

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**VALIDAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA O
DIAGNÓSTICO DE BACTÉRIAS EM PEIXES, VISANDO
REDUÇÃO DE TEMPO E CUSTO**

**Fernanda de Alexandre Sebastião
Bióloga**

2015

**T
E
S
E
/
S
E
B
A
S
T
I
Ã
O

F.
A.

2
0
1
5**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**VALIDAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA O
DIAGNÓSTICO DE BACTÉRIAS EM PEIXES, VISANDO
REDUÇÃO DE TEMPO E CUSTO**

Fernanda de Alexandre Sebastião

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Pilarski

Coorientadora: Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – Unesp Câmpus de
Jaboticabal, como parte das exigências para
obtenção do título de Doutora em
Microbiologia Agropecuária.**

2015

S443v Sebastião, Fernanda de Alexandre
Validação de técnicas moleculares para o diagnóstico de
bactérias em peixes, visando redução de tempo e custo / Fernanda de
Alexandre Sebastião. -- Jaboticabal, 2015
viii, 136 f. ; il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015

Orientadora: Fabiana Pilarski

Banca examinadora: Everlon Cid Rigobelo, Marco Antônio de
Andrade Belo, Rogério Salvador, Fabiana Garcia

Bibliografia

1. PCR de colônia. 2. Sequenciamento. 3. PCR tempo real . I.
Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 639.3.09

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: VALIDAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA O DIAGNÓSTICO DE BACTÉRIAS EM PEIXES, VISANDO REDUÇÃO DE TEMPO E CUSTO

AUTORA: FERNANDA DE ALEXANDRE SEBASTIÃO

ORIENTADORA: Profa. Dra. FABIANA PILARSKI

COORIENTADORA: Prof. Dra. ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:

Fabiana Pilarski

Profa. Dra. FABIANA PILARSKI
Centro de Aquicultura da Unesp / Jaboticabal/SP

Everlon Rigobelo
Prof. Dr. EVERLON CID RIGOBELLO
Departamento de Produção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Marco Antonio de Andrade Belo
Prof. Dr. MARCO ANTONIO DE ANDRADÉ BELO
Universidade Camilo Castelo Branco / Descalvado/SP

Rogério Salvador
Prof. Dr. ROGÉRIO SALVADOR
Universidade Estadual do Norte do Paraná / Bandeirantes/PR

Fabiana Garcia
Profa. Dra. FABIANA GARCIA
Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios / Votuporanga/SP

Data da realização: 06 de fevereiro de 2015.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Fernanda de Alexandre Sebastião, nascida em 08 de agosto de 1983, em Jaboticabal, SP. Bióloga, graduada em Ciências Biológicas (Licenciatura e Bacharelado) pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, FCAV/UNESP de Jaboticabal-SP (2003-2007), Mestre em Microbiologia Agropecuária pela FCAV/UNESP, Jaboticabal (2008-2010) e; Doutora em Microbiologia Agropecuária pela FCAV/UNESP Jaboticabal, SP (2011-2015). Tem experiência na área de Microbiologia, com ênfase Aquicultura e Biologia Molecular, atuando principalmente nos seguintes temas: isolamento de bactérias ictiopatógenicas (principalmente *Flavobacterium columnare*, *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae*), biotecnologia (PCR convencional, Real Time PCR quantitativa absoluta, sequenciamento de gene 16S rDNA) e patologia de organismos aquáticos.

EPÍGRAFE

“Não tenha medo de fazer o que acha que é certo, mesmo recebendo crítica de colegas. Faça sempre o que for saudável e que lhe faça feliz, sem prejudicar as outras pessoas”.

(Autor desconhecido)

DEDICATÓRIA

Dedico minha vida, minha devoção e esta tese a meus pais, Geraldo Aparecido Sebastião e Maria Aparecida de Alexandre Sebastião, a minha irmã, Roberta de Alexandre Sebastião e as minhas avós, Mileide Fernandes Sebastião e Claudete Merenda de Alexandre.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva da vida, saúde e discernimento;

A toda minha família, em especial aos meus pais, por seus esforços, buscando dar a melhor condição de vida, educação e bem-estar a suas filhas, agradeço a vida, o amor, a base forte que permite que eu possa evoluir sempre;

As minhas orientadoras, Fabiana Pilarski e Eliana Gertrudes de Macedo Lemos, pelo suporte científico, conselhos e confiança em nosso trabalho;

Aos componentes da banca examinadora, professores Rogério, Everlon, Marco Belo e Fabiana, pelas correções imprescindíveis a melhoria desta tese;

À Prevet Sanidade Aquícola, nas pessoas de José Dias Neto e Breno, pelo companheirismo, ajuda nas coletas, e contribuição com cepas bacterianas, sem as quais este trabalho não estaria completo;

Ao Laboratório da profa. Maria Inês Tiraboshi Ferro, nas pessoas do prof. Luis Roberto Furlan, Raquel, Flávia e Miguel, que me auxiliaram muito nos primeiros passos deste trabalho;

Ao laboratório da profa. Eliana Lemos, agradeço a todos pelo apoio, em especial a Camila Fernandes, Silvana Pompéia, Eliamar, Gisele, Raphael Barbeta, Omori, Laís, Gabi e Milena, pela amizade, ensinamentos em PCR tempo real, clonagem e bioinformática;

Ao Caunesp, onde passei grande parte de minha vida acadêmica, agradeço os amigos que conquistei, Pedro Viadanna, Gustavo Valladão, Silvia Gallani, Lindomar, Róberson Sakabe, Silvinha (técnica) e Suerli.

À FAPESP, pela bolsa de estudos e reserva técnica.

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1 - Considerações gerais	
Introdução	1
Revisão de Literatura	2
Brasil no contexto da Aquicultura Mundial	2
Enfermidades na Piscicultura.....	3
Diagnóstico	13
Objetivo geral	16
Objetivos específicos	16
Referências	17
CAPÍTULO 2 – Aplicação das técnicas de PCR direto de colônia e Sequenciamento genético no diagnóstico de bacterioses de peixes de cultivo, frequência e perfil de sensibilidade a antimicrobianos.	
Resumo	25
Introdução	25
Material e Métodos	27
Resultados e Discussão	34
Conclusões.....	45
Referências	45
CAPÍTULO 3 - Validação da técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) para o diagnóstico de infecções por <i>Aeromonas hydrophila</i> em peixes no Brasil.	
Resumo	49
Introdução	49
Material e Métodos.....	51
Resultado e Discussão.....	60
Conclusões.....	73
Referências	74
CAPÍTULO 4 - Validação da técnica de PCR quantitativo absoluto em tempo real (qPCR) para o diagnóstico de infecção por <i>Streptococcus agalactiae</i> em peixes no Brasil.	

Resumo	76
Introdução	76
Material e Métodos	78
Resultado e Discussão	86
Referências	101
CAPÍTULO 5 – Considerações finais	104
APÊNDICE	107

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 011752/12 do trabalho de pesquisa intitulado "**Avaliação da técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) para o diagnóstico de infecções por *Aeromonas hydrophila* e *Flovobacterium columnare* em peixes**", sob a responsabilidade da Prof^a Dr^a Eliana Gertrudes de Macedo Lemos está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 05 de junho de 2012.

Jaboticabal, 15 de junho de 2012.



Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi
Coordenador - CEUA



VALIDAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA O DIAGNÓSTICO DE BACTÉRIAS EM PEIXES, VISANDO REDUÇÃO DE TEMPO E CUSTO

RESUMO - Com a intensificação da piscicultura brasileira, caracterizada por densidade de estocagem cada vez maior, especialmente em tanques-rede, tem-se observado um número crescente de enfermidades, principalmente de origem bacteriana, ocasionando alta mortalidade e prejuízos econômicos expressivos em todas as fases da criação. Um dos problemas relacionados ao controle de enfermidades na piscicultura é o uso constante e equivocado de antimicrobianos e quimioterápicos nas criações, que provocam problemas de resistência bacteriana e impactos ambientais que comprometem a qualidade do produto final. Assim, a busca por alternativas rápidas e eficazes de diagnóstico são cada vez mais necessárias, uma vez que contribuem para o controle de enfermidades antes que estas provoquem sinais clínicos irreversíveis e taxas de mortalidade elevada. Em vista disso, o diagnóstico molecular, representado pelas técnicas da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e suas variações, tais como sequenciamento e PCR em tempo real, constituem alternativas a serem exploradas. Desse modo, os objetivos deste trabalho foram: a) adaptar a metodologia de PCR de colônia aliada ao sequenciamento do gene 16S rRNA para bactérias que causam doenças em peixes, b) determinar a sensibilidade aos antimicrobianos florfenicol e oxitetraciclina dos gêneros bacterianos de maior frequência, c) validar testes de PCR em tempo real para detecção e quantificação de *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae* e avaliar sua especificidade e sensibilidade analítica d) aplicar a metodologia validada no diagnóstico de infecções por esses patógenos em grupos de tilapias infectadas experimentalmente. Nas metodologias desenvolvidas, buscou-se redução de custos e tempo para diagnóstico. Os resultados encontrados demonstraram que a PCR de colônia apresentou redução de custos e tempo quando comparada às técnicas tradicionais de isolamento, identificação bioquímica, extração de DNA e PCR convencional; a combinação da PCR de colônia e sequenciamento do gene 16S rRNA permitiu identificar todos os patógenos bacterianos testados, não sendo necessário o desenho de “primers” específicos para cada espécie, uma vez que é um gene conservado; os gêneros bacterianos mais incidentes foram *Aeromonas*, *Lactococcus*, *Enterococcus* e *Streptococcus*, sendo que a resistência aos antimicrobianos avaliados foi preocupante (>50%) para os três últimos gêneros; os testes de PCR quantitativa absoluta em tempo real para *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae* apresentaram 100% de especificidade e sensibilidade a níveis tão baixos, dificilmente detectados por outras técnicas, além de tempo total para diagnóstico, incluindo a extração de DNA, reduzido para 4 h, e gastos com análise por amostra reduzido em 48%, tornando-os ferramentas eficazes no auxílio a programas de monitoramento sanitário, visando a identificação precoce de patógenos e aplicação de medidas preventivas adequadas.

Palavras-chave: *Aeromonas hydrophila*, florfenicol, PCR colônia, PCR tempo real, sequenciamento, *Streptococcus agalactiae*

MOLECULAR TECHNIQUES VALIDATION FOR BACTERIAL DIAGNOSIS IN FISH AIMING REDUCTION OF TIME AND COST

ABSTRACT - With the intensification of the Brazilian fish farming, characterized by increasing density storage, especially in cages, it has been observed a growing number of diseases, mainly bacterial, causing high mortality and significant economic losses in all phases of breeding. One of the problems related to the control of diseases in fish farming is the constant misuse of antibiotics and chemotherapeutics that cause problems of bacterial resistance and environmental impacts which affect the quality of the final product. Thus, the search for rapid and effective diagnostic alternative is increasingly necessary, since they contribute to control of diseases before they cause irreversible clinical signs and high mortality rates. In view of this, the molecular diagnostic techniques represented by the Polymerase Chain Reaction (PCR) and its variations, such as sequencing and real time PCR, constitute alternatives to be explored. Thus, the objectives of this work were: a) adapting the methodology of colony PCR coupled with sequencing of the 16S rRNA gene for bacteria that cause disease in fish, b) determine the sensitivity to antimicrobial florfenicol and oxytetracycline bacterial genera of higher frequency, c) validate real-time PCR assay for detection and quantification of *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus agalactiae* and to evaluate its sensitivity and analytical specificity d) applying the validated Methodology for the diagnosis of infections caused by these pathogens in infected experimentally tilapias groups. In the developed methodologies, we attempted to reduce costs and time to diagnosis. The results showed that: colony PCR showed a reduction of costs and time compared to traditional isolation techniques, biochemical identification, DNA extraction and conventional PCR; the alliance of colony PCR and 16S rRNA gene sequencing allowed identification of all tested bacterial pathogens, not being necessary the design of specific "primers" for each species, since it is a conserved gene; bacterial genera most incidents were *Aeromonas*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, and resistance to the antimicrobials tested presented concern (> 50%) for the last three genera; absolute quantitative real time PCR for *Streptococcus agalactiae* and *Aeromonas hydrophila* showed 100% specificity and sensitivity to levels so low that hardly other techniques could be able to detected, as well as the total time for diagnosis, including DNA extraction, reduced to 4 h and the costs per analysis were reduced in 48%, making them effective tools in helping monitoring programs that aim early identification of pathogens and implementation of appropriate preventive measures.

Keywords: *Aeromonas hydrophila*, florfenicol, colony PCR, Real time PCR, Sequencing, *Streptococcus agalactiae*

CAPITULO 1 – Considerações gerais

1. Introdução

O Brasil apresenta grande potencial para o desenvolvimento da piscicultura devido ao seu vasto território, condições climáticas favoráveis e grandes reservatórios públicos e privados, que permitiram a intensificação da atividade nos últimos anos (FAO, 2012).

A possibilidade de maior rendimento em curto prazo, fez com que os produtores escolhessem o sistema intensivo de produção, utilizando elevadas densidades de estocagem, grande quantidade de ração, e má qualidade da água. Condições de criação que causam estresse crônico e imunossupressão nos peixes, propiciando o aparecimento de enfermidades e surtos epizooticos (NIELSEN et al., 2001)

Dentre os maiores responsáveis por prejuízos econômicos nas pisciculturas estão as bactérias, com destaque para *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae* (DASH et al., 2009; FIGUEIREDO et al., 2012).

A mortalidade de cardumes inteiros pode ocorrer em até 72 horas após a infecção e um diagnóstico confiável, baseado nas técnicas da microbiologia clássica podem exceder o tempo hábil para tratamento. Na tentativa de controlar os surtos de enfermidade, os produtores utilizam vários antibióticos de forma indiscriminada e sem critérios vários antibióticos, tendo como consequências a seleção de cepas resistentes, grande quantidade de resíduos destes no ambiente e nos peixes e riscos à saúde do consumidor (MEIRELES, 2008).

Buscando o controle das epizootias em pisciculturas, é essencial que se faça a distinção entre as espécies envolvidas para se selecionar a melhor forma de tratamento e/ou prevenção. Sendo assim, as ferramentas para o diagnóstico utilizadas devem ser seguras, precisas e rápidas.

Como exemplo destas ferramentas, foi explorada neste trabalho a técnica molecular de PCR aliada ao sequenciamento do gene 16S rRNA, uma vez que este gene apresenta tanto regiões altamente conservadas como variáveis em todos os

procariotos, sendo que estas últimas provém informações taxonômicas em vários níveis de classificação e para distinção entre espécies (JANDA; ABBOTT, 2007).

Além da técnica descrita acima, foi utilizada a PCR quantitativa em tempo real, pois, devido à sua alta sensibilidade, a detecção de números muito baixos de bactérias é possível, sem necessidade de isolamento e cultivo prévios, acelerando ainda mais o resultado do diagnóstico (WILSON; CARSON, 2003).

2. Revisão de literatura

2.1 Brasil no contexto da Aquicultura Mundial

A aquicultura mundial vem crescendo expressivamente desde os anos 70, destacando-se a última década, em que houve um crescimento anual médio cinco vezes superior ao apresentado pelas atividades agrícolas tradicionais, como avicultura, suinocultura e bovinocultura (FAO, 2007). Esse ritmo de crescimento tem superado a maioria das projeções feitas por especialistas da área.

Somando-se as atividades de aquicultura e pesca, o setor obteve, nos últimos anos, os maiores índices de produtividade, abastecendo o mercado mundial com cerca de 160 milhões de toneladas de peixes. Desse total, a aquicultura já é responsável por aproximadamente 44%, enquanto que nos anos 90, representava apenas 13% (FAO, 2012).

Estima-se um aumento da produção aquícola até 2025, acompanhando o crescimento populacional, uma vez que a pesca extrativista está estagnada há mais de 20 anos e não conseguirá atender a demanda de mercado (CREPALDI et al., 2006).

No Brasil, a aquicultura tem apresentado taxas de crescimento superior à média mundial, saindo de 20,5 mil toneladas (US\$ 100,4 milhões), em 1990, para 210 mil toneladas (US\$ 830,3 milhões), em 2001, alcançando 2,5 milhões de toneladas em 2013, superando a meta do Plano Safra da Pesca e Aquicultura para o final de 2014 (MPA, 2013).

Sendo assim, o Brasil ocupa posição de destaque na aquicultura mundial. Dentre os países latino-americanos, foi o segundo maior produtor de pescado

cultivado em 2005, atrás somente do Chile, que produziu 714 mil toneladas. Foi o maior produtor de tilápias, à frente de Honduras e Colômbia, ambos com cerca de 28 mil toneladas, e do Equador, com 22 mil toneladas e o segundo maior produtor de camarão marinho, atrás do México, que produziu 72 mil toneladas em 2005 (BRASIL, 2010).

Levantamento do Ministério da Pesca e Aquicultura apontou que os brasileiros consomem atualmente 17,3 kg de pescado per capita/ano, quantidade que alcança a média mundial divulgada pela Organização Mundial de Saúde (MPA, 2013).

O crescimento da aquicultura brasileira é beneficiado pelas características naturais, geração e difusão de tecnologia, disponibilidade de insumos e oportunidades de mercado. Sendo assim, se baseia, principalmente, na produção de tilápia, tambaqui, pacu e mais recentemente, o pintado e o pirarucu (SEBRAE, 2014). Dentre estas, as de maior importância para a aquicultura brasileira, são as tilápias, pois compõem o grupo de peixes que mais cresce na comercialização mundial (MPA, 2009).

2.2 Enfermidades na piscicultura

O aumento no interesse pela piscicultura tem levado produtores a buscar o sistema intensivo de produção devido a maior lucratividade. Todavia, a má nutrição dos peixes, manipulação excessiva, lesões causadas por ferimentos ou por parasitas, alterações bruscas de temperatura, elevadas concentrações de amônia e de matéria orgânica na água e baixos níveis de oxigênio resultam na imunossupressão dos peixes, propiciando o aparecimento de enfermidades cujos patógenos responsáveis, em ambientes naturais, não seriam de grandes expressões (DASH et al., 2009).

Em relação aos patógenos que têm causado prejuízos econômicos nas pisciculturas, destacam-se as bactérias, as quais podem causar elevada taxa de mortalidade, tanto em peixes da natureza, quanto nos de criação (LIMA, 2007).

2.2.1 *Aeromonas*

Atualmente, o gênero compreende 25 espécies aceitas e validadas: *Aeromonas hydrophila* (com três subespécies: *hydrophila*, *dhakensis* e *ranae*), *Aeromonas bestiarum*, *Aeromonas salmonicida* (com cinco subespécies: *salmonicida*, *masoucida*, *smithia*, *achromogenes* e *pectinolytica*), *Aeromonas caviae*, *Aeromonas media*, *Aeromonas eucrenophila*, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas veronii*, *Aeromonas jandaei*, *Aeromonas schubertii*, *Aeromonas trota*, *Aeromonas allosaccharophila*, *Aeromonas encheleia* e *Aeromonas popoffii*, *Aeromonas simiae*, *Aeromonas molluscorum*, *Aeromonas bivalvium*, *Aeromonas tecta*, *Aeromonas aquariorum*, *Aeromonas piscicola*, *Aeromonas fluvialis*, *Aeromonas taiwanensis*, *Aeromonas sanarellii*, *Aeromonas diversa* e *Aeromonas rivuli* (BEAZ-HIDALGO; FIGUERAS, 2013).

Três espécies são definidas fenotipicamente: *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. veronii* subtipo *sobria*. Não se conhece muito sobre as outras espécies, mas também são microorganismos aquáticos e foram implicados em doença humana (NIELSEN et al., 2001).

Diversos testes bioquímicos foram propostos ao longo do tempo para identificação e diferenciação entre as espécies de *Aeromonas* (ABBOTT; CHEUNG; JANDA, 2003; MARTIN-CARNAHAN; JOSEPH, 2005). No entanto, os testes fenotípicos, os quais levam em consideração características bioquímicas e morfológicas, podem conduzir a erros na identificação. Assim, os métodos moleculares são mais específicos, conduzindo a um diagnóstico definitivo (BEAZ-HIDALGO; FIGUERAS, 2012). O sequenciamento do gene 16S rRNA tem provado ser eficiente neste quesito, com ressalva para algumas espécies de *Aeromonas*, como por exemplo, *A. bestiarum*, *A. salmonicida* e *A. piscicola*, que compartilham 99.8–100% de similaridade genética (FIGUERAS et al., 2011a).

A. hydrophila destaca-se por se tratar da espécie mais frequentemente isolada em piscicultura mundial (61,5%), segundo alguns estudos (RODRIGUES, 2007; SANTOS, 2011).

Todavia, deve-se alertar que, segundo revisão de Beaz-Hidalgo e Figueras (2013), a prevalência de *A. hydrophila* nas infecções em peixes pode estar

superestimada como resultado da identificação bioquímica sem acurácea. Os testes moleculares mostraram que as infecções podem ter sido causadas por *A. veronii* em bagre do canal, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), *A. sobria* em tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) e truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), *A. bestiarum* em carpas e *A. piscicola* em salmonídeos (NAWAZ et al., 2006; KOZINSKA, 2007; BEAZ-HIDALGO et al., 2010; SORIANO-VARGAS et al., 2010; FIGUERAS et al., 2011b; LI e CAI, 2011; BEAZ-HIDALGO e FIGUERAS, 2012).

A. hydrophila é um bastonete gram-negativo, móvel, com 1,0 a 3,5 µm de comprimento por 0,3 a 1,0 µm de largura, possui flagelo polar de aproximadamente 1,7 µm, usualmente monotríquio, sendo que, em culturas mantidas por longo tempo em meio sólido, podem formar flagelos peritríquios, não produtora de esporos, não capsulada, aeróbia ou anaeróbia facultativa e pertencente a família Aeromonadaceae, cujo habitat é predominantemente aquático (dulcícola e marinho). É responsável por lesões ulcerativas e septicemia hemorrágica em peixes de água doce. Tem ampla distribuição geográfica e seus sinais clínicos são: presença de pequenas lesões superficiais, hemorragias locais (brânquias e opérculo), úlceras, exoftalmia e distensão abdominal. Internamente, pode verificar-se acúmulo de líquido ascítico, anemia e lesões no fígado e rins (SARKAR et al., 2012).



Figura 1. Bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) com sinais de septicemia hemorrágica causada por *Aeromonas* sp. Foto Fernanda de A. Sebastião, 2012.

A doença causada por *A. hydrophila* está associada ao excesso de matéria orgânica na água, acometendo peixes em condições de estresse e/ou associa-se à infecção por outros patógenos, como no caso do protozoário ciliado *Epistylis* sp.. (GARCIA, 2005).

A transmissão do agente infeccioso se dá de modo horizontal, estando o mesmo presente na água e no sedimento presente no fundo dos viveiros, sendo

transmitido por descargas do trato intestinal dos peixes e lesões externas na pele (COSTA, 2003).

Estudos recentes evidenciaram a capacidade de algumas espécies de *Aeromonas* ocasionar patologias moderadas ou graves tanto no homem quanto nos animais, por exemplo, infecções intestinais ou extra-intestinais no homem assumindo destacada relevância epidemiológica em casos de infecções oportunistas em pacientes imunocomprometidos (PEREIRA et al., 2008), o que levou a OMS (2003) a classificá-la como problema de saúde pública.

A presença de grande quantidade de *Aeromonas* na piscicultura intensiva pode, portanto, representar risco de infecção tanto para o peixe como para funcionários da piscicultura e consumidores (PEREIRA et al., 2008).

No Brasil, estudos revelaram o isolamento de *Aeromonas* a partir de diferentes nichos como o ecossistema marinho, amostras de solo, alimentos como pescado fresco, filés congelados, mariscos e vegetais e também a partir de infecções em animais domésticos, mamíferos marinhos e animais de sangue frio (HOFER et al., 2006; PEREIRA et al., 2008).

2.2.2 *Lactococcus*

Lactococcus pertence à família Streptococcaceae, engloba bactérias que perteceram ao gênero *Streptococcus* Grupo N1 numa classificação anterior a 1985 (SCHLEIFER et al., 1985). São homofermentadoras, produzindo um único produto na fermentação da glicose, que é o ácido láctico. São cocos gram-positivos, com 0,5-1,5 µm de comprimento, agrupados aos pares e/ou em cadeias pequenas, imóveis, não produtoras de esporos, catalase-negativa e α-hemolíticos.

Existem cinco espécies do gênero *Lactococcus* descritas atualmente: *Lactococcus lactis*, *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus piscium*, *Lactococcus plantarum* e *Lactococcus raffinolactis*.

Tanto *L. piscium* como *L. garvieae* são patógenos emergentes de peixes e causam lactococose na aquicultura marinha e de água doce, havendo casos relatados em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), tilápia (*Oreochromis niloticus*), bagre (*Ictalurus punctatus*) e camarão gigante de água doce (*Macrobrachium*

rosenbergii). Causam perdas econômicas importantes, principalmente quando a temperatura da água aumenta durante os meses de verão. Normalmente, causam septicemia hemorrágica e hiperaguda, que pode evoluir dependendo das condições ambientais as quais os peixes estão submetidos (VENDRELL et al., 2006). Os peixes com lactococose apresentam letargia, anorexia, escurecimento da pele e natação próxima à superfície da água (AVCI et al., 2010).

L. garvieae foi isolado de várias espécies de peixes ao redor do mundo, destacando-se Japão (KUSUDA E SALATI, 1993), Austrália (CARLSON E MUNDAY, 1990), África do Sul (BRAGG E BROERE, 1986) e Europa (EYNGOR ET AL., 2004).

Cepas de *L. lactis* foram divididas geneticamente em *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *hordniae* e *L. lactis* subsp. *cremoris* pela técnica de sequenciamento do gene 16S rRNA (WANG et al., 2008). E, por não serem reconhecidas como patógenos veterinários, são usados em processos fermentativos, tais como produção de queijos a partir de leite bovino, que incluem Brie, Camembert, Cheddar, Colby, Gruyère, Parmesão e Roquefort (COFFEY e ROSS, 2002).

Como patógeno oportunista, há poucos trabalhos existentes na literatura, todavia, vale ressaltar um estudo recente (CHEN et al., 2012) que apresentou *L. lactis* subsp. *lactis* como o responsável pela perda de 100% de esturjões híbridos (*Huso huso* X *Acipenser ruthenus*) de uma piscicultura no Taiwan, China. O exame clínico do caso revelou que os peixes (600 a 800g) apresentavam enterite, abdomen aumentado, elevação na taxa respiratória e acúmulo de líquido ascítico. A histopatologia mostrou hemorragia generalizada ou focos de necrose coagulativa no fígado e baço. Um aglomerado de células bacterianas foi observado ao redor do foco necrótico. Os pesquisadores também observaram necrose no parênquima renal e pâncreas. Foi realizada infecção experimental em tilápias híbridas e a concentração letal que causou 100% de mortalidade foi de 10^8 UFC/mL (CHEN et al., 2012).

2.2.3 *Enterococcus*

São cocos gram-positivos, tamanho de 0,87 a 1,01 μm , formadores de cadeias curtas, catalase negativos, e anaeróbios facultativos. Crescem em temperaturas que variam entre 10 e 45°C, e são positivos na presença de 6.5% NaCl (pH 9.6) com 40% de bile e em 0.1% leite com azul de metileno (HANCOCK; GILMORE, 2006), colônias de 1-2 mm de comprimento.

São componentes da microbiota normal de humanos e animais, além do solo e água, porém em hospedeiros imunossuprimidos, são os maiores causadores de infecções nosocomiais (HAMMAD et al., 2014).

A ocorrência de *Enterococcus* no intestino de peixes e em ambientes aquícolas foi detectada em pesquisas sobre análise de microbiota intestinal de várias espécies de peixes (MICHEL et al., 2007; VALENZUALA et al., 2010).

As espécies *E. faecalis* e *E. faecium* foram reconhecidas como agentes causais de endocardites e estão entre os patógenos mais encontrados em infecções nosocomiais, incluindo bacteremia e infecções do trato abdominal e urinário humanos (FISHER; PHILIP, 2009).

São intrinsecamente resistentes a vários agentes antimicrobianos, os quais são utilizados no tratamento de infecções causadas por bactérias gram-positivas. Além disso, os *Enterococcus* possuem a habilidade de adquirir resistência à antibióticos por transferência de plasmídeos e transposons, troca cromossômica ou mutação, o que representa um desafio para as terapias de tratamento (COQUE, 2008).

2.2.4 *Streptococcus agalactiae*

São células esféricas ou ovóides gram-positivas, com tamanho entre 0.5-1.0 x 1.0-2.0 μm , catalase-negativa, imóveis, não esporuladas e anaeróbias facultativas. Obtêm energia por meio da fermentação de carboidratos como a glicose, que resulta em sua maior parte, em ácido láctico (KILLIAN, 1998).

Classificações tradicionais de streptococci são baseadas na serotipagem dos antígenos carboidratos da parede celular e suas atividades hemolíticas. As espécies

de estreptococos do grupo B de Lancefield (GBS) correspondem a uma única espécie que é *S. agalactiae* (EVANS et al., 2002b). Pode ser dividido em 10 serotipos baseados na composição do polissacarídeo capsular: Ia, Ib e II ao IX (SLOTVED et al., 2007). Estudos recentes demonstraram a existência dos serotipos Ib (SUANYUK et al., 2005) e III (SUANNYUK et al., 2008) em peixes.

GBS isolados de tilápias criadas em sistema intensivo no Brasil são piruvato, PAL (2-naftil fosfato), LAP (L-leucina-2- naftilamida) e ADH (arginina dihidrolase) positivos. Também são incapazes de fermentarem a arabinose, manitol, sorbitol, lactose, trealose, inulina, rafinose, amido e glicogênio (SALVADOR, 2008).

Possuem o Fator CAMP, que é considerado fator de virulência devido a sua capacidade de se ligar a imunoglobulinas G e M, via fração Fc. Assim, a detecção da produção do fator CAMP é de auxílio significativo na identificação de *S. agalactiae* (LANG et al., 2007).

S. agalactiae é o agente etiológico da septicemia e meningoencefalite em peixes, e por se tratar de uma inflamação no sistema nervoso central, observa-se como principais sinais clínicos natação errática, lesões na pele do hospedeiro, líquido esbranquiçado e sanguinolento na cavidade visceral, esplenomegalia, peritonite fibrosa, opacidade ocular, oftalmite com edema corneal (GIORDANO, 2007).



Figura 2. Tilapia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) com sinais de estreptococose (exoftalmia, excesso de muco, acúmulo de líquido ascítico).

São bactérias oportunistas distribuídas no meio aquático e sua patogenicidade está associada às condições de estresse oriundo à má qualidade da água e condições de criação intensivas, tais como alta densidade, baixa concentração de oxigênio dissolvido, altas concentrações de amônia e nitrito, pH, alcalinidade, dureza e transparência da água inadequados (GIORDANO, 2007).

Segundo Figueiredo et al. (2006), nos últimos anos tem-se observado uma elevação na ocorrência de casos clínicos associados a *S. agalactiae* em diferentes regiões geográficas, o que levou o mesmo a ser considerado patógeno emergente para peixes em água doce ou marinho (EVANS et al., 2002b) e hoje ser a principal causa de perdas na tilapicultura mundial.

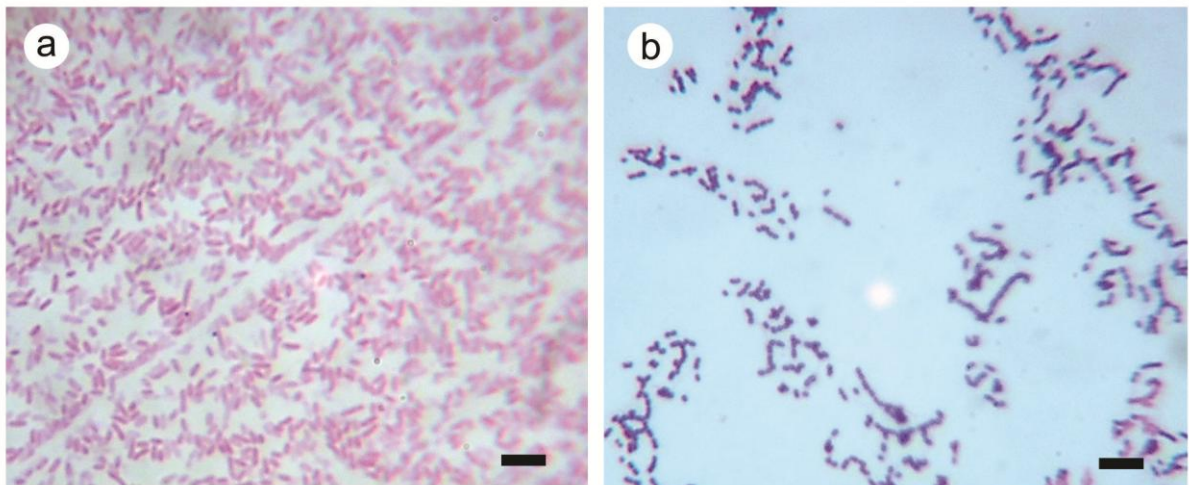


Figura 3. Bactérias na piscicultura. (a) *A. hydrophila*; (b) *S. agalactiae*. Aumento de 1000X. Fotos: Fernanda de A. Sebastião; Prancha: Gustavo Valladão, 2014.

Todavia, para o controle da enfermidade, Shoemaker e Klesius (1997) há décadas já relataram dificuldades na utilização de antibióticos para o tratamento de infecções por *Streptococcus* sp., pois o patógeno pode sobreviver no interior de macrófagos onde as drogas antimicrobianas não os alcançam, sendo assim, os antibióticos podem eliminar os sinais clínicos, mas não o agente.

Outro agravante é que os peixes doentes não se alimentam da ração medicada e, portanto, apresentam maior predisposição às linhagens do microrganismo resistentes (SALVADOR, 2008). Por isso, a utilização exclusiva de antibióticos não é eficiente, devendo aplicar práticas adequadas de manejo. Além da

possibilidade de se desenvolverem estirpes bacterianas resistentes, há pouca aceitação dos consumidores a animais tratados e a utilização de antibióticos indiscriminadamente também gera impactos negativos no ambiente (NAKANISHI et al., 2002).

A vacinação em aquicultura surge como alternativa ao uso de antibióticos e outros produtos químicos, na prevenção de infecções, nas formas oral (SHOEMAKER et al., 2006), imersão (LONGHI et al., 2012) injetável intraperitonealmente (SALVADOR, 2008) ou via bacteriófagos (MATSUZAKI et al., 2005).

2.3.5 *Pseudomonas*

São bastonetes gram-negativos, 0.5 – 1.0 x 1.5 – 5.0 µm de comprimento, pertencentes à família Pseudomonadaceae, não esporulados, tipicamente possuem flagelos polares, aeróbios estritos, não fermentadores nem produtores de gás, catalase positiva e geralmente oxidase positiva (ARDURA, et al., 2013).

Pseudomonas são habitantes da água, solo e alimentos, sobrevivendo até em alguns desinfetantes (fato importante em ambiente hospitalar), não apresentam grandes exigências nutritivas, possuem amplo espectro de temperatura (4°C a 43°C) e crescimento ótimo em pH neutro. Aderem a materiais sintéticos, desde canos de PVC presentes nos tanques da piscicultura, a tubagens e cateteres hospitalares (SILVA et al., 2010).

Ao contaminarem alimentos, como peixes pós-processamento, por exemplo, por ação proteolítica e lipolítica sobre nutrientes destes alimentos, produzem compostos oxidados, muco e outros compostos que afetam o aroma e o sabor do pescado (SILVA et al., 2010).

Como agente oportunista pode pertencer à população bacteriana normal da água e dos animais, sendo o intestino humano um grande reservatório de *Pseudomonas*, mas num hospedeiro susceptível pode ser altamente virulento e provocar até a morte (ARDURA et al., 2013).

Tanques com alta carga de material orgânico e, portanto, com água de má qualidade, facilitam a ocorrência de surtos desta bactéria, podendo ser superior nos

períodos de primavera e outono. Nestas condições, sua incidência pode aumentar e causar problemas a peixes mal nutridos e com injúrias físicas decorrentes de despesca e transporte, levando a enormes prejuízos para os aquicultores (SANTOS, 2011).

Os sinais clínicos provocados pela bactéria são perda de apetite, redução da atividade metabólica, evidenciada pela natação lenta e tendência a se posicionar nas áreas mais rasas do tanque. Pode-se observar também erosão nas nadadeiras, lesões circulares ou irregulares do tipo úlceras pelo corpo, hemorragia nas bordas das lesões e na base das nadadeiras, olhos saltados de aspecto opaco e hemorrágico, abdômen distendido e presença de fluído opaco ou ligeiramente sanguinolento na cavidade abdominal, fluído amarelado ou sanguinolento no intestino, hemorragia nos órgãos internos como o fígado, hiperplasia de órgãos como o fígado, baços e rins, fígado de coloração pálida ou ligeiramente esverdeada e pontos hemorrágicos na parede interna da cavidade abdominal (PEIXOTO et al., 2013).



Figura 4. Pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) com pontos hemorrágicos. Foto LAPOA- Caunesp/Unesp Jaboticabal.

