

CAPÍTULO 1:

CONSIDERAÇÕES GERAIS

RESUMO

Salmonella enterica é um patógeno de grande preocupação global devido a sua presença nos alimentos e potencial zoonótico, que pode levar a surtos de infecções em humanos. Esse patógeno é frequentemente associado à contaminação de produtos alimentares, incluindo peixes de aquicultura, podendo causar infecções gastrointestinais graves, resistência bacteriana aos antimicrobianos e até infecções sistêmicas em grupos vulneráveis. Há necessidade urgente do monitoramento de *Salmonella* no setor aquícola, especialmente no Brasil, onde o tambaqui é produzido. Com o crescimento da piscicultura intensiva, aumenta-se o risco de exposição à patógenos, tornando essencial o controle de patógenos zoonóticos para garantir a segurança dos alimentos e proteger a saúde dos consumidores. A presença de *Salmonella* na aquicultura também implica riscos para o conceito "One Health", que integra saúde humana, animal e ambiental. Deste modo, este estudo teve como objetivo detectar cepas de *Salmonella* isoladas de tambaquis em diferentes fases de produção, buscando caracterizar genotipicamente o patógeno. A pesquisa visa contribuir para a compreensão da epidemiologia de *Salmonella* na produção do tambaqui e, desta forma contribuir com o desenvolvimento de medidas de controle sanitário e implementação de medidas de biossegurança para garantir a segurança dos alimentos e a sustentabilidade desta importante proteína animal.

Palavras-chave: Aquicultura, Biossegurança, *Salmonella enterica*, Saúde pública.

ABSTRACT

Salmonella enterica is a pathogen of great global concern due to its presence in food and zoonotic potential, which can lead to outbreaks of infections in humans. This pathogen is often associated with the contamination of food products, including aquaculture fish, and can cause serious gastrointestinal infections, bacterial resistance to antimicrobials and even systemic infections in vulnerable groups. There is an urgent need for *Salmonella* monitoring in the aquaculture sector, especially in Brazil, where tambaqui is produced. With the growth of intensive fish farming, the risk of exposure to pathogens increases, making the control of zoonotic pathogens essential to ensure food safety and protect consumer health. The presence of *Salmonella* in aquaculture also poses risks to the “One Health” concept, which integrates human, animal and environmental health. Therefore, this study aims to detect strains of *Salmonella* isolated from tambaquis at different stages of production, seeking to genotypically characterize the pathogen. The research aims to contribute to the understanding of the epidemiology of *Salmonella* in tambaqui production and, in this way, contribute to the development of health control measures and the implementation of biosecurity measures to guarantee food safety and the sustainability of this important animal protein.

Keywords: Aquaculture, Biosecurity, *Salmonella enterica*, Public-health

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Salmonella* é composto por bactérias Gram-negativas, anaeróbias facultativas, não encapsuladas, não formadoras de esporos, em forma de bacilos, pertencentes à família Enterobacteriaceae e responsável pelo maior número de infecções causadas por alimentos e internações hospitalares em todo o mundo (Abey et al., 2024; Chen et al., 2024).

Salmonella, além de ser o patógeno de veiculação alimentar mais importante, também possui a capacidade de estabelecer uma cadeia de transmissão fortemente interconectada, que liga o meio ambiente, os animais, incluindo os peixes, os alimentos e os humanos (Xiau et al., 2024). No caso específico de *Salmonella* spp., a Instrução Normativa (IN) nº 161/2022 da ANVISA determina ausência em 25 g de amostra.

Este gênero inclui duas espécies principais: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. *S. enterica* é responsável por infecções alimentares em humanos, desde gastroenterites leves até infecções sistêmicas graves, dependendo do sorovar, da carga bacteriana e do estado imunológico do hospedeiro e região geográfica (Eng et al., 2015; Fàbrega & Vila, 2013).

Atualmente, existem mais de 2700 sorovares de *Salmonella*, dos quais 1500 subespécies estão associadas à salmonelose em animais e humanos (Issenhuth-Jeanjean et al., 2014) e o grande problema dessa bactéria é que ela exibe mecanismos complexos e diversos de resistência aos antimicrobianos, como sistemas de bomba de efluxo, produção de β -lactamase, mutações em genes de resistência e sistemas CRISPR-Cas, os quais desempenham papéis críticos em sua resistência (Xiau et al., 2024).

Na aquicultura, *Salmonella* pode ser introduzida no ambiente pela contaminação da água por dejetos de animais, especialmente aves, ração ou contato próximo entre os peixes em tanques de criação, o que facilita sua transmissão (Prystowsky et al., 2011).

Com o crescimento do setor aquícola e a intensificação da piscicultura, especialmente no Brasil, onde o tambaqui é a espécie nativa mais produzida, atrás somente da tilápia-do-Nilo, o monitoramento de patógenos bacterianos torna-se essencial para garantir a segurança do produto.

Estudos apontam que o tambaqui, nativo da Bacia Amazônica, tem alto potencial para a aquicultura tropical por suas características adaptativas, rápido crescimento e elevado valor nutricional, sendo fonte importante de proteínas e ácidos graxos essenciais (Baras et al., 2020). Contudo, essas condições favoráveis à criação intensiva também aumentam o risco de infecções bacterianas e de propagação de patógenos como *Salmonella*, com implicações para a saúde humana.

Métodos de detecção e genotipagem de patógenos permitem identificar com precisão os isolados e conhecer melhor o perfil de virulência, a resistência bacteriana aos antimicrobianos e adaptação à diferentes ambientes. A detecção envolve métodos bioquímicos e o uso de meios seletivos, como o ágar XLD e o ágar MacConkey, que auxiliam na diferenciação inicial das colônias de *Salmonella* de outras bactérias entéricas (Foley et al., 2011; Silva et al., 2016). Esses métodos são importantes para triagem rápida e fornecem uma visão preliminar da presença do patógeno. Já a caracterização genotípica utiliza métodos moleculares, como a amplificação dos genes *invA* e 16S rRNA por PCR, específicos para *Salmonella* spp., que são essenciais para confirmar a presença do patógeno com alta sensibilidade e especificidade (Fratamico & Strobaugh, 1998; Sebastião et al., 2015).

No contexto da saúde pública, o estudo de *Salmonella* na aquicultura, especialmente em peixes consumidos em larga escala, como o tambaqui, possui implicações diretas para o conceito "*One Health*", que integra a saúde humana, animal e ambiental. A presença de *Salmonella* em ambientes de criação de peixes pode representar um risco zoonótico, pois a transmissão aos humanos pode ocorrer diretamente pelo consumo de pescado contaminado ou indiretamente pela disseminação de cepas resistentes no meio ambiente (WHO, 2015).

Além disso, o uso de antimicrobianos na aquicultura pode promover a seleção de cepas resistentes, criando desafios adicionais para o tratamento de infecções em humanos (Davies & Davies, 2010). Deste modo, a adoção de práticas de manejo sanitário rigorosas, controle da qualidade de água, uso responsável dos antimicrobianos e a implementação de alternativas sustentáveis são fundamentais para reduzir o impacto desse patógeno e garantir a segurança do consumidor.

O presente estudo contribui para o entendimento da epidemiologia de *Salmonella* em ambientes aquáticos e para o desenvolvimento de estratégias eficazes de identificação e caracterização deste importante patógeno. Esse conhecimento é vital para o setor aquícola, onde o risco de infecção cruzada e propagação de patógenos é alto devido à densidade dos animais e à complexidade das interações com o ambiente aquático.

Dessa forma, este estudo fornece subsídios para a formulação de políticas de controle e monitoramento, visando à sustentabilidade do setor e à promoção de práticas que assegurem produtos seguros e de alta qualidade para o consumidor (Frye & Jackson, 2013; Bäumler et al., 2000). Ao estudar a identificação e caracterização genotípica de *Salmonella* em tambaquis, este trabalho oferece uma base científica para intervenções sanitárias que busquem reduzir o risco de infecção humana pela bactéria e promover a segurança dos alimentos na aquicultura brasileira.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Características do gênero *Salmonella* spp.

As bactérias do gênero *Salmonella* pertencem à família Enterobacteriaceae. São bacilos curtos (1,0 µm a 2,0 µm), Gram-negativos, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos, capazes de utilizar o citrato como única fonte de carbono e produzir gás a partir da glicose (exceto *S. Typhi*). Produzem ácido sulfídrico a partir da redução do enxofre por ação da enzima cisteína desulfidrase e, em sua maioria, são móveis por flagelos peritríquios, exceto os sorovares *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* (Trabulsi e Alterthum, 2015). A temperatura ideal de crescimento é de 36°C a 43°C, associada a pH em torno de 7, embora suportem a faixa de pH de 4,5 a 9,5 (Brooks et al., 2010).

As bactérias deste gênero oxidam a glicose (vermelho de metila positivo), decompõem o peróxido de hidrogênio (catalase positiva) e normalmente reduzem nitrato a nitrito. A maioria dos sorotipos fermenta a glicose com produção de ácido e gás, não fermentam a lactose e a sacarose, produzem H₂S, não produzem urease

e indol, descarboxilam lisina e ornitina, fermentam o dulcitol e utilizam o citrato (D'Aoust; Maurer, 2007; Silva et al., 2007).

O gênero *Salmonella* pode ser dividido nos sorovares tifóide, composto pela *S. Typhi* e *S. Paratyphi* e sorovar não-tifóide (SNT) composto por *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*. O sorovar tifóide causa a febre tifóide e paratífóide em humanos, que pode evoluir para sintomas neurológicos, septicemia e consequentemente, a morte. Já o sorovar não-tifóide pode causar gastroenterite moderada à severa e em casos graves bacteremia (disseminação da bactéria por todo o corpo) (Billah & Rahman, 2024).

Baseado na análise da sequência 16S rRNA, o gênero *Salmonella* está classificado em duas espécies, *Salmonella enterica* (2443 sorotipos) e *Salmonella bongori* (20 sorotipos). A espécie *S. enterica* possui seis subespécies, agrupadas de acordo com semelhanças genéticas e características bioquímicas, *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae* e *S. enterica* subsp. *indica* (Andino e Hanning, 2015). Dentre estas, a subespécie *enterica* alberga aproximadamente 60% dos sorovares, a maioria responsável por causar infecções em inúmeros hospedeiros, entre humanos e animais (Issenhuth-Jeanjean et al., 2014).

Entre essas subespécies, existem mais de 2500 sorovares, potencialmente patogênicos para humanos e animais, refletindo a diversidade antigênica desse patógeno (variações na estrutura flagelar e lipopolissacarídica) (Billah & Rahman, 2024).

A *S. enterica* é a responsável pelo maior número de surtos de gastroenterite cuja veiculação é alimentar em humanos e animais homeotérmicos em todo o mundo (Majowicz et. al, 2010). As infecções causadas pela espécie chegaram a 4.5 milhões de casos em todo o mundo em 2016, com um média elevada de mortalidade (22 mortes para cada 100.000 pessoas). (Troeger et al., 2018).

Até o momento foram tipificados mais de 2.659 sorovares de *Salmonella* spp. (Tabela 1), dos quais 1500 já foram isolados de humanos e animais (Issenhuth-Jeanjean et al., 2014).

Tabela 1. Características dos grupos filogenéticos do gênero *Salmonella*.

Espécies	Subespécies	Número de Sorotipos	Hospedeiros
<i>Salmonella enterica</i>	<i>enterica</i>	1.586	Animais homeotérmicos
	<i>salamae</i>	522	
	<i>diarizonae</i>	338	
	<i>arizonae</i>	102	Animais heterotérmicos
	<i>houtenae</i>	76	
	<i>indica</i>	13	
<i>Salmonella bongori</i>	<i>bongori</i>	22	
TOTAL		2.659	

FONTE: Iseenhuth-Jeanjean et. al (2014).