2.3 DIAGNÓSTICO POR TÉCNICAS MOLECULARES

Epizootias levam a mortalidade de cardumes inteiros em até 72 horas e um diagnóstico confiável, baseado nas técnicas da microbiologia clássica (isolamento, caracterização bioquímica e antibiograma) podem levar até um mês, dependendo da espécie a ser isolado, o que inviabiliza o tratamento com medicamentos adequados e específicos ao patógeno. O resultado é o uso indiscriminado de antibióticos nas pisciculturas e a seleção de cepas resistentes (Petersen; Dalsgaard, 2003).

Assim, buscando o controle das enfermidades nas pisciculturas, é essencial que se faça a distinção entre as espécies envolvidas. Sendo que, a utilização de técnicas moleculares para a identificação de bactérias, têm representado ferramentas seguras, eficientes e rápidas para diagnóstico. Como exemplo destas ferramentas, foram exploradas neste trabalho a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) aliada ao sequenciamento do gene 16S rRNA dos isolados como também a PCR quantitativa absoluta em tempo real.

A PCR é uma técnica de Biologia Molecular que permite replicação *in vitro* do DNA de forma extremamente rápida. Com a PCR, quantidades mínimas de material genético podem ser amplificadas milhões de vezes em poucas horas, permitindo a rápida identificação de espécies, de marcadores genéticos e de doenças infecciosas (ROCHE, 2015).

Como os estudos neste campo de biotecnologia na Aquicultura brasileira são escassos, faz-se necessária a utilização de iniciadores ou “primers” universais, tais como os que flanqueiam a região do gene 16S rRNA.

O gene 16S rRNA apresenta tanto regiões altamente conservadas como variáveis em todos os procariotos, sendo que estas últimas provém informações taxonômicas em vários níveis de classificação e para distinção entre espécies sendo adequados para identificação de espécies. Os primeiros nucleotídeos do terminal 5' do segmento 16S rRNA contêm informação suficiente para se obter um sequenciamento e por isso são de interesse na análise molecular (CLAESSON et al., 2010).

Vários estudos com o propósito de caracterização de cepas bacterianas de interesse à piscicultura foram realizados nas seguintes espécies: *A. hydrophilia*, *A.*

salmonicida, *Edwardsiella tarda*, *S. agalactiae*, *Renibacterium salmoninarum*, *Vibro anguillarum*, *V. vulnificus* e *Yersinia ruckeri*, e utilizaram a PCR, uma vez que esta técnica permite a síntese de produtos altamente conservados nas subunidades 5S, 16S e 23S do ribossomo o que pode potencialmente diferenciar espécies e mostrar diferenças intraespecíficas (SOULE et al., 2005; FLEMMING et al., 2007; SEBASTIÃO et al., 2010).

A PCR quantitativa absoluta em tempo real (qaPCR) consiste numa reação de PCR cuja detecção dos amplicons é simultânea à amplificação, não necessitando de etapas posteriores como gel de eletroforese, detecção radioativa, ELISA ou Blots. A qaPCR tem sido utilizada para detecção de patógenos, análise de expressão gênica, polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP) e análises de aberrações cromossômicas (STROPA, 2009).

Seu princípio está baseado na detecção da fluorescência na reação à medida que o DNA dupla fita é gerado, na presença de um agente fluorescente que se incorpora entre a dupla fita. A sensibilidade e a especificidade alcançada em uma qPCR bem concebida é uma ferramenta ideal para uso na vigilância e monitoramento de infecções (PEIRSON; BUTLER, 2007).

Neste trabalho utilizou-se como agente fluorescente o SyBr Green®, que apresenta como características principais ter intercalante da fita dupla de DNA, similar ao brometo de etídeo, se mantém estável em altas temperaturas, não interfere na atividade da enzima, liga-se à molécula em proporções lineares (quanto maior a molécula, maior será a fluorescência), porém referencialmente a GC, inespecífico, liga-se a qualquer molécula de fita dupla, quando não ligado ao DNA, exibe fluorescência muito pequena, porém quando ligado ao DNA, a fluorescência é aumentada (PONCHEL et al., 2003).

As vantagens são menor custo em relação a outros intercalantes do mercado, facilidade de uso e sensibilidade. E as desvantagens estão relacionadas a não permitir o uso de multiplex, captar a formação de dímeros, depender do tamanho do fragmento (PONCHEL et al., 2003).

A alta sensibilidade da qPCR em tempo real torna possível a detecção de números muito reduzidos de bactérias (WILSON; CARSON, 2003). No entanto, restrições devido ao tamanho da amostra, a presença de DNAs não-alvo, inibidores

da PCR e a logística de amostragem de alto rendimento podem limitar sua utilidade, e por isso deve-se tomar cuidado com estes fatores, como citado a seguir.

As restrições impostas pelo tamanho da amostra e de ácidos nucleicos não-alvo podem ser resolvidas por PCR aliada a meio de cultura seletivo (THISTED LAMBERTZ et al., 1996) uma vez que o enriquecimento seletivo aumenta a quantidade da bactéria-alvo e ajuda a reduzir o número de concorrentes da microbiota (WITHAM et al., 1996). O impacto dos inibidores seletivos da PCR como componentes e tecidos de peixes, podem ser minimizados utilizando protocolos de extração de ácido nucleico de alta qualidade (WILSON; CARSON, 2001).

A reação de amplificação em tempo real representa grande avanço nos métodos moleculares de auxílio diagnóstico, particularmente por facilitar sobremaneira as tarefas de quantificação da expressão gênica em determinado tecido ou amostra biológica (PEIRSON; BUTLER, 2007).

A desvantagem inicial, comparada com a PCR convencional e sequenciamento, é a necessidade de desenho de “primers” específicos para a espécie que se deseja identificar, todavia, após padronização, este fato tornará a técnica realmente rápida e eficaz, permitindo um diagnóstico conclusivo em 2,5 horas.

O presente trabalho avaliou os genes da adesina para *A. hydrophila* e fator CAMP para *S. agalactiae*, que se tratam de genes de virulência específicos de cada espécie (SHANNON et al, 2007).

Sabe-se que para colonizar, invadir, evitar o sistema de defesa e causar dano tecidual ao hospedeiro, as *Aeromonas* dispõem de vasta gama de fatores de virulência tais como proteases, hemolisinas, citotoxinas, enterotoxinas, leucocidina, elastases, camada-S e adesinas (GALINDO et al., 2006; VON GRAEVENITZ, 2007). Estas, as adesinas, desempenham papel fundamental na instalação de infecções pela bactéria, uma vez que são responsáveis pela aderência da mesma na célula hospedeira, pois se situam na superfície da parede bacteriana e se ligam a receptores específicos (FANG et al, 2004).

Já a maioria das cepas de GBS secreta uma proteína extracelular difusa conhecida como fator CAMP (Christie-Atkins-Munch-Petersen) e codificada pelo gene *cfb*. Presuntivamente, pode identificar a espécie pelo teste CAMP, que se

baseia no fato da proteína causar a lise das células vermelhas do sangue de carneiro presente no meio de cultura previamente sensibilizado com *Staphylococcus aureus* (WILKINSON, 1977; KE et al, 2000).

Sendo assim, a amplificação do gene *cfb*, contemplando a região do fator CAMP representa uma metodologia óbvia para diagnóstico de GBS, apesar de que classificá-lo como fator de virulência por meio do Postulado de Koch ainda permanece controverso, uma vez que alguns autores não conseguiram demonstrar alteração na patogenicidade de GBS após deleção do gene *cfb* (KE et al, 2000; LANG et al, 2007; CHUZEVILLE et al, 2012).

Além de diagnóstico, a caracterização molecular também é crucial para o desenvolvimento de novas vacinas, uma vez que permite o reconhecimento de genótipos que podem estar associados à virulência. Os reconhecimentos da prevalência de alguns genótipos particulares numa infecção e os seus padrões podem ajudar a comunidade científica a desenvolver métodos mais eficazes no controle de ictiopatologias (DARWISH; ISMAIEL, 2005).

2.4 Objetivo Geral

Em vista da necessidade de métodos rápidos e eficientes no diagnóstico de enfermidades de peixes e do escasso número de trabalhos, especialmente na literatura brasileira, o presente estudo avaliou duas ferramentas moleculares para o diagnóstico de bacterioses em peixes: PCR direta de colônia associada ao sequenciamento do gene 16S rRNA e PCR quantitativa absoluta em tempo real, nos aspectos relacionados a eficiência, custo e tempo de execução.

2.5 Objetivos específicos

2.5.1) Explorar as técnicas de PCR de colônia e sequenciamento do gene 16S rRNA como formas de diagnósticos de patógenos bacterianos em peixes, buscando redução do tempo e custo da operação;

2.5.2) Determinar a sensibilidade aos antimicrobianos florfenicol e oxitetraciclina das cepas dos gêneros de *Streptococcus*, *Aeromonas*, *Enterococcus* e *Lactococcus*;

2.5.3) Desenvolver um teste de PCR quantitativa absoluta em tempo real para detecção de *A. hydrophila* e avaliar sua especificidade e sensibilidade analítica;

2.5.4) Desenvolver um teste de PCR quantitativa absoluta em tempo real para detecção de *S. agalactiae* e avaliar sua especificidade e sensibilidade analítica.

3. Referências

ABBOTT, S.L.; CHEUNG, W.K.; JANDA, J.M. The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 2348–2357, 2003.

ARDURA, A.; LINDE, A.R.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Genetic Detection of *Pseudomonas* spp. in Commercial Amazonian Fish. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v.10, p.3954-3966, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/ijerph10093954>>.

AVCI, H.; TANRIKUL, T.T.; AIDOGAN, A.; BIRINCIOLU, S.S. Pathological and Microbiological Investigations in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) Naturally Infected with *Lactococcus garvieae*.
, v. 16 (Suppl. B), p. S313-S318, 2010.

BEAZ-HIDALGO, R.; ALPERI, A.; BUJA'N, N.; ROMALDE, J.L.; FIGUERAS, M.J. Comparison of phenotypical and genetic identification of *Aeromonas* strains isolated from diseased fish. **Systematic Applied Microbiology**, v.33, p. 149–153, 2010.

BEAZ-HIDALGO, R.; FIGUERAS, M.J. *Aeromonas* spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease. **Journal of Fish Diseases**, v. 36, p. 371-388, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/jfd.12025>>.

BEAZ-HIDALGO, R.; FIGUERAS, M.J. Molecular detection and characterization of furunculosis and other *Aeromonas* fish infections. In: **Health and Environment in Aquaculture** (ed. By E. Carvalho), p. 97–132, 2012.

BRAGG, R., BROERE, J.S.E. Streptococcosis in rainbow trout in South Africa. **Bulletin of European Association of Fish Pathologists**, v.6, p. 89-91, 1986.

BRASIL. Ministério de Pesca e Aquicultura (MPA). **Boletim estatístico de pesca e aquicultura**, Brasil, 2010.

CARSON J.; MUNDAY, B. Streptococcosis-an emerging disease in Aquaculture. **Australian Aquaculture**, v. 5, p.32-33, 1990.

CHEN, M.H.; HUNG, S.W.; SHYU, C.L.; LIN C.C.; LIU P.C.; CHANG, C.H.; SHIA, W.Y.; CHENG C.F.; LIN S.L.; TU C.Y.; LIN Y.H.; WANG, W.S. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* infection in Bester sturgeon, a cultured hybrid of *Huso huso* X

Acipenser ruthenus, in Taiwan. **Research in Veterinary Science**, v. 93, p. 581–588, 2012.

CHUZEVILLE, S., PUYME`GE, A., MADEC, J-Y., HAENNI, M., PAYOT, S. Characterization of a New CAMP Factor Carried by an Integrative and Conjugative Element in *Streptococcus agalactiae* and Spreading in *Streptococci*. **PLoS ONE**, v. 7, n.11, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0048918>>.

CLAESSON, M.J.; WANG, Q.; O’SULLIVAN, O.; GREENE-DINIZ, R.; COLE, J.R.; ROSS, R.P.; O’TOOLE, P.W. Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. **Nucleic Acids Research**, v. 28, p. 1-13, 2010.

COFFEY, A.; ROSS, R.P. Bacteriophage-resistance systems in dairy starter strains: molecular analysis to application. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 82, p. 303–21, 2002.

COQUE, M.T. Evolutionary biology of pathogenic enterococci. In: BAQUERO, F., NOMBELA, C., CASSELL, G.H., GUITIERREZ, J.A. (Eds.), **Evo Biology of Bacterial and Fungal Pathogens**. ASM Press, Washington, DC, p. 501-521, 2008.

COSTA, A.B. **Caracterização de bactérias do complexo *Aeromonas* isoladas de peixes de água doce e sua atividade patogênica**. 2003. 68f. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

CREPALDI, D.V.; FARIA, P.M.C.; TEIXEIRA, E.A.; RIBEIRO, L.P.; COSTA, A.A.P.; MELO, D.C.; CINTRA, A.P.; PRADO, S.A.; COSTA, F.A.A.; DRUMONA, M.L.; LOPES, V.E.; MORAES, V.E.. A situação da Aquicultura e da pesca no Brasil e no mundo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.30, n.3/4, p. 81-85, 2006.

DARWISH, A. M.; ISMAIEL, A. A. 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. **Molecular and Cellular Probes**, v. 19, p. 267-274, 2005.

DASH, S.S.; DAS, B.K.; PATTAIK, P.; SAMAL, S.K.; SAHU, S.; GHOSH, S. Biochemical and Serological Characterization of *Flavobacterium columnare* from Freshwater Fishes of Eastern India. **Journal of World Aquaculture Society**, v. 40, p. 236-247, 2009.

EVANS, J.J.; KLESIOUS, P.H.; GILBERT, P.M.; SHOEMAKER, C.A.; AL SARAWI, M.A.; LANDSBERG, J.; DUREMDEZ, R.; AL MARZOUK, A.; AL ZENKI, S.. Characterization of b-haemolytic group B *Streptococcus agalactiae* in cultured seabream, *Sparus auratus* L., and wild mullet, *Liza klunzingeri* (Day), in Kuwait. **Journal of Fish Diseases**, v.25, p.505-513, 2002b.

EYNGOR, M.; ZLOTKIN, A.; GHITTINO, C.; PREARO, M.; DOUET, D.G.; CHILMONCZYK, S.; ELDAR, A. Clonality and diversity of the fish pathogen

Lactococcus garvieae in Mediterranean countries. **Applied Environmental Microbiology**, v.70, n. 9, p. 5132-5137, 2004.

FANG, H. M., GE, R., SIN, Y.M. Cloning, characterization and expression of *Aeromonas hydrophila* major adhesion. **Fish & Shellfish Immunology**, v.16, p. 645–658, 2004.

FAO Fisheries Department, Fishery Information Data and Statistics Unit. **Fishstat plus: universal software for fishery statistical time series**. Aquaculture production: quantities 1950-2005, Aquaculture production: values 1984-2005; Capture production: 1950-2005. Version 2.30. Rome: FAO, 2007. Disponível em <http://www.fao.org>. Acesso em 20 jan. 2011.

FAO Fisheries Department, Fishery Information Data and Statistics Unit. **The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA)**. Feeding the world. Trends in the fisheries sector. 2012, p. 146-149. Acesso em 10 out. 2014.

FIGUEIREDO, H.C.P.; NOBREGA-NETTO, L.; LEAL, C.A.G.; PEREIRA, U.P.; MIAN, G.F. *Streptococcus iniae* outbreaks in Brazilian Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) farms. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 576-580, 2012.

FIGUEIREDO, H.C.P.; CARNEIRO, D.O.; FARIA, F.C.; COSTA, G.M. *Streptococcus agalactiae* associado à meningoencefalite e infecção sistêmica em tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, p. 678-680, 2006.

FIGUERAS, M.J.; BEAZ-HIDALGO R.; PAREDES, K. Furunculosis y otras infecciones producidas por *Aeromonas*. In: **Enfermedades infecciosas del cultivo de Salmónidos en Chile y el Mundo** (ed. by R. Avendan˜o-Herrera), Niva Chile S.A., Puerto Varas, Chile, p. 285–374. 2011b.

FIGUERAS, M.J.; BEAZ-HIDALGO, R.; COLLADO, L.; MARTÍNEZ-MURCIA, A.J. Point of view on the recommendations for new bacterial species description and their impact on the genus *Aeromonas* and *Arcobacter*. **The Bulletin of the International Society for Microbial Systematics**, v. 2(Pt 1), p. 1–16, 2011a.

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

FLEMMING, L.; RAWLINGS, D.; CHENIA, H. Phenotypic and molecular characterisation of fish-borne *Flavobacterium johnsoniae*-like isolates from aquaculture systems in South Africa. **Research in Microbiology**, v.158, p. 18-30, 2007.

GALINDO, C. L., SHA, J., FADL, A. A. PILLAI, L. L., CHOPRA, A. K.. Host immune responses to *Aeromonas* virulence factors. **Current Immunology Reviews**, v. 2, p.13-26, 2006.

GARCIA, F. **Pacus *Piaractus mesopotamicus* alimentados com dietas suplementadas com vitamina C e E e submetidos ao desafio por *Aeromonas***

hydrophila. 2005. 95f. Dissertação (Mestrado) Centro de Aquicultura da Unesp, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

GIORDANO, L.G.P. **Streptococcus agalactiae: A** çã o d p o c d d “ o” cã a da vacina experimental em Tilapia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). 2007. 62f. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Universidade Estadual de Londrina. Londrina, PR, 2007.

HAMMAD, A.M.; SHIMAMOTO, T.; SHIMAMOTO, T. Genetic characterization of antibiotic resistance and virulence factors in *Enterococcus* spp. from Japanese retail ready-to-eat raw fish. **Food Microbiology**, v. 38, 62-66, 2014.

HANCOCK, L.E.; GILMORE, M.S. **Pathogenicity of enterococci**. In: Fischetti, V.A., Novick, R.P., Ferretti, J.J., Portnoy, D.A., Rood, J.I. (Eds.), Gram-positive Pathogens, second ed. ASM Press, Washington, DC, p. 299-311, 2006.

HOFER, E.; REIS, C.M.F.; THEOPHILO, G.N.D.; CAVALCANTI, V.O.; LIMA, N.V.; HENRIQUES, M.F.C.M. Envolvimento de *Aeromonas* em surto de doença diarreica aguda em São Bento do Una, Pernambuco **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 39, p. 217-219, 2006.

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

KE, D., MÉNARD, C., PICARD, F.J., BOISSINOT, M., OUELLETTE, M., ROY, P.H., BERGERON, M.G. Development of conventional and real-time PCR assays for the rapid detection of group B streptococci. **Clinical Chemistry**, v. 46, p. 324–331, 2000.

KILLIAN M. Streptococcus and Lactobacillus. In: Topley e Wilson's microbiology and microbial infections. Collier, L., Balows, A and Sussman, M. **Systematic Bacteriology**. Balows, A.; Duerden B.I., Arnold (Hodder Headline Group),v.2, p. 635-658, 1998.

KOZIN'SKA, A. Dominant pathogenic species of mesophilic aeromonads isolated from diseased and healthy fish cultured in Poland. **Journal of Fish Diseases**, v.30, p.293–301, 2007.

KUSUDA, R.; SALATI, F. Major bacterial diseases affecting mariculture in Japan. **Annual Review of Fish Diseases**, v.3, p. 9-85, 1993.

LANG, S.; XUE, J.; GUO, Z.; PALMER, M. Streptococcus agalactiae CAMP factor binds to GPI-anchored proteins. **Medical Microbiology and Immunology**, v.196, p. 1-10, 2007.

LIMA, L.C. Doenças de Importância Econômica em Piscicultura. In: VII SEMINÁRIO DE AVES E SUÍNOS – AveSui Regiões 2007, III Seminário de Aquicultura, Maricultura e Pesca Aquicultura, abril de 2007 – Belo Horizonte, MG. **Resumos...** Belo Horizonte, 2007.

LONGHI, E.; PRETTO-GIORDANO, L.G.; MÜLLER, E.E. Avaliação da eficácia de vacina autóctone de *Streptococcus agalactiae* inativado aplicada por banho de imersão em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, suplemento 2, p. 3191-3200, 2012.

MARTIN-CARNAHAN, A.; JOSEPH, S.W. Family I. Aeromonadaceae Colwell, MacDonell and DeLey 1986. In: **B y' M u o S y m c B c o o y**, 2nd edn, Vol. 2 (ed. by D.J. Brennan, N.R. Krieg, J.T. Staley & G.N. Garrity), p. 556–578. Springer-Verlag, New York, 2005.

MATSUZAKI, S.; UCHIYAMA, M.R.J.; SAKURAI, S.; KURODA, T.U.M.; IKEUCHI, M.; FUJIEDA, T.T.M.; WAKIGUCHI, H.; IMAI, S. Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. **Journal of Infect Chemotherapy**, v. 11, p. 211-219, 2005.

MEIRELES, M.A.O.M. **Uso de antimicrobianos e resistência bacteriana: Aspectos socioeconômicos e comportamentais e seu impacto clínico e ecológico. 2008. 47f.** Monografia (especialista em Microbiologia). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2008.

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

MPA Ministério da Pesca e Aquicultura. **Produção Pesqueira do Brasil Supera Expectativas. Balanço 2013.** Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Publicidade/Cartilha-Balan%C3%A7o-2013-Minist%C3%A9rio-Pesca-Aquicultura.pdf>> Acesso em 14 out. 2014.

MPA MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. **Produção pesqueira e aquícola. Estatística 2008 e 2009.** Brasília, DF, 30 p. 2009. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/mpa/seap/Jonathan/mpa3/dados/2010/Docs/Caderno%20Consolidação%20dos%20dados%20estatísticos%20final%20curvas%20-%20completo.pdf>> Acesso em 14 fev. 2011.

NAKANISHI T, KIRYU I, OTOTAKE M. Development of a new vaccine delivery method for fish: percutaneous administration by immersion with application of a multiple puncture instrument. **Vaccine**, v.20, p.3764-3769, 2002.

NAWAZ, M.; SUNG, K.; KHAN, S.A.; KHAN, A.A.; STEELE, R. Biochemical and molecular characterization of tetracycline-resistant *Aeromonas veronii* isolates from catfish. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 27, p.6461–6466, 2006.

NIELSEN, M.E.; HØI, L.; SCHMIDT, A.S.; QIAN, D.; SHIMADA, T.; SHEN, J.Y.; LARSEN, L. Is *Aeromonas hydrophila* the dominant motile *Aeromonas* species that causes disease outbreaks in aquaculture production in the Zhejiang Province of China? **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 46, p.23-29, 2001.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Guidelines for drinking water quality**. 3. ed. 2009. Disponível em: <http://www.who.int/docstore/watersanitation_health/GDWQ/Updating/draftguidel/draftchap7.htm>. Acesso em: 01 abr. 2013.

PEIRSON, S.N.; BUTLER, J.N. Quantitative polymerase chain reaction. **Methods in Molecular Biology**, v. 362, p. 349-362, 2007.

PEIXOTO, P.G.; OLIVEIRA, R.V.; SILVA, B.B.; BARBOSA, C.T.; PELLI, A. Isolamento de *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter cloacae* isolados em Curimba *Prochilodus lineatus* em Sistema Fechado. **Iniciação Científica Cesumar**, v. 15, n. 2, 2013.

PEREIRA, C. S.; AMORIM, S. D.; SANTOS, A.F.M.; REIS, C.M.F.; THEOPHILO, G.N.D.; RODRIGUES, D.P. Characterization of *Aeromonas* spp isolates from newborns hospitalized. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.41, p. 179-182, 2008.

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

PONCHEL, F.; TOOMES, C.; BRANSFIELD, K.; LEONG, F.T.; DOUGLAS, S.H.; FIELD, S.L.; BELL, S.M.; COMBARET, V.; PUISIEUX, A.; MIGHELL, A.J.; ROBINSON, P.A.; INGLEHEARN, C.F.; ISAACS, J.D.; MARKHAM, A.F. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. **BMC Biotechnology**, v. 3, n.18, p. 1-13, 2003.

ROCHE, 2015. Disponível em: <http://www.roche.pt/portugal/index.cfm/produtos/equipamentos-de-diagnostico/products/molecular-diag/intro-pcr/> Acesso em 10 de fev 2015.

RODRIGUES, E. **Pesquisa de *Aeromonas* spp. em tilápia (*Oreochromis niloticus*), cultivada no estado do Rio de Janeiro - Brasil: isolamento, identificação de espécies e avaliação da sensibilidade antimicrobiana**. 2007. 208 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2007.

SALVADOR, R. **Imunização e inflamação por *Streptococcus agalactiae* em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com ração suplementada com parede celular de *Saccharomyces cerevisiae***. 2008. 152 f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal, 2008.

SANTOS, F.G.B. **Caracterização Fenotípica e Molecular de Bactérias com Potencial Patogênico em Pacamã (*Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1877)**. 2011. 54p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus de Ciências Agrárias, Petrolina, PE, 2011.

SARKAR, B.; MOHANTY, NETAM, A.S.P.; MISHRA, S.; PRADHAN, N.; SAMANTA M. Inhibitory role of silver nanoparticles against important fish pathogen, *Aeromonas hydrophila*. **International Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 2, n.4, p. 70-74, 2012.

SCHLEIFER, K.H.; KRAUS, J.; DVORAK, C.; KILPPER-BALZ, R.; COLLINS, M.D.; FISCHER, W. Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov". **Syst. Appl. Microbiol.**, v. 6, p. 183–195, 1985.

SEBASTIÃO, F.A.; PILARSKI, F.; LEMOS, M.V.F. Isolation and molecular characterization of *Flavobacterium columnare* strains from fish in Brazil. **Journal of Bacteriology Research**, v.2, p.22-29, 2010.

SEBRAE. 2014. **Ideias de negócios para 2014**. 35p. Disponível em: <http://www.sebrae2014.com.br/sebrae/sebrae%202014/Ideias%20de%20negocios/Agronegocios%20-%20Pscicultura%20-%20Criacao%20de%20Peixes.pdf> Acesso em 20 out. 2014.

SHANNON, K.E., LEE, D.-Y., TREVORS, J.T., BEAUDETTE, L.A. Application of real-time quantitative PCR for the detection of selected bacterial pathogens during municipal wastewater treatment. **Science of the Total Environment**, v.382, p.121–129, 2007.

SHOEMAKER, C.; KLESIUS, P. Streptococcal disease problems and control: a review. **Tilapia Aquaculture**, v.2, p.671-680, 1997.

SHOEMAKER, C.A.; VANDENBERG, G.W.; DÉSORMEAUX, A.; KLESIUS, P.H.; EVANS, J.J. Efficacy of a *Streptococcus iniae* modified bacterin delivered using Oralject™ technology in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v.255, p. 151-156, 2006.

SILVA, B.C., MOURIÑO, J.L.P., VIEIRA, F.N., JATOBÁ, A., SEIFFERT, W.Q., MARTINS, M.L. 2012. Haemorrhagic septicaemia in the hybrid surubim (*Pseudoplatystoma corruscans* x *Pseudoplatystoma fasciatum*) caused by *Aeromonas hydrophila*. **Aquacult. Res.** 43, 908-916.

SLOTVED, H.C.; KONG, F.; LAMBERTSEN, L.; SAUER, S.; GILBERT, G.L. Serotype IX, a proposed new *Streptococcus agalactiae* serotype. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 2929–2936, 2007.

SOULE, M.; LaFRENTZ, S.; CAIN, K.; LaPATRA, S.; CALL, D.R. Polymorphisms in 16S rRNA genes of *Flavobacterium psychrophilum* correlate with elastin hydrolysis and tetracycline resistance. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 65, p. 209-216, 2005.

STROPA, K.C. **Enumeração celular pela quantificação absoluta por PCR em tempo real de culturas de bradirrizóbios**. 2009. 108f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista, campus Jaboticabal, SP, 2009.

SUANYUK, N.; KANGHEAR, H.; KHONGPRADIT, R.; SUPAMATTAYA, K. *Streptococcus agalactiae* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 27, p.307-319, 2005.

SUANYUK, N.; KONG, F.; KO, D.; GILBERT, G.L.; SUPAMATTAYA, K. Occurrence of rare genotypes of *Streptococcus agalactiae* in cultured red tilapia *Oreochromis* sp. and Nile tilapia *O. niloticus* in Thailand—Relationship to human isolates? **Aquaculture**, v. 284, p. 35–40, 2008.

THISTED LAMBERTZ, S.; BALLAGI-PORDANY, A.; NILSSON, A.; NORBERG; DANIELSSON-THAM, M.L. A comparison between a PCR method and a conventional culture method for detecting pathogenic *Yersinia enterocolitica* in food. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 81, p. 303–308, 1996.

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

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

VON GRAEVENITZ, A. The role of *Aeromonas* in diarrhea: a review. **Infection**, v.35, n.2, p.59-64, 2007.

WANG, P.C.; LIN, Y.D.; LIAW, L.L.; CHERN, R.S.; CHEN, S.C. *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* also causes white muscle disease in farmed giant freshwater prawns *Macrobrachium rosenbergii*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 79, p. 9–17, 2008.

WILKINSON HW. CAMP-disk test for presumptive identification of group B streptococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 6, p. 42–5, 1977.

WILKINSON HW. CAMP-disk test for presumptive identification of group B streptococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 6, p. 42–5, 1977.

WILSON, T.; CARSON, J. Development of sensitive, high-throughput one-tube RT-PCR-enzyme hybridisation assay to detect selected bacterial fish pathogens. **Disease of Aquatic Organisms**, v. 54, p. 127-134, 2003.

WILSON, T.; CARSON, J. Rapid, high-throughput extraction of bacterial genomic DNA from selective-enrichment culture media. **Letters in Applied Microbiology**, v.32, p.326–330, 2001.

WITHAM, P.K.; YAMASHIRO, C.T.; LIVAK, K.J.; BATT, C.A. A PCR based assay for the detection of *Escherichia coli* shiga-like toxin genes in ground beef. **Applied Environmental Microbiology**, v.62, p. 1347–1353, 1996.

Capítulo 2. Aplicação das técnicas de PCR direto de colônia e Sequenciamento genético no diagnóstico de bacterioses de peixes de cultivo, frequência e perfil de sensibilidade a antimicrobianos

*Enviado a Aquaculture Reports

RESUMO - Com a crescente intensificação da piscicultura brasileira, tem-se verificado maior incidência de doenças, principalmente de origem bacteriana, devido à elevada densidade populacional, elevada quantidade de matéria orgânica e baixos níveis de oxigênio dissolvido. Todavia, para um estudo epidemiológico de sucesso e controle das enfermidades, é essencial a identificação das espécies patogênicas por meio de um diagnóstico confiável e rápido. Para tanto, este trabalho avaliou a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) direto de colônia de bactéria aliada ao sequenciamento do gene 16S rRNA como ferramenta válida no campo de diagnóstico de bacterioses em peixes, visando redução dos custos e do tempo de identificação dos isolados. A metodologia foi bem sucedida, produzindo bandas com a mesma intensidade que a PCR padrão, a qual utiliza DNA puro, para todos os 177 isolados avaliados. Além disso, avaliou-se o perfil de sensibilidade a antimicrobianos florfenicol e oxitetraciclina para os gêneros de maior frequência isolados: *Aeromonas*, *Lactococcus*, *Enterococcus* e *Streptococcus* responsáveis por substanciais perdas econômicas nas pisciculturas dos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Mato Grosso do Sul e Paraná. Quanto à resistência aos antimicrobianos autorizados para uso no país, os gêneros que apresentaram elevada resistência foram o *Streptococcus* (83,3%) ao florfenicol; *Lactococcus* (71,4%) a oxitetraciclina, (85,7%) ao florfenicol e *Enterococcus* (57,1%) a oxitetraciclina e (71,4%) ao florfenicol. Os resultados obtidos constituem, para o Brasil, um avanço nas técnicas de diagnóstico disponíveis, e no estudo epidemiológico e de resistência a antimicrobianos, uma vez que o Brasilapesar do grande potencial hídrico, ainda carece de estudos em relação à legislação das águas, melhoramento genético, usos de antimicrobianos, e aplicação de tecnologias de diagnóstico de enfermidades em aquicultura.

Palavras-chave: PCR de colônia, florfenicol, oxitetraciclina, *Aeromonas*, *Streptococcus*, *Lactococcus*.

1. Introdução

Dada à vasta disponibilidade de água e condições climáticas favoráveis, o Brasil apresenta grande potencial para desenvolvimento da piscicultura, a qual tem crescido expressivamente nos últimos anos. De acordo com a FAO (2010), o país é o segundo maior produtor aquícola da América Latina e Caribe, sendo que a piscicultura de água doce (tilápia, carpa e peixes nativos) somou 87% (545.300 ton) do total da produção aquícola em 2011.

O crescente interesse pela atividade e, conseqüentemente, a busca por maior lucratividade, tem levado produtores a adotarem o sistema superintensivo de produção. Porém, a alta densidade de peixes confinados, os manejos inadequados de criação e a contaminação da água por produtos tóxicos, causam estresse crônico e imunossupressão nos animais, propiciando o aparecimento de enfermidades e surtos epizooticos, cujos patógenos responsáveis, em ambientes naturais, não seriam de grande expressão (Dash et al., 2009).

Entretanto, em relação a infecções bacterianas que acometem os peixes no Brasil, a compreensão completa do agente etiológico, patogênese, bioquímica, antigenicidade, epizootiologia e inter-relação de fatores relacionados ao estresse e ambiente, essencial para que se possa prevenir e controlar enfermidades, tem sido pouco estudado, especialmente pelo fato da piscicultura ser uma atividade recente, e sua intensificação ter ocorrido a partir dos anos 90 (Shama et al., 2000).

Dentre os patógenos que têm causado prejuízo econômico no país destacam-se as bactérias gram-negativas dos gêneros *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* e *Francisella* e, as gram-positivas *Streptococcus* e *Lactococcus* (Vendrell et al., 2006; Olivares-Fuster et al., 2008; Staroscik et al., 2008; Evans et al., 2009; Birkbeck et al., 2011; Burr et al., 2012; Figueredo et al., 2012; Beaz-Hidalgo e Figueras, 2013) as quais podem causar elevada taxa de mortalidade de peixes em até 72h após infecção (Silva, 2012).

Apesar do aumento do número de estudos sobre diagnósticos de agentes causadores das bacterioses nos últimos anos, ainda há poucas alternativas disponíveis para o controle de infecções bacterianas em peixes no Brasil.

Por isso, faz-se necessária a busca por alternativas cada vez mais rápidas e eficazes de diagnóstico, uma vez que podem contribuir para a atenuação de enfermidades antes que estas provoquem sinais clínicos irreversíveis e taxas de mortalidade elevada. Em vista disso, o diagnóstico molecular possui alta sensibilidade e especificidade, utiliza quantidade reduzida de volume amostral, acurácea na detecção de patógenos, constituindo uma alternativa a ser estudada (Janda e Abbott, 2007).

Neste sentido, o uso de uma metodologia que não necessite de extração de DNA purificado, sendo mais rápida e menos onerosa poderia auxiliar no processo de

detecção precoce dos patógenos de peixes, como a PCR direto da colônia da bactéria de estudo (Coton e Coton, 2005).

Além disso, como não existem catalogadas todas as sequências de microorganismos nos bancos de dados atuais, o uso de “primers” universais e degenerados é uma solução prudente. Assim, os métodos baseados em amplificação e sequenciamento da subunidade ribossomal 16S rRNA (Janda e Abbott, 2007) têm sido amplamente explorados.

A PCR utilizando “primers” universais depende da hipótese de que os mesmos sejam complementares às regiões conservadas dos genes presentes no ambiente, havendo assim a amplificação, enquanto a heterogeneidade é encontrada no interior do fragmento determinado por esses oligonucleotídeos, nas regiões hipervariáveis (Ben-Dov et al., 2006; Claesson et al., 2010). Esta técnica tem revolucionado o campo da ecologia microbiana, desde estudos de bactérias não cultiváveis até a correta identificação de patógenos para um diagnóstico preciso.

Já em relação a métodos de controle das enfermidades, a carência de estudos é ainda maior, pois somente há dois antimicrobianos legalizados no Brasil o Florfenicol e Oxitetraciclina, de acordo com o Compêndio de Produtos Veterinários (SINDAN) e uma única vacina comercial destinada à prevenção de infecção por *Streptococcus agalactiae*.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi o de avaliar a eficácia, custo e tempo das técnicas de PCR direto de colônia bacteriana e sequenciamento do gene 16S rRNA como formas de diagnósticos eficazes na identificação de patógenos bacterianos em peixes, além de determinar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos florfenicol e oxitetraciclina dos isolados de *Aeromonas*, *Lactococcus*, *Enterococcus* e *Streptococcus*, uma vez que tal conhecimento é fundamental para elaboração de estratégias de prevenção e/ou tratamento adequados no país.

2. Material e métodos

2.1 Cepas bacterianas e condições de cultivo

Os 178 isolados bacterianos foram obtidos entre os anos de 2010 e 2014 a partir dos seguintes hospedeiros (n= número de peixes avaliados): tilápia (*Oreochromis niloticus* n=93), tambaqui (*Colossoma macropomum* n=10), carpa (*Cyprinus carpio*

n=3), cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum* n=34) e pacu (*Piaractus mesopotamicus* n=8) adultos.

Os peixes apresentaram sinais clínicos característicos de enfermidades bacterianas, tais como lesões ulcerativas na pele, septicemia hemorrágica, meningoencefalite, corrosão de nadadeiras, exoftalmia, e foram coletados de diferentes pisciculturas do Brasil, nos municípios de Dourados (MS n=38), Rio de Janeiro (RJ n=4), Itambaracá (PR n=10), Itaju, Arealva, Porto Ferreira, Guaíra, Santa Fé do Sul, Palmital e Jaboticabal (SP n=123).

Uma ressalva para as cepas de Palmital (SP) que foram obtidas diretamente do banco de dados do Laboratório de Enfermidades de Animais Aquáticos da APTA, Votuporanga, SP.

Para o isolamento foi realizado um raspado com “swab” estéril do rim e encéfalo dos peixes.

Colônias gram-negativas foram semeadas em meio TSA (Tryptic Soy Agar – Biolife) e TSB (Tryptic Soy Broth- Biolife) e incubadas por 24 h em estufa bacteriológica ajustada a 28 °C. Enquanto que colônias gram-positivas foram semeadas em Columbia Ágar-sangue incubadas por 24-72 h (Difco) a 30 °C e repicadas em meio líquido BHI (Brain Heart Infusion Broth, HIMEDIA).

2.2 Identificação molecular dos isolados

Dois métodos foram utilizados no preparo do DNA dos isolados com o objetivo de verificar o sucesso ou não na amplificação e no sequenciamento dos amplicons: PCR convencional (Figura 1) e PCR direto de colônia (Figura 2).

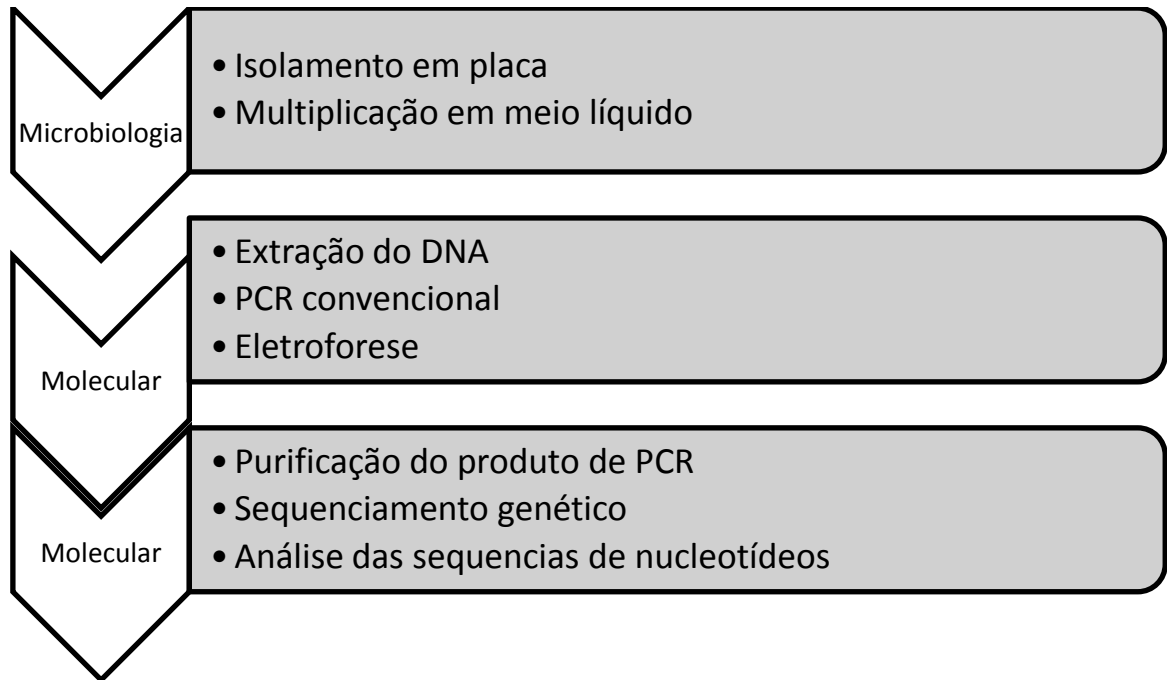


Figura 1. Fluxograma do método convencional para identificação bacteriana por PCR padrão e Sequenciamento.

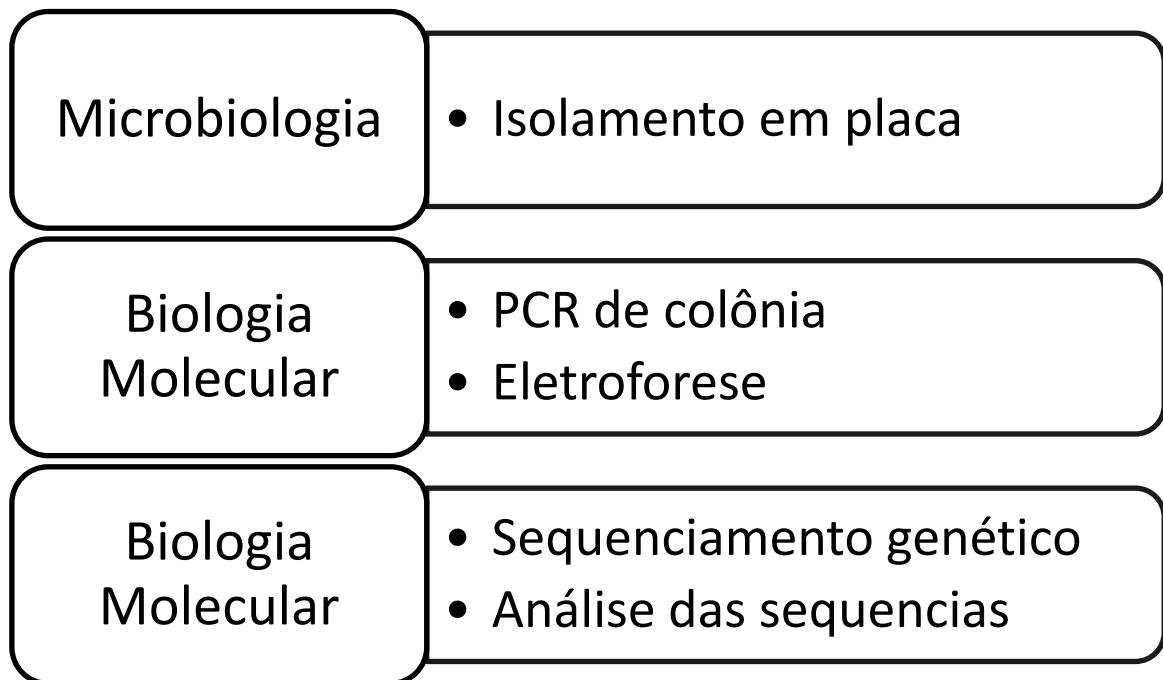


Figura 2. Fluxograma do método para identificação bacteriana por PCR de colônia e Sequenciamento do gene 16S rRNA.

O método de PCR padrão seguiu as etapas:

2.2.1 Extração de DNA

Uma colônia de cada isolado foi transferida para um tubo contendo meio de cultura líquido apropriado (TSB para gram-negativa e BHI para gram-positiva) e incubado por 18 h (gram-negativa) e 36 h (gram-positiva) ou até que se atingisse a DO_{600} de 1 a 1,5. Após os períodos de incubação, 1,0 mL da cultura bacteriana foi centrifugado a 12.000 xg por 1 min, o sobrenadante descartado e o pellet congelado a -20°C para posterior extração do DNA. Utilizou-se o kit Axyprep® miniprep para DNA genômico bacteriano, segundo metodologia do fabricante (Axygen Biosciences, Union City, CA, USA). A quantificação foi feita por fluorimetria, utilizando o aparelho QuBit 2.0 (Life Technologies, NY, USA).

2.2.2 PCR padrão

A reação consistiu de: 2,5 μL de tampão 10X (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl); 0,2 μL de 25 mM dNTP; 1,0 μL 50 mM MgSO_4 ; 0,2 μL de Taq High Fidelity (Platinum®Taq DNA Polymerase, Life Technologies, NY, USA); 2,0 μL de cada primer (10 pmol); DNA template 25 ng; água ultra-pura q.s.p. 25 μL de reação. O programa de amplificação utilizado foi: 94°C por 2 min, 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, temperatura de 55°C , específica para anelamento de cada primer, por 30 s, 68°C por 1,5 min e 68°C por 10 min para extensão final.

Os “primers” utilizados, específicos para o gene 16S rRNA bacteriano, foram 8F (AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG)/907R (CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT), de acordo com descrito por Lane et al. (1985), Felske et al. (1997) e Ben-Dov et al. (2006).

Os amplicons gerados (899 pb) foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídeo. A corrida foi realizada seguindo as recomendações de Sambrook et al, 2001.

2.2.3 Purificação dos produtos de PCR e sequenciamento gênico

Os produtos de PCR foram purificados pelo Kit MinElute (Qiagen, Crawley, West Sussex, UK) de acordo com instruções do fabricante. Em seguida, fez-se a quantificação dos produtos de PCR purificados em QuBit 2.0, e realizado sequenciamento gênico, a partir de 50 ng/ μL de amostra.

A metodologia de sequenciamento foi a preconizada por Sanger (1977). Os produtos de PCR das amostras foram amplificados com a enzima AmpliTaq polimerase e “BigDye Terminator” (Applied Biosystems) conforme as recomendações do fabricante, utilizando o conjunto de oligonucleotídeos iniciadores 8F e 907R. O sequenciamento foi realizado em aparelho ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems).

2.3 PCR direto de colônia bacteriana

Este protocolo permite a PCR a partir da colônia da bactéria isolada na placa de Petri, sem a necessidade de nenhuma metodologia de extração de DNA. Para tanto, inoculou-se uma colônia (1-2 mm de diâmetro) com palito de dente estéril no fundo do tubo para PCR (0,2 mL), colocou-se no freezer a -20°C, “overnight”, e em seguida, adicionou-se a seguinte solução: 2,0 µL tampão 10X (10mM Tris-HCl, 50mM KCl); 1,2 µL MgCl₂ (50 mM); 0,2 µL DNTP (25 mM); 0,7 µL de cada “primer” 8F/907R (10 pmol/µL); 0,2 µL taq DNA polimerase (2,5 U); água ultra-pura q.s.p. 20 µL de reação.

O programa utilizado para amplificação do gene foi: 95°C por 5 min, 30 ciclos de 95°C por 1 min, 54°C por 1,5 min e 72°C por 1 min, acrescentando-se um tempo de 5 min a 72°C para extensão final.

Os amplicons, com concentração média de 50 ng/µL, foram visualizados em fotodocumentador (ChemiDoc MP Bio-Rad) sob luz UV, após aplicação de 4 µL do mesmo em gel de agarose 1,5% e corado com brometo de etídio. A corrida eletroforética foi realizada seguindo as recomendações de Sambrook et al. (2001).

As amostras foram quantificadas por fluorometria através do Qubit® 2.0 Fluorometer (Life Technologies) e sequenciadas de acordo com metodologia descrita acima.

2.4 Análise das sequências de nucleotídeos

As sequências obtidas foram visualizadas no programa BioEdit Sequence Alignment Editor (v. 7.1.11). Primeiramente, determinou-se a qualidade Phred/Phrap das sequências, em seguida, as porções iniciais e finais das sequências foram removidas, mantendo apenas a porção de alta qualidade.

Após limpeza, cada sequência no formato FASTA foi exportada e, utilizando a ferramenta BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), o fragmento foi comparado com as sequências depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), admitindo-se uma cobertura de 100% e identidade igual ou superior a 98% com o padrão depositado no GenBank para confirmação da especificidade da sequência.

As sequências também foram submetidas ao RDP – Ribosomal Database Project II (<http://rdp.cme.msu.edu>) para comparação e identificação.

Em seguida, as sequências deste estudo foram depositadas no banco de dados do NCBI GenBank sob os números de acesso KJ560937 ao KJ561113. A relação completa das espécies identificadas, número de acesso, local de origem, espécie de peixe proveniente, época e ano de coleta, e tamanho do amplicon está listada no Anexo 1.

Para a validação dos dados de sequenciamento, foi confeccionada uma árvore filogenética, com 139 isolados obtidos neste trabalho reconhecidamente patogênicos para peixes e 22 sequências padrões (Tabela 1) provenientes de vários países e depositadas no GenBank.

Tabela 1. Cepas padrões utilizadas na construção da árvore de máxima verossimilhança, e seus locais de origem.

No. Acesso cepa padrão	Identificação	Local origem
JX861241	<i>Aeromonas veronii</i>	Índia
JN644061	<i>Aeromonas jandaei</i>	China
NR_074841	<i>Aeromonas hydrophila</i>	EUA
DD137077	<i>Edwardsiella tarda</i>	Japão
EU239205	<i>Pseudomonas fulva</i>	Coréia
KC210866	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	China
AB530699	<i>Enterococcus faecalis</i>	Tailândia
NR_036922	<i>Enterococcus durans</i>	Alemanha
KC176716	<i>Streptococcus agalactiae</i>	China

NR_027517	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	Japão
NR_025148	<i>Streptococcus iniae</i>	Israel
NR_044359	<i>Lactococcus raffinolactis</i>	Coréia do Sul
KC429785	<i>Lactococcus lactis lactis</i>	China
GQ850376	<i>Lactococcus garviae</i>	Irã
FJ555494	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Brasil
AF015927	<i>Streptococcus agalactiae</i>	EUA
FJ804000	<i>Streptococcus iniae</i>	Brasil
GQ426093	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	Brasil
HQ189121	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Brasil
JN001309	<i>Lactococcus garviae</i>	Brasil
DQ343843	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	EUA
AY706724	<i>Edwardsiella tarda</i>	EUA

Os isolados deste trabalho foram *S. agalactiae*: 64P, 112FG, M, 36P, 45P, 26P, 74P, 18P, 102FG, 106FG, 77FG, 105FG, 76FG, 104FG, 100FG, 103FG, 99FG, 78FG, ZO9S, ZO5, 124FG, 43P e 110FG; *S.iniae*: ZO4, ZO7, 79FG e 81FG; *L. lactis lactis*: 17MS, 18 MS, 20MS, 24 MS, 500FG, S17, 39MS, 41 MS, 111FG, 498 FG e S8; *L. raffinolactis*: A15 e 505FG; *L. garviae*: A71, A74, 497FG, 491FG, ZO1, ZO2, A62, 14MS, 31MS, 33MS, 36MS, 52MS, 9MS, 15MS, S11 e 499FG; *E. casseliflavus*: A1, A8, A5, A9, A2, A6, A10, A7, A14, P, S27, S22, S28, S21, S19 e S25; *E. durans*: 5MS e S9; *E. faecalis*: 3MS, 4MS, 7MS, 8MS, 10MS, 13MS, 28MS, 42MS, 43MS, 37MS e S14; *Edwardsiella tarda*: 91FG, 4N, 18FG, T13A, ; *A. hydrophila*: 1SIL, 10D, 9D, A129, ATCC7966, A130, A122, A133, 41FG, A128, A135, 117FG, 120FG, 121FG, 125FG e 126FG; *A. jandaei*: 14D e A124; *A. veronii*: 7SIL, ANEP, 6SIL, 5N, 1D, A107, A115, A131, A119, A116, A113, A109, A134, A112, A136; *Pseudomonas*

sp: 2SIL, 4SIL, 3SIL, A82, A76, 94FG, 83FG, T51, 115FG, 114FG, 116FG, A75, A78, A66, 49MS.

As 161 sequencias FASTA foram alinhadas pela ferramenta Clustaw Multiple Alignment (programa BioEdit Sequence Alignment Editor, v. 7.1.11), em seguida, estes dados foram inseridos no programa Mega (v. 5.05) para se determinar o melhor modelo de substituição molecular.

Como resultado da análise preliminar, foi gerada uma árvore de máxima verossimilhança, utilizando o modelo "General Time Reversible", parâmetro modelo gamma com cinco categorias, opção de inferência na árvore "Nearest-Neighbor-Interchange". Bootstrapping de 1000 repetições.

2.5 Teste de sensibilidade a antimicrobianos

Foram utilizados discos impregnados com florfenicol (30 µg) e oxitetraciclina (30 µg) e inseridos em Agar Mueller Hinton (Difco), segundo a técnica de CLSI (2009). Foram consideradas sensíveis as cepas com os halos iguais ou superiores a 37 mm; intermediárias, aquelas entre 26 e 36 mm, e resistentes as inferiores a 25 mm.

Foram avaliadas 33 cepas dos gêneros de maior prevalência em âmbito nacional, sendo 12 de *Aeromonas* (cepas A131, A112, A116, A124, 14DP, A135, A133, A130, 121FG, A110, 117FG E 126F), 06 de *Streptococcus* (18P, 76FG, M, 36P, 103FG, 100FG), 08 de *Lactococcus* (497FG, 505FG, 111FG, 17MS, 20MS, 31MS, A71 E S11) e 07 de *Enterococcus* (A1, A5, A8, P, 4MS, 8MS, 42MS).

3. Resultados e Discussão

O presente estudo confirmou que a PCR de colônia aliada ao sequenciamento do gene 16S rRNA pode ser uma ferramenta válida no campo de diagnóstico de bacterioses em peixes, reduzindo custos e tempo de identificação dos isolados (Tabelas 2 e 3), uma vez que as etapas de extração e purificação do DNA da PCR padrão são eliminadas, porém ainda dependente das condições ideais de crescimento do microrganismo.

Tabela 2. Custo das análises para identificação de bactérias realizadas em laboratório de universidade já equipado.

	Microbiologia clássica Valor/amostra R\$	PCR padrão Valor/amostra R\$	PCR colônia Valor/amostra R\$
Isolamento em placa	0,93	0,93	0,93
Multiplicação em meio líquido	1,25	1,25	-
Testes bioquímicos	26,02	-	-
Extração DNA	-	17,00	-
PCR	-	7,56	7,56
Eleroforese	-	0,83	0,83
Purificação	-	7,64	-
Sequenciamento	-	15,00	15,00
Total	28,02	R\$ 50,21	R\$24,32

Tabela 3. Tempo gasto em cada etapa nas metodologias avaliadas.

	Microbiologia Clássica	PCR padrão	PCR colônia
Isolamento placa	24 a 72 h	24 a 72 h	24 a 72 h
Multiplicação em meio líquido	24 a 48 h	24 a 48 h	-
Testes bioquímicos	7 dias	-	-
Extração DNA	-	3 h	-
PCR e eletroforese	-	4,5h	4,5h
Purificação	-	1h	-
Sequenciamento	-	1 dia	1 dia
Total	9 a 12 dias	4 a 7 dias	3 a 5 dias

*tempos de isolamento variam dependendo da espécie a ser cultivada.

Verificou-se economia de 13,21 % nos gastos de análise da PCR de colônia em relação à microbiologia clássica (isolamento e testes bioquímicos), além de redução de 6 dias para emissão do laudo conclusivo. Em relação a PCR padrão, a economia foi de 51,57 % e diminuição de cerca de um dia para o diagnóstico final.

A metodologia de PCR de colônia produziu bandas com a mesma intensidade que a PCR padrão, a qual utiliza DNA extraído e purificado, para todos os 178 isolados (Figura 3). Outros estudos utilizaram esta metodologia (Kong et al. 2004; Coton e Coton, 2005) porém, este trabalho direcionou a utilização da técnica para o diagnóstico de enfermidades na importantes para a aquicultura, área que carece de evolução nas tecnologias, principalmente no Brasil.

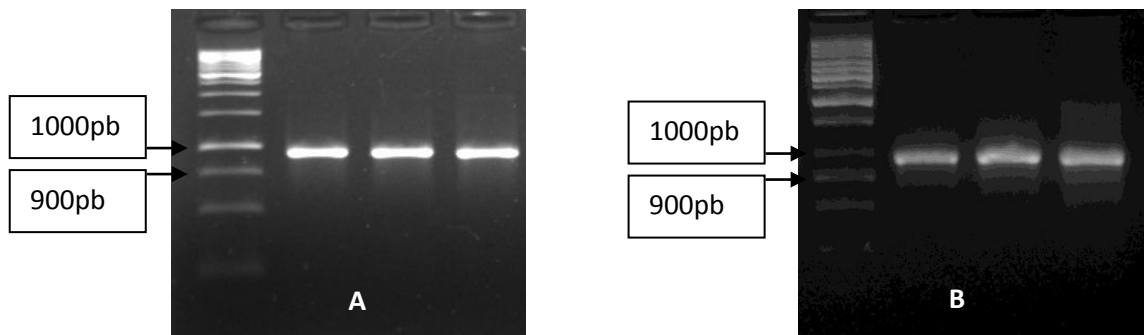


Figura 3. Eletroforograma de gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio, evidenciando amplificação do gene 16S rRNA (“primers” 8F/907R). O tamanho molecular da banda é de 899 pb. A: PCR de colônia; B: PCR padrão.

Tabela 4. Vantagens e desvantagens de cada método.

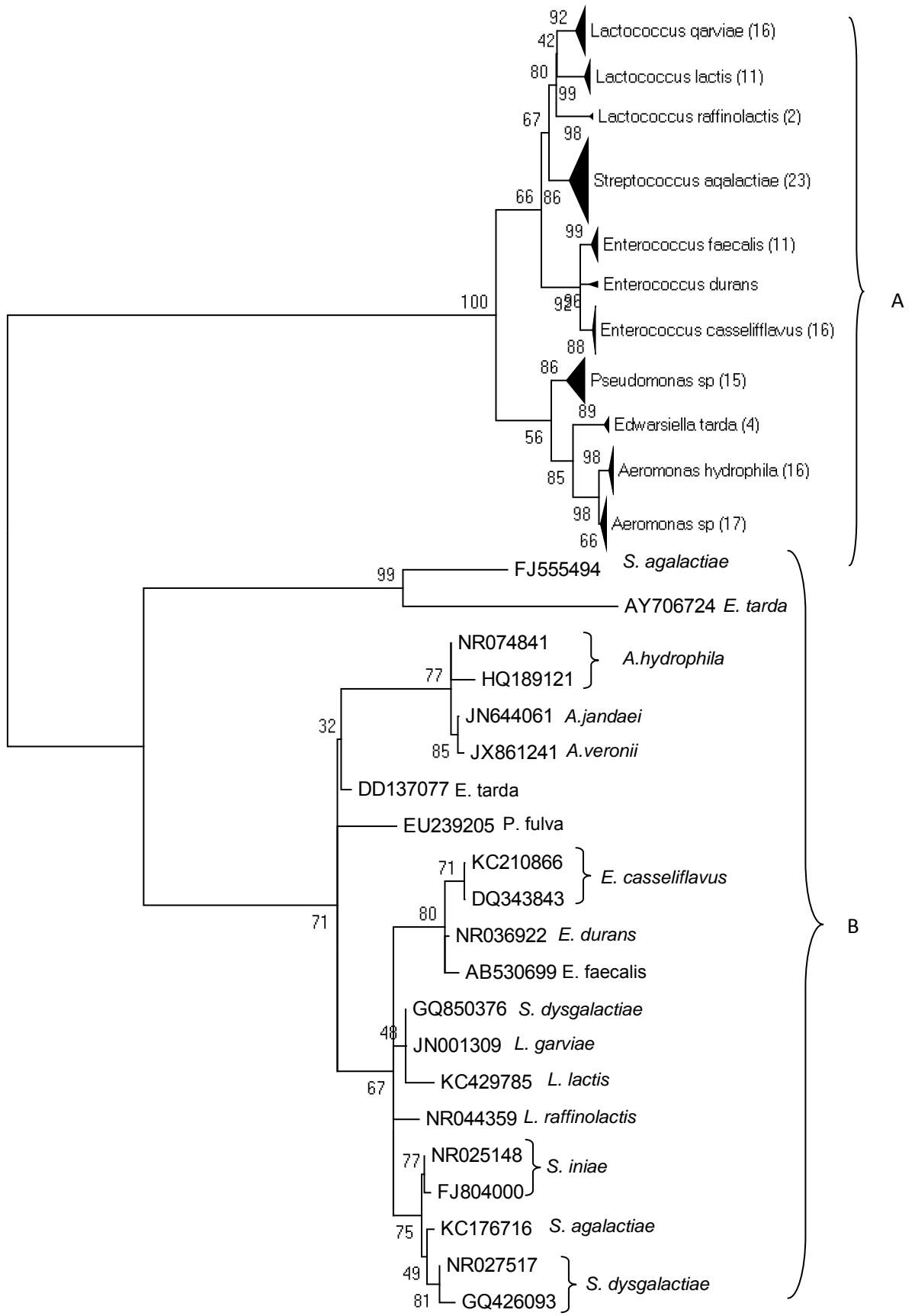
	Microbiologia clássica	PCR padrão	PCR de colônia
Vantagens	Menor tecnificação	Diagnóstico conclusivo, mais rápido que a M. clássica.	Diagnóstico conclusivo; 51 % mais econômica e 24-48 h mais rápida que a PCR padrão.
Desvantagens	Diagnóstico inconclusivo e demorado	Mais onerosa; Ainda depende cultivo bacteriano	1 a 3% pode falhar; Ainda depende cultivo bacteriano

A desvantagem da PCR direto de colônia é que 1 a 3% das amplificações podem falhar devido a variação no diâmetro dos palitos de dente (Kong et al., 2005).

Os eletroforogramas resultantes do sequenciamento dos amplicons provenientes de ambas as técnicas apresentaram qualidade Phred/Phrap igual ou superior a 20, garantindo a confiabilidade na escolha da PCR direto da colônia como alternativa mais rápida para diagnóstico.

Visando validar os dados do sequenciamento, foi construída a árvore de máxima verossimilhança, exibida na Figura 4, agrupando as cepas isoladas neste trabalho em ramos de mesma espécie, de acordo com o esperado.

O princípio da máxima verossimilhança para inferências filogenéticas é avaliar a probabilidade de que um determinado modelo de mudanças evolutivas possa explicar a origem dos dados observados. Neste método, uma árvore inicial é construída utilizando o método de “Neighbor-Joining”, e os comprimentos de cada ramo são ajustados para maximizar a verossimilhança das informações, produzindo a topologia da árvore para o modelo evolutivo desejado (Tamura et al., 2011).



0.2

Figura 4. Árvore de máxima verossimilhança de cepas de bactérias oportunistas em peixes de maior incidência neste trabalho (A) e padrões depositados no GenBank (B), identificados pelo sequenciamento do gene 16S rRNA, com conjunto de “primers” 8F/907R.

A presença de ramos evolutivos distintos entre os isolados deste trabalho, de outros trabalhos da América e de países da Europa e Oriente (chave B, Figura 4) pode ser explicada pelo fato dos isolados de diferentes regiões geográficas apresentarem taxas de mortalidades distintas e conseqüentemente patogenicidades diferentes, como relatado para *S. agalactiae* isolada dos EUA, Brasil, Honduras, Israel e Kuwait (Evans et al., 2014).

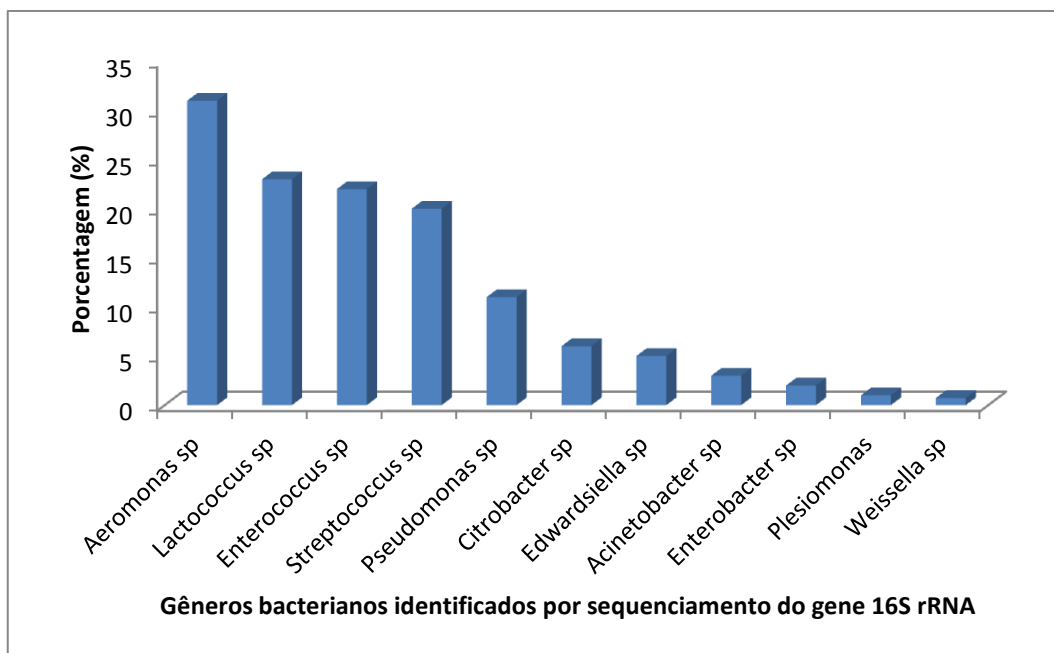


Figura 5. Porcentagem de gêneros bacterianos identificados pelo sequenciamento do gene 16S rRNA nos estados do Mato Grosso do Sul, São Paulo, Paraná e Rio de Janeiro.

Os gêneros relacionados às bactérias patogênicas e de maior frequência neste estudo foram *Aeromonas* (31%), *Lactococcus* (23%), *Enterococcus* (22%), *Streptococcus* (20%), *Pseudomonas* (11%), *Citrobacter* (6%), *Edwardsiella* (5%), *Acinetobacter* (3%), *Enterobacter* (2%), *Plesiomonas* (1%) e *Weissella* (1%). O restante (maioria proveniente da pele) pode ser considerado como contaminante no processo de isolamento e/ou habitantes naturais da microbiota da água (Figura 5).

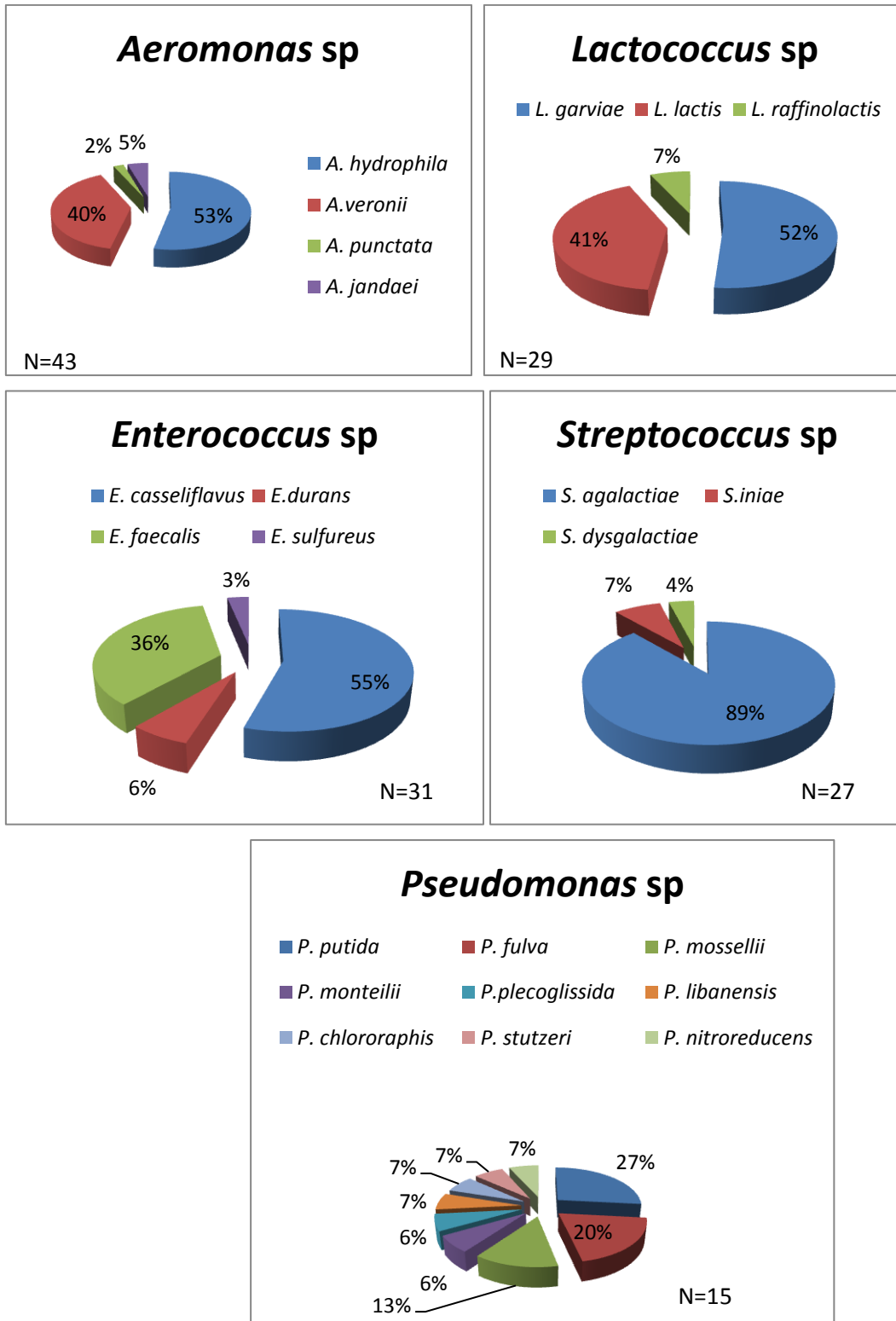


Figura 6. Distribuição das principais espécies de patógenos bacterianos provenientes dos estados de Mato Grosso do Sul, Paraná, Rio de Janeiro e São Paulo e identificados pelo sequenciamento do gene 16S rRNA.

Em relação às espécies, dentre os 43 isolados de *Aeromonas*, 53% foram identificados como *A. hydrophila* pelo sequenciamento do gene 16S rRNA, corroborando dados da literatura que apontam a predominância desta espécie em peixes (Belém-Costa e Cyrino, 2006). Já *A. veronii* correspondeu a 40% dos isolados, como ilustrado na figura 6.

Destaca-se também a característica de sazonalidade observada neste estudo, pois na primavera e verão, com a temperatura da água elevada observou-se o maior índice de isolamento desses patógenos. Entre as 27 cepas de *Streptococcus* oriundas do Mato Grosso do Sul, Paraná e São Paulo, 89% corresponderam a *S. agalactiae*, fato também observado por Netto et al. (2011) e Figueiredo et al., (2012).

Apesar de infecção por *S. agalactiae* ser a maior causa de perda na tilapicultura mundial, esse patógeno também foi isolado em cachara proveniente do Mato Grosso do Sul. Outros estudos também descrevem *S. agalactiae* em várias outras espécies de peixes, como *Sparus auratus*, *Liza klunzigeri* (Evans et al., 2002) e *Pampus argenteus* (Duremdez et al., 2004).

Para o gênero *Lactococcus*, a espécie emergente (*L. garviae*) correspondeu a 52% do total dos 29 isolados do gênero, seguido por *L. lactis* com 41% de incidência, com o maior número isolado de cacharas.

L. garviae foi isolado de várias espécies de peixes ao redor do mundo, destacando-se Japão (Nishiki et al., 2011), África do Sul (Bekker et al., 2011), Europa (Eyngor et al., 2004) e Brasil, com o primeiro surto documentado em 2009, em tilapia e pintado (Evans et al., 2009). Os peixes acometidos pela lactococose apresentaram letargia, anorexia, escurecimento da pele e natação próxima à superfície da água (AVCI et al., 2010), resultando em perdas econômicas importantes, principalmente quando a temperatura da água está elevada durante os meses de verão (Vendrell et al., 2006).

Há poucos trabalhos que apresentam *L. lactis* como patógeno oportunista de peixes, todavia, vale ressaltar um estudo recente (Chen et al., 2012) que apresentou o *L. lactis* subsp. *lactis* como o responsável pela perda de 100% dos esturjões híbridos (*Huso huso* x *Acipenser ruthenus*) em uma piscicultura do Taiwan, China.

Neste estudo, foram isolados 31 cepas de *Enterococcus* a partir de amostras da pele e rim, sendo 55% *E. casseliflavus*, 36% *E. faecalis*, 6% *E. durans* e 3% *E.*

sulfureus. A prevalência de *E. casseliflavus* também foi detectada em isolados de água e sedimento (66,7% de um total de 410 isolados de *Enterococcus* sp). na Tailândia (Petersen e Dalsgaard, 2003b).

Dentre as várias espécies existentes de *Pseudomonas* (n=15), neste estudo predominaram as espécies *P. putida* (27%) e *P. fulva* (20%). Eissa et al. (2010) encontraram 30,83% de incidência de espécies de *Pseudomonas* em tilápia-do-nilo, no Egito. Já, Hussain (2002) e Zorrilla et al. (2003) relataram a incidência de 15,27%, 13,5% e 9,7%, respectivamente, de espécies de *Pseudomonas* em peixes marinhos, números que se aproximam dos 11% encontrados neste estudo .

Como o número de isolados de cada região foi baixo, não se pôde determinar um perfil de frequência de patógenos por localidade neste trabalho, porém ressalta-se importância de se desenhar um perfil regional em programas de monitoramento de sanidade aquícola ou manejo preventivo, pois, da mesma forma que, em caso de surtos de enfermidades, medidas de tratamento serão distintas em cada região, uma vez que os fatores luz, qualidade da água e solo, contaminação por herbicidas de plantações vizinhas ao sistema aquícola, quantidade de parasitas, forma de manejo, etc também são peculiares a cada localidade.