Essas bactérias apresentam características bioquímicas que requerem diagnóstico laboratorial acurado com posterior identificação molecular (D'Aoust; Maurer, 2007; Silva et al., 2007).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) criou em janeiro de 2000 o Programa Global de Controle de *Salmonella* com o objetivo de detectar, controlar e prevenir os surtos alimentares causados por essa bactéria. Dessa forma, laboratórios de todo mundo são capacitados para diagnosticar o agente e os países participantes anualmente reportaram os 15 sorotipos mais frequentemente encontrados (Hendriksen et al., 2011).

2.2. Salmonelose e Saúde Pública

Salmonella está bastante difundida geograficamente em todo o mundo. A constituição genética desta bactéria permite sua adaptação a uma variedade de ambientes e animais, incluindo hospedeiros mamíferos e não-mamíferos (Sánchez-Vargas; Abu-El-Haija; Gómez-Duarte, 2011), sendo o seu principal habitat o trato gastrointestinal de humanos e animais. Os reservatórios de *Salmonella* no ambiente são a água, o solo, as fezes de animais, os insetos e ratos, e as superfícies de equipamentos e utensílios de fábricas e cozinhas, os quais contribuem para sua transmissão e alta prevalência de infecção em humanos (Scallan et al., 2011).

A salmonelose é a doença de origem alimentar mais frequente no mundo (Bollaerts et al., 2008; Feasey et al., 2012; Fardsanei et al., 2017). Pode ser transmitida aos humanos através do consumo de carne animal, como frango e porco cru ou mal cozido, ovos e seus subprodutos, vegetais ou frutas contaminadas com fezes de animais, frutos do mar (peixes e crustáceos, como caranguejos, amêijoas, lagostas, mexilhões, vieiras, camarões, ostras). A contaminação cruzada em frigoríficos ou abatedouros também é uma importante fonte de transmissão da *Salmonella*, contribuindo com aproximadamente 12% das infecções pela bactéria (Akil e Ahmad, 2019).

A IN nº 161 de 2022, publicada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), estabelece critérios microbiológicos para a segurança dos produtos de pescado destinados ao consumo humano no Brasil. Dentre suas diretrizes, a normativa reforça a exigência da ausência de *Salmonella* spp. em 25 g em produtos de pescado e seus derivados, visando a proteção da saúde pública e a garantia da qualidade sanitária desses produtos. A recomendação alinha-se às normas internacionais de segurança dos alimentos, reconhecendo *Salmonella* como um patógeno de preocupação global devido ao seu potencial de causar surtos de doenças transmitidas por alimentos.

Dependendo do sorovar envolvido, da concentração do inóculo, dos fatores de virulência expressos pelo agente e do estado imunológico do hospedeiro, a bactéria pode ocasionar desde uma infecção gastrointestinal leve até septicemia ou morte (Coburn et al., 2007; Verbrugghe et al., 2016; Bierschenk et al., 2017). Os sintomas caracterizam-se por dor abdominal, diarreia, calafrios, febre, vômito, desidratação e dores de cabeça, sendo que o período de incubação pode variar de 5 a 72 horas, frequentemente ocorrendo entre 12 e 36 horas. A recuperação ocorre de 1 a 7 dias após o aparecimento dos sintomas e medicação adequada (Bollaerts et al., 2008; Salem et al., 2017).

A duração da doença é variável, podendo prolongar-se dependendo do hospedeiro, da dose ingerida e da cepa de *Salmonella* envolvida. Alguns grupos de pessoas, tais como idosos, crianças com menos de cinco anos e pessoas com comprometimento do sistema imunológico, são mais propensos a desenvolver uma doença grave, podendo resultar em problemas de saúde a longo prazo ou morte (Braden, 2012; Silva et al., 2007).

Por ser normalmente encontrada no ambiente de produção animal é, consequentemente, muito isolada em alimentos de origem animal e, por isso, relacionada a grandes problemas de saúde pública, pelo seu envolvimento com doenças de origem alimentar no mundo todo. Portanto, trata-se de uma doença zoonótica que pode ser transmitida diretamente ou indiretamente entre os animais e os seres humanos. Os principais alimentos responsáveis por infecções pela bactéria são os ovos, as carnes de aves e suínos, e o leite (EFSA, 2014; WHO, 2015).

Para a prevenção da doença são necessárias medidas de controle em todas as etapas da produção de alimentos, desde a produção agrícola ou ambiente de criação de animais de produção, processamento do alimento na indústria, preparação nos estabelecimentos comerciais e também nas residências e cozinhas industriais. O manuseio seguro da carne crua, bom cozimento e boa higiene na cozinha podem prevenir ou reduzir o risco representado pelos alimentos contaminados (EFSA, 2014; WHO, 2015).

2.3. Aquicultura e prevalência de *Salmonella*

No contexto da aquicultura, a prevalência de *Salmonella* spp. é uma preocupação crescente, devido à possibilidade de contaminação ao longo de toda a cadeia produtiva. Esse patógeno pode ser introduzido nos sistemas de criação de peixes através de fontes externas, como a água, pássaros próximos aos tanques e a ração contaminada, além de se propagar facilmente devido à alta densidade de peixes. Estudos demonstram que a presença de *Salmonella* em peixes de produção pode estar associada a fatores ambientais e práticas de manejo inadequadas, principalmente relacionada a água da piscicultura (Prystowsky et al., 2011; Frye & Jackson, 2013).

Em sistemas intensivos e semi-intensivos de aquicultura, a manutenção da qualidade da água e o monitoramento sanitário dos viveiros são essenciais para reduzir a carga de patógenos. A alta densidade de peixes nesses ambientes, contudo, pode facilitar a disseminação de bactérias patogênicas entre os indivíduos, aumentando o risco de infecções e contaminações cruzadas. Isso ocorre, em parte, porque ambientes de produção favorecem o contato próximo e

constante entre os peixes, facilitando a transferência de patógenos através das fezes, da água e dos alimentos compartilhados, principalmente por peixes filtradores (Scallan et al., 2011; Andino & Hanning, 2015).

Além disso, a presença de *Salmonella* na aquicultura representa uma ameaça não só para a saúde dos peixes, mas também para a saúde pública, visto que esses produtos são consumidos diretamente por humanos. Estudos sugerem que, mesmo com o monitoramento constante, patógenos como *Salmonella* podem persistir em ambientes aquáticos por muitos anos, exigindo práticas de biossegurança rigorosas para prevenir surtos e garantir a segurança dos produtos derivados do pescado (Silva et al., 2016). Dessa forma, o controle microbiológico da água e dos peixes é um componente essencial para a produção segura e sustentável, protegendo tanto os consumidores quanto a viabilidade do setor.

2.4. Tambaqui (*Colossoma macropomum*)

O tambaqui é um peixe nativo da Bacia Amazônica e de grande porte, com capacidade de atingir até 30 kg, embora o peso médio dos indivíduos produzidos seja menor. Esta espécie se destaca na piscicultura devido ao seu rápido crescimento, adaptabilidade a diferentes condições de manejo e alto valor nutritivo, sendo rico em proteínas e ácidos graxos essenciais. Essas características tornam o tambaqui ideal para produção em sistemas semi-intensivos e intensivos, onde pode ser produzido em tanques escavados e viveiros (Baras et al., 2020). É a segunda espécie mais produzida no Brasil com 109,9 mil toneladas, representando 17,8% da produção total (IBGE, 2022). Sua criação tem aumentado significativamente, especialmente na Região Norte do Brasil, onde a piscicultura é uma importante atividade econômica e fonte de proteína animal (Lima et al., 2021).

Contudo, as condições de produção e a densidade populacional podem levar ao surgimento de desafios sanitários, como infecções bacterianas. Essas infecções não só comprometem a saúde dos peixes, mas também representam um risco para a saúde pública, pois bactérias patogênicas podem ser transmitidas aos consumidores através do pescado contaminado. O monitoramento sanitário é, portanto, crucial para manter a saúde dos peixes e garantir a segurança dos

produtos, preservando a confiança do consumidor e a sustentabilidade do setor (Silva et al., 2016).

A produção de tambaqui contribui para o desenvolvimento econômico e social das regiões produtoras, gerando empregos e oferecendo uma fonte acessível de proteína animal. Com o crescimento da demanda de proteína oriunda do pescado no Brasil e em outros países, o tambaqui desempenha um papel relevante na sustentabilidade da aquicultura, ajudando a reduzir a pressão sobre a pesca extrativa e a conservar os recursos naturais locais (Frye & Jackson, 2013).

Por sua importância econômica e adaptabilidade, o tambaqui tem potencial para ser um dos pilares da aquicultura sustentável na Amazônia, desde que acompanhado de práticas de manejo sanitário adequadas e de políticas de incentivo à produção responsável.

2.5. Métodos de Detecção e Genotipagem de *Salmonella*

A identificação de *Salmonella* em peixes, como no tambaqui, envolve métodos de detecção e caracterização genotípica da bactéria para confirmar a presença do patógeno e obter informações detalhadas sobre sua virulência, resistência aos antimicrobianos e adaptabilidade à diferentes ambientes. Esses métodos são essenciais para garantir um diagnóstico preciso e auxiliar na implementação de medidas de controle da bactéria na cadeia produtiva.

A detecção de *Salmonella* é baseada em testes bioquímicos e de crescimento em meios seletivos. Métodos como a incubação em ágar XLD (Xylose Lysine Deoxycholate) e ágar MacConkey são frequentemente utilizados para diferenciar *Salmonella* de outras bactérias entéricas, uma vez que *Salmonella* é capaz de fermentar xilose e reduzir tiosulfato a sulfeto de hidrogênio, produzindo colônias com características distintas. Testes bioquímicos como TSI (Triple Sugar Iron) e LIA (Lysine Iron Agar) também ajudam a verificar a produção de H₂S, um indicador comum da presença de *Salmonella* spp. (Silva et al., 2016; Foley et al., 2011). Esses métodos fornecem uma triagem inicial eficiente, mas podem ser complementados por análises moleculares para confirmação definitiva.

Já a caracterização genotípica, utiliza métodos moleculares para identificar genes específicos de *Salmonella*, como o gene *invA*, conhecido por sua

especificidade e sensibilidade na detecção de *Salmonella* spp. Esse gene codifica uma proteína essencial para a invasão de células hospedeiras, sendo um marcador confiável em reações de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para confirmar a presença da bactéria (Fratamico & Strobaugh, 1998). Além do *invA*, o gene 16S rRNA, utilizado em análises filogenéticas e taxonômicas, ajuda a identificar e diferenciar espécies de *Salmonella* com alta precisão. Essas técnicas de PCR são essenciais em amostras aquáticas, em que a presença de múltiplas espécies bacterianas pode dificultar a identificação dessa bactéria (Sebastião et al., 2015).

A detecção e genotipagem na aquicultura permite não apenas a identificação de *Salmonella*, mas também auxilia na compreensão dos perfis de resistência aos antimicrobianos e dos mecanismos de sobrevivência em ambientes aquáticos. Esses dados são fundamentais para o desenvolvimento de estratégias de controle de patógenos e para o monitoramento da segurança dos alimentos, especialmente em sistemas de produção intensivos, em que a contaminação por *Salmonella* pode comprometer a qualidade do pescado e representar um risco à saúde pública (Frye & Jackson, 2013; Prystowsky et al., 2011).

A aplicação combinada desses métodos fortalece a confiabilidade do diagnóstico e oferece uma abordagem ampla para a identificação e o controle da bactéria em ambientes de criação de peixes.

2.6. Análise filogenética

A análise filogenética de *Salmonella* isolada de tambaqui busca entender a relação evolutiva entre diferentes cepas da bactéria, auxiliando na identificação de suas origens e mecanismos de adaptação aos ambientes aquáticos. Esse processo envolve a comparação das sequências genéticas de *Salmonella* com outras cepas, o que permite agrupar amostras semelhantes e traçar suas relações com cepas isoladas de outros animais ou ambientes. Essa abordagem é essencial para monitorar a diversidade genética do patógeno e sua evolução na aquicultura.

Para a análise filogenética, as sequências de genes específicos, como o *invA* e o 16S rRNA, são obtidas de cepas de *Salmonella* e comparadas com as sequências de outras cepas depositadas em bancos de dados, como o GenBank. O alinhamento dessas sequências é feito com ferramentas como o software MAFFT

ou BioEdit, garantindo que as regiões homólogas sejam alinhadas corretamente para uma análise precisa das relações evolutivas (Kato & Standley, 2013; Hall, 1999).

Com as sequências alinhadas, a construção de uma árvore filogenética pode ser realizada usando o método de máxima verossimilhança (Maximum Likelihood - ML), que calcula a árvore mais provável com base nos dados observados. Softwares como MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) facilitam a montagem da árvore e a interpretação das relações filogenéticas entre as cepas, evidenciando possíveis clados de *Salmonella* associados a ambientes aquáticos ou a diferentes hospedeiros (Tamura et al., 2011).

A análise filogenética permite identificar grupos de *Salmonella* com características adaptativas específicas ao ambiente aquático, auxiliando no entendimento de como esses patógenos sobrevivem e se disseminam na aquicultura. Isso é fundamental para o desenvolvimento de estratégias preventivas contra infecções em ambientes de criação de peixes, além de auxiliar no controle de patógenos que podem ser transmitidos para os humanos através do consumo de pescado contaminado. Bäuml et al. (2000) destacaram que a análise genética e evolutiva de cepas patogênicas é crucial para rastrear surtos para o controle de cepas que apresentam resistência aos antimicrobianos.

Ao possibilitar o rastreamento de cepas específicas de *Salmonella* associadas a surtos, a análise filogenética contribui de forma significativa para a segurança de alimentos, a biossegurança na aquicultura e a formulação de políticas de uso de antimicrobianos.

2.7. One Health

O conceito de *One Health* (Saúde única) propõe uma abordagem integrada e colaborativa para entender e controlar os fatores que impactam a saúde humana, animal e ambiental. No contexto da segurança de alimentos e da aquicultura, como na caracterização de *Salmonella* em peixes, esse conceito é particularmente relevante, pois destaca a interconexão entre as práticas de produção animal, a saúde dos consumidores e a conservação ambiental.

O conceito *One Health* reconhece que doenças infecciosas podem se disseminar entre humanos e animais, influenciadas por fatores ambientais. A salmonelose por exemplo, é uma doença que pode ser transmitida de animais de criação, como peixes oriundos da aquicultura, para humanos através do consumo de produtos contaminados. Essa contaminação pode ocorrer ao longo da cadeia produtiva, especialmente em sistemas de criação intensiva, em que as condições sanitárias, muitas vezes precárias, relacionadas principalmente a qualidade da água e o manejo inadequado aumentam o risco de disseminação de patógenos (Silva et al., 2016; WHO, 2015).

A resistência bacteriana aos antimicrobianos é uma preocupação central do conceito *One Health*, pois o uso indiscriminado desses produtos veterinários na produção animal pode contribuir para o surgimento de cepas bacterianas resistentes, que são uma ameaça global à saúde pública. Na aquicultura, o uso de antimicrobianos para controlar infecções bacterianas, pode levar à seleção de cepas resistentes, que podem ser transmitidas aos humanos através do consumo de pescado contaminado. Essa resistência dificulta o tratamento de infecções e reforça a necessidade de práticas de manejo responsáveis e da implementação de alternativas aos antimicrobianos (Davies & Davies, 2010; Bäumlér et al., 2000).

A resistência de *Salmonella* aos antimicrobianos, principalmente da *Salmonella* não-tifóide tem emergido como um grave problema de saúde em todo o mundo pois vem aumentando anualmente, resultando em maior número de mortes em pessoas infectadas, pela ineficácia dos medicamentos disponíveis. Foram encontradas cepas da bactéria resistentes ao cloranfenicol (Montville & Matthews, 2008), a tetraciclina, ácido nalidíxico e estreptomicina (Nair et al., 2018), amoxicilina-ácido clavulânico e ampicilina (Elhadi, 2014). Um estudo realizado em 32 pisciculturas na Malásia, demonstrou elevada resistência de *Salmonella* a ampicilina e estreptomicina e 20% de resistência a colistina, um antimicrobiano fundamental para a medicina humana, enfatizando que a aquicultura contribui para a resistência bacteriana aos antimicrobianos mundialmente (Dewi et al., 2022).

Ainda com relação ao conceito *One Health*, a biossegurança na aquicultura é fundamental para prevenir a introdução e disseminação de patógenos. O monitoramento da qualidade da água, o controle de pássaros, a implementação de boas práticas de manejo, são medidas importantes para reduzir a prevalência de

infecções. Essas medidas ajudam a proteger a saúde dos peixes, a qualidade ambiental e, a segurança dos consumidores (Frye & Jackson, 2013; EFSA, 2014).

O conceito *One Health* promove a integração entre setores de saúde humana, animal e ambiental, o que exige políticas públicas coordenadas e educação continuada para produtores, profissionais de saúde e consumidores. A conscientização sobre os riscos associados à salmonelose, à resistência aos antimicrobianos e às práticas de manejo na aquicultura são cruciais para reduzir as ameaças à saúde coletiva e preservar os ecossistemas aquáticos (Eng et al., 2015).

A aplicação do conceito *One Health* na aquicultura reforça a importância de uma abordagem colaborativa para mitigar riscos e assegurar a sustentabilidade do setor, priorizando a saúde dos animais, a segurança de alimentos e a conservação do meio ambiente.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Detectar e caracterizar genotipicamente cepas de *Salmonella* isoladas de tambaqui em diferentes fases de produção (alevino, juvenil e adulto).

3.2. Específicos

- Realizar a detecção de *Salmonella* sp. obtida de tambaquis em diferentes fases de produção através de análise microbiológica convencional;
- Realizar a caracterização genotípica das cepas de *Salmonella* sp. através da extração de DNA, PCR, sequenciamento e filogenia;

CAPÍTULO 2:
DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE
Salmonella enterica* ISOLADA DE TAMBAQUI (*Colossoma
***macropomum*)**

RESUMO

Salmonella enterica é uma bactéria zoonótica com alto potencial de infecção. Com o crescimento da piscicultura no Brasil, torna-se essencial monitorar patógenos para garantir a segurança dos alimentos e prevenir infecções em peixes como o tambaqui, uma espécie nativa da Amazônia, amplamente produzida na região norte do Brasil. Assim, o objetivo deste estudo foi detectar e caracterizar genotipicamente isolados de *Salmonella* sp. obtidos de tambaquis em diferentes fases de produção (alevino, juvenil e adulto). Os tambaquis foram capturados em viveiros escavados de uma piscicultura comercial localizada na região norte do Brasil. A detecção foi realizada através do isolamento da bactéria em meios seletivos (ágar XLD e MacConkey) e testes bioquímicos (TSI e LIA). A caracterização genotípica foi realizada através da PCR e sequenciamento dos genes *invA* e 16S rRNA, específicos para *Salmonella* spp., para confirmação da espécie e posterior construção da árvore filogenética. Foi identificada a bactéria *S. enterica* no trato gastrointestinal de dois tambaquis (59IT e 76IT) e a análise genotípica mostrou alta similaridade com cepas de *Salmonella* encontradas em outros animais e regiões geográficas, o que sugere uma ampla capacidade de adaptação desse patógeno.

Palavras-chave: Filogenia, Peixes, Piscicultura, *Salmonella entérica*.

ABSTRACT

Salmonella enterica with high infectious and zoonotic potential. With the growth of aquaculture in Brazil, it is essential to monitor pathogens to ensure food safety and prevent infections in fish such as tambaqui, a native species of the Amazon that is widely farmed in the northern region of Brazil. Thus, the aim of this study was to detect and genotypically characterize isolates of *Salmonella* sp. obtained from tambaqui at different production stages (fingerling, juvenile, and adult). The tambaqui were collected from earthen ponds in a commercial fish farm located in the northern region of Brazil. Detection was performed through bacterial isolation in selective media (XLD and MacConkey agar) and biochemical tests (TSI and LIA). Genotypic characterization was carried out through PCR and sequencing of the *invA* and 16S rRNA genes, specific for *Salmonella* spp., to confirm the species and subsequently construct a phylogenetic tree. *S. enterica* was identified in the intestinal tract of two tambaqui (59IT and 76IT), and genotypic analysis showed high similarity with *Salmonella* strains found in other animals and geographic regions, suggesting a broad adaptive capacity of the pathogen.

Keywords: Phylogeny, Fish, Aquaculture, *Salmonella enterica*.

1. INTRODUÇÃO

Salmonella é um gênero de bactérias Gram-negativas da família Enterobacteriaceae, composta por duas espécies principais: *S. enterica* e *S. bongori*. Entre elas a *S. enterica* é responsável pela maior parte das infecções em humanos e é subdividida em seis subespécies e mais de 2.500 sorovares, sendo os sorovares Typhimurium e Enteritidis os mais associados a surtos de origem alimentar (Eng et al., 2015).

A bactéria é conhecida por sua habilidade de infectar diversos hospedeiros, incluindo humanos, animais domésticos e silvestres, e até peixes, o que amplia seu impacto na saúde pública. Sua patogênese começa com a ingestão de alimentos ou água contaminados. Após a entrada no sistema gastrointestinal, *Salmonella* é capaz de atravessar as células epiteliais intestinais, onde pode sobreviver e se multiplicar no interior dos macrófagos, evadindo o sistema imunológico do hospedeiro (Fàbrega & Vila, 2013). A IN 161/2022 do MAPA exige a ausência de *Salmonella* spp. em pescado e impõe medidas rigorosas de controle e boas práticas na cadeia produtiva para garantir a segurança dos alimentos.

Na aquicultura, *Salmonella* pode ser introduzida no ambiente através da água contaminada por fezes de animais, e pela proximidade entre os peixes nos tanques, o que facilita sua transmissão. A detecção e caracterização genotípica dos isolados de *Salmonella* em peixes de produção, como o tambaqui, é vital para monitorar a presença de patógenos zoonóticos de interesse em saúde pública e resistentes aos antimicrobianos (Prystowsky et al., 2011).

A presença desse microrganismo em produtos derivados de pescado representa uma preocupação crescente, especialmente em regiões onde o consumo de peixes oriundos da piscicultura é elevado. Entre as espécies de importância econômica, o tambaqui é a espécie nativa mais produzida no Brasil e também na América Latina destacando sua popularidade e valor comercial (Baras et al., 2020). No entanto, a possível infecção por patógenos como *Salmonella* pode comprometer a produção desta espécie e a segurança dos produtos, (Silva et al., 2016).

Dada a relevância de *Salmonella* para a segurança dos alimentos, a detecção e caracterização genotípica de cepas isoladas de tambaqui torna-se uma ferramenta essencial para garantir a qualidade do produto final. Essas análises

fornece informações detalhadas sobre o perfil dessas cepas, além de auxiliarem na identificação de mecanismos de adaptação à ambientes aquáticos (Frye & Jackson, 2013). Compreender esse perfil é fundamental para desenvolver estratégias de controle eficazes na produção de pescado e reduzir os riscos de contaminação ao longo da cadeia produtiva (Bäumler et al., 2000).

Desta forma, este estudo busca contribuir para identificação e caracterização de cepas de *Salmonella* isoladas de tambaqui, proporcionando uma base científica para intervenções que visem à redução do impacto desse patógeno na aquicultura, de modo a assegurar a qualidade do produto e a confiança do consumidor.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta de amostras

Os peixes, em diferentes fases da produção (alevino, juvenil e adulto) foram coletados no mês de agosto de 2024, no período de estiagem, em uma piscicultura comercial localizada na Região Norte do Brasil, com produção de peixes em viveiros escavados, em sistemas semi-intensivo e intensivo.