Quanto aos tratamentos, com a intensificação da produção de peixes e aumento da incidência de enfermidades, houve também aumento no uso indiscriminado de antimicrobianos, o que tem preocupado sociedade (Blackburn et al., 2010). O emprego de drogas em larga escala tanto para fins profiláticos quanto terapêuticos tem provocado a seleção de populações bacterianas resistentes aos principais antimicrobianos disponíveis no mercado (Sarter et al., 2007), com especial atenção para o Brasil, onde apenas dois antibióticos, florfenicol e oxitetraciclina estão na lista dos aprovados pelo Programa Nacional de Sanidade de Animais Aquáticos (PNSAA) baseado nas diretrizes da OIE, e sob responsabilidade do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Para ilustrar este quadro preocupante de resistência, foram realizados antibiogramas com florfenicol e oxitetraciclina em 33 isolados obtidos neste trabalho, divididos em quatro gêneros mais incidentes segundo a distribuição geral das regiões geográficas analisadas (Tabela 5).

Tabela 5. Teste de sensibilidade a antimicrobianos realizados para o florfenicol e oxitetraciclina para os gêneros de bactérias mais prevalentes dentre os isolados deste trabalho.

Gênero bacteriano	Resistência ao Florfenicol (%)	Resistência a Oxitetraciclina (%)
<i>Aeromonas</i> n=12	16,7	8,3
<i>Streptococcus</i> n=6	83,3	16,7
<i>Lactococcus</i> n=7	85,7	71,4
<i>Enterococcus</i> n=7	71,4	57,1

Para o grupo das *Aeromonas* ainda há possibilidade de tratamento com ambos os antibióticos, uma vez que a resistência apresentada foi inferior a 20%, dados semelhantes aos relatados por Petersen e Dalsgaard (2003b) em pisciculturas integradas na Tailândia, que avaliaram as espécies de peixes: *Probarbus jullieni*, *Barbodes gonionotus*, tilapia e carpa comum.

No entanto, além dos problemas taxonômicos e epidemiológicos, o uso de antimicrobianos para tratar infecções bacterianas e sua incorporação em doses sub-terapêuticas na ração de peixes resultam em aumento global da resistência. Ou seja, se não houver uso consciente dos antimicrobianos legalizados no Brasil para o tratamento de surtos de *Aeromonas*, o uso de outras drogas pode não ser mais uma alternativa para o futuro.

Em relação aos isolados de *Streptococcus*, houve alta resistência (83,3%) ao florfenicol, porém sensibilidade a oxitetraciclina na maioria dos isolados testados. Já os isolados dos gêneros *Lactococcus* e *Enterococcus* apresentaram alta resistência (acima de 57%) aos dois antimicrobianos.

Existem grandes dificuldades na utilização de antimicrobianos para o tratamento da estreptococose, uma vez que o patógeno pode sobreviver no interior de macrófagos, onde muitas drogas antimicrobianas não conseguem atuar. Os antimicrobianos podem eliminar os sinais clínicos da doença, porém não o patógeno, além do fato que peixes doentes tornam-se anoréxicos, tornando este método de tratamento falho, e ainda contribuindo para o desenvolvimento de resistência (Amal e Zamri-Saad, 2011).

Uma alternativa nos casos de estreptococose tem sido a vacinação. Há vários tipos de vacinas estreptocócicas, com ou sem adição de extrato de produtos extracelulares ou adjuvantes. As vacinas podem ser injetáveis, orais ou por imersão, sendo as primeiras mais eficazes e têm contribuído para diminuição da morbidade e mortalidade de peixes e conseqüentemente, diminuído o uso indiscriminado de antimicrobianos (Amal e Zamri-Saad, 2011).

Em relação aos enterococos, tem-se relatado um aumento significativo de infecções nosocomiais e os isolados clínicos têm adquirido resistência a uma vasta gama de antimicrobianos (Cesare et al., 2012), tornando tais infecções de difícil tratamento.

Os maiores índices de resistência relatados são em propriedades onde há consórcio entre criação de peixes e de frangos ou porcos. No caso, a resistência de *Enterococcus* a oxitetraciclina foi de 75% em pisciculturas consorciadas na Tailândia (Petersen e Dalsgaard, 2003a; Petersen e Dalsgaard, 2003b) contra 57% de resistência encontrada neste trabalho para oxitetraciclina e 71,4% para florfenicol.

Em relação ao grupo dos lactococos, segundo gênero de maior incidência avaliado neste trabalho, muitos antimicrobianos que demonstram atividade *in vitro* contra *L. garviae*, são ineficientes em condições de campo, provavelmente devido à rápida anorexia desenvolvida pelos animais e o surgimento de cepas resistentes (Vendrell, 2006). Os isolados de *Lactococcus* sp. obtidos neste estudo apresentaram 85% de resistência ao florfenicol e 71,4% a oxitetraciclina. Kawanishi et al. (2005) encontraram resistência simultânea em 44% dos isolados de *L. garviae* a eritromicina, lincomicina e oxytetraciclina.

As substâncias mais utilizadas no controle da lactococose em truta arco-íris são a eritromicina, oxitetraciclina, amoxicilina e doxyciclina. Dentre estas, somente a oxitetraciclina é permitida no Brasil, e seus resultados são inconstantes ao redor do mundo, como Japão (Ooshima et al., 1997) e Turquia (Diler et al., 2002).

As alternativas investigadas no controle da lactococose tem sido injeção intraperitoneal de bacteriófagos de *L. garviae* (Oliveira et al., 2012) nos peixes de criação, utilização de *Aeromonas sobria* como probiótico, (Brunt et al., 2005) para estimular a imunidade inata, aumentando o número de leucócitos e melhorando a atividade fagocítica e da atividade respiratória dos leucócitos, e a alternativa mais

eficaz que é a vacinação com cepas de *L. garviae* inativadas por formalina (Vendrell et al., 2006).

4. Conclusão

A técnica de PCR direta de colônia associada ao sequenciamento do gene 16S rRNA constituiu uma alternativa eficiente, rápida e econômica, pois permitiu redução de 9 para 3 dias no tempo para diagnóstico em relação a microbiologia clássica, além de fornecer um resultado conclusivo e com economia de 16% nos gastos das análises. Em comparação a PCR padrão, permitiu economia de 52,44% dos gastos, demorando um dia a menos para emissão do laudo. Como consequência do sucesso da técnica, foi possível identificar os principais patógenos responsáveis por mortalidades nas pisciculturas das localidades analisadas neste trabalho. Também foi observado um elevado índice de resistência ao florfenicol e a oxitetraciclina pelos isolados testados, fato preocupante para a sociedade. Recomenda-se a criação de programas de monitoramento da sanidade na produção aquícola e maior fiscalização no uso dos antimicrobianos na piscicultura brasileira.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão da bolsa de estudos (Processo 2011/07951-5), ao suporte técnico do Centro de Aquicultura da Unesp (CAUNESP/Jaboticabal) e Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (Depto de Tecnologia, FCAV/UNESP Jaboticabal) e as doações de cepas pela Dra Fabiana Garcia.

Referências

- Amal, M.N.A. and Zamri-Saad, M. 2011. Streptococcosis in Tilapia (*Oreochromis niloticus*): A Review. *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.* 34, 195-206.
- Avcı, H., Aydoğan, A., Tanrikul, T. T., Birincioğlu, S. S. 2010. Pathological and Microbiological Investigations in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) naturally Infected with *Lactococcus garvieae*. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*, 16 (Suppl-B): S313-S318..
- Beaz-Hidalgo, R., Figueras, M.J. 2012. Molecular detection and characterization of furunculosis and other *Aeromonas* fish infections. In: *Health and Environment in Aquaculture* (ed. By E. Carvalho), pp. 97–132.

- Bekker, A., Hugo, C., Albertyn, J., Boucher, C. E. and Bragg, R. R. 2011. Pathogenic Gram-positive cocci in South African rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J.Fish Dis., 34, 483–487.
- Belem-Costa, A., Cyrino, J.E.P. 2006. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) and *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). Scientia Agricola. 63, 281-284.
- Ben-Dov E., Shapiro O.H., Siboni N., Kushmaro A. 2006. Advantage of Using Inosine at the 3' Termini of 16S rRNA Gene Universal "primers" for the Study of Microbial Diversity. Appl. Environ. Microbiol 72, 6902–6906.
- Blackburn, J. K., Mitchell, M. A., Blackburn, M-C. H., Curtis, A., Thompson, B. A. 2010. Evidence of antibiotic resistance in free-swimming, top-level marine predatory fishes. J. Zoo Wildl. Med. 41, 7-16.
- Brunt, J., Austin, B. 2005. Use of a probiotic to control lactococcosis and streptococcosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)", J. Fish Dis., 28, 693-701.
- Cesare, A., Vignaroli, C., Luna, G.M., Pasquaroli, S., Biavasco, F. 2012. Antibiotic-Resistant Enterococci in Seawater and Sediments from a Coastal Fish Farm. Microbial Drug Resist. 18, 502-509.
- Chen, M.H., Hung, S.W., Shyu, C.L., Lin C.C., Liu P.C., Chang, C.H., Shia, W.Y., Cheng C.F., Lin S.L., Tu C.Y., Lin Y.H., Wang, W.S. 2012. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* infection in Bester sturgeon, a cultured hybrid of *Huso huso* X *Acipenser ruthenus*, in Taiwan. Res.Vet. Science, 93, 581–588.
- Claesson, M.J., Wang, Q., O'Sullivan, O., Greene-Diniz, R., Cole, J.R., Ross, R.P., O'Toole, P.W. 2010. Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. Nucleic Acids Res. 28, 1-13.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard M2-A10. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Coton, E., Coton, M. 2005. Multiplex PCR for colony direct detection of Gram-positive histamine- and tyramine-producing bacteria. J. Microbiol. Methods 63, 296– 304.
- Dash, S.S., Dasi, B.K., Pattnaik, P., Samal, S.K., Sahu, S., Ghosh, S. 2009. Biochemical and Serological Characterization of *Flavobacterium columnare* from Freshwater Fishes of Eastern India. J.World Aquacult. Soc. 40, 236-247.
- Diler, O., Altun, S., Adiloglu, A.K., Kubilay, A., Isikli, B. 2002. First occurrence of Streptococcosis affecting farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey", Bull Eur Ass Fish Pathol, 22, 21-25.
- Duremdez, R., Al-Marzouk, A., Qasem, J.A. 2004. Isolation of *Streptococcus agalactiae* from cultured silver pomfret, *Pampus argenteus* (Euphrasen), in Kuwait. J. Fish Dis. 27, 307-310.
- Eissa, N.M.E., Abou E.E.N., Shaheen, A.A., Abbass A. 2010. Characterization of *Pseudomonas* Species Isolated from Tilapia "*Oreochromis niloticus*" in Qaroun and Wadi-El-Rayan Lakes, Egypt. Global Vet. 5, 116-121.

- Evans, J.J., Klesius, P.H., Shoemaker, C.A. 2009. First isolation and characterization of *Lactococcus garvieae* from Brazilian Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), and pintado, *Pseudoplathystoma corruscans* (Spix & Agassiz). J. Fish Dis. 32, 943-951.
- Evans, J.J., Pasnik, D.J., Klesius, P.H. 2014. Differential pathogenicity of five *Streptococcus agalactiae* isolates of diverse geographic origin in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). Aquacult. Res., 1-8.
- Evans, J.J., Wiedenmayer, A.A., Klesius, P.H. 2002. A transport system for maintenance of viability of *Acinetobacter calcoaceticus*, *Streptococcus iniae*, and *Streptococcus agalactiae* over varying time periods. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol., 22, 238-246.
- Eyngor, M., Zlotkin, A., Ghittino, C., Prearo, M., Douet, D.G., Chilmonczyk, S., Eldar, A. 2004. Clonality and diversity of the fish pathogen *Lactococcus garvieae* in Mediterranean countries. Appl Environ Microbiol, 70, 5132-5137.
- FAO Fishery and Aquaculture Country Profiles. Brazil (2010). Country Profile Fact Sheets. In: FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome. Updated 1 June 2010. Acesso em 06 jul. 2014.
- Figueiredo, H.C.P., Nobrega-Netto, L., Leal, C.A.G., Pereira, U.P., Mian, G.F. 2012. *Streptococcus iniae* outbreaks in Brazilian Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) farms. Braz. J. Microbiol. 43, 576-580.
- Hussain, R.A. Studies on some bacterial infections affecting certain marine fishes in the Arabian Gulf of ingodom of Saudi Arabia. Thesis M.V.Sc., Fac. Vet. And anim. Res. King Faisal Univ., 2002.
- Janda, J.M., Abbott, S.L. 2007. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. J. Clin. Microbiol. 45, 2761–2764.
- Kawanishi, A.; Kojima, A.; Ishihara, K.; Esaki, H.; Kijima, M.; Takahashi, T. 2005. Drug resistance and pulsed-field gel electrophoresis patterns of *Lactococcus garvieae* isolates from cultured *Seriola* (yellowtail, amberjack and kingfish) in Japan. Lett Appl Microbiol, v.40, p. 322–328.
- Kong, P., Richardson, P.A., Hong, C. 2005. Direct colony PCR-SSCP for detection of multiple pythiaceous oomycetes in environmental samples. J. Microbiol. Methods 61, 25– 32.
- Netto, L.N., Leal, C.A.G., Figueiredo, H.C.P. 2011. *Streptococcus dysgalactiae* as an agent of septicemia in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). J. Fish Dis. 34, 251-254.
- Nishiki, I., Furukawa, M., Matui, S., Itami, T., Nakai, T., Yoshida, T. Epidemiological study on *Lactococcus garvieae* isolates from fish in Japan. Fish Sci., 77, 367–373.
- OLIVEIRA, J.; CASTILHO, F.; CUNHA, A.; PEREIRA, M. J. 2012. Bacteriophage therapy as a bacterial control strategy in aquaculture. Aquacult Int, v.20, p. 879-910.
- Ooshima, T., Kaneda, S., Ise, N., Okada, M., Takagi, H. 1997. Studies on tobramycin, a new antibiotic drug for enterococcosis in yellowtail, *Seriola quinqueradiata*, Fish Sci. 63, 741-745.

- Petersen, A., Dalsgaard, A., 2003a. Antimicrobial resistance of intestinal *Aeromonas* spp. and *Enterococcus* spp. in fish cultured in integrated broiler-fish farms in Thailand. *Aquaculture* 219, 71–82.
- Petersen, A., Dalsgaard, A., 2003b. Species composition and antimicrobial resistance genes of *Enterococcus* spp., isolated from integrated and traditional fish farms in Thailand. *Environ. Microbiol.* 5, 395–402.
- Sambrook, J., Russel, D.W. 2001. *Molecular Cloning*. 3rd edition. 3 vol. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sarter, S., Nguyen, H. N. K., Hung, L. T., Lazard, J., Montet, D. 2007. Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria isolated from farmed catfish. *Food Control*. 18, 1391-1396.
- Shama, S., Brandão, D.A., Vargas, A.C., Costa, M.M., Pedrozo, A.F. 2000. Bactérias com potencial patogênico nos rins e lesões externas de jundiás (*Rhamdia quelen*) cultivados em sistema semi-intensivo. *Ciência Rural*. 30, 293-298.
- Silva, B.C., Mouriño, J.L.P., Vieira, F.N., Jatobá, A., Seiffert, W.Q., Martins, M.L. 2012. Haemorrhagic septicaemia in the hybrid surubim (*Pseudoplatystoma corruscans* x *Pseudoplatystoma fasciatum*) caused by *Aeromonas hydrophila*. *Aquacult. Res.* 43, 908-916.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.*, 10, 2731-2739.
- Vendrell, D., Balcazar, J.L., Ruiz-Zarzuola, I., Blas, I.D., Girones, O., Muzquiz, J.L. 2006. *Lactococcus garvieae* in fish: A review. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 29, 177-198.
- Zorrilla, I., Chabrillo'n, M., Arijó, S., Dí'az-Rosales, P., Martí'nez-Manzanares, E., Balebona, M.C., Morin'igo, M.A. 2003. Bacteria recovered from diseased cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) in southwestern Spain. *Aquaculture* 218, 11 – 20.

CAPÍTULO 3. Validação da técnica de PCR quantitativo em tempo real (qaPCR) para o diagnóstico de infecções por *Aeromonas hydrophila* em peixes no Brasil

RESUMO – *Aeromonas hydrophila* é um cocobastonete gram-negativo responsável por substanciais perdas na aquicultura mundial nos últimos anos, além de ser risco potencial para saúde dos humanos. A doença causada por esta bactéria está associada ao excesso de matéria orgânica na água e a danos causados ao hospedeiro por manejo ou parasitos. Todavia, a bactéria depende de potentes fatores de virulência, para que possa colonizar, invadir e driblar o sistema imune do hospedeiro. Neste trabalho, explorou-se o gene (*ahaI*) da adesina presente na *A. hydrophila*, a qual desempenha papel fundamental na instalação de infecções pela bactéria. Avaliou-se a especificidade e sensibilidade analítica da PCR quantitativa absoluta em tempo real, baseada em SyBr Green I, para identificar e quantificar amostras de *A. hydrophila*, através da microbiologia convencional, e a partir do DNA total extraído de tecido de rim de tilápias infectadas experimentalmente com a bactéria. O ensaio mostrou 100% de especificidade e limiar de detecção de 20 fg para o DNA de isolados e 0,2 fg para DNA total de tecido. Este trabalho constitui uma ferramenta valiosa para detecção de *A. hydrophila* de peixes oriundos de criação intensiva e, a habilidade de quantificação da bactéria no hospedeiro, representa uma forma de medida da eficácia de vacinas e terapias com antibióticos, além de auxiliar na identificação dos fatores que predispõem as populações a surtos de doenças. Assim, com o monitoramento da presença do patógeno, esta técnica contribuirá para a redução das perdas na piscicultura.

Palavras-chave: adesina, *Aeromonas hydrophila*, qaPCR em tempo real, tilápia.

1. Introdução

Dentre as várias espécies de bactérias com potencial risco para a ocorrência de doenças em pisciculturas intensivas no Brasil, destaca-se a *Aeromonas hydrophila*. Este cocobastonete gram-negativo pertencente à família Aeromonadaceae, cujo habitat é predominantemente aquático, é responsável por lesões ulcerativas e septicemia hemorrágica em peixes de água doce. É móvel, possui flagelos polares, não produz esporos, não possui cápsula, pode ser aeróbia ou anaeróbia facultativa (Austin e Austin, 1987).

A doença causada por *A. hydrophila* está associada ao excesso de matéria orgânica na água, acometendo peixes em condições de estresse e/ou associada à infecção por outros patógenos (ABDEL-TAWWAB et al., 2008).

A transmissão do agente infeccioso ocorre de modo horizontal, estando o mesmo presente na água e no sedimento dos viveiros, sendo transmitido por descargas do trato intestinal dos peixes e lesões externas na pele (COSTA, 2003).

A presença de grande quantidade de *A. hydrophila* em pisciculturas intensivas apresenta também risco aos humanos, uma vez que a bactéria pode causar gastroenterite, septicemia, síndrome urêmico-hemolítica, meningite, peritonite, infecções em feridas, infecções do trato respiratório e infecções oculares (VIZZOTTO, 2009).

Para que possam colonizar, invadir e driblar o sistema imunológico do hospedeiro e causar dano tecidual, as *Aeromonas* dispõem de vasta gama de fatores de virulência tais como proteases, hemolisinas, citotoxinas, enterotoxinas, leucocidina, elastases, camada-S e adesinas (GALINDO et al., 2006; VON GRAEVENITZ, 2007), mas os mecanismos associados à doença não foram ainda amplamente estabelecidos (HUYS et al., 2002).

As adesinas desempenham papel fundamental na instalação de infecções pela bactéria, uma vez que são responsáveis pela aderência da mesma na célula hospedeira, pois se situam na superfície da parede bacteriana e se ligam a receptores específicos (FANG et al., 2004).

Diversas adesinas filamentosas (fímbrias) e não-filamentosas (afimbriais) foram descritas em espécies de *Aeromonas* mesofílicas. Os dois tipos de fímbrias aumentam a adesão da bactéria a diferentes linhagens celulares (MERINO et al., 1995).

Em vista disso, o gene da adesina (ahal), como fator de virulência, tem sido utilizado para identificação da espécie de *A. hydrophila* (FUKUSHIMA et al., 2003; FANG et al., 2004; SHANNON et al., 2007).

Nos últimos anos, uma variação da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), a PCR quantitativa em tempo real, tem auxiliado na identificação de *Aeromonas* sp na piscicultura (SHANNON et al., 2007 GRIFFIN et al., 2013) devido à alta sensibilidade, especificidade e acurácia da técnica na detecção de números muito baixos de bactérias, além de eliminar a necessidade de eletroforese em gel.

O agente fluorescente o SyBr Green® , o qual atua como intercalante da fita dupla de DNA e se mantém estável em altas temperaturas, pode ser utilizado pois,

além de não interferir na atividade da enzima e ligar-se à molécula em proporções lineares, possui menor custo em relação a outros intercalantes do mercado e maior facilidade de uso (WILSON; CARLSON, 2003).

Assim, os objetivos do trabalho foram desenvolver um teste de PCR quantitativo absoluto em tempo real para identificação de *A. hydrophila* e avaliar sua especificidade e sensibilidade analítica para isolados bacterianos, além de avaliar a capacidade do teste em detectar a presença de *A. hydrophila* em amostras de DNA extraídas diretamente do rim dos peixes hospedeiros.

2. Material e Métodos

No entanto, neste trabalho, os “primers” previamente publicados (FUKUSHIMA et al., 2003) foram ligeiramente modificados para que pudessem amplificar o gene de isolados de *A. hydrophila* obtidos neste estudo.

2.1 Isolamento bacteriano

As 31 cepas de *A. hydrophila* foram isoladas de peixes doentes apresentando sinais clínicos característicos de aeromoniose, tais como escurecimento da derme, corrosão das nadadeiras e manchas avermelhadas na pele, originários de diferentes pisciculturas do Brasil (Itajú-SP, Santa Fé do Sul-SP, Palmital-SP, Rio de Janeiro-RJ, Arealva-SP, Guaíra-SP, Porto Ferreira-SP e Jaboticabal-SP), pertencentes ao Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos (Lapoa, Caunesp/Unesp), ao LENAQ (Laboratório de Enfermidades de Animais Aquáticos, APTA/Votuporanga) e ao Laboratório de Microbiologia de Pevet Sanidade Aquícola (Jaboticabal-SP).

Foram previamente identificadas pelo sequenciamento do gene 16S rRNA, “primers” 8F/907R. As informações estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Cepas de *Aeromonas hydrophila* utilizadas neste trabalho.

Cepa	Referência	Origem	Local
A111	Acervo Lapoa	Rim tilapia	SP
A120	Acervo Lapoa	Rim tilapia	SP
A125	Acervo Lapoa	Rim tilapia	SP
127FG	Acervo Lenaq	Rim tilapia	SP/PR
231413	Acervo Prevet	Rim tilapia	SP
35142A	Acervo Prevet	Rim tilapia	SP
201406B	Acervo Prevet	Rim tilapia	SP
37142A	Acervo Prevet	Rim tilapia	SP
42141D	Acervo Prevet	Rim tilapia	SP
43142C	Acervo Prevet	Rim tilapia	SP
49143A	Acervo Prevet	Rim tilapia	SP
37142B	Acervo Prevet	Encéfalo tilapia	SP
DP09146	Acervo Prevet	Rim tilapia	SP
DP09148	Acervo Prevet	Rim tilapia	SP
MI15141G	Acervo Prevet	Rim tilapia	SP
1SIL	KJ561014	Rim tilapia	SP
5SIL	KJ561015	Rim tilapia	SP
A129	KJ561018	Rim tilapia	SP
ATCC7966	KJ561019	Ambiente	RJ
A130	KJ561020	Pele tilapia	SP
A122	KJ561021	Pele pintado	SP
A133	KJ561022	Pele tilapia	SP
41FG	KJ561023	Rim tilapia	SP/PR
A128	KJ561024	Pele tilapia	SP
A135	KJ561025	Pele carpa	RJ
117FG	KJ561026	Rim tilapia	SP/PR
120FG	KJ561027	Rim tilapia	SP/PR
125FG	KJ561029	Rim tilapia	SP/PR
126FG	KJ561030	Rim tilapia	SP/PR
128FG	KJ561031	Rim tilapia	SP/PR

2.2 Extração de DNA

Uma colônia de cada cepa bacteriana foi transferida para um tubo contendo 2 mL de meio TSB (Tryptic Soy Broth- Biolife) e incubado por 18 h ou até que se atingisse a DO_{600} de 1 a 1,5. Após incubação a 28°C, 1,0 mL da cultura bacteriana foi centrifugada a 12.000 xg por 1 min, o sobrenadante descartado e o pellet congelado a -20°C para posterior extração do DNA. Utilizou-se o kit Axyprep® miniprep para DNA genômico bacteriano, segundo metodologia do fabricante

(Axygen Biosciences, Union City, CA, USA). A quantificação foi feita por fluorimetria, utilizando o aparelho QuBit 2.0 (Life Technologies, NY, USA).

2.3 Desenho dos “primers”

O primer R para amplificação do Gene Major Adhesin Aha I (*Aeromonas hydrophila*) na PCR em tempo real foi redesenhado a partir do gene aha da *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila* ATCC 7966, disponível no GenBank. O F permaneceu o mesmo descrito por Fukushima et al (2003). A sequência do para “primers” está descrita na Tabela 2.

Tabela 2. Sequência de nucleotídeos no sentido 5'-3' dos “primers” para gene ahaI de *Aeromonas hydrophila*. Amplicon de 200pb.

Primer	Sequencia	Tm (°C)
Aha I Forward	GAGAAGGTGACCACCAAGAACA	57,8
Aha I Reverse	GAGATGTCAGCCTTGTAGAGCT	54,2

Após o desenho manual dos “primers”, as sequências foram inseridas no software Primer Express 3.0 para obtenção de possíveis formações de dímeros simples, dímeros compostos, hairpins e temperatura de melting, classificando-os como adequados para utilização na PCR em tempo real.

2.4 PCR convencional

Inicialmente, foi desenvolvida PCR tradicional para se testar a funcionalidade dos “primers” aha I desenhados. A reação final consistiu de: 0,5 µL de taq DNA-polimerase (Fermentas®); 1,2 µL de MgCl₂ (25 mM), 2,5 µL tampão 10X; 0,6 µL dntp (200 µM); 1,0 µL de cada primer (10 pmol); 2,0 µL DNA (50 ng/µL); 16,2 µL H₂O ultra-pura.

O programa otimizado foi o seguinte: 95°C por 5 min, 40 ciclos de 95°C por 1 min, 66°C por 1 min e 72°C por 2 min, além de uma extensão extra a 72°C por 5 min. Em seguida, foi realizada eletroforese em gel de agarose 3%, 90 min, 70 V, para visualização da banda de DNA de 200pb.

2.5 Clonagem do gene *aha I* para confecção da curva-padrão em qPCR

2.5.1 Purificação dos produtos de PCR

Após a PCR descrita no ítem anterior, seguiu-se a purificação do produto de PCR pelo kit Min Elute® (Qiagen, West Sussex, UK), metodologia recomendada pelo fabricante. Em seguida, fez-se a quantificação dos produtos de PCR purificados em fluorímetro QuBit 2.0.

2.5.2 Meio de cultura para cultivo dos clones

O meio utilizado para multiplicação dos clones foi o LB (Luria-Bertani), composto por Triptona (10g/L), extrato de levedura (5g/L), NaCl (10 g/L), água destilada q.s.p., Agar (9 g/L) e ampicilina (50 µg/mL de meio).

2.5.3 Clonagem e transformação bacteriana

Para clonagem e inserção do gene *ahal* em *E. coli* competente, foi utilizado o kit Clone Jet (Fermentas®) e a metodologia utilizada foi de acordo com instruções do fabricante, a célula competente utilizada foi *E. coli* DH10B.

Os clones foram semeados em placas preaquecidas contendo meio LB com ampicilina, incubados a 37°C, “overnight”.

Na manhã seguinte, cada colônia foi transferida para um tubo contendo LB líquido com ampicilina e incubado em shaker a 230 rpm, 37°C, “overnight”.

Após incubação, 1 mL da cultura bacteriana de cada tubo foi estocada em tubo criogênico, contendo 0,5 mL de glicerol 40% estéril, congelado em nitrogênio líquido e estocado em freezer -80°C.

O restante do volume da cultura bacteriana foi dividido em tubos eppendorf de 1,5 mL, estéreis, e centrifugados a 4000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado e as células lavadas com 240 µL de solução GET (9 g/L; 20 mL/L EDTA

0,5 M; 25 mL/L tris-HCl 1 M pH 8,0; água ultra-pura q.s.p. 1 L), centrifugadas a 4000 rpm por mais 5 min e o sobrenadante descartado.

Os tubos contendo os pellets foram estocados em freezer -20°C até o momento da extração plasmidial.

2.5.4 Extração DNA plasmidial

O protocolo para extração dos plasmídeos foi baseado em Sambrook et al., (2001), com modificações e consistiu de: ressuspensão do pellet em 60 µL da solução GET com RNase (10 µg/mL), agitação em vortex e incubação a temperatura ambiente por 5 min; adição de 120 µL de solução de lise NaOH/SDS (26 µL/mL de SDS 10%, 13 µL/mL de NaOH 4M; água ultra-pura q.s.p. 1 mL), agitação suave e incubação a temperatura ambiente por 5 min; adição de 120 µL de solução de acetato de potássio 3 M (0,6 mL de KAc 5M, 0,115 mL de ácido acético glacial e q.s.p. 1 mL de água ultra-pura), agitação suave, incubação a temperatura ambiente por 5 min, guardado em freezer – 80°C, “overnight”. Após, as amostras descongeladas, foram centrifugadas por 45 min, a 4000 rpm, a 20 °C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo eppendorf de 1,5 mL, estéril e adicionado 16 µL de acetato de sódio 3M (pH 5,2). O volume de 1,0 mL foi completado com isopropanol. Misturou-se gentilmente e guardou-se em freezer -20°C, “overnight”. Em sequência, centrifugou-se os tubos por 45 min, 4000 rpm, a 4°C. O isopropanol foi descartado e adicionou-se 300 µL de etanol 70 % gelado e centrifugou-se novamente por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o excesso de álcool foi evaporado em speed-vac a 30°C, por 10 min. O DNA plasmidial foi ressuspensão em 40 µL de água ultra-pura, autoclavada.

A quantidade do DNA extraído foi lida em fluorímetro Qubit®2.0 e a integridade do DNA foi observada em gel de agarose 1%.

2.5.5 PCR para constatação da inserção do gene ahal no vetor PJET1.2/BLUNT.

A reação consistiu de: 0,5 µL de taq DNA-polimerase (Thermo Scientific®); 1,2 µL de MgCl₂ (25 mM), 2,5 µL tampão 10X; 0,2 µL dntp (200 µM); 2,0 µL de cada “primer” (F e R, 5 pmol); 1,0 µL DNA (50 ng/µL); 15,6 µL H₂O ultra-pura.

O programa no termociclador foi o seguinte: 95°C por 3 min, 25 ciclos de 94°C por 30s, 60°C por 30s e 72°C por 1 min.

As bandas foram observadas após eletroforese em gel de agarose 3%, corado com brometo de etideo.

2.5.6 Reação de Sequenciamento do plasmídio

A reação de sequenciamento consistiu de: 4,0 µL de tampão, 1,0 µL de “Big Dye”, 1,0 µL de “primer” do vetor pJET (5 pmol), 1,0 µL DNA (50 ng/µL) e água ultra-pura q.s.p. 10 ul.

O programa de sequenciamento apresentou um passo inicial de 4 min, a 95°C, 40 ciclos de 94°C por 1 min, 60°C por 1 min, 72°C por 1,5 min e extensão final por 10 min a 72°C.

Em seguida procedeu-se a lavagem da reação de PCR: acrescentou-se 80 ul de isopropanol (75%), agitou-se em vortex, incubou-se em temperatura ambiente por 15 s, centrifugou-se por 45 min, a 20°C, 4000 rpm, descartou-se o sobrenadante e, colocando-se em papel toalha, deixou-se secar por alguns minutos. Acrescentou-se, após secagem, 150ul de etanol 70%, centrifugou-se por 5 min, a 20°C, a 4000 rpm, descartou-se sobrenadante e centrifugou-se a 500 rpm, com a tampa aberta para remoção do excesso de álcool. Deixou-se secar em fluxo laminar por 30 min.

Adicionou-se 10 ul de formamida, deixou-se desnaturar a 95°C por 5 min e manteve-se em gelo até a inserção da placa no sequenciador (ABI3730 – Applied Biosystems).

2.6 PCR quantitativa absoluta em tempo real

O método de PCR em tempo real foi realizado utilizando o marcador SyBr Green Master mix® (Applied Biosystems), sendo a reação conduzida em um aparelho termociclador para PCR em tempo real (Applied Biosystems – Modelo Real time - 7500).

A otimização dos ensaios para *A. hydrophila* consistiu das seguintes etapas:

- 1) Verificação do ensaio: teste de um controle positivo (*A. hydrophila* ATCC 7966) e um negativo (água) com os “primers” a 1000nM;
- 2) Titulação dos “primers”: com a quantidade de DNA do controle positivo constante (52 ng/ μ L), variou-se a concentração dos “primers” a 600, 800 e 1000nM e suas possíveis combinações para os “primers” R e F.

Objetivou-se selecionar a concentração de “primers” que gerasse menor Ct, maior ΔR_n e sem dímeros.

- 3) Avaliação da eficiência do ensaio: com as concentrações dos “primers” determinadas, foi feita amplificação de diluição seriada (1:10) do DNA plasmidial de *A. hydrophila* para avaliar a eficiência indicada pela inclinação da curva padrão – slope.

A reação de amplificação consistiu de 1,0 μ L de cada primer (F e R), 10,0 μ L de PCR master mix SyBr Green®, 2,0 μ L de DNA e 6,0 μ L de água DEPC.

Os ciclos da PCR foram constituídos por um passo inicial de 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, seguindo-se 40 ciclos compostos por desnaturação a 95°C por 15 s e anelamento a 60°C por 1 min. Ao final dessa etapa de 40 ciclos, foi realizada a dissociação dos produtos amplificados de DNA, entre a temperatura de 65°C e 95°C, para a avaliação da T_m , e as leituras efetuadas a cada 0,1°C. Todas as amostras foram testadas em triplicata.

2.6.1 Teste de especificidade analítica

Com a finalidade de se comprovar a especificidade dos “primers” desenhados para *A. hydrophila*, foi realizado um novo ensaio, submetendo à reação de qPCR em tempo real, nas mesmas condições descritas no item 2.6, os seguintes isolados:

Aeromonas jandaei, *Aeromonas veronii*, *Enterococcus casseliflavus*, *Lactococcus garviae*, *Lactococcus lactis*, *Pseudomonas nitroreducens*, *Enterobacter ludwigii*, *Pseudomonas fulva*, *Pseudomonas mosselii*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter murlinae*, *Edwardsiella tarda*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter johnsonii*, *A. ursingii*.

2.6.2 Teste de sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica foi determinada após conversão das unidades (ng ou pg de DNA) em quantidade de cópias do gene por μL de reação, segundo a fórmula abaixo:

Determinação do número de cópias:

$$\frac{\text{X g}/\mu\text{L DNA}}{\text{Tamanho do clone em pb} \times 649} \times 6,022 \times 10^{23}$$

Observações:

clone = plasmídeo + inserto

649 g/mol = PM médio de 1 pb DNA

$6,022 \times 10^{23}$ = n° de moléculas em 1 mol (n° de Avogadro)

Tamanho do clone de *A. hydrophila* é de 2580pb.

2.7 ENSAIO DE PATOGENICIDADE

Este teste foi feito com a finalidade de se concluir o Postulado de Koch para as cepas de *A. hydrophila* utilizadas, avaliar a influência da quantidade do gene de adesina presente em cada cepa sobre a capacidade de instalação da doença nos animais em experimento e reduzir o tempo de diagnóstico, eliminando-se a etapa de isolamento bacteriano, partindo-se da extração do DNA total do rim dos animais infectados experimentalmente com *A. hydrophila*.

2.7.1 Desenho experimental

Foram utilizadas 60 tilápias (*Oreochromis niloticus*) de $19,7 \pm 0,5$ g, provenientes de uma piscicultura comercial, localizada na cidade de Porto Ferreira (SP). Foram distribuídos três peixes em cada aquários de 43L, totalizando 20 aquários. Cada aquário foi suplementado com filtro e aeração. A cada dois dias era feita a limpeza dos aquários por sifonagem e a troca de um quarto do volume de água. A temperatura da sala de ensaio foi mantida a 28°C durante os sete dias de aclimação dos peixes e a temperatura da água variou entre 25 e 26°C. Após a infecção dos peixes com *A. hydrophila*, a temperatura na sala de ensaio foi mantida em 28°C durante o dia e 21°C durante a noite, para favorecer o desenvolvimento da doença.

Foi fornecida ração comercial, oferecida duas vezes ao dia, 1% da biomassa.