Também foram coletadas amostras de água (500 mL) de cada viveiro, para análise físico-química, utilizando kit colorimétrico (Alfakit®, Florianópolis, Brasil). A transparência foi aferida com o disco de Secchi (Alfakit®, Florianópolis, Brasil) e a temperatura e oxigênio dissolvido aferidos com o auxílio da sonda multiparâmetros (YSI® Pro20).

Foram amostrados 45 tambaquis de nove viveiros escolhidos ao acaso, conforme esquema apresentado na Figura 1.

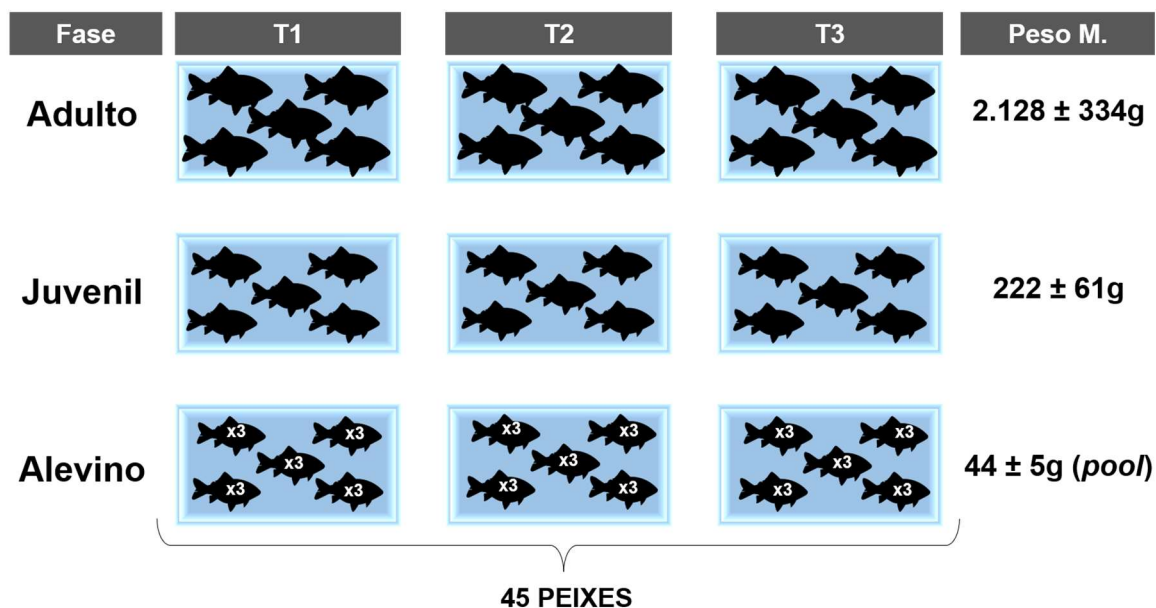


Figura 1. Esquema de amostragem.

Os peixes, após a captura, foram anestesiados com 100 mg/L de eugenol, colocados em sacos plásticos estéreis, lacrados e identificados com numeração e fase de produção, sendo eutanasiados através de choque térmico em gelo e levados ao congelamento em freezer horizontal (-25°C). Após o congelamento, os peixes foram novamente embalados em sacos plásticos, armazenados em caixas isotérmicas contendo gelo seco e encaminhados (transporte aéreo) ao Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos – LAPOA do Centro de Aquicultura da UNESP – CAUNESP da UNESP, localizado em Jaboticabal, no estado de São Paulo (Figura 2).



Figura 2. Coleta das amostras. (A) Uso da sonda multiparâmetros (YSI® Pro20) para aferição de temperatura e oxigênio dissolvido. (B) Peixes embalados em sacos

plásticos estéreis, lacrados e identificados. (C) Peixes em congelamento (-25 °C). (D) Caixa térmica com os peixes embalados para envio ao laboratório.

2.2. Cultivo e identificação de *Salmonella*

2.2.1. Pré-enriquecimento

No laboratório, os peixes foram retirados das caixas isotérmicas por ordem de coleta, lavados em água corrente, pesados, medidos, limpos com álcool a 70% e levados para cabine de segurança biológica (Bio Seg®12, Veco). Foram necropsiados com o auxílio de tesoura e bisturi esterilizados, evitando o rompimento do trato gastrointestinal (TGI) para retirada da musculatura. As amostras foram pesadas em placa de Petri esteril e diluídos em 225 mL de água peptonada tamponada a 0,1% e homogeneizados por um minuto, obtendo diluição 10^{-1} .

A bactéria também foi pesquisada no TGI dos peixes. Para isso, todo conteúdo do TGI de cada peixe foi retirado e pesado em placa de Petri esteril, diluído em 225 mL de água peptonada tamponada a 0,1% e homogeneizado por um minuto para obtenção da diluição 10^{-1} .

Para o isolamento bacteriano dos alevinos, fez-se um *pool* de três animais para obter a quantidade de amostra recomendada que é de 25 g (APHA, 2001). As amostras de músculo e TGI (*pool*) foram pesadas em balança analítica, obtendo-se de cada *pool* uma amostra (Figura 3).



Figura 3. Isolamento bacteriano. (A) Preparo dos materiais e meio líquido para autoclavagem. (B) Medição do comprimento padrão e comprimento total dos peixes.

(C) Pesagem dos peixes. (D) Peixes sendo levados para a sala de microbiologia após assepsia. (E) Pesagem das amostras. (F) Coleta de músculo em cabine de segurança biológica.

Dessa forma, 45 amostras de músculo e 45 de intestino, diluídas em água peptonada tamponada, foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas para o pré-enriquecimento primário, totalizando 90 amostras.

2.2.2. Enriquecimento seletivo

Após o período de incubação, duas alíquotas de 1 mL cada, da cultura pré-enriquecida foram inoculadas em 10 mL de caldo selenito cistina e em 10 mL de caldo Rappaport Vassiliadis (Kasvi®, Brasil) e incubadas a 37°C por 24h. Após este procedimento, com auxílio de alça bacteriológica descartável estéril, foi realizado o plaqueamento seletivo em duplicata, em que cada cultura do caldo pré-enriquecido foi semeada pela técnica de esgotamento, em placas de Petri descartável estéreis contendo ágar XLD (Kasvi®, Brasil) e ágar MacConkey (Kasvi®, Brasil), incubadas a 37°C por 24h. Após o período de crescimento, para o isolamento e pureza da bactéria, de cada uma das placas semeadas, colônias com características sugestivas de *Salmonella* foram inoculadas em novas placas contendo o ágar XLD, incubadas a 37°C por 24h. As colônias sugestivas do gênero *Salmonella* foram transferidas para tubos do tipo eppendorfs (2 mL) contendo meio Brain Heart Infusion (BHI) (Kasvi®, Brasil) adicionado de Glicerol na proporção 1:1 (concentração final de 25%), e armazenadas em ultrafreezer a -80°C (Figura 4).

Após o período de incubação, testes bioquímicos foram realizados, retirando de cada uma das placas, três a cinco colônias, as quais foram inoculadas em tubos contendo ágar TSI (Thermo Scientific™ Oxoid™) e ágar LIA (Thermo Scientific™ Oxoid™) e incubadas a 37° por 24h. Concomitantemente, colônias foram submetidas a coloração de Gram.

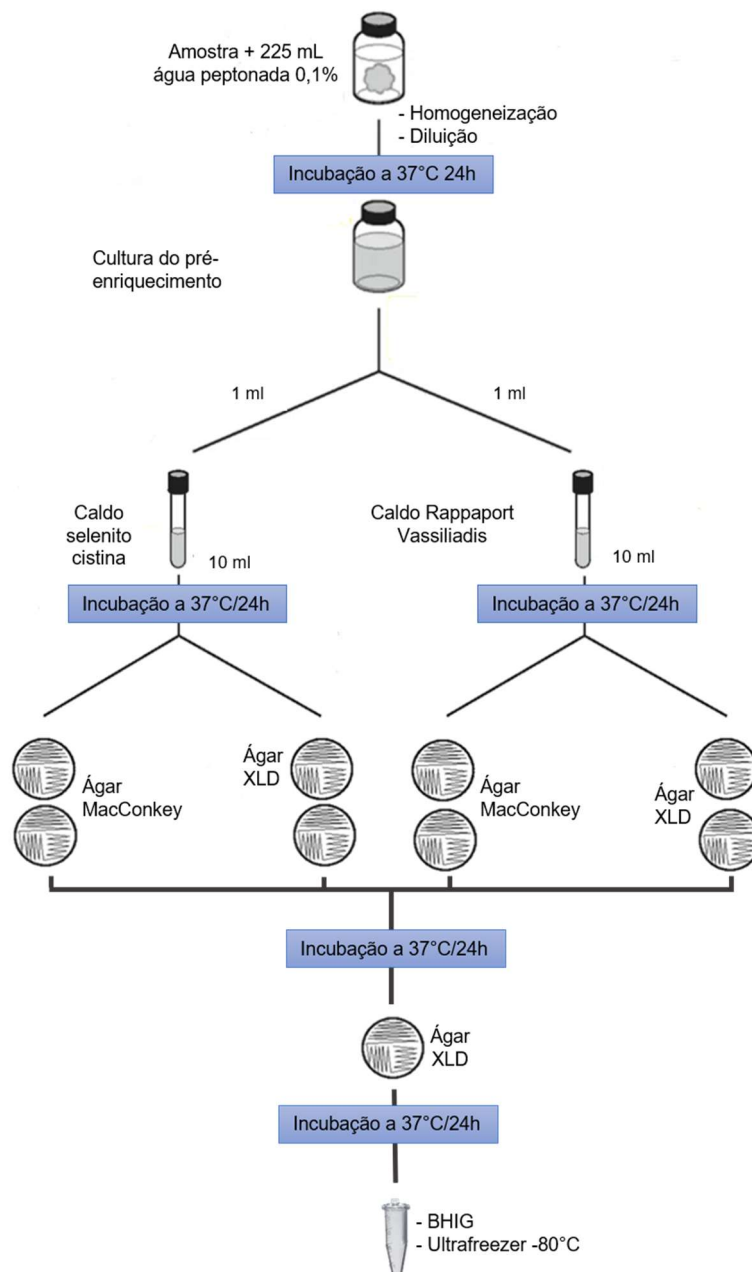


Figura 4. Esquema geral das análises microbiológicas realizadas para isolamento da bactéria.

2.3. Confirmação genotípica

2.3.1. Extração de DNA

Para a identificação da bactéria, colônias sugestivas de *Salmonella* foram repicadas em meio BHI, incubadas a 37°C por 24h e submetidas a extração do DNA com o auxílio do kit comercial DNeasy Blood & Tissue Handbook (QIAGEN®),

seguindo o protocolo de purificação total do DNA de tecido animal fornecido pelo próprio fabricante.

O DNA extraído foi avaliado em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific®) para observação da concentração e mensuração da absorbância a 230, 280 e 260 nm para estabelecimento das relações 260/280 e 260/230, indicando contaminantes por solventes orgânicos e proteínas respectivamente.

2.3.2. Reação em Cadeia Polimerase (PCR)

A partir do DNA das amostras, foram realizadas reações de PCR para a detecção dos genes *invA* e 16S rRNA presentes em *Salmonella* spp. (Tabela 2). A PCR foi realizada em um volume final de 25 µL, adotando as recomendações para uso do kit Platinum™ II Taq Hot-Start DNA Polymerase (Invitrogen™) utilizando primers específicos para o gene *invA*. As condições de amplificação no termociclador foram: desnaturação inicial à 94°C por dois minutos, 30 ciclos de 94°C, 60°C e 68°C por 15 segundos cada, após os 30 ciclos a reação é resfriada se mantendo por 4°C.

Tabela 2. Sequências dos genes para reações de PCR.

Gene		Sequência (5'-3')	Produto amplificado (pb)	Referência
<i>invA</i>		F: CGGTGGTTTTAAGCGTACTATT R: CGAATA TGC TCC ACAAGG TTA	796	Fratamico & Strobaugh 1998
16S rRNA	UN-20	F: GCCCTAGTTACCAGTTTTAC	1.450	Triyanto & Wakabayashi, 1999
	R1438	R: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG		Darwish & Ismaiel 2005

O produto de PCR obtido foi analisado em gel de agarose 1,5% corado com Nancy® (ThermoFisher, CA, EUA). O gel resultante foi fotografado sob a luz UV utilizando scanner de gel (Loccus Biotecnologia).

2.3.3. Sequenciamento genético

As cepas identificadas molecularmente pelos genes *invA* e 16S rRNA foram encaminhadas ao Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO) para realização do sequenciamento genético.

2.3.4. Processamento dos dados de sequenciamento

Inicialmente, as sequências brutas foram avaliadas visualmente com o auxílio dos programas Bioedit (Bioedit 7.7.1; Hall, 1999) e FinchTV (Geospiza) (Gallagher e Wiley, 2008) para remover leituras de baixa qualidade. As leituras de baixa qualidade foram removidas em cada sequência *forward* e *reverse*, e sequências consenso foram realizadas através do programa Bioedit, as quais foram usadas para a identificação das cepas através do banco de dados “GenBank”, utilizando a ferramenta BLAST no “National Center for Biotechnology Information” (NCBI). As sequências consensos obtidas serão depositadas no banco de dados NCBI GenBank.

2.4. Caracterização genotípica: análise filogenética

Para a análise filogenética, foi criada uma biblioteca no NCBI, com sequências do gene *invA* de isolados clínicos e ambientais, em países da Ásia, Europa e África. Adicionalmente, uma sequência de *Citrobacter freundii* foi utilizada, pois ela é uma espécie próxima e de referência na confecção da filogenia, com o objetivo de enraizar a árvore. As sequências foram alinhadas com o auxílio da ferramenta MAFFT v.7 (Katoh & Standley, 2013), obtendo um número de posições para a determinação do modelo evolutivo e posterior análise filogenética. Para a construção da árvore foi usado o método de Máxima Verossimilhança (ML) confeccionada através do software MEGA 7 (Tamura *et al.* 2011), que consiste em procurar pela árvore que tenha maior probabilidade de acordo com o conjunto de dados observados. A árvore foi refinada com o auxílio do programa que permite editar a imagem (PowerPoint).

3. RESULTADOS

3.1. Amostras

Cepas de *Salmonella* foram isoladas de tambaquis produzidos em viveiros escavados em diferentes fases de produção (alevino, juvenil e adulto). Os parâmetros físico-químicos da água (Tabela 3) apresentaram valores considerados normais para a espécie e em conformidade com as normas estabelecidas na Resolução nº 357/2005 pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA.

Tabela 3. Parâmetros físico-químicos da água dos viveiros em relação aos parâmetros estabelecidos pela Resolução CONAMA nº 357/2005.

FASE	VIVEIRO	TEMP. °C	pH	O.D.	AMÔNIA	ALC.	TRANSP.
Engorda	1	30.6	7.0	8.2	0.10	30	22
	2	30.1	8.0	8.1	0.10	40	13
	3	30.4	7.0	8.2	0.25	40	34
Juvenil	1	30.0	7.5	7.5	0.10	50	10
	2	29.3	7.0	7.4	1.0	50	14
	3	30.2	7.0	7.7	0.10	30	29
Alevino	1	30.1	7.0	7.4	0.25	30	40
	2	30.2	6.5	5.6	0.10	60	29
	3	30.1	7.0	4.1	0.10	30	36
Resol. CONAMA 357/2005		25 - 30	6.5 - 8.0	>4.0	<1.0	>40	≤100

3.2. Cultivo e identificação de *Salmonella*

De um total de 90 amostras entre músculo e intestino coletadas de tambaquis nas fases de alevino, juvenil e adulto, obteve-se 54 isolados sugestivos de *Salmonella* nos caldos de enriquecimento seletivo Selenito Cistina e/ou Rappaport, seguidos de plaqueamento em meio XLD e MacConkey, com repiques de colônias sugestivas em meio XLD (Figura 5) e descarte das demais, representando 40 animais possivelmente infectados dos 45 que foram amostrados.

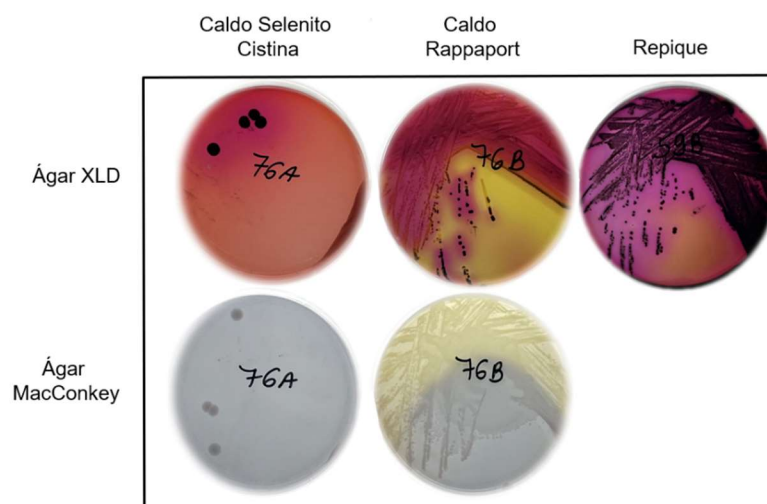


Figura 5. Cultivo em Ágar XLD e Ágar MacConkey, obtidas após enriquecimento em Caldo Selenito Cistina e Caldo Rappaport. Repique em Ágar XLD para pureza da bactéria.

Para a caracterização e classificação inicial das bactérias, foi realizada a coloração de Gram, que permitiu verificar que todos os isolados se tratavam de bactérias Gram-negativas (Figura 6).

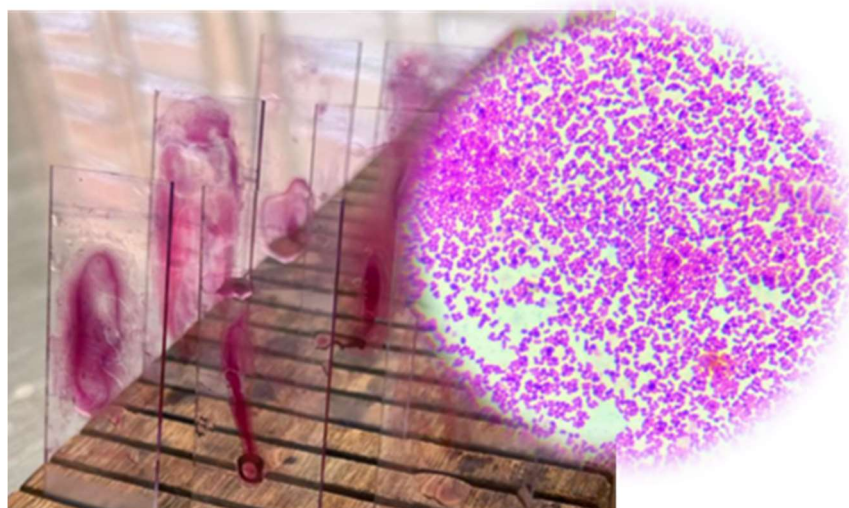


Figura 6. Coloração de Gram das amostras para caracterização inicial das bactérias.

Dos 54 isolados submetidos aos testes bioquímicos em tubos contendo ágar TSI, 44 foram positivos com características sugestivas de *Salmonella*, apresentando coloração avermelhada na parte superior e amarelada com uma zona enegrecida na parte inferior e 10 foram negativos exibindo coloração amarelada na parte inferior, ou em todo o meio, e com produção de gás. Já para LIA, 45 foram

positivos apresentando coloração púrpura com a presença de Lisina Descarboxilase, como sugere a literatura, tornado a interpretação das amostras mais precisa, e 9 foram negativos exibindo coloração amarelada, esverdeada ou sem alteração aparente. (Figura 7).

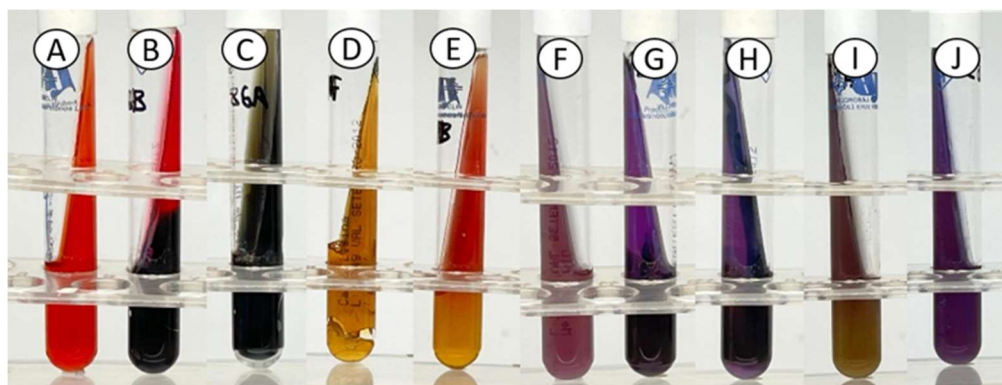


Figura 7. Interpretação dos tubos contendo meio TSI e LIA inclinado. (A)Amostra controle contendo meio TSI sem inoculação de bactérias; (B)Amostra Positivo - produção de H₂S; (C)Amostra Positivo – produção de H₂S e aparência de meio amarelado; (D)Amostra Negativo – todo o meio na cor amarelo, sem produção de H₂S e alta produção de CO₂; (E)Amostra Negativo – sem produção de H₂S, amarelo na parte inferior e avermelhado na superior; (F)Amostra controle contendo meio LIA sem inoculação de bactérias; (G)Amostra Positivo – cor púrpura; (H)Amostra Positivo – cor púrpura; (I)Amostra Negativo – cor esverdeada; (J)Amostra Positivo – cor púrpura.

3.3. Confirmação genotípica

Para a confirmação genotípica, foram selecionadas 18 cepas com características distintas, dentre um total de 54 isolados sugestivos de *Salmonella*. Essas cepas foram previamente repicadas em meio BHI, incubadas a 37 °C por 24 horas e submetidas à extração de DNA, com o objetivo de otimizar o uso dos kits de extração disponíveis no início da pesquisa.

Dentre essas 18 cepas, oito eram provenientes de tambaquis adultos, três de juvenis e sete de alevinos. Todas foram amplificadas com o gene *invA*, e apenas quatro destas foram repicadas e amplificadas com o gene 16S rRNA, conforme apresentado na Tabela 4.

Tabela 4. Relação das amostras submetidas a extração de DNA. MT = músculo tambaqui; IT= intestino tambaqui.