2.7.2 Infecção experimental por *A. hydrophila*

Os peixes de cada aquário foram infectados com 20 cepas distintas de *A. hydrophila*, nomeadas como 231413, 126FG, A129, ATCC7966, 41FG, 117FG, 120FG, 125FG, A122, A111, A135, A120, A128, 35142A, A125, A133, 1SIL, 128FG, A130, 127FG, na concentração determinada pela CL_{50} .

As cepas pertencem ao acervo bacteriano do Lapoa (Caunesp/Unesp Jaboticabal) e Lenaq (APTA/Votuporanga), e foram previamente identificadas como *A. hydrophila* por PCR e sequenciamento do gene 16S rRNA.

Para o preparo do desafio, cada uma das cepas foi cultivada em meio TSB, centrifugada a 7000xg por 30 min; o pellet foi ressuspensão em solução salina 0,85% para lavagem, centrifugado novamente a 7000 xg por 30 min. Em seguida, foi ajustada a concentração final para $1,5 \times 10^7$ UFC/mL de salina.

Uma dose de 100 µL da solução bacteriana foi injetada intraperitonealmente por peixe, após anestesia com óleo de cravo (1mL/L de água) e a mortalidade foi acompanhada diariamente durante uma semana.

Peixes com sinais clínicos e moribundos eram eutanaziados através de choque térmico para coleta de 10 mg do rim e plaqueamento do mesmo em TSA

para reisolamento da bactéria. O mesmo foi feito para os peixes que permaneceram vivos ao final de sete dias.

2.7.3 Extração de DNA tecidual e cepas reisoladas

O DNA foi extraído direto do tecido renal das tilápias em experimentação, utilizando o kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Crawley, West Sussex, UK), e seguindo as instruções do fabricante.

A integridade do DNA foi verificada em gel de agarose 0,8% e a quantificação foi feita por fluorimetria pelo Qubit 2.0.

As cepas reisoladas tiveram seu DNA genômico extraído de acordo com o descrito no item 2.2.

A reação para amplificação do gene e o programa no termociclador em tempo real foram os mesmos descritos no item 2.6, com modificação na concentração do DNA tecidual inicial, que foi de 3 ng/ μ L; já para o DNA dos isolados bacterianos foi de 1 ng/ μ L.

3. Resultados e discussão

Após otimização, a PCR convencional foi bem-sucedida, apresentando banda única na altura de 200pb (Figura 1) e possibilitando a clonagem do gene em questão (Figura 2).

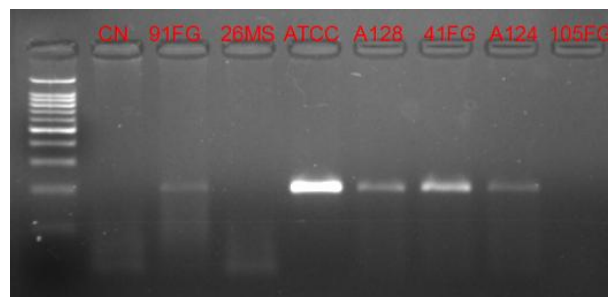


Figura 1. Gel de agarose 3%, corado com brometo de etídeo, evidenciando a amplificação de *A. hydrophila*. CN: controle negativo (água DEPC), 91FG: *Edwardsiella tarda*, 26MS: *Enterococcus sulfureus*, ATCC, A128, 41FG: *Aeromonas hydrophila*, A124: *Aeromonas jandaei*, 105FG: *Streptococcus agalactiae*.

Após eluição da banda no gel de agarose low melting e concentração em speed-vac (Eppendorf®) por 15 min a 45°C, a concentração de DNA lida em NanoDrop® foi de 21,1 ng/ul para a cepa ATCC 7966

A metodologia de clonagem foi eficiente, obtendo-se placa com grande quantidade de colônias.



Figura 2. Colônias formadas de acordo com a seleção positiva pJET1.1/blunt (Fermentas®) vetor de clonagem que contém um gene da enzima de restrição letal que é interrompido por uma ligação de inserção de DNA no sítio de clonagem, como resultado apenas as células bacterianas com plasmídeos sobrevivem.

A metodologia de extração plasmidial também foi eficiente. A Figura 3 revela o perfil plasmidial extraído.

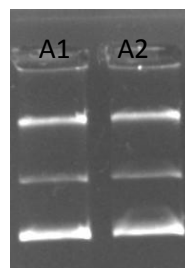


Figura 3. Padrão de restrição de plasmídeos de *E. coli* após eletroforese em gel de agarose 0,8%, 70V, 90 min. A1, A2: clones da cepa ATCC 7966 de *A. hydrophila*.

DNA plasmidial de *A. hydrophila* foi preparado em diluições seriadas de 1:10 (10 ng a 100 fg), amplificado por PCR tempo real utilizando SyBr Green I para construção da curva-padrão.

Para otimização da reação de amplificação, foi realizado teste de titulação dos “primers”, e a concentração que apresentou menor Ct e maior ΔRn foi 1000/1000 nM. Esta concentração foi selecionada, apesar de uma pequena formação de dímeros no NTC, como evidenciado na Figura 4.

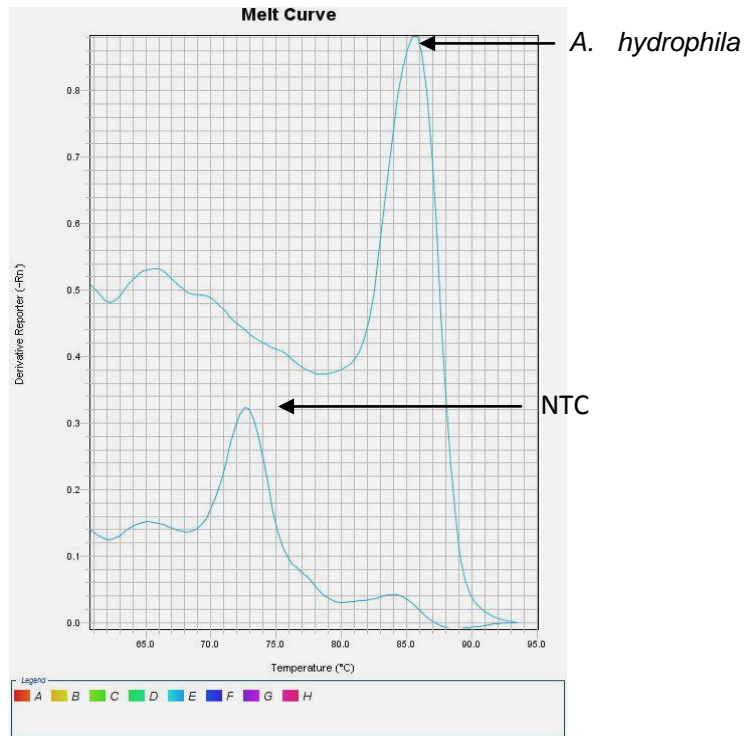


Figura 4. Gráfico da curva de dissociação evidenciando a temperatura de melting da cepa de *A. hydrophila* controle e a formação de dímero do controle negativo (NTC).

Como o intercalante utilizado é SyBr Green, e ele não é gene-específico, qualquer mínima contaminação presente na água ou, mesmo o fato da presença de dímeros, gera fluorescência que pode ser mal interpretada como amplificação (BUSTIN et al., 2009). Nota-se que a temperatura de melting da amostra positiva é de 86°C, diferente do controle negativo que é de 72°C, reforçando a possibilidade de diferenciação de ambos.

O teste da eficiência da curva foi realizado diluindo-se serialmente (1:10) o DNA plasmidial de *A. hydrophila*, a partir de 10 ng até 100 fg. Como resultado obtivemos o valor de slope: -3,507; R^2 : 0,999; Eficiência: 92,824% (Figura 5). Como o primeiro ponto apresentou um Ct muito precoce, com valor de 4,5, foi eliminado da curva e a curva de amplificação é mostrada na Figura 6.

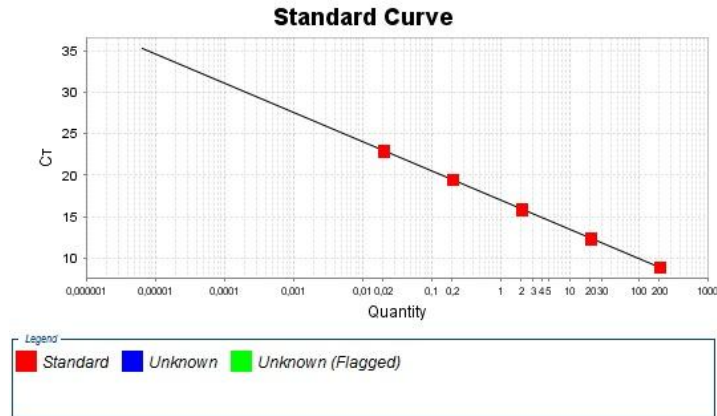


Figura 5. Curva-padrão obtida na qPCR por diluição seriada de DNA plasmidial de *A. hydrophila*.

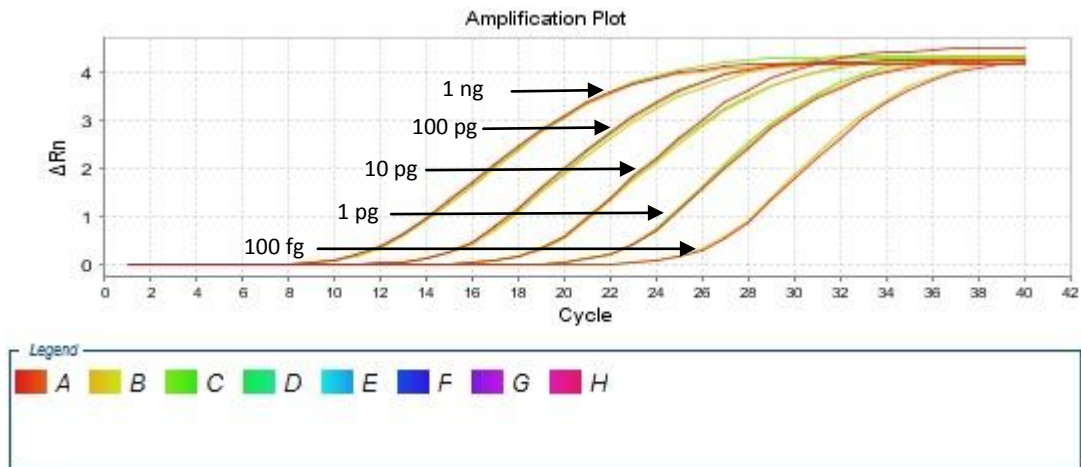


Figura 6. Um exemplo dos resultados da qPCR em tempo real evidenciando a relação entre quantidade de DNA e threshold cycle (Ct). Neste exemplo, DNA plasmidial de *A. hydrophila* foi diluído seriamente de 1 ng a 100 fg amplificado com SyBr Green master mix.

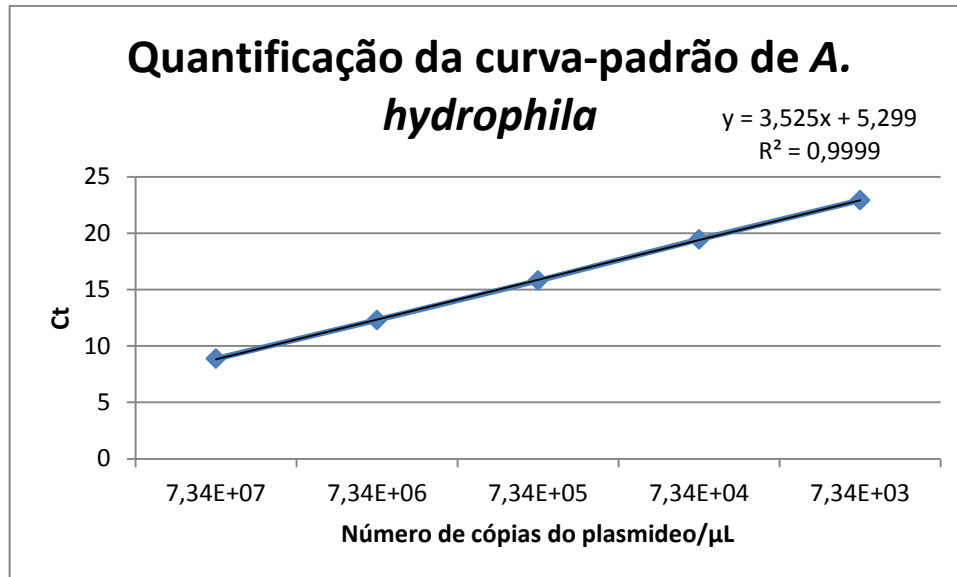


Figura 7. Curva-padrão obtida na qPCR por diluição seriada de DNA plasmídico de *A. hydrophila* evidenciando a relação do número de cópias do gene *ah1* e threshold cycle (Ct). Neste exemplo, DNA plasmídico de *A. hydrophila* foi diluído serialmente de 1 ng a 100 fg amplificado com SyBr Green master mix.

Em relação aos isolados de *A. hydrophila*, a concentração de DNA genômico utilizada nos ensaios, após otimização, foi de 1ng/ μ L ou na ordem de 10^6 UFC/mL. Os resultados da quantificação, Ct e temperatura de melting estão explícitos na Tabela 3.

Tabela 3. Quantificação do gene para adesina da curva-padrão e de DNA amplificado de 33 isolados de *A. hydrophila* deste trabalho.

Amostra	Quantificação (pg) e desvio-padrão	Ct médio e desvio-padrão	Tm ($^{\circ}$ C)
A2	204 \pm 0,00	8,88 \pm 0,03	86,0
A3	20,4 \pm 0,00	12,30 \pm 0,05	86,0
A4	2,04 \pm 0,00	15,81 \pm 0,05	86,18
A5	0,204 \pm 0,00	19,45 \pm 0,01	86,18
A6	0,0204 \pm 0,00	22,93 \pm 0,09	86,18
125FG	2,37 \pm 0,29	15,67 \pm 0,18	86,92
120FG	2,96 \pm 0,24	15,32 \pm 0,13	86,0
117FG	2,96 \pm 0,2	15,32 \pm 0,10	86,0
A111	4,49 \pm 0,04	14,68 \pm 0,01	86,92
A122	0,19 \pm 0,02	19,54 \pm 0,12	86,92
A125	4,35 \pm 0,16	14,73 \pm 0,06	87,28
A135	3,51 \pm 0,30	15,06 \pm 0,13	86,37

ATCC 7966	1,74 ± 0,17	16,14 ± 0,14	86,55
201406B	2,14 ± 0,03	17,07 ± 0,02	86,71
35142A	1,96 ± 0,08	17,20 ± 0,06	87,25
37142A	2,35 ± 0,17	16,93 ± 0,11	87,43
37142B	2,62 ± 0,18	16,76 ± 0,11	87,07
42141D	0,62 ± 0,03	18,95 ± 0,08	86,71
49143A	2,28 ± 0,05	16,97 ± 0,03	87,07
127FG	<0,0002	31,33 ± 0,20	86,55
126FG	<0,0002	29,74 ± 0,22	86,55
128FG	<0,0002	32,92 ± 1,14	86,73
41FG	<0,0002	31,41 ± 0,14	86,18
A114	<0,0002	30,47 ± 0,09	85,82
A120	<0,0002	29,86 ± 0,45	86,73
A128	<0,0002	33,28 ± 1,25	86,37
A129	<0,0002	29,83 ± 0,05	85,82
A130	<0,0002	33,75 ± 0,74	86,92
A133	<0,0002	29,89 ± 0,19	87,10
1SIL	<0,0002	32,05 ± 0,11	86,52
231413	<0,0002	35,56 ± 0,16	86,16
281442B	<0,0002	31,63 ± 0,27	85,07
42142C	<0,0002	30,72 ± 0,14	86,34
43142C	<0,0002	32,06 ± 0,06	86,89
5SIL	<0,0002	31,40 ± 0,05	85,62
DP09146	<0,0002	31,76 ± 0,08	86,71
DP09148	<0,0002	32,01 ± 0,38	86,16
MI15141G	<0,0002	32,36 ± 0,04	85,07
NTC	0	37,12	64,01

* Threshold cycle (Ct) médio e temperatura de melting (Tm). A2 até A6: pontos da curva-padrão.

Os isolados de *A. hydrophila* analisados apresentam quantidade variável do gene ahal, sendo que 42,4% (n=14) com Ct médio de 17 e temperatura de melting esperada de 86°C (FUKUSHIMA et al, 2003). Já 57,6 % (n=19) apresentaram amplificação tardia, com Ct médio de 31, com concentração inferior a 100 fg, ainda mantendo a Tm média de 86°C, indicativo de ser *A. hydrophila* (Figura 8), porém apresentando a formação de dímeros.

A temperatura de melting é aquela suficiente para separar totalmente as duas fitas do DNA molde. O valor e a duração requeridos dependem do tamanho e algumas vezes da sequência do DNA molde, além do tipo de termociclador e os demais componentes da reação (BUSTIN et al., 2009).

Sequências curtas amplificadas podem transferir formações de primer-dímeros e interferem na formação de produtos específicos devido à competição das

duas reações pelos reagentes e assim pode levar a leitura errada. Por isso, é de boa prática o controle da formação de primer-dímero. E isto pode ser feito pela análise da curva de melting após a PCR. A temperatura é gradualmente aumentada e a fluorescência é medida em função da temperatura. A fluorescência diminui gradualmente com o aumento da temperatura por causa do aumento do gradiente térmico que permite maior rotação do intercalante ligado.

Todavia, quando a temperatura é atingida, a dupla fita é separada totalmente e o intercalante se solta e a fluorescência cai abruptamente. Esta temperatura, referida como T_m , é facilmente determinada como o máximo do primeiro derivado negativo da curva de melting. Como produtos primer-dímero são tipicamente menores que o produto-alvo, eles se dissociam em temperaturas mais baixas e são facilmente reconhecidos na análise da curva de dissociação (KUBISTA et al, 2006).

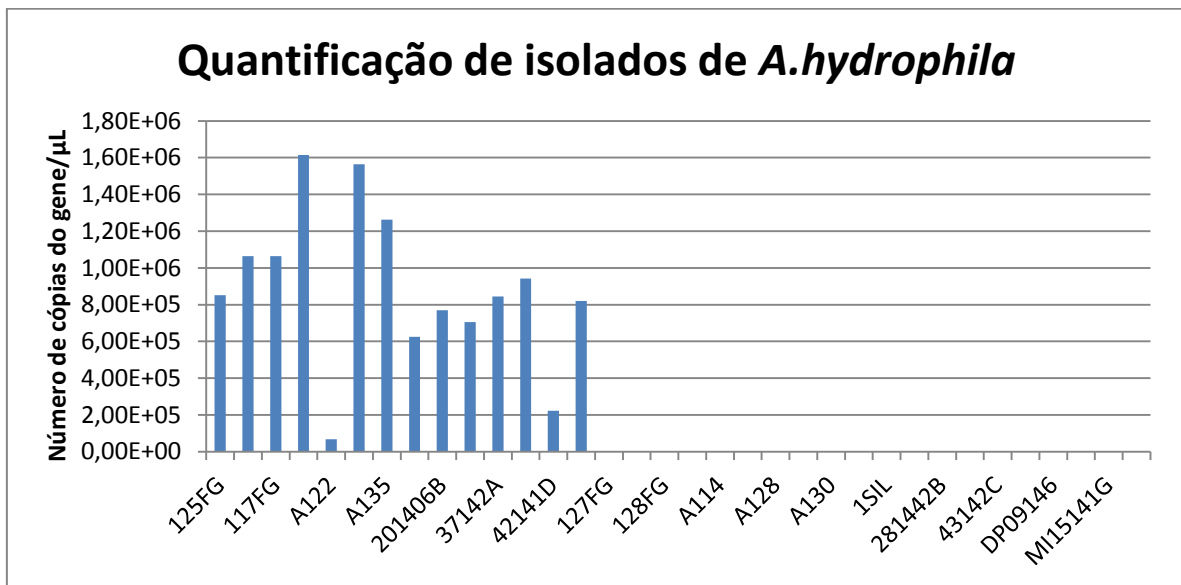


Figura 8. Quantificação dos isolados de *A. hydrophila* segundo número de cópias do gene de adesina por μL .

Já para o teste de especificidade analítica, obtivemos os seguintes resultados, descritos na Tabela 4 e Figura 9, sendo que os dados da curva-padrão foram: slope -3,54, R^2 0,997 e eficiência de 91,622%.

As espécies distintas a *A. hydrophila* apresentaram C_t tardio de 33,45 em média, sendo que o software da qPCR reconhece como não amplificação C_t acima de 35 (que ocorreu para *C. murlinae* e *E. tarda*), também não houve amplificação

detectável para ser quantificada pelo ensaio. Porém o diferencial está na Tm, com valores inferiores a 86°C ou ocorrendo picos múltiplos na curva de dissociação, apresentando duas ou mais Tm (Tabela 4).

Tabela 4. Quantificação do gene para adesina de *A. hydrophila* da curva-padrão e de DNA de isolados de variadas espécies.

Amostra	Espécie	Quantificação (pg)	Ct médio e desvio-padrão	Tm (°C)
A2	<i>A. hydrophila</i>	204	8,59 ± 0,3	85,89
A3	<i>A. hydrophila</i>	20,4	12,04 ± 0,1	86,08
A4	<i>A. hydrophila</i>	2,04	15,18 ± 0,04	86,08
A5	<i>A. hydrophila</i>	0,204	19,06 ± 0,1	86,08
A6	<i>A. hydrophila</i>	0,024	22,79 ± 0,2	86,26
23FG	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	0	34,93 ± 1,70	80/64
84FG	<i>Acinetobacter ursingii</i>	0	34,99 ± 1,50	73
90FG	<i>Aeromonas jandaei</i>	0	32,91 ± 0,51	72/86/76
A124	<i>Aeromonas jandaei</i>	0	30,49 ± 1,02	86/72
A109	<i>Aeromonas veronii</i>	0	31,82 ± 0,40	86/66
A106	<i>Citrobacter freundii</i>	0	34 ± 1,20	73
48MS	<i>Citrobacter murlinae</i>	0	35 ± 1,74	72
18FG	<i>Edwardsiella tarda</i>	0	35,51 ± 1,35	73
A9	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	0	34,52 ± 1,97	86/66
491FG	<i>Lactococcus garviae</i>	0	33,17 ± 0,38	73
S11	<i>Lactococcus garviae</i>	0	33,90 ± 0,62	73/86
A71	<i>Lactococcus garviae</i>	0	34,29 ± 2,15	73
A74	<i>Lactococcus garviae</i>	0	34,72 ± 1,46	73
S17	<i>Lactococcus lactis</i>	0	33,63 ± 0,92	66/73/75
A75	<i>Pseudomonas fulva</i>	0	32,93 ± 0,77	73
A66	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	0	34,64 ± 0,49	73
22FG	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0	34,74 ± 1,22	72
105FG	<i>Streptococcus agalactiae</i>	0	30,89 ± 0,30	72/86
81FG	<i>Streptococcus iniae</i>	0	28,60 ± 0,16	86/72
NTC	água	0	34,8	77,25

Threshold cycle (Ct) médio e temperatura de melting (Tm). A2 até A6: pontos da curva-padrão.

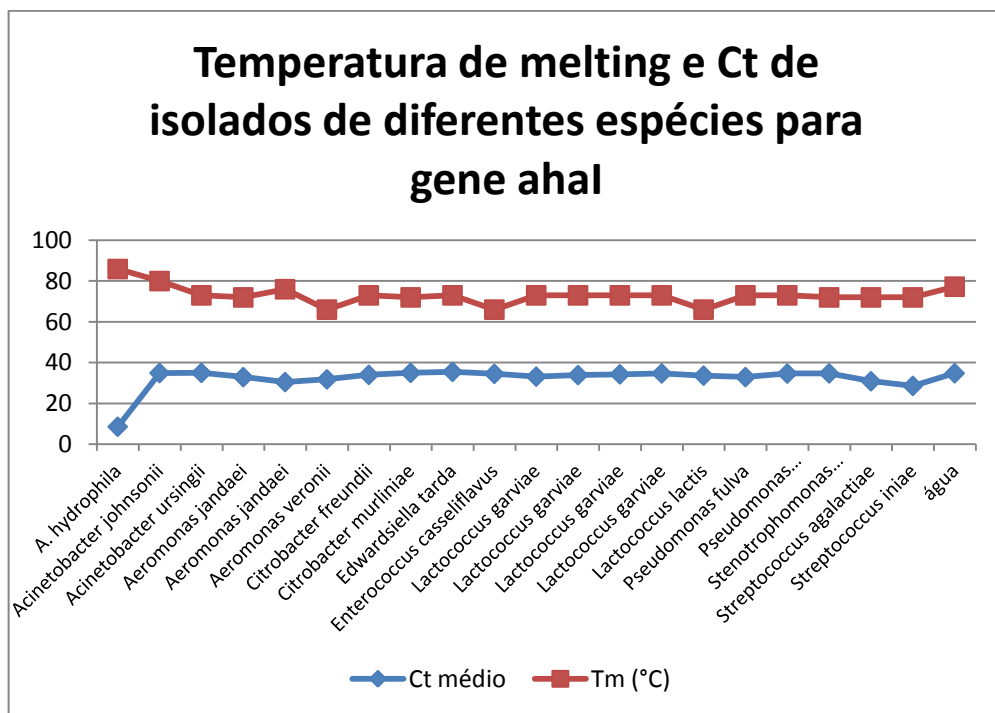
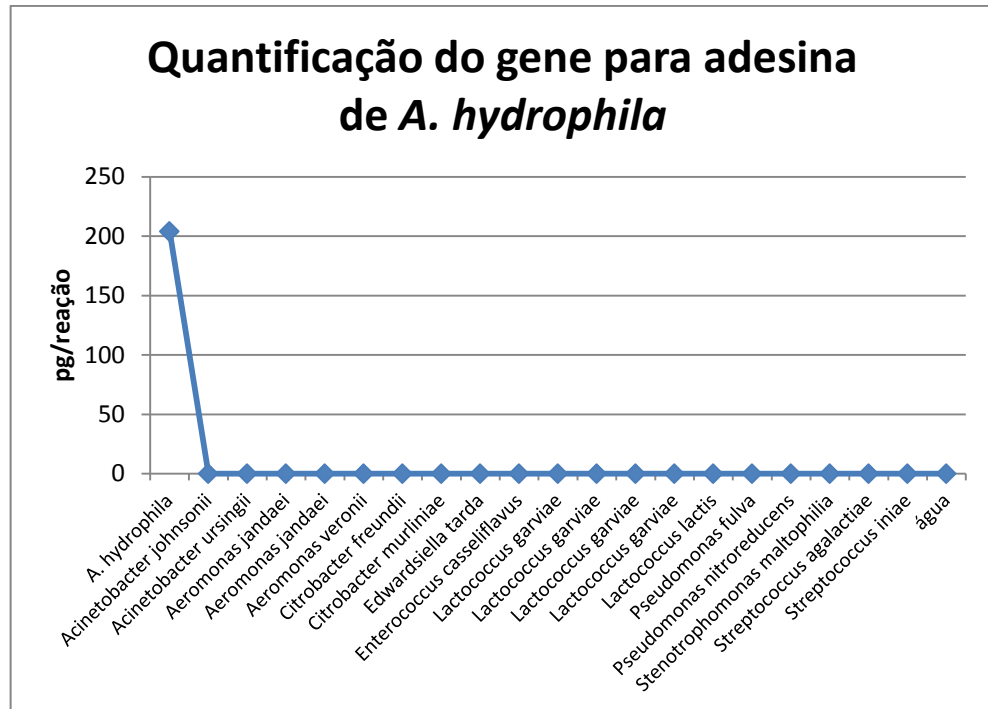


Figura 9. Teste de especificidade analítica do primer aha I de *A. hydrophila* em relação a outras espécies de bactérias patogênicas a peixes.

A sensibilidade analítica da curva-padrão para o par de “primers” selecionado pode ser visualizada em gel de agarose (Figura 10). A2 corresponde a 2 ng de DNA plasmidial, que foi diluído em série, 1:10. O limiar de detecção, visível em gel, foi de

20fg a partir de DNA de isolados (6 ordens de magnitude). Concentrações abaixo do limiar só podem ser detectadas na qPCR, observando a temperatura de melting (Figura 9).

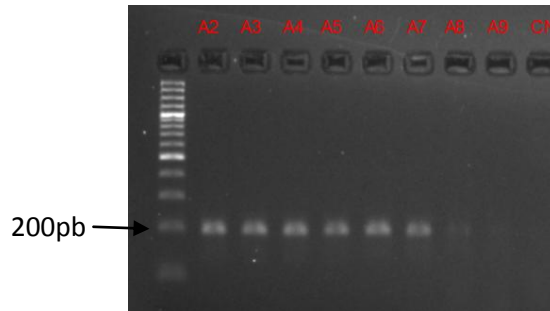


Figura 10. Gel de agarose 3%, corado com brometo de etídio. A2 a A9: DNA plasmidial de *A. hydrophila* da curva-padrão, diluição 1:10, a partir de 2 ng. CN: controle negativo (água DEPC).

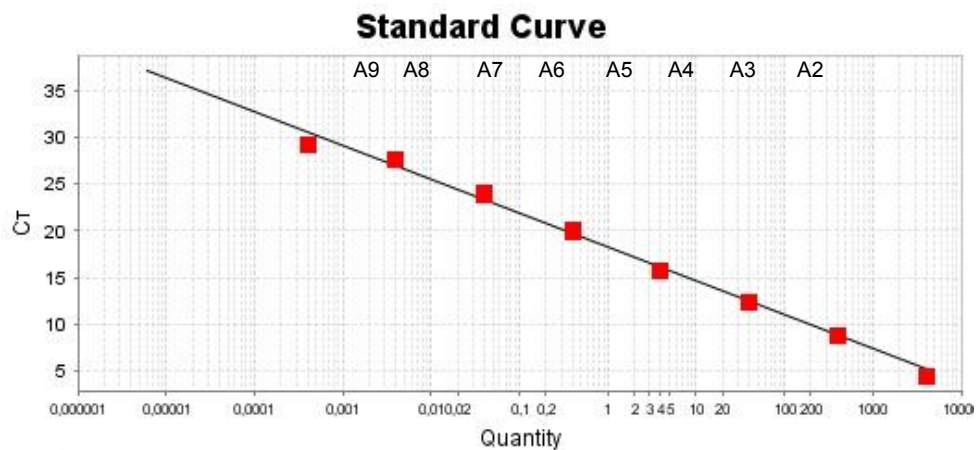


Figura 11. Resultado da PCR quantitativa em tempo real para sensibilidade analítica de *A. hydrophila*, ensaio feito em triplicata, quantificados em pg por μL de reação. Ct corresponde ao número de ciclos da reação para amplificar o DNA.

O pré-requisito para se compreender os mecanismos de patogenicidade de um microrganismo é a identificação de todos seus genes de virulência (STRAUSS; FALKOW, 1997). Existem várias metodologias para se detectar genes de virulência, tais como subtração genômica, marcação de transposon e expressão *in vivo* (ZHANG et al, 2000).

Para avaliar os níveis de virulência apresentados pelo teste de qPCR em tempo real para as cepas de *A. hydrophila*, foi realizado o teste de patogenicidade *in vivo*.

Após 48 h de infecção experimental com as 20 cepas descritas no item 2.7.2, os peixes apresentaram sinais clínicos, tais como corrosão de nadadeiras, pontos avermelhados e escurecimento da pele, após necropsia, verificou-se também rim hemorrágico (Figura 12).



Figura 12. Tilapia com sinais clínicos de bacteriose 48 horas após infecção experimental com cepa 125FG de *A. hydrophila*. Sinais clínicos externos (A) e internos (B).

O reisolamento da bactéria em TSA só foi possível em cinco das 20 cepas avaliadas: A130, 125FG, 126FG, 128FG e 41FG, sendo que somente a 125FG havia mostrado ser virulenta com base na amplificação do gene de adesina (Figura 13). Vários fatores devem ser considerados, tais como o status imunológico dos peixes, valor da concentração do inóculo inicial mais baixo que a CL_{50} das demais cepas e a existência de outros fatores de virulência que são tão ou mais eficazes para a instalação da infecção, mesmo com a ausência ou quantidade muito reduzida do gene de adesina.

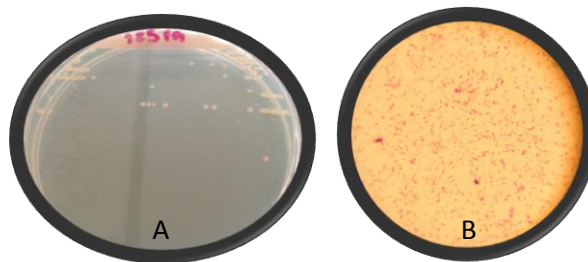


Figura 13. Reisolamento da cepa 125FG após infecção experimental. Placa de TSA contendo as colônias de *A. hydrophila* (A) e bastonetes gram-negativos após teste de Gram (B), aumento de 1000X.

No gel de agarose, a intensidade das bandas foi bem fraca (Figura 14), o que pode ser explicado pela quantidade baixa do gene amplificado, detectado pela qPCR em tempo real (Tabela 5).

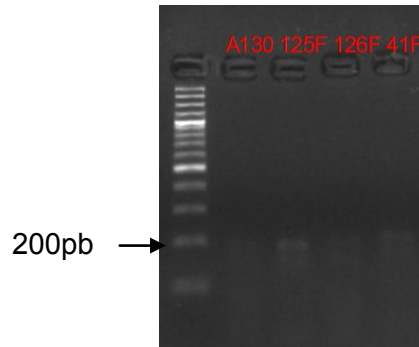


Figura 14. Gel de agarose 3%, corado com brometo de etideo, com as cepas reisoladas de *A. hydrophila* após infecção experimental com 10^7 UFC/mL em tilápia.

Tabela 5. Quantificação do gene ahal para adesina amplificado das cepas reisoladas de *A. hydrophila*.

Amostra	Quantidade (pg)	Média Ct	Tm (°C)
128FG	0,0013	28,62±0,10	85,47
125FG	0,0002	32,14±0,49	85,67
126FG	0,0002	32,34±0,25	85,12
41FG	0,0002	32,39±0,50	84,93
A130	0,0002	32,68±0,20	85,67

O fato de não ter havido crescimento bacteriano após infecção experimental foi confirmado após extração do DNA total do tecido renal dos peixes e qPCR em tempo real. Nota-se na Tabela 6 os baixos valores da concentração do gene amplificado, cuja presença só pode ser notada por meio da técnica molecular e não da microbiologia clássica (Figuras 13 e 14).

Os dados apresentados na Tabela 6, Figura 15 e 16 comprovam a eficácia da técnica de qPCR em tempo real a partir de DNA total extraído de rim de tilápias experimentalmente infectadas. Com esta metodologia, é possível a eliminação da etapa de isolamento e multiplicação da bactéria e, desse modo, o diagnóstico pode ser conclusivo em até quatro horas (1,5 h para extração de DNA e 2,5 h para PCR em tempo real), redução significativa de tempo em relação a PCR convencional, que seria de quatro dias. Além de redução de custos da análise por amostra, pois na PCR convencional aliada ao sequenciamento, o preço é de R\$ 50,21 excluindo-se

gastos com equipamentos e mão-de-obra, e na qPCR em tempo real direto de tecido é de R\$ 25,95.

Tabela 6. Quantificação do gene *ahal* para adesina amplificado do DNA extraído diretamente do rim de tilápias infectadas experimentalmente com cepas de *A. hydrophila*.

Amostra	Quantidade (pg)	Média Ct	Tm (°C)
117FG	0,0002	32,33±0,35	85,12
125FG	0,0003	32,14±0,49	84,75
126FG	0,0002	32,69±0,14	85,48
127FG	0,0002	32,84±0,18	85,12
128FG	0,0003	32,13±0,25	86,21
1SIL	0,0001	33,26±0,07	85,48
231413	0,0003	31,91±0,05	85,48
35142A	0,0002	32,82±0,07	85,48
41FG	0,0002	32,24±0,21	85,30
A111	0,0002	32,39±0,14	85,67
A120	0,0002	32,56±0,28	85,48
A122	0,0001	33,47±0,07	85,85
A128	0,0002	32,19±0,19	86,21
A129	0,0001	33,62±0,12	85,67
A130	0,0003	32,15±0,12	84,93
A133	0,0002	33,26±0,22	85,12
A135	0,0003	32,54±0,27	85,48
ATCC	0,0002	32,93±0,07	85,85
CR	0,0001	33,64±0,42	72,86

CR (controle rim) corresponde ao DNA extraído do rim de tilápia sadia.