PCR	AMOSTRA	GENE	FASE
1	14MT	<i>invA</i>	Adulto
2	37MT	<i>invA</i>	Alevino
3	51IT	<i>invA</i>	Adulto
4	67IT	<i>invA</i>	Juvenil
5	S. Dublin*	<i>invA</i>	-
6	4MT	<i>invA</i>	Adulto
7	6MT	<i>invA</i>	Adulto
8	11MT	<i>invA</i>	Adulto
9	18MT	<i>invA</i>	Juvenil
10	20MT	<i>invA</i>	Juvenil
11	31MT	<i>invA</i>	Alevino
12	39MT	<i>invA</i>	Alevino
13	44MT	<i>invA</i>	Alevino
14	49IT	<i>invA</i>	Adulto
15	56IT	<i>invA</i>	Adulto
16	59IT	<i>invA</i>	Adulto
17	76IT	<i>invA</i>	Alevino
18	84IT	<i>invA</i>	Alevino
19	85IT	<i>invA</i>	Alevino
20	14MT	16S rRNA	Adulto
21	37MT	16S rRNA	Alevino
22	51IT	16S rRNA	Adulto
23	67IT	16S rRNA	Juvenil
24	S. Dublin*	16S rRNA	-

* Amostra controle positivo.

Por meio da técnica de PCR e da amplificação do gene *invA* presente em *Salmonella*, duas amostras (59IT e 76IT) apresentaram resultado positivo para a bactéria. Na amplificação do gene 16S rRNA, quatro amostras foram positivas (14MT, 37MT, 51IT e 67IT), conforme demonstrado na Figura 8.

As 36 amostras remanescentes foram processadas posteriormente, após a aquisição de novos kits, e submetidas à amplificação do gene *invA*; entretanto, nenhuma delas apresentou resultado positivo para *Salmonella*. Dessa forma, apenas as amostras que obtiveram resultado positivo foram encaminhadas para sequenciamento genômico e confirmação da espécie.

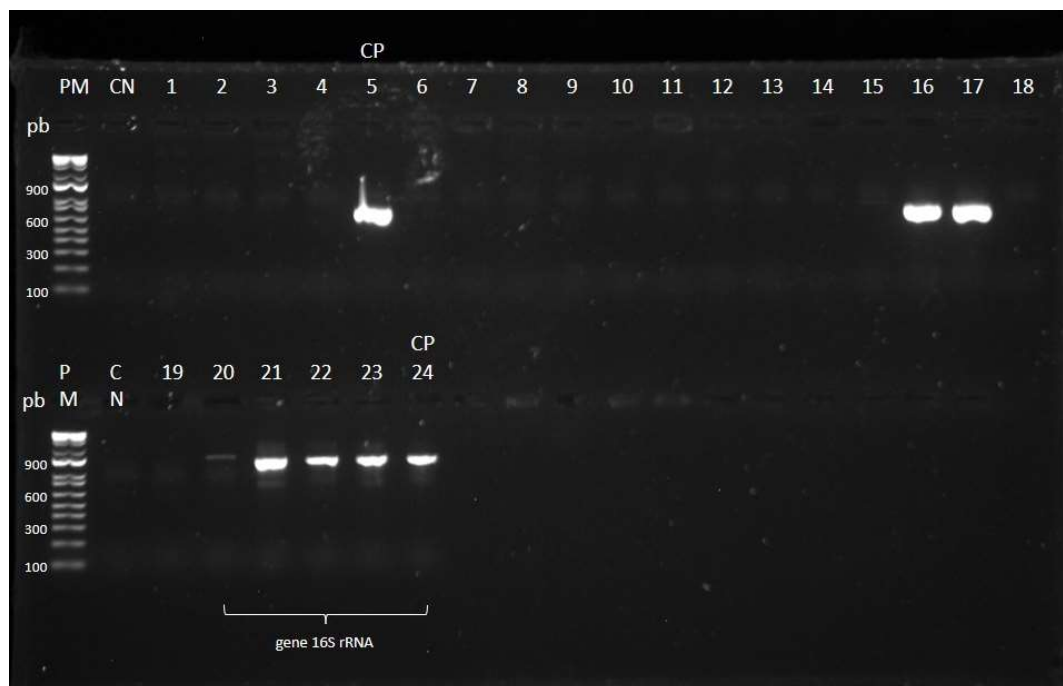


Figura 8. Eletroforese em gel agarose 1,5% com visualização de produto amplificado com o gene *invA* e com o gene 16S rRNA para identificação de *Salmonella* spp. PM: Marcador de Peso Molecular Ladder 1 kb Plus (Invitrogen); CN: Controle Negativo; CP: Controle Positivo (*S. Dublin*); (pb) pares de base.

Das amostras sequenciadas pelo CREBIO (Tabela 5), duas (59IT, 76IT) foram identificadas como *Salmonella enterica*, três (37MT, 51IT e 67IT) como *Edwardsiella tarda*, e uma (14MT) não obteve amplificação necessária para identificação, sendo gerada a sequência consenso entre os amplicons senso e antisenso sequenciados. As amostras usadas como controle positivo são de *S. Dublin*, um sorovar de *Salmonella* pertencente a *S. enterica* subespécie *enterica*, o que corrobora com os resultados obtidos.

Tabela 5. Identificação das amostras encaminhadas para sequenciamento genético e resultados obtidos.

Amostra	Gene	Fase	Resultado
59IT	<i>invA</i>	Adulto	<i>Salmonella enterica</i>
76IT	<i>invA</i>	Alevino	<i>Salmonella enterica</i>
14MT	16S rRNA	Adulto	-
37MT	16S rRNA	Alevino	<i>Edwardsiella tarda</i>
51IT	16S rRNA	Adulto	<i>Edwardsiella tarda</i>
67IT	16S rRNA	Juvenil	<i>Edwardsiella tarda</i>

Os isolados identificados como *Salmonella enterica* correspondem a amostras retiradas do intestino de tambaqui, sendo 59IT obtida do tambaqui na fase adulto e 76IT na fase de alevino.

As sequências analisadas foram corrigidas manualmente com auxílio das ferramentas FinchTV e alinhadas com BLASTn(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PRORGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome). Com o uso dos softwares Bioedit e AliView foi possível a construção da árvore filogenética, a qual foi comparada com uma biblioteca criada com 24 sequências obtidas do gene *invA* existentes no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Na análise filogenética, as sequências parciais do gene *invA* das cepas 59IT e 76IT, bem como a cepa de controle de *S. Dublin*, apresentaram similaridade acima de 98% com diversas sequências de *Salmonella* depositadas no GenBank, incluindo aquelas isoladas de pacientes na Tailândia (CP104805, CP104820), sangue humano na Tanzânia (CP129108), Chile (CP120394) e Israel (CP156168), e fezes humana na Suíça (CP160169, CP160181) e na China (CP162902), além de animais como porco na Coreia do Sul (CP149167) e cachorro na Tailândia (CP169317). Conforme demonstrado na Figura 9. As cepas deste estudo foram incluídas no clado de *S. enterica* e diferenciadas de outros táxons reconhecidos de *S. bongori* na árvore construída usando sequência de gene *invA*.

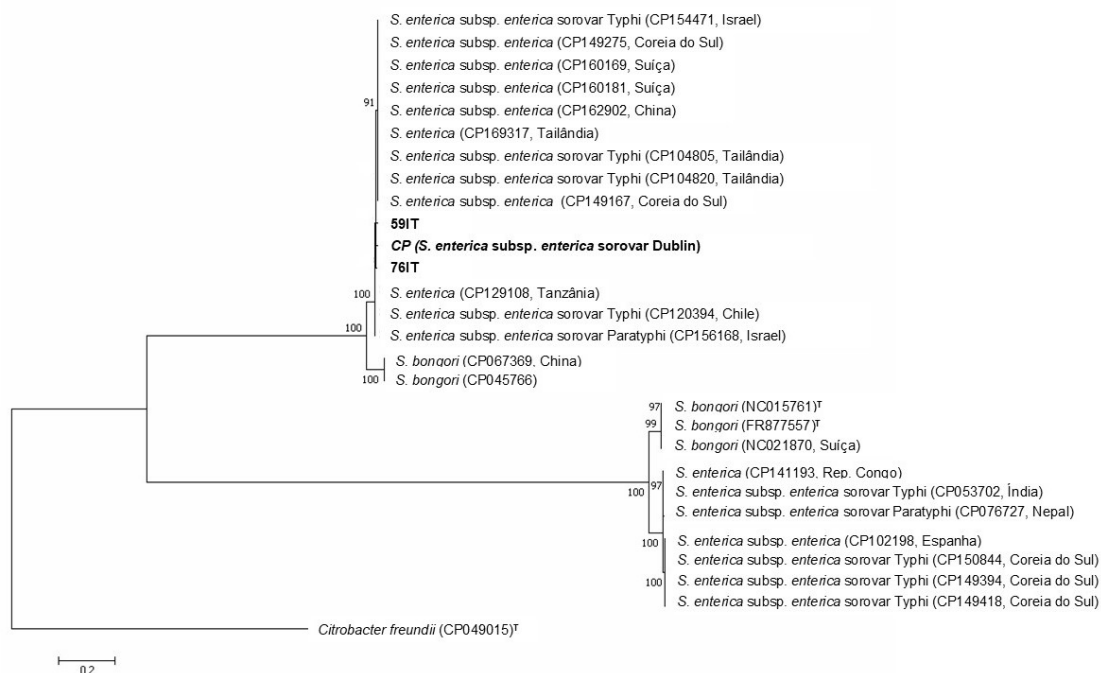


Figura 9. Árvore filogenética enraizada construída pelo método de Máxima Verossimilhança (ML) com base em análises individuais de sequências de gene *invA* de dois isolados clínicos deste estudo (59IT e 76IT), juntamente com a cepa CP (*S. Dublin*) usada como controle positivo, 24 cepas de *Salmonella* isoladas de diferentes hospedeiros. A cepa *Citrobacter freundii* foi usada como referência para enraizamento da árvore. O conjunto de dados final foi de 1.827 pb. As análises evolutivas foram realizadas no MEGA 7.

4. DISCUSSÃO

A presença de *Salmonella* nos tambaquis corrobora com estudos prévios que indicam que ambientes de produção intensiva podem ser fontes de contaminação por patógenos devido à alta densidade de peixes e à possível contaminação da água por dejetos animais.

Neste estudo, a bactéria foi identificada em amostras do intestino de alevinos e adultos de tambaqui. Nossa hipótese é que existe uma fase de produção de ponto crítico de controle e que há maior incidência de contaminação dos peixes ainda na fase de alevinagem, através da água contaminada com *Salmonella*, principalmente nos meses de temperaturas mais elevadas, que propiciam a multiplicação mais rápida da bactéria, facilitando a infecção dos peixes (Waldner et al., 2012; Akil et al., 2014).

Com a necessidade de reabastecimento dos viveiros em período de estiagem, a introdução e disseminação de *Salmonella* na piscicultura pode ocorrer

frequentemente pela contaminação da água, seja por uso de rios poluídos ou de águas residuais de atividades agrícolas ou de residências próximas a rios (El-Shafai et al., 2004). Embora *Salmonella* não seja nativa de ambientes aquáticos, ela pode sobreviver neles na presença de matéria orgânica (Winfield & Groisman, 2003). Estudos também relatam que, em áreas em que a água é compartilhada entre irrigação agrícola, criação de gado e piscicultura, o risco de contaminação por *Salmonella* é significativamente maior (Gaul et al., 2013).

Em países como os Estados Unidos e Canadá, onde os padrões de biossegurança na aquicultura são mais rigorosos, a incidência de *Salmonella* nos peixes oriundos da piscicultura é menor, mas ainda relevante. Relatórios do FDA (*Food and Drug Administration*) indicam que surtos de *Salmonella* podem ocorrer em instalações onde há falhas no controle de qualidade, como em casos contaminação cruzada, em que o manuseio de utensílios ou a alimentação é contaminada, ou a água de origem é inadequadamente tratada (Gaul et al., 2013). Na Europa, a situação é semelhante. Na Espanha e Itália, a contaminação dos peixes de piscicultura por *Salmonella* tem sido associada ao uso de águas superficiais contaminadas por esgotos agrícolas ou urbanos (Pintar et al., 2012).

Outro fator que deve ser levado em consideração é as aves e pequenos mamíferos que transitam próximos aos viveiros, pois as aves são hospedeiros frequentes de *Salmonella* e podem excretar a bactéria em suas fezes, contaminando o solo e a água, o que facilita a transmissão para peixes (Foley et al., 2008). Nas pisciculturas onde os viveiros são abertos e não possuem proteção antipássaros, as aves selvagens são frequentes e a probabilidade de contaminação por aves infectadas aumenta. Esse cenário foi observado em surtos de salmonelose em aves canoras na América do Norte, em que a bactéria foi encontrada em grande número nas fezes e ambientes frequentados por aves migratórias e locais (CDC, 2024; UC Davis, 2021).

Alguns estudos mostram que cepas de *S. enterica* isoladas de peixes compartilham similaridade genética com cepas encontradas em outros animais, sugerindo uma possível origem comum ou transmissão cruzada. Em estudo realizado por Li et al. (2014), foi observado que cepas de *S. enterica* isoladas de tilápias provenientes de piscicultura, na China, apresentavam perfis genéticos semelhantes aos encontrados em suínos e aves na mesma área. Esses achados

reforçam a hipótese de disseminação interespecies de *Salmonella* em ambientes de produção animal, indicando que práticas de manejo e biossegurança são cruciais para evitar a propagação do patógeno entre diferentes espécies, conforme recomenda o Manual de Boas Práticas para Controle de *Salmonella* em Tambaqui e Peixes Redondos (Galvão; Fabricio, 2023).

Levando em consideração o sistema produtivo, a alta densidade de estocagem, as mudanças bruscas de temperatura e de pH, podem estar associados a susceptibilidade dos peixes à infecção por *Salmonella* devido ao estresse. Condições estressantes causam imunossupressão do sistema imunológico, tornando-os mais vulneráveis a infecções bacterianas, incluindo *Salmonella*, principalmente em ambientes em que o número de patógenos é elevado (Barton, 2002; Weyts et al., 1999; Reed et al., 2012).

Em nosso estudo, *Salmonella enterica* permaneceu viável nos peixes mesmo após o armazenamento em sacos plásticos estéreis, congelamento e o transporte até o laboratório, demonstrando sua resistência às condições adversas e eleva significativamente o risco de surtos alimentares. Nos Estados Unidos, casos de salmonelose em humanos foram associados ao consumo de frutos do mar e peixes importados de países em que as práticas sanitárias são menos rigorosas (Gaul et al., 2013). Dessa forma, surtos de *Salmonella* relatados em pisciculturas têm implicações diretas na saúde pública, pois a infecção em humanos pode ocorrer tanto pelo consumo direto de peixes contaminados quanto pela contaminação cruzada em frigoríficos, cozinhas e instalações de processamento de alimentos.

A presença de *Salmonella enterica* em tambaquis de piscicultura representa um risco potencial para a saúde pública, especialmente para as regiões em que o consumo de pescado é alto. Outro ponto a ser levado em consideração é o número de cepas dessa bactéria resistentes aos antimicrobianos, alguns importantes para a medicina humana, se tornando uma ameaça à saúde pública pelo risco de disseminação de genes de resistência aos antimicrobianos. A identificação de *Salmonella* em ambientes aquáticos e o entendimento de seus mecanismos de sobrevivência em tais condições podem orientar práticas mais seguras e o uso racional de antimicrobianos.

O isolamento de *Salmonella* spp. em tambaquis e outros peixes de produção apresenta desafios significativos devido à exigência nutricional da bactéria e à sua semelhança microbiológica com *Proteus* spp., que pode crescer em meios seletivos e dificultar a identificação. Métodos microbiológicos convencionais, como o uso de meios seletivos (XLD, MacConkey) e testes bioquímicos (TSI, LIA), muitas vezes não são suficientes para diferenciar com precisão essas bactérias, tornando essencial a aplicação de técnicas moleculares, como PCR para os genes *invA* e 16S rRNA.

A genotipagem por PCR, especialmente do gene *invA*, amplamente aceito como marcador para detecção de *Salmonella*, foi fundamental para a confirmação da espécie. Fratamico & Strobaugh (1998) destacaram a especificidade do gene *invA*, que possui alta sensibilidade para detecção de *Salmonella* em diferentes tipos de amostras. A detecção positiva em duas amostras e a amplificação do gene 16S rRNA em quatro amostras, confirma a presença de *Salmonella enterica*, corroborando a precisão do protocolo genotípico empregado. Esse tipo de análise molecular contribui significativamente para a identificação precisa de patógenos em produtos alimentares (Sebastião et al., 2015).

A presença de *Salmonella* em pescado representa um risco à saúde pública, o que reforça a importância do cumprimento da legislação sanitária, como a IN 161 de 2022 do MAPA, que estabelece critérios microbiológicos para produtos da pesca, incluindo a ausência de *Salmonella* em 25g de amostra. Assim, o monitoramento rigoroso da bactéria em sistemas de produção aquícola, aliado à adoção de boas práticas de manejo e controle sanitário, é essencial para garantir a segurança dos alimentos e atender às exigências regulatórias. De modo a contribuir, a longo prazo, para a sustentabilidade da cadeia produtiva e consequentemente para exportação com a obtenção do selo de indicação geográfica.

Os resultados da análise filogenética indicam que as cepas de *S. enterica* proveniente do intestino de tambaqui compartilham alta similaridade genética com cepas de *Salmonella* isoladas de diversos hospedeiros e áreas geográficas, e que as sequências do gene *invA* das cepas 59IT e 76IT apresentam mais de 98% de similaridade com sequências de *Salmonella* isoladas de amostras humanas e animais em diferentes países, reforçando a ampla distribuição e potencial de

adaptação desse patógeno à múltiplos hospedeiros e ambientes. A alta similaridade do gene *invA* entre cepas de diferentes regiões e hospedeiros está associada à sua conservação evolutiva, pois este gene é crucial para a sobrevivência e virulência de *Salmonella* em diferentes ambientes e nichos ecológicos (Fan et al., 2022).

Vale ressaltar que um fator limitante deste trabalho foi a condução do processo de coleta das amostras, que tiveram de ser congeladas para o transporte aéreo até laboratório. Esse procedimento ocorreu devido à falta de profissionais da área microbiológica na região, bem como a falta de estrutura e equipamentos adequados para realização das análises, além de materiais necessários para as devidas coletas. Essas limitações tornam este trabalho de grande relevância, considerando que mesmo após o congelamento das amostras a uma temperatura -25°C, foi possível ainda detectar duas cepas de *Salmonella enterica* nas amostras de tambaqui, fato que comprova a necessidade de investimento em pesquisas no setor aquícola da região Norte do país.

5. CONCLUSÃO

A detecção e caracterização genotípica de *Salmonella enterica* em tambaquis (*Colossoma macropomum*) evidenciaram a presença desse importante patógeno zoonótico em diferentes fases da produção aquícola, inclusive em indivíduos nas fases de alevino e adulto. A confirmação molecular, por meio da amplificação dos genes *invA* e *16S rRNA*, seguida da análise filogenética, demonstrou alta similaridade das cepas isoladas com outras cepas de *Salmonella* oriundas de diferentes regiões geográficas e hospedeiros, indicando a capacidade adaptativa e o risco de disseminação desse microrganismo em ambientes de criação. Os resultados reforçam a necessidade do monitoramento microbiológico constante e da adoção de práticas rigorosas de biossegurança, considerando fatores como qualidade da água, densidade de estocagem e presença de vetores. A identificação de *S. enterica* em uma das espécies de peixe mais consumidas no Brasil destaca a urgência na implementação de medidas eficazes de controle sanitário ao longo de toda a cadeia produtiva. Assim, este estudo contribui significativamente para o entendimento da epidemiologia de *Salmonella* na aquicultura, fornecendo subsídios para políticas públicas voltadas à segurança alimentar, saúde pública e

sustentabilidade do setor, dentro do conceito One Health, que integra a saúde humana, animal e ambiental, além de servir para a elaboração de protocolos que visem minimizar o risco de contaminação pela bactéria na aquicultura.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abey, S. L., Gedefawa, M., Molla, W., Dagnaw, G. G., Mengistu, B. A., Kinde, M. Z., Nigatu, S., Jemberu, W. T., Adugna, T., Berju, A., Dagnachew, S., Birhanu, K., Ejo, M., & Bitew, A. B. (2024). Molecular detection and antimicrobial resistance profile of *Salmonella* isolated from humans, animals, abattoir equipment and environment. *Applied Food Research*, 4, 100437. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2024.100437>

Akil, L., & Ahmad, N. (2014). Fatores ambientais e biológicos na contaminação de peixes por patógenos bacterianos: Um estudo de caso em ambientes aquáticos. *Journal of Fish Disease*, 37(10), 831-839. <https://doi.org/10.1111/jfd.12221>

Akil, L., & Ahmad, N. (2019). Cross-contamination in slaughterhouses: A significant source of *Salmonella* transmission contributing to foodborne infections. *Food Control*, 98, 12-17. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.11.014>

American Public Health Association. (2001). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Washington, DC.

Andino, A., & Hanning, I. (2015). *Salmonella enterica*: Survival, colonization, and virulence differences among serovars. *ScientificWorldJournal*, 2015, 520179. <https://doi.org/10.1155/2015/520179>

Baras, E., Amaral, H., Mathot, E., & Slembrouck, J. (2020). Feeding and growth performance of juvenile tambaqui, *Colossoma macropomum* in different aquaculture settings. *Aquaculture Reports*, 16, 100248. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100248>

Barton, B. A. (2002). Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology*, 42(3), 517-525. <https://doi.org/10.1093/icb/42.3.517>

Bäumler, A. J., Tsolis, R. M., Fahlen, T. F., & Heffron, F. (2000). A virulência de *Salmonella enterica*: Mecanismos de patogenicidade e a interação com o hospedeiro. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(3), 734-753. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.3.734-753.2000>

Bierschenk, D., Boucher, D., & Schröder, K. (2017). *Salmonella*-induced inflammasome activation in humans. *Molecular Immunology*, 86, 38-43. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.02.008>

Billah, M. M., & Rahman, M. S. (2024). *Salmonella* in the environment: A review on ecology, antimicrobial resistance, seafood contaminations, and human health implications. *Journal of Hazardous Materials Advances*, 13, 100407. <https://doi.org/10.1016/j.hazadv.2024.100407>

Bollaerts, K., De Bock, F., Mertens, T., Wuyts, M., & Ceuppens, S. (2008). Human salmonellosis: Estimation of dose-illness from outbreak data. *Risk Analysis*, 28(2), 427-440. <https://doi.org/10.1111/j.1539-6924.2008.01080.x>

Braden, C. R. (2012). Suspecting foodborne illnesses in special populations: Quick facts for providers. *Medscape*. <https://www.medscape.com/viewarticle/758303>

Brasil. (2005). Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005: Estabelece as classes de corpos de água e os padrões de qualidade e os critérios ambientais para lançamento de efluentes. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). *Diário Oficial da União*.

Brasil. (2022). Ministério da Agricultura e Pecuária. Instrução Normativa nº 161, de 1º de setembro de 2022. Estabelece os critérios microbiológicos para alimentos de origem animal. *Diário Oficial da União*: seção 1, Brasília, DF, 05 set. 2022. Disponível em: <https://www.in.gov.br>. Acesso em: 10/02/2025.