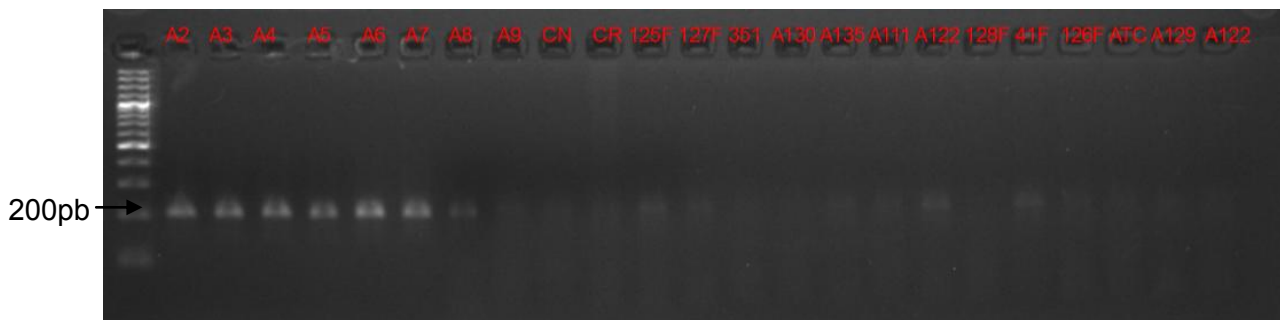


Figura 15. Gel de agarose 3%, corado com brometo de etideo, exibindo baixa amplificação do gene para adesina a partir de DNA total de rim de tilápia infectada com $1,5 \cdot 10^6$ UFC de *A. hydrophila*. A2 a A9: pontos da curva-padrão com DNA plasmidial; CN: controle negativo (água); CR: controle negativo (DNA do rim de tilápia sadia); 125FG a A122: cepas de *A. hydrophila* que foram inoculadas nos peixes em experimento.

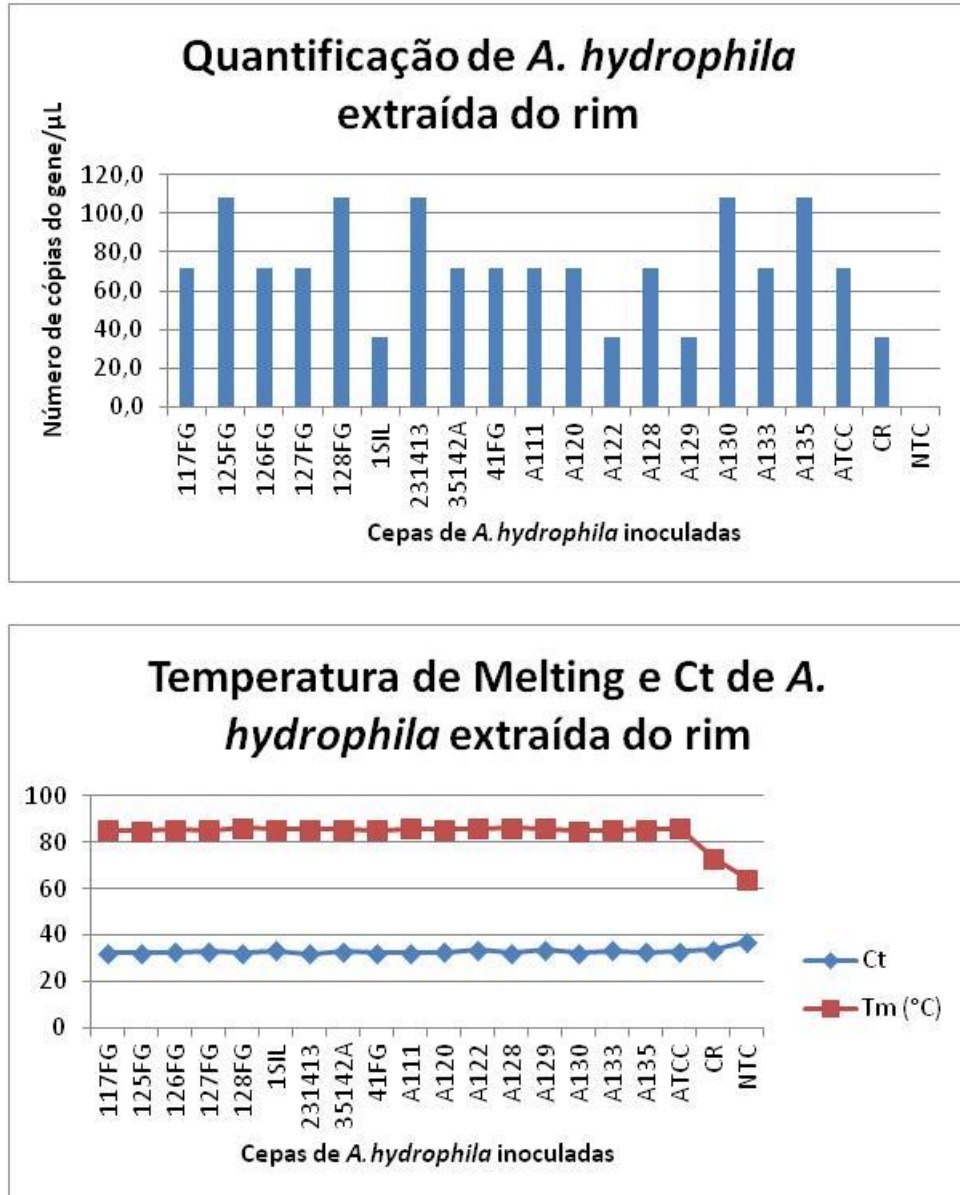


Figura 16. Quantificação do gene para adesina amplificado do DNA bacteriano extraído diretamente do rim de tilápias infectadas experimentalmente com cepas de *A. hydrophila*. CR (controle rim) corresponde ao DNA extraído do rim de tilápia sadia, NTC (água).

4. Conclusões

A técnica de qPCR foi validada para identificação e quantificação de *A. hydrophila*. Nos isolados com quantidade reduzida do gene ahal pode haver dúvidas na identidade da espécie pela presença de dímeros e picos múltiplos na curva de dissociação, comuns em ensaios de SyBr Green I. Estes problemas podem ser

resolvidos com a mudança de intercalantes inespecíficos para aqueles que utilizam sondas, tais como TaqMan.

Além disso, futuros estudos podem explorar outros genes de virulência, e sua expressão, inclusive para justificar os resultados deste trabalho, em que cepas, que apesar das baixas quantidades do gene de adesina, foram capazes de causar infecções nos peixes, os quais apresentaram sinais clínicos típicos da bacteriose.

Este trabalho constitui uma ferramenta valiosa para detecção de *A. hydrophila* a partir de peixes de criação intensiva, com redução de tempo e custo em relação às metodologias tradicionais (microbiologia clássica e PCR convencional) e, a habilidade de quantificação da bactéria no hospedeiro, representa uma forma de medida da eficácia de vacinas e terapias com antibióticos, além de auxiliar estudos epidemiológicos a identificar fatores que predisõem populações a surtos de doenças, desse modo, com monitoramento da presença de patógenos, esta técnica contribuirá para redução das perdas em piscicultura.

5. Referências

- ABDEL-TAWWAB, M., ABDEL-RAHMAN, A.M., ISMAEL, N.E.M. Evaluation of commercial live bakers' yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a growth and immunity promoter for Fry Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) challenged in situ with *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture**, v.280, p.185-189, 2008.
- BUSTIN, S.A., BENES, V., GARSON, J.A., HELLEMANS, J., HUGGETT, J., KUBISTA, M., MUELLER, R., NOLAN, T., PLAFFL, M.W., SHIPLEY, G.L., VANDESOMPELE, J., WITWER, C.T.. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v.55, n. 4, p. 611–622, 2009.
- COSTA, A.B. **Caracterização de bactérias do complexo *Aeromonas* isoladas de peixes de água doce e sua atividade patogênica**. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.
- FANG, H. M., GE, R., SIN, Y.M. Cloning, characterization and expression of *Aeromonas hydrophila* major adhesion. **Fish & Shellfish Immunology**, v.16, p. 645–658, 2004.
- FUKUSHIMA, H., TSUNOMORI, Y.; SEKI, R. Duplex Real-Time SYBR Green PCR Assays for Detection of 17 Species of Food- or Waterborne Pathogens in Stools. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n. 11, p. 5134–5146, 2003.
- GALINDO, C. L., SHA, J., FADL, A. A. PILLAI, L. L., CHOPRA, A. K.. Host immune responses to *Aeromonas* virulence factors. **Current Immunology Reviews**, v. 2, p.13-26, 2006.

- HUYS, G., KAÏMPFER, M.J., ALBERT, I., KUHN, R., DENYS, J. Swings. *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* subsp. nov., isolated from children with diarrhoea in Bangladesh, and extended description of *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila* (Chester 1901) Stainer 1943 (approved lists 1980). **International**, v.52, p. 705-712, 2002.
- KUBISTA, M., ANDRADE, J.M., BENGTSSON, M., FOROOTAN, A., JONA'K, J., LIND, K., SINDELKA, R., SJO'BACK, R., SJO'GREEN, B., STRO'MBOM, L., STAHLBERG, A., ZORIC, N. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, v.27, p. 95–125, 2006.
- MERINO, S., RUBIRESA, X., KNØCHELB, S., TOMÁS, J. M. Emerging pathogens: *Aeromonas* spp. **International Journal of Food Microbiology**, v. 28, p.157-168, 1995.
- SAMBROOK, J. RUSSEL, D. W.. **Molecular Cloning**. 3rd edition. 3 vol. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.
- SHANNON, K.E., LEE, D.-Y., TREVORS, J.T., BEAUDETTE, L.A. Application of real-time quantitative PCR for the detection of selected bacterial pathogens during municipal wastewater treatment. **Science of the Total Environment**, v.382, p.121–129, 2007.
- STRAUSS, E. J., FALKOW, S. Microbial pathogenesis: genomic and beyond. **Science**, v.276, p.707-712, 1997.
- VIZZOTTO, B.S. **Caracterização fenotípica e molecular de estirpes de *Aeromonas* isoladas no paraná no período de 1999-2009**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.
- VON GRAEVENITZ, A. The role of *Aeromonas* in diarrhea: a review. **Infection**, v.35, n.2, p.59-64, 2007.
- WILSON, T.; CARSON, J. Development of sensitive, high-throughput one-tube RT-PCR-enzyme hybridisation assay to detect selected bacterial fish pathogens. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 54, p. 127-134, 2003.
- ZHANG, Y.L., ONG, C.T., LEUNG, K.Y. Molecular analysis of genetic differences between virulent and avirulent strains of *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased fish. **Microbiology**, v. 146, p. 999–1009, 2000.
- Austin, B.; Austin, D.A. Bacterial fish pathogens: disease in farmed and wild fish. **Ellis Horwood Limited**, pp. 171–173, 1987.
- GRIFFIN, M.J.; GOODWIN, A.E.; MERRY, G.E.; LILES, M.R.; WILLIAMS, M.A.; WARE, C.; WALDBIESER, G.C. Rapid quantitative detection of *Aeromonas hydrophila* strains associated with disease outbreaks in catfish aquaculture. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 25, p. 473-481, 2013.

CAPÍTULO 4. Validação da técnica de PCR quantitativo absoluto em tempo real (qaPCR) para o diagnóstico de infecção por *Streptococcus agalactiae* em peixes no Brasil

RESUMO – *Streptococcus agalactiae* ou GBS são cocos gram-positivos, responsáveis por perdas substanciais na tilapicultura no Brasil e no mundo. Causam septicemia e meningoencefalite nos peixes e a mortalidade de cardumes inteiros pode ocorrer em até 72 h. Destaca-se a importância do desenvolvimento de metodologias de diagnóstico cada vez mais rápidas, específicas e sensíveis. Neste estudo, um par de “primers” específicos para GBS foi desenhado a partir do gene *cfb* e inicialmente avaliado por PCR convencional e eletroforese em gel de agarose. Em seguida, os protocolos foram adaptados para PCR quantitativa (qaPCR) em tempo real com o objetivo de validar a técnica para identificação e quantificação dos isolados de GBS por meio da detecção em tempo real dos amplicons por medidas de fluorescência. E finalmente, foi realizado ensaio de patogenicidade em tilápia com as cepas de GBS deste trabalho, o DNA total do encéfalo dos hospedeiros foi submetido a mesma técnica e as cepas foram reisoladas, fechando o postulado de Koch. O ensaio apresentou 100% de especificidade em relação as outras espécies bacterianas avaliadas e sensibilidade de detecção de 4,7 colônias por 20 mg de encéfalo, tornando este teste uma ferramenta de grande valia para programas de monitoramento sanitário.

Palavras-chave: fator CAMP, PCR quantitativa absoluta em tempo real, *Streptococcus agalactiae*, tilápia.

1. Introdução

Streptococcus agalactiae ou *Streptococci* do Grupo B (GBS) são bactérias oportunistas presentes no meio aquático e responsáveis por septicemia e meningoencefalite em várias espécies de peixes ao redor do mundo (BAYA, et al., 1990; EVANS, et al., 2002; DUREMDEZ, et al., 2004), com maior incidência naqueles cultivados em águas tropicais, como no Brasil. Representa também risco a saúde pública, pois em humanos neonatais podem causar septicemia, pneumonia, meningite, osteomielites e infecções nos tecidos moles (IP, et al., 2006; OLIVARES-FUSTER et al., 2008).

Segundo Figueiredo et al. (2006), nos últimos anos tem-se observado uma elevação da ocorrência de casos clínicos associados a *S. agalactiae* em diferentes

regiões geográficas, o que levou o mesmo a ser considerado um patógeno emergente para peixes de água doce ou marinha (EVANS et al., 2002) e hoje ser a causa de maior perda na tilapicultura mundial.

Não há informação oficial sobre os prejuízos econômicos resultantes de infecção por *S. agalactiae* em pisciculturas no Brasil, porém a partir de dados sobre mortalidade de tilápias em estudo recente realizado por MIAN et al. (2009) pode-se inferir os prejuízos econômicos desta bacteriose no setor aquícola.

Fatores como a alta densidade de estocagem, baixa concentração de oxigênio dissolvido, altas concentrações de amônia e nitrito, pH, alcalinidade, dureza e transparência da água inadequados, além de temperatura acima de 26°C, estão associados aos surtos de GBS (GIORDANO, 2007; MIAN, et al., 2009).

Para o diagnóstico da enfermidade, testes bioquímicos, genotipagem, PCR com “primers” específicos para *S. agalactiae* e PCR associada ao sequenciamento do gene 16S rRNA tem, comprovadamente, cumprido seu papel na identificação do patógeno, porém são dependentes do isolamento e cultivo bacteriano, o que torna o resultado mais demorado (FIGUEIREDO et al., 2006; DUREMDEZ et al., 2004; SUANYUK et al., 2008).

Após instalação da doença, em cerca de 24 horas, dependendo da patogenicidade da cepa, a mortalidade já é iniciada (ABUSELIANA et al., 2011). Por isso, há necessidade de desenvolvimento de métodos de diagnóstico cada vez mais rápidos, específicos e sensíveis a fim de substituir o cultivo bacteriano na detecção do agente patogênico e, assim, iniciar o tratamento mais adequado rapidamente.

Com esta finalidade, a PCR quantitativa absoluta em tempo real (qPCR), representa uma ferramenta molecular que preenche todos os requisitos acima citados, sendo útil não apenas na identificação do patógeno, como também na quantificação do mesmo no tecido do hospedeiro (WILSON, CARSON, 2003).

A maioria das cepas de GBS secreta uma proteína extracelular difusa conhecida como fator CAMP (Christie-Atkins-Munch-Petersen) e codificada pelo gene *cfb*. Presuntivamente, pode-se identificar a espécie pelo teste CAMP, que se baseia no fato da proteína causar a lise das células vermelhas do sangue de carneiro presente no meio de cultura previamente sensibilizado com *Staphylococcus aureus* (WILKINSON, 1977; KE et al., 2000).

Sendo assim, a amplificação do gene *cfb*, contemplando a região do fator CAMP representa uma metodologia óbvia para diagnóstico de GBS, apesar de que classificá-lo como fator de virulência por meio do Postulado de Koch ainda permanece controverso, uma vez que alguns autores não conseguiram demonstrar alteração na patogenicidade de GBS após deleção do gene *cfb* (KE et al., 2000; LANG et al., 2007; CHUZEVILLE et al., 2012).

Assim, os objetivos deste estudo foi desenvolver um teste de qPCR em tempo real para detecção de *S. agalactiae* e avaliar sua especificidade e sensibilidade analítica, além de fazer a validação preliminar desse teste a partir da detecção/quantificação de GBS em DNA total extraído diretamente do encéfalo de tilápia, após infecção experimental com as cepas GBS.

2. Material e métodos

2.1 Cultivo bacteriano

As cepas de *S. agalactiae* utilizadas neste trabalho pertencem ao acervo bacteriano do Lapa (Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos - CAUNESP/UNESP Jaboticabal, SP), Lenaq (Laboratório de Enfermidade de Animais Aquáticos – APTA/Votuporanga) e do Laboratório de Microbiologia de Prevet Sanidade Aquícola (Jaboticabal, SP) e foram previamente identificadas por PCR e Sequenciamento do Gene 16S rRNA no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica - CREBIO (FCAV/UNESP Jaboticabal, SP). A lista completa encontra-se na Tabela 1.

TABELA 1. Cepas de *Streptococcus agalactiae* utilizadas para validar a técnica de PCR quantitativa em tempo real.

Isolado <i>S.agalactiae</i>	Referência	Origem/Local
100FG	KJ561056	Tilapia/ Lenaq
102FG	KJ561062	Tilapia/ Lenaq
104FG	KJ561057	Tilapia/ Lenaq
105FG	KJ561059	Tilapia/ Lenaq
106FG	KJ561061	Tilapia/ Lenaq
110FG	KJ561069	Tilapia/ Lenaq
112FG	KJ561072	Tilapia/ Lenaq
18P	KJ561063	Tilapia / Lapa

26P	KJ561065	Tilapia / Lapoa
36P	KJ561067	Tilapia / Lapoa
43P	KJ561068	Tilapia / Lapoa
45P	KJ561066	Tilapia / Lapoa
52P	KJ561078	Tilapia / Lapoa
64P	KJ561071	Tilapia / Lapoa
74P	KJ561064	Tilapia / Lapoa
76FG	KJ561058	Tilapia/ Lenaq
77FG	KJ561060	Tilapia/ Lenaq
78FG	KJ561053	Tilapia/ Lenaq
99FG	KJ561054	Tilapia/ Lenaq
MP	KJ561070	Tilapia / Paraná
ZO9S	KJ561052	Tilapia / Prevet
ZO5P	KJ561051	Tilapia / Prevet
44149B	Acervo Prevet	Tilapia
45141A	Acervo Prevet	Tilapia
45142A	Acervo Prevet	Tilapia
251433A	Acervo Prevet	Tilapia
251432A	Acervo Prevet	Tilapia
40141B	Acervo Prevet	Tilapia
36145B	Acervo Prevet	Tilapia
37141A	Acervo Prevet	Tilapia
37141B	Acervo Prevet	Tilapia
44145A	Acervo Prevet	Tilapia
44145B	Acervo Prevet	Tilapia
1A	Acervo Prevet	Tilapia
1B	Acervo Prevet	Tilapia
33145A	Acervo Prevet	Tilapia

As cepas foram armazenadas em BHI (Brain Heart Infusion, Biolife), 30% glicerol estéril, em freezer -80°C e, para reativação, foram semeadas em Ágar-sangue (TSA com 5% de sangue ovino), incubadas por 48h a 30°C . A verificação da pureza das cepas foi feita por meio de teste de Gram e visualizada ao microscópio, aumento de 1000X.

2.2 Modelo do “p m”

O gene *cfb*, codificador do fator CAMP, foi selecionado como um alvo adequado para identificação de GBS. O organismo modelo foi *S. agalactiae* ILRI112, disponível no GenBank. As sequências encontram-se na Tabela 2, e o tamanho do amplicon esperado é de 154 pb.

TABELA 2. Sequencia dos “primers” usados para amplificação do gene do fator CAMP em *Streptococcus agalactiae*.

Primer	S q u c 5'→3'	Tm (°C)
Forward	AGCTTAGTTATCCCAAATCCCAT	56,1
Reverse	GTGCCAACCTGAGACAGTT	56,2

Após o desenho manual dos “primers”, as sequências foram inseridas no software Primer Express 3.0 para obtenção de possíveis formações de dímeros simples, dímeros compostos, hairpins e temperatura de melting, classificando-os como adequados para utilização na PCR em tempo real.

2.3 Extração de DNA

Cerca de cinco colônias de cada cepa de GBS foram transferidas para um tubo contendo 2 mL de meio BHI e incubadas por 48 h ou até que se atingisse a DO₆₀₀ de 1 a 1,5. Após incubação a 30°C, 1,0 mL da cultura bacteriana foi centrifugada a 12.000 xg por 5 min, o sobrenadante descartado e o pellet congelado a -20°C para posterior extração do DNA. Utilizou-se o kit Axyprep® miniprep para DNA genômico bacteriano, segundo metodologia do fabricante para bactérias gram-positivas (Axygen Biosciences, Union City, CA, USA).

No ensaio final de patogenicidade, o DNA foi extraído direto do tecido (encéfalo) das tilapias em experimentação, utilizando o kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Crawley, West Sussex, UK) seguindo as instruções do fabricante.

Em ambos os casos, a integridade do DNA foi verificada em gel de agarose 0,8% e a quantificação foi feita por fluorimetria pelo Qubit 2.0 (Life Technologies, NY, USA). Foram avaliadas também a relação dos comprimentos de onda A_{260/280} em NanoDrop® (Thermo Fisher Scientific).

Na Figura 1 coloca-se a representação esquemática das três metodologias de PCR desenvolvidas: PCR convencional, num primeiro momento, com objetivo de se testar a funcionalidade dos “primers”; em seguida foi feita a validação do ensaio de PCR quantitativa absoluta (qPCR) em tempo real, otimizando a concentração dos “primers” e ainda utilizando DNA genômico bacteriano isolado e purificado; e finalmente, a última etapa foi a infecção experimental de tilapias com *S. agalactiae*

para extração do DNA diretamente do encéfalo, eliminando a etapa mais longa do processo de diagnóstico, que é o cultivo e isolamento bacteriano.

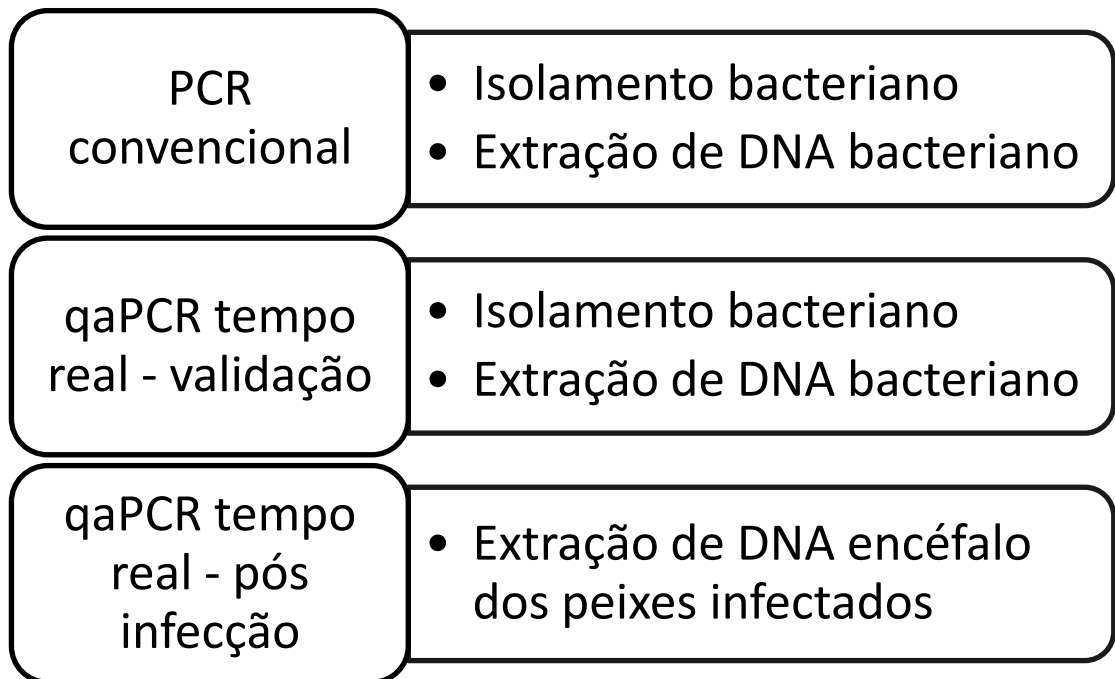


Figura 1. Resumo das etapas iniciais das três metodologias desenvolvidas neste trabalho.

2.4 Detecção do gene de fator CAMP por PCR convencional

Após otimização, com variação nas concentrações de $MgCl_2$, DNA, dntp e temperatura de anelamento, a reação final para amplificação do gene de fator CAMP consistiu de: 0,5 μL de taq DNA-polimerase (Fermentas®); 1,2 μL de $MgCl_2$ (25 mM), 2,5 μL tampão 10X; 0,6 μL dntp (200 μM); 0,5 μL de cada primer (10 pmol); 3,0 μL DNA (6 ng/ μL); 16,2 μL H_2O ultra-pura.

O programa utilizado no termociclador (Applied BioSystems, GeneAmp 9700) foi o seguinte: 94°C por 4 min, 35 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 1 min e 72°C por 1 min, além de uma extensão extra a 72°C por 5 min.

Em seguida, foi realizada eletroforese em gel de agarose 3%, 90 min, 70V, para visualização da banda de DNA.

O produto da PCR foi sequenciado para se confirmar que houve realmente amplificação do gene do fator CAMP.

2.5 Detecção do gene de fator CAMP por PCR quantitativa absoluta em tempo real

A amplificação dos 154 pb do gene codificador do fator CAMP em GBS foi realizada em placas ópticas de 96 poços, vedadas com filme adesivo optico (Applied Biosystems, Life Technologies do Brasil Ltda) em termociclador para PCR em tempo real (Applied Biosystems – Modelo Real time - 7500), cujo marcador utilizado foi SyBr Green I (Applied Biosystems).

A reação consistiu de 1,0 µL de cada primer (F e R a 800 nM), 10,0 µL de SyBr Green PCR Master Mix®, 2,0 µL de DNA e 6,0 µL de água DEPC.

Os ciclos da reação consistiram de um passo inicial de 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, seguindo-se 40 ciclos compostos por desnaturação a 95°C por 15 s e anelamento a 60°C por 1 min. Ao final dessa etapa de 40 ciclos, foi realizada a dissociação dos produtos amplificados de DNA, entre a temperatura de 65°C e 95°C, para a avaliação da T_m, e as leituras efetuadas a cada 0,1°C. Todas as amostras foram testadas em triplicata.

A amplificação das amostras de isolados bacterianos foi a partir de uma concentração inicial de 1,0 x 10⁹ células por mL e seguiu-se bateria de testes com diluições seriadas, 1:10, para se encontrar a melhor concentração de DNA para o ensaio.

Já a amplificação do DNA proveniente de encéfalo dos peixes (coletado de forma asséptica, dentro de fluxo laminar), iniciou-se de uma amostra de 20 mg do tecido contendo 4,0 x 10⁸ células bacterianas por mL, que também foi diluída serialmente no fator 1:10 para se selecionar a melhor concentração para amplificação.

As cepas avaliadas para validação do teste da qPCR foram listadas na Tabela 1.

A curva padrão foi construída a partir de DNA plasmidial sintético de *S. agalactiae* ILRI112, amplicon de 154pb: Gene camp factor, locus SAIL_20450, AGCT TAGTTATCCC AAATCCCATA TCAATATTTG CTTGACTAAC CTTATTTGCT AAATGTTGAG TTGAAAAGT GATTGCTTCA ATCACATCTG TTAAGGCTTC

TACACGACTA CCAATAGAAT TCAAATCATA AACTGTCTCA GGGTTGGCAC
(GeneArt® Gene Synthesis, Life Technologies).

2.5.1 Teste de especificidade analítica

As cepas utilizadas para o teste de especificidade dos “primers” (n=20) estão apresentadas na Tabela 3. São espécies comumente isoladas em peixes com sinais clínicos de bacteriose e são filogeneticamente relacionadas a *S. agalactiae*. Foram isolados em várias pisciculturas das regiões Sudeste e Centro-Oeste do Brasil.

TABELA 3. Isolados bacterianos utilizados no teste de especificidade analítica de *Streptococcus agalactiae* no ensaio de qPCR em tempo real.

Cepa	Referência	Origem/Local
18FG	KJ560940 <i>Edwardsiella tarda</i>	Tilapia/Palmital, SP
48MS	KJ560946 <i>Enterobacter ludwigii</i>	Cachara/Mato Grosso do Sul
A70	KJ560949 <i>Enterobacter ludwigii</i>	Tilapia/Arealva, SP
A9	KJ560953 <i>Enterococcus casseliflavus</i>	Tambaqui/Caunesp, SP
A10	KJ560956 <i>Enterococcus casseliflavus</i>	Tambaqui/Caunesp, SP
A71	KJ560983 <i>Lactococcus garviae</i>	Tilapia/Arealva, SP
A74	KJ560984 <i>Lactococcus garviae</i>	Tilapia/Arealva, SP
491FG	KJ560986 <i>Lactococcus garviae</i>	Tilapia/Palmital, SP
S11	KJ560997 <i>Lactococcus garviae</i>	Tilapia/Arealva, SP
S17	KJ561000 <i>Lactococcus lactis</i>	Tilapia/Caunesp, SP
A135	KJ561025 <i>Aeromonas hydrophila</i>	Carpa/Rio de Janeiro
A124	KJ561033 <i>Aeromonas jandaei</i>	Tilapia/Arealva, SP
A110	KJ561034 <i>Aeromonas punctata</i>	Pintado/Arealva, SP
A109	KJ561046 <i>Aeromonas veronii</i>	Pintado/Arealva, SP
78FG	KJ561053 <i>S. agalactiae</i>	Tilapia/Palmital, SP
45P	KJ561066 <i>S. agalactiae</i>	Tilapia/Paraná
81FG	KJ561076 <i>Streptococcus iniae</i>	Tilapia/Palmital, SP
23FG	KJ561079 <i>Acinetobacter johnsonii</i>	Tilapia/ Palmital, SP

84FG	KJ561082 <i>Acinetobacter ursingii</i>	Tilapia/ Palmital, SP
A75	KJ561097 <i>Pseudomonas fulva</i>	Tilapia/Arealva, SP
A76	KJ561101 <i>Pseudomonas mosselii</i>	Tilapia/Arealva, SP
22FG	KJ561111 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Tilapia/Palmital, SP

2.5.2 Teste de sensibilidade analítica

O teste de sensibilidade foi determinado para DNA dos isolados (Tabela 1) e nas amostras extraídas diretamente de encéfalo dos peixes no ensaio de patogenicidade (item 2.6.2) para verificar o efeito dos inibidores de PCR presentes no tecido encefálico.

Para se determinar a sensibilidade analítica do ensaio para *S. agalactiae*, o DNA foi diluído serialmente, fator 1:10, utilizando água nuclease-free, concentração de 10 ng a 100 fg. A curva de regressão foi construída confrontando-se os valores de log da concentração de DNA e os valores de Ct. Os valores de slope e R² foram calculados com base na regressão linear da curva-padrão construída. O limite de detecção foi determinado como a concentração mais baixa de DNA que produziu sinal de amplificação.

A conversão das unidades (ng ou pg de DNA) em quantidade de cópias do gene por µL de reação foi feita segundo a fórmula a seguir, sabendo-se que o tamanho do clone de *S. agalactiae* é de 2528 pb.

Determinação do número de cópias:

$$\frac{X \text{ g/}\mu\text{L DNA}}{\text{Tamanho do clone em pb} \times 649} \times 6,022 \times 10^{23}$$

Observações:

clone = plasmídeo + inserto

649 g/mol = PM médio de 1 pb DNA

$6,022 \times 10^{23}$ = n° de moléculas em 1 mol (n° de Avogadro)

2.6 Ensaio de patogenicidade

2.6.1 Desenho experimental

Foram utilizadas 60 tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com peso médio de $31 \pm 5,0$ g, provenientes de uma piscicultura comercial localizada na cidade de Porto Ferreira (SP). Os peixes ($n=3$) foram distribuídos em 20 aquários de 43L. Cada aquário foi suplementado com filtro e aeração. A cada três dias foi feita a limpeza dos aquários por sifonagem e a troca de um quarto do volume de água.

A temperatura da sala de ensaio foi mantida a 26°C durante os sete dias de aclimação dos peixes e a temperatura da água variou entre 25 e 26°C . Após a infecção dos peixes com *S. agalactiae*, a temperatura na sala de ensaio foi mantida em 28°C para favorecer o desenvolvimento da doença. As variáveis limnológicas da água se mantiveram dentro do recomendado para o bem-estar dos peixes (AZIM; LITTLE, 2008), com média de temperatura de $29,2^{\circ}\text{C}$, concentração de oxigênio dissolvido de $7,4$ mg/L, e pH $7,6$.

A alimentação foi fornecida diariamente duas vezes ao dia (1% da biomassa) e o alimento fornecido foi ração comercial.

2.6.2 Infecção experimental por *S. agalactiae*

Os peixes de cada aquário foram infectados com cepas distintas de *S. agalactiae*: 26P, 18P, 36P, 112FG, 74FG, 64P, 58P, 77FG, 45P, 102FG, 100FG, 104FG, MP, 99FG, 76FG, 78FG, 106FG, 105FG, 43P, ZO5p, na concentração determinada pela CL_{50} .

Para o preparo das bactérias para infecção experimental, cada uma das cepas foi cultivada em meio BHI, incubada a 30°C por 72 h, e então centrifugada a 7000 xg por 30 min; o pellet foi ressuspenso em solução salina 0,85% para lavagem, centrifugado novamente a 7000 xg por 30 min. Em seguida, foi ajustada a concentração final.

Uma dose de $0,1$ mL da solução bacteriana ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) foi injetada intraperitonealmente em cada peixe, após anestesia com óleo de cravo (1mL/L de água) e a mortalidade foi acompanhada diariamente por uma semana.

Peixes com sinais clínicos e moribundos foram eutanaziados com choque térmico para coleta de 20 mg do encéfalo e plaqueamento do mesmo em Colúmbia agar-sangue (Difco) para reisolamento da bactéria. O mesmo foi feito para os peixes que permaneceram vivos após sete dias de infecção.

3. Resultados e discussão

Um ensaio de PCR convencional foi otimizado para verificar a eficiência do par de “primers” desenhado em amplificar amostra de GBS neste trabalho (Figura 2). Foi selecionada a mix em que não houve amplificação no controle negativo (formação de dímeros) e banda única na altura de 154 pb.

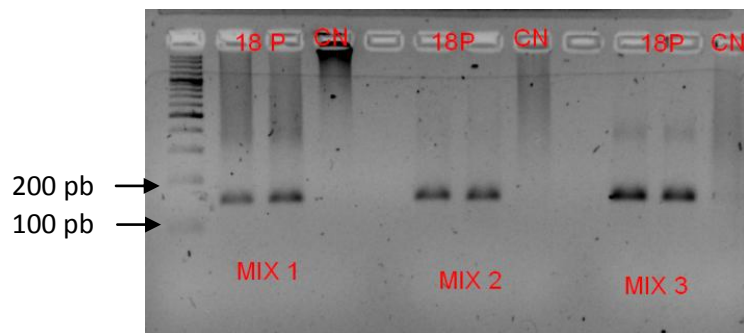


FIGURA 2. Gel de agarose 3%, corado com brometo de etideo, contemplando o processo de otimização de várias reações de PCR com DNA genômico de *S. agalactiae* (18P), amplicon do gene codificador do fator CAMP (154pb).

A reação escolhida foi a representada pela mix 2, Figura 2, e visando a seleção da melhor temperatura de anelamento dos “primers”, realizou-se PCR em termo-gradiente (Tgradiente, Biometra®), variação de 45 a 65°C, como mostrado na Figura 3.

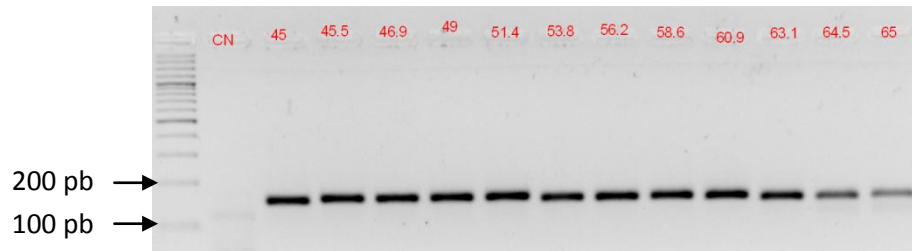


FIGURA 3. Gradiente de temperatura de anelamento dos “primers” para *S. agalactiae* (18P) em gel de agarose 3%, corado com brometo de etídeo.

Como a temperatura de anelamento determinada *in silico* foi de 55°C e o gel confirmou a amplificação, esta temperatura foi selecionada.

A identificação dos agentes patogênicos na piscicultura, como *S. agalactiae*, é fundamental para o bem-estar e gestão de enfermidades em populações de peixes de importância econômica. (KEELING et al., 2012).

Em seguida, um ensaio de qPCR em tempo real foi desenvolvido para facilitar a detecção de GBS em populações de peixes susceptíveis, uma vez que, esta tem se tornado a ferramenta molecular mais utilizada nos últimos anos, por exigir menor intensidade de trabalho, oferecer maior custo-benefício e poder ser facilmente adaptada a processamentos em alta escala, se comparada com outros métodos como cultivo, sorologia e PCR convencional. (JACOBSON;WRIGHT, 2006).