Brooks, G. F., Carroll, K. C., Butel, J. S., Morse, S. A., & Mietzner, T. A. (2010). Bacilos entéricos Gram-negativos (Enterobacteriaceae). In _____ (Ed.), *Microbiologia Médica* (25ª ed., pp. 213-224). Porto Alegre, Brasil: Artmed. (Tradução de 2012)

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2024). *Salmonella* outbreak linked to wild songbirds. Recuperado de <https://www.cdc.gov>

Chen, Y., Liu, X., Zhang, Q., Wang, L., & Li, M. (2024). Avanços no estudo das infecções por *Salmonella* e suas implicações em saúde pública e segurança

alimentar. *International Journal of Microbiology and Health*, 35(2), 210-223.
<https://doi.org/10.1016/j.ijmh.2024.01.002>

Coburn, B., Grassl, G. A., & Finlay, B. B. (2007). *Salmonella*, the host and disease: A brief review. *Immunology and Cell Biology*, 85(2), 112-118.
<https://doi.org/10.1038/sj.icb.7100043>

D'Aoust, J. Y., & Maurer, J. (2007). *Salmonella* species. In *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers* (3rd ed., pp. 187-188). ASM Press.

Darwish, A. M., & Ismaiel, A. A. (2005). Genetic diversity of *Flavobacterium columnare* examined by restriction fragment length polymorphism and sequencing of the 16S ribosomal RNA gene and the 16S-23S rDNA spacer. *FEMS Microbiology Letters*, 245(1), 89-96. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.02.003>

Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), 417-433.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10>

Dewi, R. R., Hassan, L., Daud, H. M., Matori, M. F., Nordin, F., Ahmad, N. I., Zakaria, Z. (2022). Prevalence and antimicrobial resistance of *Escherichia coli*, *Salmonella*, and *Vibrio* derived from farm-raised red hybrid tilapia (*Oreochromis spp.*) and Asian sea bass (*Lates calcarifer*, Bloch 1970) on the West coast of Peninsular Malaysia. *Antibiotics*, 11(2), 136.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics11020136/S1>

El-Shafai, S. A., El-Gohary, F. A., Nasr, F. A., van der Steen, N. P., & Gijzen, H. J. (2004). Chronic ammonia toxicity to duckweed-fed tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 232(1-4), 1-12.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.08.027>

Elhadi, N. (2014). Antibacterial activity of amoxicillin-clavulanic acid and ampicillin against clinical isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(5), 1420-1425. <https://doi.org/10.1093/jac/dku005>

Ellis, A. E. (2001). Stress and the modulation of fish immune responses. *Fish & Shellfish Immunology*, 11(6), 455-459. <https://doi.org/10.1006/fsim.2001.0325>

Eng, S. S., Wong, L. Y., Tan, T. K., & Lee, K. H. (2015). *Salmonella enterica*: Causas e consequências das infecções alimentares em seres humanos. *Journal of Foodborne Diseases*, 12(4), 45-58. <https://doi.org/10.1111/jfd.12109>

European Food Safety Authority (EFSA). (2014). EFSA explains zoonotic diseases: *Salmonella*. Recuperado de https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/corporate_publications/files/factsheet_salmonella.pdf

Fàbrega, A., & Vila, J. (2013). A patogênese de *Salmonella enterica*: Mecanismos de infecção e resistência aos antibióticos. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(3), 336-347. <https://doi.org/10.1128/CMR.00066-12>

Fan, Y., Zhang, M., Li, H., & Chen, W. (2022). The persistence of *Salmonella* in fish and seafood: A comprehensive review. *Journal of Food Safety*, 42(5), e13048. <https://doi.org/10.1111/jfs.13048>

Fardsanei, F., Goudarzi, M., Rezaee, M. A., & Hasani, A. (2017). Genetic diversity and virulence genes of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serotype Enteritidis isolated from meats and eggs. *Microbial Pathogenesis*, 107, 451-456. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.04.017>

Feasey, N. A., Angus, C. A., Nyirenda, T. E., Msefula, C. L., & Gordon, M. A. (2012). Invasive non-typhoidal *salmonella* disease: An emerging and neglected tropical disease in Africa. *The Lancet*, 379(9835), 2489-2499. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60435-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60435-9)

Foley, S. L., Nayak, R., Hanning, I. B., Johnson, T. J., Han, J., & Ricke, S. C. (2008). Population dynamics of *Salmonella enterica* serotypes in commercial egg and poultry production. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(7), 1935-1945. <https://doi.org/10.1128/AEM.02207-07>

Foley, S. L., Lynne, A. M., & Nayak, R. (2011). *Salmonella* challenges: Prevalence in swine and poultry and potential pathogenicity of such isolates. *Journal of Animal Science*, 89(4), 1320-1323. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3321>

Frye, J. G., & Jackson, C. R. (2013). Ecologia, epidemiologia e controle de *Salmonella* em produtos alimentares: Um panorama atual. *Foodborne Pathogens and Disease*, 10(7), 619-626. <https://doi.org/10.1089/fpd.2013.1495>

Fratamico, P. M., & Strobaugh, T. P. (1998). Detection of *Salmonella* spp. in food using conventional and molecular methods. In D. O. Cliver (Ed.), *Foodborne Pathogens* (pp. 167-191). Wiley.

Gallagher, S. R., & Wiley, E. A. (2008). *Current protocols essential laboratory techniques*. John Wiley & Sons, Inc.

Galvão, J. A., & Fabricio, L. F. de F. (2023). *Manual de Boas Práticas para Controle de Salmonella em Tambaqui e Peixes Redondos*. Piracicaba

Gaul, L. K., et al. (2013). Molecular characterization of *Salmonella* from imported seafood: Implications for public health. *Food Research International*, 52(2), 481-488. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.043>

Hall, T. A. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98. <https://doi.org/10.1093/nass/nag010>

Hendriksen, R. S., Vieira, A. R., Karlsmose, S., et al. (2011). Global monitoring of *Salmonella* serovar distribution from the World Health Organization global foodborne infections network country data bank: Results of quality assured laboratories from 2001 to 2007. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(8), 887-900. <https://doi.org/10.1089/fpd.2011.0849>

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). (2022). *Produção da Pecuária Municipal*. Recuperado de <https://www.ibge.gov.br>

Issenhuth-Jeanjean, S., Roggentin, P., Mikoleit, M., Guibourdenche, M., de Pinna, E., Nair, S., et al. (2014). Supplement 2008-2010 (n°. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Research in Microbiology*, 165(7), 526–530. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.04.004>

Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4), 772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>

Li, L., Wang, X., Zhang, X., & Liu, Z. (2014). *Salmonella* contamination in aquaculture systems in China. *Journal of Applied Microbiology*, 117(1), 28-35. <https://doi.org/10.1111/jam.12517>

Lima, A. F., Costa, M. B., & Ferreira, J. M. (2021). Aquaculture in the Amazon: The case of Tambaqui. *Aquaculture Reports*, 19, 100539. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100539>

Majowicz, S. E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F. J., Kirk, M., O'Brien, S. J., Jones, T. F., Fazil, A., & Hoekstra, R. M. (2010). The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. International Collaboration on Enteric Disease 'Burden of Illness' Studies. *Clinical Infectious Diseases*, 50(6), 882-889. <https://doi.org/10.1086/650733>

Montville, T. J., & Matthews, K. R. (2008). *Food Microbiology: An Introduction* (2nd ed.). ASM Press.

Nair, D.V.T., Venkitanarayanan, K., Johny, A.K., 2018. Antibiotic-resistant *Salmonella* in the food supply and the potential role of antibiotic alternatives for control. *Foods* 7 (10). <https://doi.org/10.3390/FOODS7100167>.

Pintar, K. D. M., et al. (2012). A systematic review of waterborne salmonellosis: Sources, risk factors, and survival rates. *Epidemiology and Infection*, 140(4), 615-627. <https://doi.org/10.1017/S095026881100279X>

Prystowsky, M. B., Nakasone, C., & Pukay, B. (2011). Antibiotic resistance in aquaculture: Opportunities and challenges. *Aquaculture Research*, 42(9), 1433-1441. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02887.x>

Reed, L. J., Raber, R. M., & Kotora, L. (2012). The effects of environmental stressors on aquaculture health. *Aquaculture Research*, 43(7), 1116-1122. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2012.03097.x>

Salem, W. M., Shalaby, A. R., Fawzi, A. R., & El-Gendy, S. M. (2017). Alterations in virulence and antibiotic-resistant genes of multidrug-resistant *Salmonella* serovars isolated from poultry: The bactericidal efficacy of *Allium sativum*. *Microbial Pathogenesis*, 108, 91-100. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.04.009>

Sánchez-Vargas, F. M., Abu-El-Haija, M. A., & Gómez-Duarte, O. G. (2011). *Salmonella* infections: An update on epidemiology, management, and prevention. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 9(6), 263–277. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2011.11.001>

Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M.-A., Roy, S. L., Jones, J. L., & Griffin, P. M. (2011). Foodborne illness acquired in the United States—Major pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 17(1), 7-15. <https://doi.org/10.3201/eid1701.P21101>

Sebastião, F. A., Fernandes, S. A., & Ventura, S. (2015). PCR and molecular characterization of *Salmonella* spp. in food and clinical samples. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(1), 103–107. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822015000100012>

Silva, C. C. D. D., Veneroni-Gouveia, G., & Costa, M. M. (2016). Molecular and phenotypic characterization of *Salmonella* spp. isolated from fish and aquaculture water. *Journal of Food Science and Technology*, 53(9), 3605-3611. <https://doi.org/10.1007/s11483-016-0910-0>

Silva, N., Santos, R. S., & Almeida, S. M. (2007). *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos* (3ª ed.). Varela.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2011). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870-1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>

Tort, L. (2011). *Stress and immune modulation in fish*. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(12), 1366-1375. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.06.003>

Trabulsi, L. B., & Alterthum, F. (2015). *Microbiologia* (6ª ed.). Atheneu.

Triyanto, A., & Wakabayashi, H. (1999). *Flavobacterium columnare*, the causative agent of "columnaris disease", is one of the most important bacterial pathogens in freshwater fishes. *Fish Pathology*, 34, 65–71.

Troeger, C., Forouzanfar, M. H., Rao, P. C., Khalil, I. A., Brown, A., Reiner, R. C., ... & Murray, C. J. L. (2018). Estimação global da carga de doenças causada por infecções de *Salmonella* em 2016: Uma análise da mortalidade e morbidade associadas. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(5), 469-480. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30299-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30299-4)

University of California, Davis - School of Veterinary Medicine. (2021). *Salmonellosis in Wild Songbirds*. Animal Health Topics. Recuperado de <https://healthtopics.vetmed.ucdavis.edu>

Verbrugghe, E., Haesebrouck, F., Pasmans, F., & Ducatelle, R. (2016). Host stress drives *Salmonella* recrudescence. *Scientific Reports*, 6, 20849. <https://doi.org/10.1038/srep20849>

Xiau, Z., Silva, A. P., Costa, M. L., & Oliveira, F. R. (2024). *Salmonella*: O patógeno transmitido por alimentos e sua cadeia de transmissão interconectada envolvendo o meio ambiente, animais, alimentos e humanos. *Journal of Food Safety and Public Health*, 32(4), 78-92.

Waldner, C., Carlson, J. H., & Fiser, N. (2012). Contaminação bacteriana na alevinagem de peixes: O papel da água na transmissão de patógenos. *Aquaculture Research*, 43(7), 1045-1053. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2012.02998.x>

Weyts, F. A. A., Cohen, N., Flik, G., & Verburg-van Kemenade, B. M. L. (1999). Interactions between the immune system and the hypothalamo–pituitary–interrenal axis in fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 9(1), 1-20. <https://doi.org/10.1006/fsim.1998.0164>

Winfield, M. D., & Groisman, E. A. (2003). Role of non-host environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(7), 3687-3694. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.7.3687-3694.2003>

World Health Organization (WHO). (2015). WHO estimates of the global burden of foodborne diseases. World Health Organization. ISBN 978 92 4 1565165.

World Health Organization (WHO). (2015). *Salmonella*. Disponível em: <http://www.who.int/topics/salmonella/en/>. Acesso em: 21 outubro 2024.