Para otimização da reação de amplificação, foi realizado teste de titulação dos “primers”, e a concentração que apresentou menor Ct e maior ΔR_n foi 800/800 nM. Esta concentração foi selecionada, apesar de uma pequena formação de dímeros no NTC, como evidenciado na Figura 4.

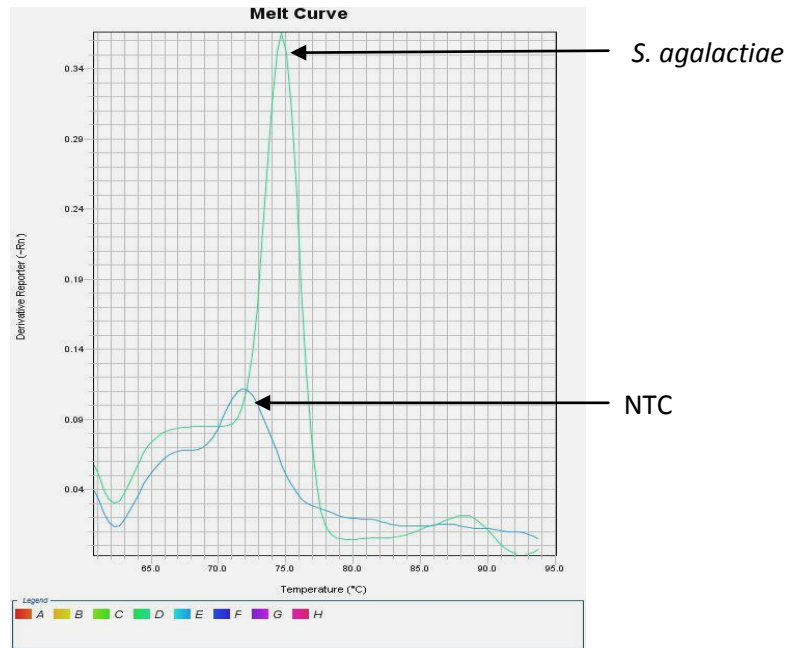


FIGURA 4. Curva de dissociação evidenciando a temperatura de melting de *S. agalactiae* e a formação de dímero no NTC.

A formação de dímeros em ensaios com SyBr Green é muito comum e difícil de ser evitada, uma vez que é um intercalante da fita dupla de DNA, podendo amplificar tanto produtos específicos quanto inespecíficos (SAUKKORIIPI et al, 2002). A diferença pode ser feita pela temperatura de dissociação, que no caso, para *S. agalactiae* é em média 75°C, e no dímero é inferior, cerca de 73°C.

O teste da eficiência da curva foi realizado diluindo-se serialmente (1:10) o DNA plasmidial de *S. agalactiae*, a partir de 12,8 ng até 12,8 fg. Como resultado obtivemos o valor de slope: -3,342; R^2 : 0,992; Eficiência: 99,1% (Figura 5).

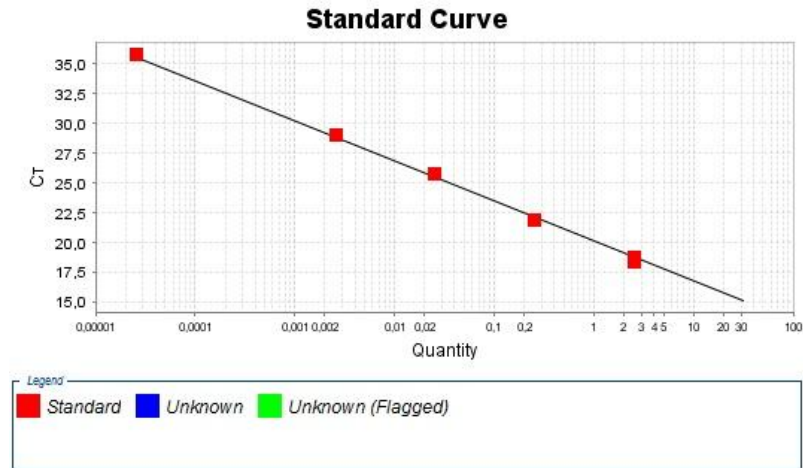


FIGURA 5. Curva-padrão do DNA plasmidial de *S. agalactiae* no ensaio de qPCR em tempo real.

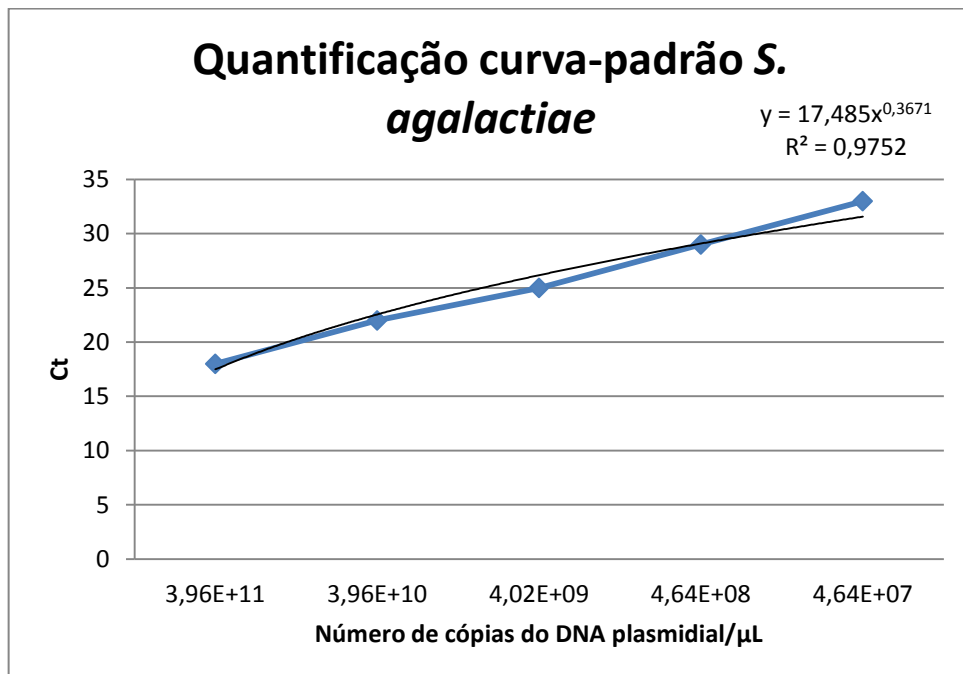


FIGURA 6. Quantificação da curva-padrão do DNA plasmidial de *S. agalactiae* em número de cópias por μ L em relação ao Ct, no ensaio de qPCR em tempo real.

Os resultados da quantificação, Ct e temperatura de melting estão explícitos na Tabela 4 e quantificação do gene fator camp em número de cópias por μ L de cada um dos isolados de *S. agalactiae* está na Figura 7.

Tabela 4. Quantificação da curva-padrão e de DNA amplificado de 37 isolados de *S. agalactiae* deste trabalho.

Amostra	Quantificação (pg)	Ct médio e desvio-padrão	Tm (°C)
S3	2,56	18,51 ± 0,18	75,14
S4	0,256	22,14± 0,38	75,33
S5	0,026	25,65± 0,16	75,33
S6	0,003	29,44 ± 0,52	75,51
S8	0	35,01± 1,03	75,5
100FG	17,13 ± 1,49	16,04 ± 0,12	75
102FG	15,32 ± 0,04	27,88 ± 0,94	75
104FG	20,99 ± 1,10	15,74 ± 0,08	75
105FG	16,46 ± 1,35	16,09 ± 0,12	75
106FG	25,73 ± 3,59	15,45 ± 0,2	75
110FG	27,80± 3,47	15,34 ± 0,18	75
112FG	21,55 ± 2,40	15,70 ± 0,16	75
18P	0,88 ± 0,07	20,34 ± 0,12	75
26P	19,21 ± 3,02	15,87 ± 0,23	75
36P	2,05 ± 0,42	19,13 ± 0,30	75
43P	17,26 ± 1,61	16,03 ± 0,14	75
45P	2,36 ± 0,19	18,91 ± 0,12	75
58P	1,08 ± 0,10	20,05± 0,13	75
64P	15,35 ± 0,80	16,19 ± 0,08	75
74FG	17,11±3,22	16,05 ± 0,27	75
76FG	16,01±0,05	17,33 ± 0,60	75
77FG	14,95±0,97	16,23 ± 0,09	75
78FG	17,10±1,19	16,04± 0,10	75
99FG	19,90±0,32	15,81± 0,02	75
MP	17,80±1,06	15,98 ± 0,09	75
1B	9,14±0,76	15,30 ± 0,13	75
251432A	11,35±1,21	14,97 ± 0,16	75
251433A	10,55±0,74	15,08 ± 0,11	75
33145A	9,73±0,19	15,20 ± 0,03	75
36145B	5,66±0,32	16,03 ± 0,09	75
37141A	11,53±0,50	14,94 ± 0,07	75
37141B	11,31±0,52	14,97± 0,07	75
40141B	10,44±1,14	15,10 ± 0,17	75
44145A	8,17±0,31	15,47 ± 0,06	75
44145B	1,26±0,12	18,34 ± 0,15	75
44149B	9,87±1,21	15,19 ± 0,18	75
45141A	6,76±0,29	15,76 ± 0,07	75
ZO5P	4,44±0,17	16,40±0,06	75
ZO9S	11,18±0,86	14,99±0,12	75
NTC	0	36,53±0,7	73,97

Ct (treshold cycle) médio e temperatura de melting (Tm). S3 até S8: pontos da curva-padrão.

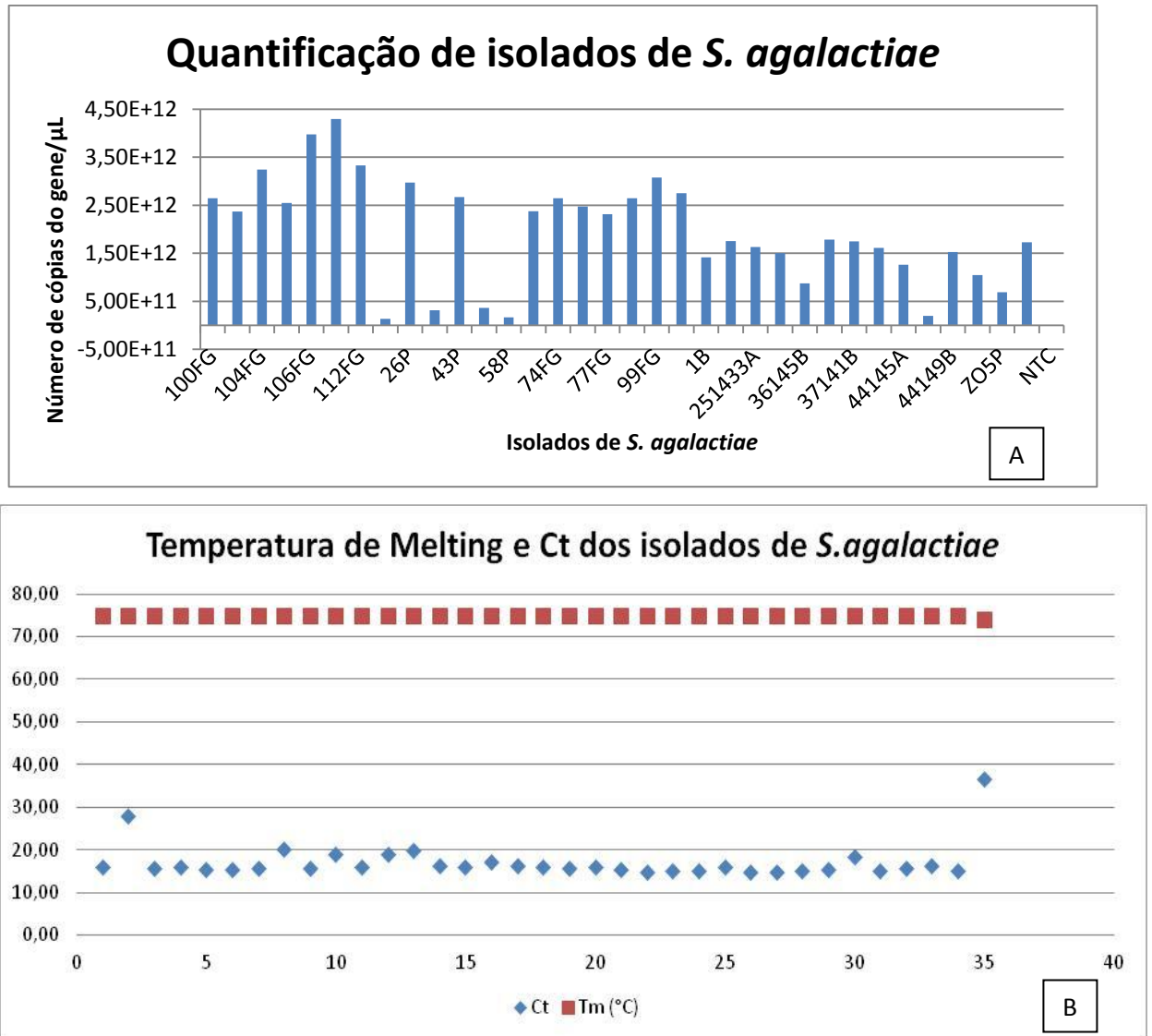


FIGURA 7. Quantificação dos isolados de *S. agalactiae* em número de cópias por μL (A), Ct e temperatura de melting (B) no ensaio de qPCR em tempo real.

O Ct médio para todas as amostras positivas de *S. agalactiae* amplificadas descritas na Tabela 4 foi de 18,19. Nas amostras negativas, contendo água ultra-pura, o Ct foi superior a 35, o que está de acordo o parâmetro do software 7500 que indica não amplificação (v 2.0.6 – Applied Biosystems). Contudo, para o ensaio apresentado na Tabela 5, o limiar mínimo de detecção de amplificação foi Ct 23,4 (3 fg de DNA), assim amplificações maiores que 28 não serão consideradas *S. agalactiae* para fins de identificação.

Tabela 5. Quantificação da curva-padrão e de DNA de isolados de variadas espécies, Ct médio e Tm.

Amostra	Espécie	Quantificação (pg)	Ct médio e desvio-padrão	Tm (°C)
S1	<i>S.agalactiae</i>	298± 0,00	9,15 ± 0,04	74,77
S2	<i>S.agalactiae</i>	29,8± 0,00	12,36 ± 0,03	75,13
S3	<i>S.agalactiae</i>	0,298± 0,00	16,15 ± 0,19	75,32
S4	<i>S.agalactiae</i>	0,03± 0,00	19,75 ± 0,12	75,32
S5	<i>S.agalactiae</i>	0,003± 0,00	23,44± 0,17	75,50
23FG	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	0	32,41 ± 0,18	75,5
84FG	<i>Acinetobacter ursingii</i>	0	34,59 ± 0,41	75,5
A135	<i>Aeromonas hydrophila</i>	0	INDET.	-
A124	<i>Aeromonas jandaei</i>	0	35,40 ± 0,22	74,03
A109	<i>Aeromonas veronii</i>	0	31,68 ± 0,10	75,13
A106	<i>Citrobacter freundii</i>	0	34 ± 1,20	75,32
48MS	<i>Citrobacter murlinae</i>	0	37,07±0,81	75,5
18FG	<i>Edwardsiella tarda</i>	0	34,48 ± 0,38	75,5
A70	<i>Enterobacter ludwigii</i>	0	35,85±1,57	75,6
A9	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	0	INDET.	75,32
A10	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	0	INDET.	-
491FG	<i>Lactococcus garviae</i>	0	34,10 ± 0,37	75,32
S11	<i>Lactococcus garviae</i>	0	33,95 ± 0,82	75,32
A71	<i>Lactococcus garviae</i>	0	32,50 ± 0,32	75,32
A74	<i>Lactococcus garviae</i>	0	INDET.	-
S17	<i>Lactococcus lactis</i>	0	INDET.	-
A75	<i>Pseudomonas fulva</i>	0	33,79 ± 0,20	75,68
A76	<i>Pseudomonas mosselii</i>	0	36,74±0,37	72
22FG	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0	36,73 ± 0,37	74,9
45P	<i>Streptococcus agalactiae</i>	2,34±0,22	16,56± 0,15	74,5

78FG	<i>Streptococcus agalactiae</i>	11,31±0,58	14,10±0,08	74,9
79FG	<i>Streptococcus iniae</i>	0,10±0,02	23,51±0,24	75,5
81FG	<i>Streptococcus iniae</i>	6,45±0,74	17,46±0,17	75,5
NTC	Água	0	35,65±0,7	71,64

Ct (treshold cycle) médio e temperatura de melting (Tm). S2 até S6: pontos da curva-padrão: slope -3,56; R² 0,999 e eficiência de 90,83%.

Sabe-se que o gene *cfb* é ubíquo entre as cepas de GBS, portanto, o teste CAMP ou a busca pelo gene por meio da PCR é comumente utilizado para diferenciar GBS de outras espécies. Assim, o par de “primers” desenhado para amplificar o gene codificador do fator CAMP em GBS deste trabalho apresentou alta especificidade, não amplificando as outras espécies testadas e com alta incidência em peixes com sinais clínicos de bacterioses, tais como *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Enterococcus* e principalmente *Lactococcus* (Gram positiva), contribuindo para redução de tempo para diagnóstico.

Todavia, o fator CAMP apresenta homólogos em outras espécies de *Streptococcus*, tais como *S. pyogenes* (GASE et al., 1999), *S. uberis* (JIANG et al., 1996), *S. porcinus* (HASSAN et al., 2000), *S. canis* (GURTURK; LAMMLER, 1990) e *Probionibacterium acnes* (VALANNE et al., 2005).

Como as espécies homólogas ao gene *cfb* descritas na literatura previamente a este trabalho, não são comumente isoladas em peixes, optou-se pelo desenho de “primers” que flanqueiam a região codificadora do fator CAMP do gene citado. Todavia, a análise dos resultados para *S. iniae*, deste trabalho, indica que houve amplificação com o primer para *S. agalactiae*, não podendo diferenciar nem mesmo pela temperatura de melting.

Outros estudos devem ser dedicados à confirmação desta informação, com maior número de amostras, uma vez que, pode ter ocorrido contaminação entre DNA de *S. agalactiae* e *S. iniae*, já que a transferência horizontal é muito comum em bactérias, promovendo uma rápida evolução genômica e que pode estar envolvida na especiação (KURLAND, 2000). Os responsáveis por tais fenômenos são os elementos genéticos móveis, que incluem plasmídeos, fagos, transposons e elementos integrativos e conjugativos, os quais consistem em clusteres gênicos

capazes de direcionar suas próprias excisões, conjugações e integração com célula hospedeira (WOZNIAK; WALDOR, 2010).

Na Figura 8 são evidenciadas as bandas de 154 pb, resultado da amplificação do DNA plasmidial diluído no fator 1:10, a partir de 1,28 pg de *S. agalactiae* e amostras de *S. agalactiae* após qPCR em tempo real.

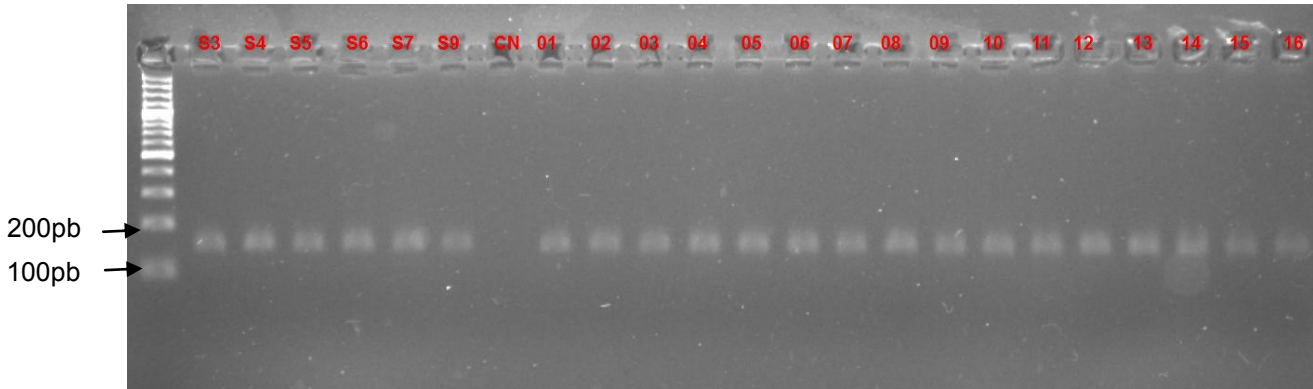


FIGURA 8. Gel de agarose 3% contemplando as bandas de *S. agalactiae* de 154pb. S3 a S4: pontos da curva-padrão; CN: controle negativo com água ultra-pura; amostras 01 a 16: 44145A, 44145B, 44149B, 45141A, 251433A, 251432A, 40141B, 36145B, 37141A, 37141B, Z09S, Z05P, 1B, 33145A, 45142A, 1A.

Previamente ao teste de patogenicidade, determinou-se a concentração letal de 50% (CL₅₀) para a cepa de GBS 26P, que foi de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.

Foram inoculados 0,1 mL de solução bacteriana, intraperitonealmente, em cada peixe e a mortalidade teve início após 48 h da inoculação, sendo que os sinais clínicos característicos de estreptococose, tais como opacidade ocular, exoftalmia (Figura 9) e natação em rodopio se manifestaram a partir do quarto dia de infecção.



Figura 9. Tilapia após infecção experimental com 9×10^8 UFC/mL, apresentando opacidade ocular e exoftalmia.

O reisolamento das cepas em Agar-sangue foi possível em 13 cepas das 20 testadas: 26P, 104FG, 64P, 106FG, 78FG, 43P, 99FG, 102FG, 74FG, 45P, 105FG, 100FG e 77FG, como ilustrado na Figura 10.

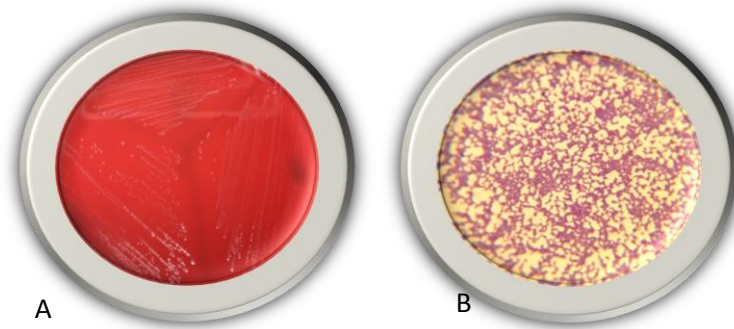


Figura 10. Reisolamento em placa de Agar-sangue da cepa 100FG de *S. agalactiae* após infecção experimental em tilapia (A) e teste de gram, evidenciando a característica de cocos gram-positivos (B).

Um novo ensaio de qPCR em tempo real foi feito para verificar a identidade dos reisolados, a partir de $4,7 \times 10^7$ UFC (em $1 \text{ ng}/\mu\text{L}$ de DNA), que foi a média de colônias recuperada por encéfalo. A curva-padrão apresentou slope de $-3,56$; R^2 de $0,99$ e eficiência de $90,76\%$ e os resultados estão na Tabela 6.

Tabela 6. Resultado da amplificação e quantificação dos re-isolados de *S. agalactiae* após infecção experimental com as cepas de mesmo nome.

Re-isolado	Quantidade (pg) e desvio-padrão	Ct e desvio-padrão	Tm (°C)
26P	10,54±1,28	24,91±0,16	75
100FG	10,17±1,37	13,49±0,30	75,3
102FG	9,03±1,65	13,69±0,29	75,3
104FG	3,55±0,90	16,19±0,40	75,1
105FG	13,35±3,95	13,11±0,45	75,3
106FG	10,38±2,45	13,49±0,40	75
43P	12,06±2,99	13,26±0,40	75,1
45P	9,58±0,52	13,58±0,08	75,5
64P	9,44±0,39	13,61±0,06	75
74FG	10,07±0,13	13,51±0,02	75,3
77FG	15,48±0,61	12,84±0,06	75,3
78FG	13,03±4,02	13,16±0,53	75
99FG	13,22±2,28	13,10±0,28	75,3
CN	0	34	74

Ct (threshold cycle) médio e temperatura de melting (Tm).

Houve confirmação da identidade dos isolados como *S. agalactiae* (Tabela 6), uma vez que ocorreu amplificação com primer específico e a temperatura de dissociação é a mesma para cepas identificadas por Sequenciamento. Ainda verificou-se uma alta quantidade do gene de fator CAMP (10,8 pg em média) e um Ct precoce de 13 ciclos, permitindo um diagnóstico em tempo real inferior a 2,5 h. O limiar de detecção foi de 1 fg/ μ L ou $4,7 \times 10^1$ UFC. As bandas podem ser visualizadas em gel de agarose 3% (Figura 11).

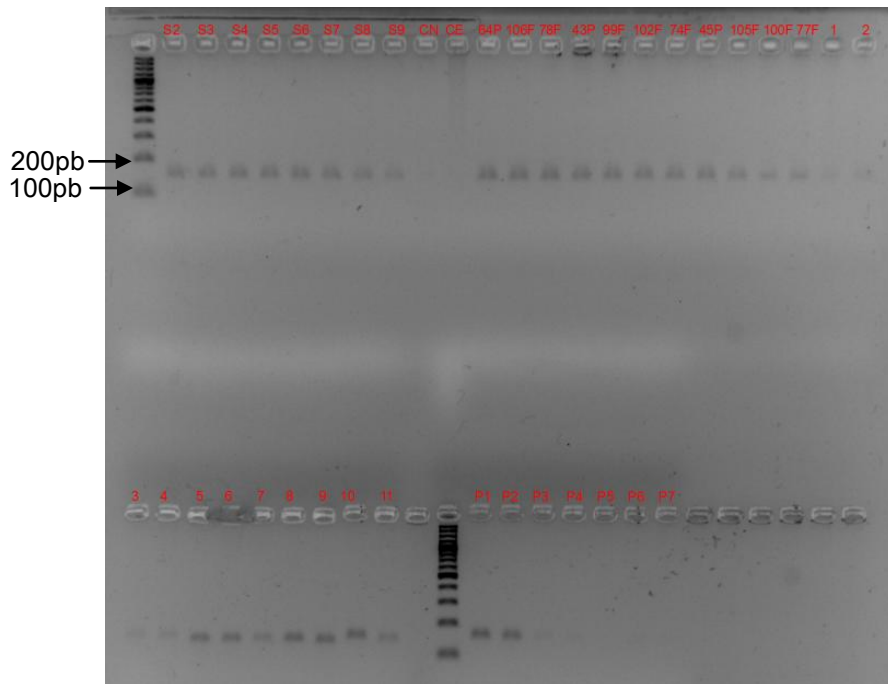


Figura 11. Gel de agarose 3%, corado com brometo de etideo, mostrando as bandas de 154pb de *S. agalactiae* após amplificação por qPCR. S2 a S9: pontos da curva-padrão, diluição 1:10, a partir de 2 ng, CN: controle negativo (água), CE: controle encéfalo (DNA total de encéfalo de tilapia sadia), 64P a 77F: cepas reisoladas de GBS, 1 a 11: amplificação direto do DNA tecidual para as cepas 26P, 18P, 36P, 112FG, 74FG, 64P, 58P, 77FG, 45P, 102FG e 100FG.

Após extração do DNA total do encéfalo, foi realizado ensaio de qPCR preliminar, visando padronizar a concentração inicial de DNA. Diluiu-se em sete pontos (P1 a P7 na Figura 8) a partir de concentração de 40,9 ng/ μ L, fator 1:10, e a melhor concentração foi de 4,09 ng/ μ L (P2), com Ct de 21 e Tm de 74,8°C).

Os resultados da amplificação e quantificação de GBS após qPCR feita com DNA total de tecido do encéfalo, sem isolamento bacteriano prévio, estão na Tabela

7. Pode-se observar que as cepas 74FG, 64P, 77FG, 45P e 102FG apresentaram maior quantidade do gene amplificado para o fator CAMP com uma quantidade de Ct (média 20,6) inferior aos dos demais isolados, que foi de 32 ciclos, em média. Além disso, todas estas cepas foram reisoladas, como já mostrado na Tabela 6.

Tabela 7. Quantificação da amplificação do gene do fator CAMP em qPCR de GBS após extração de DNA total de encéfalo de tilápias infectadas experimentalmente com as respectivas cepas.

Aquário	Cepa	Quantidade (pg) e desvio-padrão	Ct e desvio-padrão	Tm (°C)
1	26P	0,0001±0,00	32,36±0,01	75,5
2	18P	0,0001±0,00	32,75±0,01	75,5
3	36P	0,0001±0,00	31,73±0,01	75,3
4	112FG	0,0001±0,00	31,73±0,01	75
5	74FG	0,37±0,05	18,63±0,21	75
6	64P	0,24±0,11	19,38±0,65	75
7	58P	0,0002±0,01	30,53±0,01	75,12
8	77FG	0,01±0,0	23,99±0,35	75,12
9	45P	0,03±0,01	22,44±0,30	75
10	102FG	0,05±0,01	21,74±0,27	75
11	100FG	0,0002±0,01	30,07±0,01	75
12	104FG	0,01±0,00	34,69±0,19	75,5
13	MP	0,01±0,00	34,79±0,12	75,5
14	99FG	0,01±0,00	34,15±0,04	75
15	76FG	0,002 ±0,00	36,7±0,50	75
16	78FG	0,01±0,00	34,01±0,46	75,5
17	106FG	0,014±0,01	33,82±0,07	75,68
18	105FG	0,06±0,05	32,18±1,30	75
19	43P	0,05±0,01	29,94±0,27	75
20	ZO5p	0,03±0,01	32,80±0,40	75
	CE	0	33,51±0,92	74,9/63,2
	CN	0	36,80±0,01	74,9

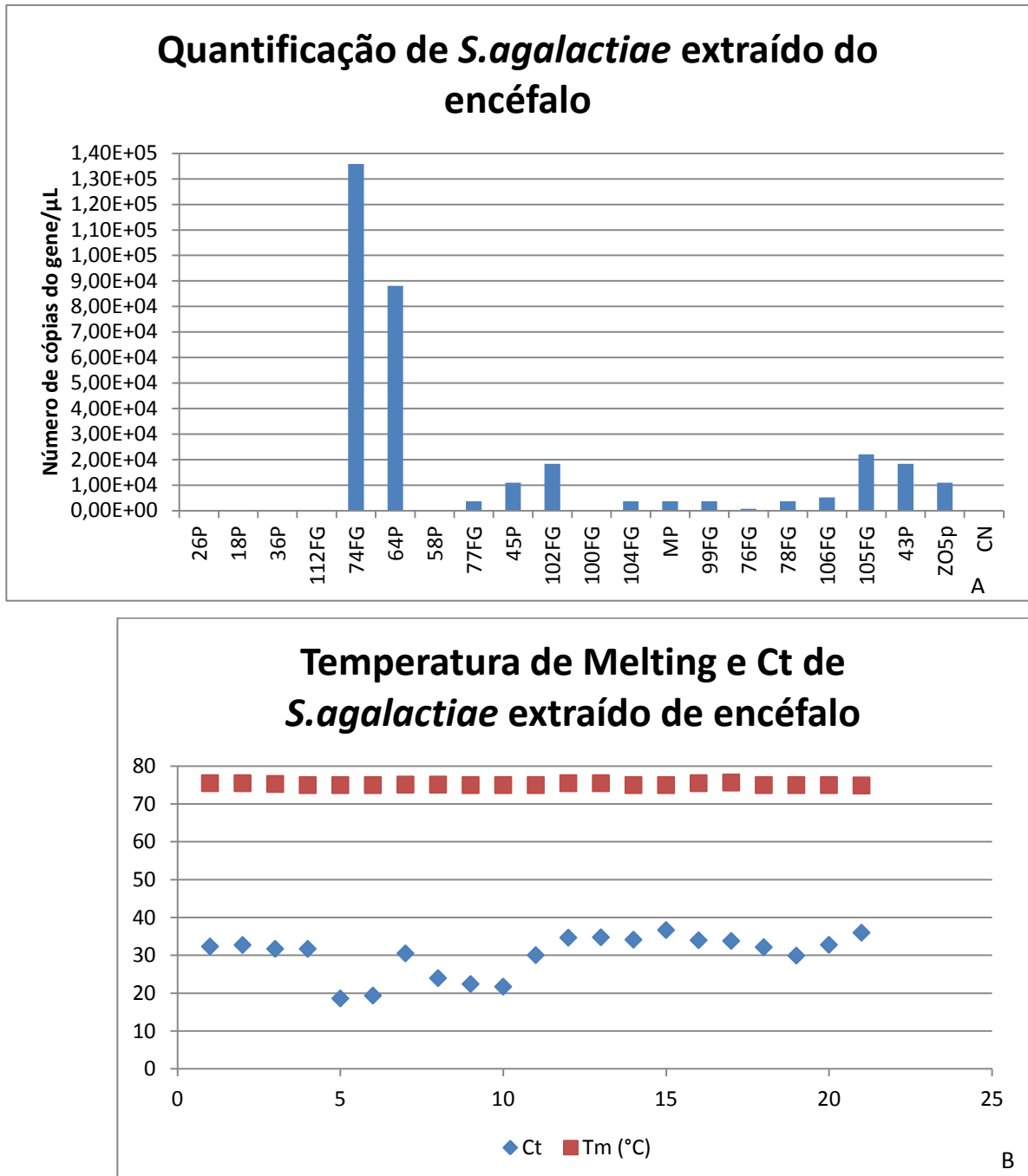


FIGURA 12. Quantificação de *S. agalactiae* em número de cópias por μL após extração de DNA diretamente de encéfalo (A), Ct e temperatura de melting das mesmas amostras (B) no ensaio de qPCR em tempo real.

Este teste de qPCR foi bem sucedido, permitindo a detecção de níveis baixíssimos da bactéria, que foram insuficientes para isolamento em meio de cultura, porém quantificados pela PCR em tempo real a partir de DNA total do encéfalo. O limiar de detecção foi de 0,1 fg/ μ L ou 4,7 UFC, em média ou inferior a 1000 cópias de gene de fator CAMP por μ L de reação (Figura 12).

Os resultados encontrados sugerem a aplicabilidade do ensaio de qPCR deste trabalho para a prática de diagnóstico de streptococose em pisciculturas e devido a especificidade de 100% em relação a outras espécies testadas e a alta sensibilidade encontrada, também pode ser utilizado em programas de monitoramento sanitário em relação a taxa do patógeno nos peixes de cultivo.

Em relação à economia de tempo, custo, vantagens e desvantagens que estes ensaios representam, estão discriminados nas Tabelas 8, 9 e 10.

Tabela 8. Custo das análises, por amostra, testadas em laboratório de universidade, já equipado.

	Microbiologia Clássica	PCR convencional	PCR tempo real - bactéria	PCR tempo real - tecido
Isolamento em placa	R\$0,93	R\$0,93	R\$0,93	-
Multiplicação em meio líquido	R\$1,25	R\$1,25	R\$1,25	-
Testes bioquímicos	R\$26,02	-	-	-
Extração DNA	-	R\$17,00	R\$17,00	R\$15,37
PCR	-	R\$7,56	R\$10,58	R\$10,58
Eletroforese	-	R\$0,83	-	-
Purificação	-	R\$7,64	-	-
Sequenciamento	-	R\$15,00	-	-
Total	R\$ 28,02	R\$ 50,21	R\$ 29,76	R\$ 25,95

Tabela 9. Tempo gasto com cada etapa das metodologias avaliadas.

	Microbiologia clássica	PCR convencional	PCR tempo real - bactéria	PCR tempo real - tecido
Isolamento em placa	72 h	72 h	72 h	-
Multiplicação em meio líquido	48 h	48 h	48 h	-
Testes bioquímicos	7 dias	-	-	-
Extração de DNA	-	3 h	3 h	1,5 h
Amplificação DNA	-	3h	3 h	2,5 h
Eletroforese	-	1 h	-	-
Purificação	-	1 h	-	-
Sequenciamento	-	1 dia	-	-
Total	12 dias	7 dias	6 dias	4h

Tabela 10. Vantagens e desvantagens de cada método.

	Vantagens	Desvantagens
Microbiologia clássica	Menor tecnificação	Diagnóstico demorado e inconclusivo
PCR Convencional	Diagnóstico conclusivo	Dependente do cultivo bacteriano, mais onerosa em relação aos outros métodos, alto volume amostral, qualitativa, falso negativo.
PCR tempo real (Bactéria)	Diagnóstico conclusivo, quantitativa, baixo volume amostral.	Dependente do cultivo bacteriano, Maior tecnificação.
PCR tempo real (Encéfalo peixes)	Diagnóstico conclusivo, independe do isolamento bacteriano, menor custo, quantitativa, baixo volume amostral	Maior tecnificação

Nota-se, portanto, a evolução nas metodologias apresentadas, culminando na qPCR em tempo real, que utiliza DNA extraído diretamente do órgão do peixe com

sinais clínicos da enfermidade, estreptococose, permitindo um avanço nas técnicas de diagnóstico (mais apurado, sensível e específico) e redução de tempo de uma semana para apenas quatro horas, além de uma economia de 48,32 % do custo da análise por amostra em relação a PCR e sequenciamento convencionais.

4. Referências

- ABUSELIANA, A.F.; DAUD, H.H.M.; AZIZ, S.A.; BEJO, S.K.; ALSAID, M. Pathogenicity of *Streptococcus agalactiae* isolated from fish farm in Selangor to juvenile red tilapia (*Oreochromis sp.*). **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 10, p. 914-919, 2011.
- AZIM, M.E., LITTLE, D.C. The biofloc technology (BFT) in indoor tanks: Water quality, biofloc composition, and growth and welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 283, p. 29-35, 2008.
- BAYA, A.M., LUPIANI, B., HETRICK, F.M., ROBERSON, B.S., LUKACOVIC, R., MAY, E., POUKISH, C. Association of *Streptococcus sp.* with fish mortalities in the Chesapeake Bay and its tributaries. **Journal of Fish Diseases**, v. 13, p. 251-253, 1990.
- CHUZEVILLE, S., PUYME`GE, A., MADEC, J-Y., HAENNI, M., PAYOT, S. Characterization of a New CAMP Factor Carried by an Integrative and Conjugative Element in *Streptococcus agalactiae* and Spreading in *Streptococci*. **PLoS ONE**, v. 7, n.11, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0048918>>.
- DUREMDEZ, R., AL-MARZOUK, A., QASEM, J.A. Isolation of *Streptococcus agalactiae* from cultured silver pomfret, *Pampus argenteus* (Euphrasen), in Kuwait. **Journal of Fish Diseases**, v. 27, p. 307-310, 2004.
- EVANS, J.J., WIEDENMAYER, A.A., KLESIUS, P.H. A transport system for maintenance of viability of *Acinetobacter calcoaceticus*, *Streptococcus iniae*, and *Streptococcus agalactiae* over varying time periods. **Bulletin-European Association of Fish Pathologists**, v. 22, p. 238-246, 2002.
- FIGUEIREDO, H.CP., CARNEIRO, D.O., FARIA, F.C., COSTA, G.M. *Streptococcus agalactiae* associado à meningoencefalite e infecção sistêmica em tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, p. 678-680. 2006.
- GASE, K., FERRETTI, J.J., PRIMEAUX, C., MCSHAN, W.M. Identification, cloning, and expression of the CAMP factor gene (cfa) of group A streptococci. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 4725-4731, 1999.
- GIORDANO, L.G.P. **Streptococcus agalactiae: A doença do tilápia-do-nilo** ("o" cá d c xp m m T p do N o (*Oreochromis niloticus*)). 2007. 62p. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Universidade Estadual de Londrina. Londrina, PR, 2007.

GÜRTÜRK, K., LÄMMLER, C. Purification and partial characterization of a cohaemolysin (CAMP-factor) produced by *Streptococcus canis*. **FEMS Microbiology and Immunology**, v.2, p. 97-102, 1990.

HASSAN, A.A., ABDULMAWJOOD, A., YILDIRIM, A.O., FINK, K., LÄMMLER, C., SCHLENSTEDT, R. Identification of streptococci isolated from various sources by determination of cfb gene and other CAMP-factor genes. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 946-51, 2000.

IP, M., CHEUK, E.S.C., TSUI, M.H.Y., KONG, F., LEUNG, T.N., GILBERT, G.L., Identification of a *Streptococcus agalactiae* serotype III subtype 4 clone in association with adult invasive disease in Hong Kong. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 4252–4254, 2006.

JACOBSON, R., WRIGHT, P. (eds) **Principles of Validation of Diagnostic Assays for Infectious Diseases**. OIE, Paris, 2006.

JIANG, M., BABIUK, L.A., POTTER, A.A. Cloning, sequencing and expression of the CAMP factor gene of *Streptococcus uberis*. **Microbiology and Pathology**, v. 20, p. 297-307, 1996.

KE, D., MÉNARD, C., PICARD, F.J., BOISSINOT, M., OUELLETTE, M., ROY, P.H., BERGERON, M.G. Development of conventional and real-time PCR assays for the rapid detection of group B streptococci. **Clinical Chemistry**, v. 46, p. 324–331, 2000.

KEELING, S.E., JOHNSTON, C., WALLIS, C., BROSNAHAN, C.L., GUDKOV, N., McDONALD, W.L. Development and validation of real-time PCR for the detection of *Yersinia ruckeri*. **Journal of Fish Diseases**, v. 35, p. 119-125, 2012.

KURLAND, C.G. Something for everyone. Horizontal gene transfer in evolution. **EMBO Reports**, v.1, p. 92–95, 2000.

LANG, S.; XUE, J.; GUO, Z.; PALMER, M. Streptococcus agalactiae CAMP factor binds to GPI-anchored proteins. **Medical Microbiology and Immunology**, v.196, p. 1-10, 2007.

MIAN, G.F., GODOY, D.T., LEAL, C.A.G., YUHARA, T.Y., COSTA, G.M., FIGUEIREDO, H.C.P. Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia. **Veterinary Microbiology**, v. 136, p. 180-183, 2009.

OLIVARES-FUSTER, O., KLESIUS, P. H., EVANS, J., ARIAS, C. R. Molecular typing of *Streptococcus agalactiae* isolates from fish. **Journal of Fish Diseases**, v.31, p.277-83, 2008.

SAUKKORIPI, A., PALMU, A., KILPI, T., LEINONEN, M. Real-time quantitative PCR for the detection of *Streptococcus pneumoniae* in the middle ear fluid of children with acute otitis media. **Molecular and Cellular Probes**, v.16, p. 385-390, 2002.

SUANYUK, N., KONG, F., KO, D., GILBERT, G.L., SUPAMATTAYA, K. Occurrence of rare genotypes of *Streptococcus agalactiae* in cultured red tilapia *Oreochromis* sp. and Nile tilapia *O. niloticus* in Thailand—Relationship to human isolates? **Aquaculture**, v. 284, p. 35-40, 2008.

VALANNE, S., MCDOWELL, A., RAMAGE, G., TUNNEY, M.M., EINARSSON, G.G., O'HAGAN, S., WISDOM, J-F., FAIRLEY, D., BHATIA, A., MAISONNEUVE, J-F., LODES, M., PERSING, D.H., PATRICK, S. CAMP factor homologues in

Propionibacterium acnes: a new protein family differentially expressed by types I and II. **Microbiology**, v.151, p.1369–1379, 2005.

WILKINSON HW. CAMP-disk test for presumptive identification of group B streptococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 6, p. 42–5, 1977.

WILSON, T.; CARSON, J. Development of sensitive, high-throughput one-tube RT-PCR-enzyme hybridisation assay to detect selected bacterial fish pathogens. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 54, p. 127-134, 2003.

WOZNIAK, R.A., WALDOR, M.K. Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. **Natural Reviews Microbiology**, v.8, p.552–563, 2010.

CAPITULO 5 – Considerações finais

A busca por metodologias de diagnóstico mais rápidas e precisas é constante para melhor atender a demanda das pisciculturas, principalmente no Brasil. Neste trabalho, tecnologias moleculares foram avaliadas, e permitiram redução de tempo, custo e aumento na confiabilidade dos resultados obtidos.

A técnica de PCR direta de colônia associada ao sequenciamento do gene 16S rRNA constituiu uma alternativa eficiente, com redução de 51,6% nos custos e sete dias no tempo para o diagnóstico de enfermidades bacterianas em peixes em comparação às metodologias clássicas usadas no Brasil, tais como isolamento, testes bioquímicos, pois não necessita de extração de DNA e nem desenho de “primers” específicos para cada uma das várias espécies bacterianas.

Além disso, com os dados de sequenciamento, iniciou-se um estudo epidemiológico preliminar dos patógenos que têm acometido as pisciculturas no Brasil, sendo que os cinco gêneros mais frequentes foram *Aeromonas*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* e *Pseudomonas*.

Em relação à resistência aos antimicrobianos, foi observado elevado índice de resistência ao florfenicol e a oxitetraciclina (superior a 50%) principalmente para os gêneros de *Lactococcus* e *Enterococcus*, deixando um alerta para a necessidade de programas de monitoramento da sanidade na produção aquícola e maior fiscalização no uso dos antimicrobianos em nossos sistemas de produção de peixes.

A escassez de trabalhos na literatura sobre ensaios de PCR quantitativa absoluta em tempo real e especialistas sobre esta técnica molecular no Brasil, relacionando-a a questões da aquicultura, tornou este trabalho um grande desafio.

A partir dos resultados encontrados, inferimos que a técnica pode ser utilizada para identificação e quantificação de *A. hydrophila* com confiabilidade e reprodutibilidade, utilizando o gene da adesina. A geração de dímeros de “primers”, comum em ensaios de SyBr Green I pode ser solucionada com a mudança de intercalantes inespecíficos para aqueles que utilizam sondas, tais como TaqMan e redesenho de “primers”. Futuros estudos podem explorar outros fatores de virulência, tais como proteases, hemolisinas, citotoxinas, enterotoxinas, leucocidina

e elastases, auxiliando a desvendar os mecanismos de instalação e infecção pela bactéria.

Quanto ao ensaio de detecção e quantificação de *S. agalactiae*, também foi bem sucedido, permitindo a detecção de níveis baixíssimos da bactéria, que foram insuficientes para reisolamento em meio de cultura, porém quantificados pela PCR em tempo real a partir de DNA total do encéfalo. O limiar de detecção foi 4,7 UFC, em média.

Os resultados encontrados sugerem a aplicabilidade do ensaio de qPCR para a prática de diagnóstico da streptococose em pisciculturas e devido a especificidade de 100% em relação a outros gêneros bacterianos testados e a alta sensibilidade encontrada, também pode ser utilizado em programas de monitoramento sanitário em relação a taxa do patógeno nos peixes de criação.

Pela microbiologia clássica, um laudo contendo identificação do patógeno e antibiograma poderia demorar cerca de duas semanas para chegar às mãos do piscicultor. Com a técnica de qPCR em tempo real a partir de DNA extraído diretamente do tecido, a identificação pode ser feita em quatro horas, com redução de 48% no custo das análises por amostra, em comparação a PCR e sequenciamento convencionais. O tempo maior será do teste de sensibilidade a antimicrobianos que ainda necessita do isolamento bacteriano e crescimento em placa (de 24 a 48h, dependendo da espécie).

Os valores sobre a evolução na economia de tempo e custos das metodologias apresentadas nesta tese estão apresentadas na Tabela 1.

Sem dúvida este trabalho constitui uma ferramenta valiosa para detecção de *A. hydrophila* e *S. agalactiae* a partir de peixes de criação intensiva e, a habilidade de quantificação da bactéria no hospedeiro, representa também uma forma de medida da eficácia de vacinas e terapias com antimicrobianos, além de auxiliar estudos epidemiológicos a identificar fatores que predispõem populações a surtos de doenças com maior rapidez e menor custo, desse modo, com monitoramento da presença de patógenos, estas técnicas contribuirão para redução das perdas em piscicultura.

Tabela 1. Resumo dos custos por amostra e tempo gasto com cada etapa das metodologias avaliadas.

Etapa	Microbiologia clássica		PCR convencional		PCR de colônia		PCR tempo real - bactéria		PCR tempo real-tecido peixe	
	R\$	Tempo	R\$	Tempo	R\$	Tempo	R\$	Tempo	R\$	Tempo
Isolamento em placa	0,93	24-72 h	0,93	24-72 h	0,93	24-72 h	0,93	24-72 h	-	-
Multiplicação em meio líquido	1,25	24-48 h	1,25	24-48 h	-	-	1,25	24-48 h	-	-
Testes bioquímicos	26,02	7 dias	-	-	-	-	-	-	-	-
Extração de DNA	-	-	17,00	3 h	-	-	17,00	3 h	15,37	1,5 h
Amplificação DNA	-	-	7,56	3h	7,56	3 h	10,58	3 h	10,58	2,5 h
Eletroforese	-	-	0,83	1 h	0,83	1 h	-	-	-	-
Purificação	-	-	7,64	1 h	-	-	-	-	-	-
Sequenciamento	-	-	15,00	1 dia	15,00	1 dia	-	-	-	-
Total	28,02	9 a 12 dias	50,21	4 a 7 dias	24,32	3 a 5 dias	29,76	3 a 6 dias	25,95	4h

APÊNDICE

APÊNDICE A. Relação e características das cepas pertencentes a este trabalho, isoladas a partir de peixes apresentando sinais clínicos de bacteriose, provenientes das regiões centro-oeste, sudeste e sul do Brasil, entre os anos de 2010 e 2014.

Número acesso	Indicação	Peixe	Órgão	Identificação molecular	Local	Época/Ano	Tamanho molecular (pb)
KJ560937	4n	TILÁPIA	PELE	<i>Edwardsiella tarda</i>	NEPEAN SP	Primavera 2013	868
KJ560938	T1.3a	TILÁPIA	BRÂNQUIAS	<i>Edwardsiella tarda</i>	PORTO FERREIRA SP	Primavera 2013	825
KJ560939	2dp	TILÁPIA	RIM	<i>Edwardsiella tarda</i>	PORTO FERREIRA SP	Primavera 2013	855
KJ560940	18FG	TILÁPIA	PELE	<i>Edwardsiella tarda</i>	Rio Paranapanema (SP/PR)	Inverno 2012	858
KJ560941	91 FG	TILÁPIA	RIM	<i>Edwardsiella tarda</i>	Rio Paranapanema (SP/PR)	Inverno 2012	860
KJ560942	8g	PACU	RIM	<i>Edwardsiella tarda</i>	CAUNESP -SP	Primavera 2013	847
KJ560943	3dp	TILÁPIA	RIM	<i>Edwardsiella tarda</i>	PORTO FERREIRA SP	Primavera 2013	873
KJ560944	45MS	BAGRE	PELE	<i>Enterobacter asburiae</i>	MATO GROSSO DO SUL	Inverno 2012	851
KJ560945	47MS	BAGRE	RIM	<i>Kosakonia cowanii</i>	MATO GROSSO DO SUL	Inverno 2012	857

KJ560946	48MS	BAGRE	RIM	<i>Enterobacter ludwigii</i>	MATO GROSSO DO SUL	Inverno 2012	800
KJ560947	A77	TILAPIA	RIM	<i>Enterobacter kobei</i>	AREALVA SP	Primavera 2011	830
KJ560948	A79	TILAPIA	RIM	<i>Enterobacter kobei</i>	AREALVA SP	Primavera 2011	853
KJ560949	A70	TILAPIA	PELE	<i>Enterobacter ludwigii</i>	AREALVA SP	Primavera 2011	855
KJ560950	A1	TAMBAQU	PELE	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	CAUNESP SP	Primavera 2011	859
KJ560951	A8	TAMBAQUI	PELE	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	CAUNESP SP	Primavera 2011	857
KJ560952	A5	TAMBAQUI	PELE	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	CAUNESP SP	Primavera 2011	869
KJ560953	A9	TAMBAQUI	PELE	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	CAUNESP SP	Primavera 2011	860
KJ560954	A2	TAMBAQUI	PELE	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	CAUNESP SP	Primavera 2011	866
KJ560955	A6	TAMBAQUI	PELE	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	CAUNESP SP	Primavera 2011	841
KJ560956	A10	TAMBAQUI	PELE	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	CAUNESP SP	Primavera 2011	862
KJ560957	A7	TAMBAQUI	PELE	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	CAUNESP SP	Primavera 2011	862
KJ560958	A14	TILAPIA	PELE	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	CAUNESP SP	Primavera 2011	856

KJ560959	P	TILÁPIA	ENCÉFALO	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	ITAMBARACÁ PR	Verão 2010	853
KJ560960	S27	TILÁPIA	RIM	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	CAUNESP SP	Inverno 2011	879
KJ560961	S22	TILÁPIA	PELE	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	CAUNESP SP	Inverno 2011	871
KJ560962	S28	TILÁPIA	BRÂNQUIA	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	CAUNESP	Inverno 2011	876
KJ560963	S21	TILÁPIA	PELE	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	CAUNESP SP	Inverno 2011	871
KJ560964	S19	TILÁPIA	PELE	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	CAUNESP SP	Inverno 2011	867
KJ560965	S25	TILÁPIA	PELE	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	CAUNESP SP	Inverno 2011	872
KJ560966	5MS	BAGRE	RIM	<i>Enterococcus durans</i>	MATO GROSSO DO SUL	Primavera 2012	840
KJ560967	S9	TILÁPIA	PELE	<i>Enterococcus durans</i>	AREALVA SP	Primavera 2011	874
KJ560968	3 MS	BAGRE	RIM	<i>Enterococcus faecalis</i>	MATO GROSSO DO SUL	Primavera 2012	854
KJ560969	4MS	BAGRE	RIM	<i>Enterococcus faecalis</i>	MATO GROSSO DO SUL	Primavera 2012	840
KJ560970	7MS	BAGRE	RIM	<i>Enterococcus faecalis</i>	MATO GROSSO DO SUL	Primavera 2012	846

KJ560971	8MS	BAGRE	RIM	<i>Enterococcus faecalis</i>	MATO GROSSO DO SUL	Primavera 2012	837
KJ560972	10MS	BAGRE	RIM	<i>Enterococcus faecalis</i>	MATO GROSSO DO SUL	Primavera 2012	852
KJ560973	13ms	BAGRE	RIM	<i>Enterococcus faecalis</i>	MATO GROSSO DO SUL	Primavera 2012	849
KJ560974	28ms	BAGRE	RIM	<i>Enterococcus faecalis</i>	MATO GROSSO DO SUL	Primavera 2012	873
KJ560975	42ms	BAGRE	RIM	<i>Enterococcus faecalis</i>	MATO GROSSO DO SUL	Primavera 2012	838
KJ560976	43ms	BAGRE	RIM	<i>Enterococcus faecalis</i>	MATO GROSSO DO SUL	Primavera 2012	864
KJ560977	37ms	BAGRE	RIM	<i>Enterococcus faecalis</i>	MATO GROSSO DO SUL	Primavera 2012	874
KJ560978	S14	TILÁPIA	PELE	<i>Enterococcus faecalis</i>	AREALVA SP	Inverno 2011	864
KJ560979	26ms	BAGRE	RIM	<i>Enterococcus sulfureus</i>	MATO GROSSO DO SUL	Primavera 2012	850
KJ560980	20b dp	TILÁPIA	BRÂNQUIAS	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PORTO FERREIRA SP	Outono 2014	819
KJ560981	46MS	BAGRE	PELE	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	MATO GROSSO DO SUL	Primavera 2012	855
KJ560982	B1	TILAPIA	PELE	<i>Kurthia gibsonii</i>	AREALVA SP	Primavera 2011	837

KJ560983	A71	TILAPIA	PELE	<i>Lactococcus garviae</i>	AREALVA SP	Inverno 2011	834
KJ560984	A74	TILAPIA	RIM	<i>Lactococcus garviae</i>	AREALVA SP	Inverno 2011	855
KJ560985	497 FG	TILÁPIA	ENCÉFALO	<i>Lactococcus garviae</i>	Rio Paranapanema (SP/PR)	Primavera 2012	789
KJ560986	491 FG	TILÁPIA	ENCÉFALO	<i>Lactococcus garviae</i>	Rio Paranapanema (SP/PR)	Primavera 2012	843
KJ560987	Zo1	TILÁPIA	RIM	<i>Lactococcus garviae</i>	GUAÍRA SP	Outono 2014	865
KJ560988	Zo2	TILÁPIA	RIM	<i>Lactococcus garviae</i>	GUAÍRA SP	Outono 2014	866
KJ560989	6n	TILÁPIA	PELE	<i>Lactococcus garviae</i>	NEPEAN SP	Primavera 2013	875
KJ560990	A62	TILAPIA	PELE	<i>Lactococcus garviae</i>	AREALVA SP	Inverno 2011	845
KJ560991	15ms	BAGRE	RIM	<i>Lactococcus garviae</i>	MATO GROSSO DO SUL	Primavera 2012	846
KJ560992	14ms	BAGRE	RIM	<i>Lactococcus garviae</i>	MATO GROSSO DO SUL	Primavera 2012	853

KJ560993	31ms	BAGRE	RIM	<i>Lactococcus garviae</i>	MATO GROSSO DO SUL	Primavera 2012	866
KJ560994	33ms	BAGRE	RIM	<i>Lactococcus garviae</i>	MATO GROSSO DO SUL	Primavera 2012	853
KJ560995	36ms	BAGRE	RIM	<i>Lactococcus garviae</i>	MATO GROSSO DO SUL	Primavera 2012	810
KJ560996	52MS	BAGRE	ENCÉFALO	<i>Lactococcus garviae</i>	MATO GROSSO DO SUL	Primavera 2012	815
KJ560997	S11	TILÁPIA	PELE	<i>Lactococcus garviae</i>	AREALVA SP	Inverno 2011	812
KJ560998	9MS	BAGRE	ENCÉFALO	<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>	MATO GROSSO DO SUL	Primavera 2012	807
KJ560999	499 FG	TILÁPIA	ENCÉFALO	<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>	Rio Paranapanema (SP/PR)	Primavera 2012	799
KJ561000	S17	TILÁPIA	PELE	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	CAUNESP SP	Inverno 2011	869
KJ561001	17ms	BAGRE	RIM	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	MATO GROSSO DO SUL	Primavera 2012	852
KJ561002	18ms	BAGRE	RIM	<i>Lactococcus lactis subsp. Lactis</i>	MATO GROSSO DO SUL	Primavera 2012	861
KJ561003	20ms	BAGRE	RIM	<i>Citrobacter freundii</i>	MATO GROSSO DO SUL	Primavera 2012	842

KJ561004	24ms	BAGRE	RIM	<i>Lactococcus lactis</i> <i>subsp. Lactis</i>	MATO GROSSO DO SUL	Primavera 2012	858
KJ561005	500 FG	TILÁPIA	ENCÉFALO	<i>Lactococcus lactis</i> <i>subsp. lactis</i>	Rio Paranapanema (SP/PR)	Primavera 2012	829
KJ561006	39ms	BAGRE	RIM	<i>Lactococcus lactis</i> <i>subsp. Lactis</i>	MATO GROSSO DO SUL	Primavera 2012	832
KJ561007	41ms	BAGRE	RIM	<i>Lactococcus lactis</i> <i>subsp. lactis</i>	MATO GROSSO DO SUL	Primavera 2012	836
KJ561008	111 FG	TILÁPIA	ENCÉFALO	<i>Lactococcus lactis</i> <i>subsp. lactis</i>	Rio Paranapanema (SP/PR)	Primavera 2012	845
KJ561009	498 FG	TILÁPIA	ENCÉFALO	<i>Lactococcus lactis</i> <i>subsp. lactis</i>	Rio Paranapanema (SP/PR)	Primavera 2012	858
KJ561010	S8	TAMBAQUI	PELE	<i>Lactococcus lactis</i> <i>subsp. lactis</i>	AREALVA SP	Inverno 2011	862
KJ561011	A15	TILÁPIA	ENCÉFALO	<i>Lactococcus</i> <i>raffinolactis</i>	CAUNESP SP	Inverno 2011	859
KJ561012	505 FG	TILÁPIA	ENCÉFALO	<i>Lactococcus</i> <i>raffinolactis</i>	Rio Paranapanema (SP/PR)	Primavera 2012	839
KJ561013	A3	TAMBAQUI	PELE	<i>Leucobacter</i> <i>aridicollis</i>	CAUNESP SP	Inverno 2011	830
KJ561014	1sil	PACU	RIM	<i>Aeromonas</i> <i>hydrophila</i>	CAUNESP –SP	Outono 2014	865
KJ561015	5sil	PACU	RIM	<i>Aeromonas</i> <i>hydrophila</i>	CAUNESP SP	Outono 2014	877

KJ561016	10dp	TILÁPIA	PELE	<i>Aeromonas hydrophila</i>	PORTO FERREIRA SP	Primavera 2013	866
KJ561017	9dp	TILÁPIA	BRÂNQUIAS	<i>Aeromonas hydrophila</i>	PORTO FERREIRA SP	Primavera 2013	867
KJ561018	A129	TILÁPIA	RIM	<i>Aeromonas hydrophila</i>	AREALVA SP	Inverno 2011	858
KJ561019	Atcc7966	TILÁPIA		<i>Aeromonas hydrophila</i>	RIO DE JANEIRO	Verão 2011	867
KJ561020	A130	TILÁPIA	PELE	<i>Aeromonas hydrophila</i>	AREALVA SP	Inverno 2011	846
KJ561021	A122	PINTADO	PELE	<i>Aeromonas hydrophila</i>	AREALVA SP	Inverno 2011	846
KJ561022	A133	TILÁPIA	PELE	<i>Aeromonas hydrophila</i>	AREALVA SP	Inverno 2011	851
KJ561023	41FG	TILÁPIA	RIM	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Rio Paranapanema (SP/PR)	Primavera 2012	861
KJ561024	A128	TILÁPIA	PELE	<i>Aeromonas hydrophila</i>	AREALVA SP	Inverno 2011	855
KJ561025	A135	CARPA	PELE	<i>Aeromonas hydrophila</i>	RIO DE JANEIRO	Verão 2011	862
KJ561026	117 FG	TILÁPIA	RIM	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Rio Paranapanema (SP/PR)	Primavera 2012	854
KJ561027	120 FG	TILÁPIA	RIM	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Rio Paranapanema (SP/PR)	Primavera 2012	821

KJ561028	121 FG	TILÁPIA	RIM	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Rio Paranapanema (SP/PR)	Primavera 2012	817
KJ561029	125 FG	TILÁPIA	RIM	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Rio Paranapanema (SP/PR)	Primavera 2012	839
KJ561030	126 FG	TILÁPIA	RIM	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Rio Paranapanema (SP/PR)	Primavera 2012	694
KJ561031	128 FG	TILÁPIA	RIM	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Rio Paranapanema (SP/PR)	Primavera 2012	656
KJ561032	14dp	TILÁPIA	RIM	<i>Aeromonas jandaei</i>	PORTO FERREIRA SP	Primavera 2013	864
KJ561033	A124	TILÁPIA	ENCÉFALO	<i>Aeromonas jandaei</i>	AREALVA SP	Inverno 2011	865
KJ561034	A110	PINTADO	PELE	<i>Aeromonas punctata</i>	AREALVA SP	Inverno 2011	843
KJ561035	7sil	PACU	RIM	<i>Aeromonas veronii</i>	CAUNESP SP	Outono 2014	750
KJ561036	an	TILÁPIA	RIM	<i>Aeromonas veronii</i>	NEPEAN-SP	Outono 2014	806
KJ561037	6sil	PACU	RIM	<i>Aeromonas veronii</i>	CAUNESP SP	Outono 2014	870
KJ561038	5n	TILÁPIA	PELE	<i>Aeromonas veronii</i>	NEPEAN-SP	Primavera 2013	880

KJ561039	1dp	TILÁPIA	RIM	<i>Aeromonas veronii</i>	PORTO FERREIRA SP	Primavera 2013	779
KJ561040	A107	PINTADO	ENCÉFALO	<i>Aeromonas veronii</i>	AREALVA SP - SP	Inverno 2011	859
KJ561041	A115	PINTADO	ENCÉFALO	<i>Aeromonas veronii</i>	AREALVA SP	Inverno 2011	835
KJ561042	A131	TILAPIA	ENCÉFALO	<i>Aeromonas veronii</i>	AREALVA SP	Inverno 2011	854
KJ561043	A119	PINTADO	ENCÉFALO	<i>Aeromonas veronii</i>	AREALVA SP	Inverno 2011	821
KJ561044	A116	PINTADO	ENCÉFALO	<i>Aeromonas veronii</i>	AREALVA SP	Inverno 2011	839
KJ561045	A113	PINTADO	RIM	<i>Aeromonas veronii</i>	AREALVA SP	Inverno 2011	833
KJ561046	A109	PINTADO	ENCÉFALO	<i>Aeromonas veronii</i>	AREALVA SP	Inverno 2011	869
KJ561047	A134	CARPA	PELE	<i>Aeromonas veronii</i>	RIO DE JANEIRO	Verão 2011	855
KJ561048	A136	CARPA	PELE	<i>Aeromonas veronii</i>	RIO DE JANEIRO	Verão 2011	853
KJ561049	A112	PINTADO	MUCO	<i>Aeromonas veronii</i>	AREALVA SP	Inverno 2011	860
KJ561050	124 FG	TILÁPIA	ENCÉFALO	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Rio Paranapanema (SP/PR)	Primavera 2012	806

KJ561051	Zo5	TILÁPIA	ENCÉFALO	<i>Streptococcus agalactiae</i>	GUAÍRA SP	Outono 2014	850
KJ561052	Zo9s	TILÁPIA	ENCÉFALO	<i>Streptococcus agalactiae</i>	GUAÍRA SP	Outono 2014	866
KJ561053	78 FG	TILÁPIA	ENCÉFALO	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Rio Paranapanema (SP/PR)	Primavera 2012	854
KJ561054	99 FG	TILÁPIA	ENCÉFALO	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Rio Paranapanema (SP/PR)	Primavera 2012	865
KJ561055	103 FG	TILÁPIA	ENCÉFALO	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Rio Paranapanema (SP/PR)	Primavera 2012	865
KJ561056	100 FG	TILÁPIA	ENCÉFALO	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Rio Paranapanema (SP/PR)	Primavera 2012	863
KJ561057	104 FG	TILÁPIA	ENCÉFALO	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Rio Paranapanema (SP/PR)	Primavera 2012	859
KJ561058	76 FG	TILÁPIA	ENCÉFALO	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Rio Paranapanema (SP/PR)	Primavera 2012	871
KJ561059	105 FG	TILÁPIA	ENCÉFALO	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Rio Paranapanema (SP/PR)	Primavera 2012	864

KJ561060	77 FG	TILÁPIA	ENCÉFALO	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Rio Paranapanema (SP/PR)	Primavera 2012	866
KJ561061	106 FG	TILÁPIA	ENCÉFALO	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Rio Paranapanema (SP/PR)	Primavera 2012	865
KJ561062	102 FG	TILÁPIA	ENCÉFALO	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Rio Paranapanema (SP/PR)	Primavera 2012	853
KJ561063	18P	TILÁPIA	FÍGADO	<i>Streptococcus agalactiae</i>	ITAMBARACÁ PR	Outono 2010	840
KJ561064	74P	TILÁPIA	ENCÉFALO	<i>Streptococcus agalactiae</i>	ITAMBARACÁ PR	Outono 2011	789
KJ561065	26P	TILÁPIA	RIM	<i>Streptococcus agalactiae</i>	ITAMBARACÁ PR	Outono 2011	855
KJ561066	45P	TILÁPIA	RIM	<i>Streptococcus agalactiae</i>	ITAMBARACÁ PR	Inverno 2011	831
KJ561067	36P	TILÁPIA	FÍGADO	<i>Streptococcus agalactiae</i>	ITAMBARACÁ PR	Verão 2011	853
KJ561068	43P	TILÁPIA	ENCÉFALO	<i>Streptococcus agalactiae</i>	ITAMBARACÁ PR	Inverno 2011	603
KJ561069	110 FG	TILÁPIA	ENCÉFALO	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Rio Paranapanema (SP/PR)	Primavera 2012	422
KJ561070	M	TILÁPIA	ENCÉFALO	<i>Streptococcus agalactiae</i>	ITAMBARACÁ PR	Outono 2011	853

KJ561071	64P	TILÁPIA	ENCÉFALO	<i>Streptococcus agalactiae</i>	ITAMBARACÁ PR	Inverno 2011	681
KJ561072	112 FG	TILÁPIA	ENCÉFALO	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Rio Paranapanema (SP/PR)	Primavera 2012	846
KJ561073	Zo4	TILÁPIA	ENCÉFALO	<i>Streptococcus iniae</i>	GUAÍRA SP	Outono 2014	839
KJ561074	Zo7	TILÁPIA	ENCÉFALO	<i>Streptococcus iniae</i>	GUAÍRA SP	Outono 2014	838
KJ561075	79 FG	TILÁPIA	ENCÉFALO	<i>Streptococcus iniae</i>	Rio Paranapanema (SP/PR)	Verão 2012	859
KJ561076	81 FG	TILÁPIA	ENCÉFALO	<i>Streptococcus iniae</i>	Reservatório de Ilha Solteira, rio Paraná - SP	Verão 2012	862
KJ561077	40ms	BAGRE	RIM	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	MATO GROSSO DO SUL	Primavera 2012	
KJ561078	52 P	TILÁPIA	RIM	<i>Weissella confusa</i>	ITAMBARACÁ PR	Verão 2011	852
KJ561079	23FG	TILÁPIA	RIM	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	Rio Paranapanema (SP/PR)	Primavera 2012	843
KJ561080	C1	CARPA	PELE	<i>Acinetobacter tjernbergiae</i>	RIO DE JANEIRO	Verão 2011	819
KJ561081	30 AM FG	TILÁPIA	RIM	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	Rio Paranapanema (SP/PR)	Primavera 2012	850

KJ561082	84AM FG	TILÁPIA	RIM	<i>Acinetobacter ursingii</i>	Rio Paranapanema (SP/PR)	Primavera 2012	849
KJ561083	96AM FG	TILÁPIA	RIM	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Rio Paranapanema (SP/PR)	Primavera 2012	799
KJ561084	69ROSA FG	TILÁPIA	RIM	<i>Arthrobacter globiformis</i>	Rio Paranapanema (SP/PR)	Primavera 2012	830
KJ561085	57MS	BAGRE	PELE	<i>Bacillus stratosphericus</i>	MATO GROSSO DO SUL	Primavera 2012	828
KJ561086	22ms	BAGRE	RIM	<i>Brevibacillus agri</i>	MATO GROSSO DO SUL	Primavera 2012	833
KJ561087	23ms	BAGRE	RIM	<i>Brevibacillus agri</i>	MATO GROSSO DO SUL	Primavera 2012	727
KJ561088	16ms	BAGRE	PELE	<i>Carnobacterium divergens</i>	MATO GROSSO DO SUL	Primavera 2012	872
KJ561089	11dp	TILÁPIA	PELE	<i>Citrobacter freundii</i>	PORTO FERREIRA SP	Primavera 2013	867
KJ561090	A108	PINTADO	ENCÉFALO	<i>Citrobacter freundii</i>	AREALVA SP	Inverno 2011	856
KJ561091	44 MS	BAGRE	RIM	<i>Citrobacter freundii</i>	MATO GROSSO DO SUL	Primavera 2012	850
KJ561092	54MS	BAGRE	RIM	<i>Citrobacter freundii</i>	MATO GROSSO DO SUL	Primavera 2012	800

KJ561093	1g	PACU	RIM	<i>Citrobacter freundii</i>	CAUNESP SP	Primavera 2013	779
KJ561094	A99	CATFISH	BAÇO	<i>Citrobacter murlinae</i>	DOURADOS MS	Inverno 2011	860
KJ561095	115 FG	TILÁPIA	RIM	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Rio Paranapanema (SP/PR)	Primavera 2012	752
KJ561096	A78	TILÁPIA	PELE	<i>Pseudomonas fulva</i>	AREALVA SP	Inverno 2011	845
KJ561097	A75	TILÁPIA	RIM	<i>Pseudomonas fulva</i>	AREALVA SP	Inverno 2011	813
KJ561098	116 FG	TILÁPIA	RIM	<i>Pseudomonas fulva</i>	Rio Paranapanema (SP/PR)	Primavera 2012	826
KJ561099	114 FG	TILÁPIA	RIM	<i>Pseudomonas libanensis</i>	Rio Paranapanema (SP/PR)	Primavera 2012	827
KJ561100	93FG	TILÁPIA	RIM	<i>Pseudomonas monteilii</i>	Rio Paranapanema (SP/PR)	Primavera 2012	846
KJ561101	A76	TILÁPIA	PELE	<i>Pseudomonas mosselii</i>	AREALVA SP	Inverno 2011	844
KJ561102	A82	TILÁPIA	PELE	<i>Pseudomonas mosselii</i>	AREALVA SP	Inverno 2011	818
KJ561103	A66	TAMBAQUI	PELE	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	AREALVA SP	Inverno 2011	821

KJ561104	94FG	TILÁPIA	RIM	<i>Pseudomonas plecoglossida</i>	Rio Paranapanema (SP/PR)	Primavera 2012	854
KJ561105	4sil	PACU	BRÂNQUIAS	<i>Pseudomonas putida</i>	CAUNESP SP	Outono 2014	856
KJ561106	2sil	PACU	BRÂNQUIAS	<i>Pseudomonas putida</i>	CAUNESP SP	Outono 2014	850
KJ561107	T5-1	TILÁPIA	BAÇO	<i>Pseudomonas putida</i>	PORTO FERREIRA SP	Primavera 2013	862
KJ561108	3sil	PACU	PELE	<i>Pseudomonas putida</i>	CAUNESP SP	Outono 2014	690
KJ561109	49MS	BAGRE	PELE	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	MATO GROSSO DO SUL	Primavera 2012	850
KJ561110	49AM FG	TILÁPIA	RIM	<i>Stenotrophomonas chelatiphaga</i>	Rio Paranapanema (SP/PR)	Primavera 2012	858
KJ561111	22FG	TILÁPIA	RIM	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Rio Paranapanema (SP/PR)	Primavera 2012	867
KJ561112	T3.5b	TILÁPIA	PELE	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	PORTO FERREIRA SP	Primavera 2013	864
KJ561113	A132	TILAPIA	PELE	<i>Comamonas testosteroni</i>	AREALVA SP	Inverno 2011	849

Cepas com final FG são provenientes do LENAQ (Laboratório de Enfermidades de Animais Aquáticos – APTA/Votuporanga).