

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS**  
**CÂMPUS DE DRACENA**

**Sandie Barbosa Bispo dos Santos**

Zootecnista

**ESTUDO DE *LACTOCOCCUS SPP.* E *AEROMONAS***  
***VERONII* ISOLADAS DE TILÁPIA-DO-NILO**  
**CULTIVADAS NO BRASIL**

Dracena

2023

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS**  
**CÂMPUS DE DRACENA**

**Sandie Barbosa Bispo dos Santos**

Zootecnista

**ESTUDO DE *LACTOCOCCUS SPP.* E *AEROMONAS***  
***VERONII* ISOLADAS DE TILÁPIA-DO-NILO**  
**CULTIVADAS NO BRASIL**

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Ciências Agrárias e Tecnológicas –  
Unesp, Câmpus de Dracena como parte  
das exigências para obtenção do título de  
Mestre em Ciência e Tecnologia Animal.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Susumu Takahashi

Dracena

2023

FICHA CATALOGRÁFICA  
Desenvolvida pela Seção Técnica de Biblioteca e Documentação  
Campus de Dracena

S237e

Santos, Sandie Barbosa Bispo dos.

Estudo de *Lactococcus spp.* e *Aeromonas veronii* isoladas de Tilápia-do-nilo cultivadas no Brasil / Sandie Barbosa Bispo dos Santos. -- Dracena: [s.n.], 2023.

81 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas, Dracena. Área do conhecimento: Produção Animal, 2023.

Orientador: Leonardo Susumu Takahashi

1. Tilápia-do-Nilo. 2. Aeromonas. 3. Anti-infecciosos. 4. Septicemia. 5. Bactéria. I. Título.

Bibliotecário Fábio S. Rosas  
CRB 8/6665

## **IMPACTO ESPERADO NA SOCIEDADE**

1. Esclarecer a patologia de duas bactérias emergentes que acometem a cadeia produtiva de tilápia no Brasil, em termos de sinais clínicos observados nos animais; 2. Traçar o perfil de resistência a antimicrobianos dos patógenos estudados, com o objetivo de trazer um tratamento eficaz e assertivo contra estas doenças, por meio de antibiograma e concentração inibitória mínima de antimicrobianos comumente utilizados no Brasil; 3. Publicação de artigos científicos em periódicos internacionais de alta visibilidade na comunidade científica, devida a importância e aplicação dos resultados a serem obtidos, tanto no âmbito nacional como internacional, a fim de produzir tecnologia e conhecimento sobre peixes; 5. Viabilizar a realização da pesquisa científica de qualidade, e elucidar as dúvidas geradas por lacunas ainda existentes devido ao recente problema gerado por estes patógenos; 6. Orientar alunos para execução de pesquisa de qualidade.

1. Clarify the pathology of two emerging bacteria that affect the tilapia production chain in Brazil, in terms of clinical signs observed in the animals; 2. Trace the antimicrobial resistance profile of the studied pathogens, with the aim of providing effective and assertive treatment against these diseases, through antibiogram and minimum inhibitory concentration of antimicrobials most used in Brazil; 3. Publication of scientific articles in international journals of high visibility in the scientific community, due to the importance and application of the results to be obtained, both nationally and internationally, in order to produce technology and knowledge about fish; 5. Make it possible to carry out quality scientific research, and clarify doubts generated by gaps that still exist due to the recent problem generated by these pathogens; 6. Guide students to carry out quality research.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Estudo de *Lactococcus* spp. e *Aeromonas veronii* isoladas de tilápia do Nilo cultivadas no Brasil

AUTORA: SANDIE BARBOSA BISPO DOS SANTOS

ORIENTADOR: LEONARDO SUSUMU TAKAHASHI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciência e Tecnologia Animal, área: Produção Animal pela Comissão Examinadora:

Prof. Associado LEONARDO SUSUMU TAKAHASHI (Participação Virtual) Departamento de Produção Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas - FCAT UNESP Dracena

Profa. Dra. CRISTIÉLE DA SILVA RIBEIRO (Participação Virtual) Departamento de Biologia e Zootecnia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira UNESP

MIGUEL FREDERICO FERNANDEZ ALARCON:31796936812  
Assinado de forma digital por MIGUEL FREDERICO FERNANDEZ ALARCON:31796936812  
Dados: 2023.03.03 12:10:22 -03'00'

MIGUEL FREDERICO FERNANDEZ ALARCON (Participação Virtual) Laboratório Pathovet Limitada

Dracena, 03 de março de 2023

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

Sandie Barbosa Bispo dos Santos, nascida em 10 de abril de 1995, na cidade de Araraquara/SP. Zootecnista formada pela Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas, Unesp, Campus de Dracena/SP (Agosto/2015 a Junho/2020). Durante a graduação foi bolsista do Programa de Ensino Tutorial – Zootecnia (PET-Zoo), onde desenvolveu atividades de ensino, pesquisa e extensão junto à comunidade dracenense (2016-2018). Foi bolsista PROEX (2015), e bolsista FAPESP com o projeto intitulado: Efeito da proteína digestível em variáveis hematológicas de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), desenvolvido durante o ano de 2019. Além disso, foi membro de dois grupos de pesquisa e extensão: GEEO (Grupo de Ensino e Extensão de Ovinocultura - Unesp Dracena – 2015 a 2017) e GAUD (Grupo de Aquicultura da UNESP de Dracena - (2016 a 2020).

## DEDICATÓRIA

À minha família, minha base e ponto de paz. Meu refúgio e apoio incondicional, que possibilitou mais essa conquista.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por me abençoar com pessoas incríveis.

Agradeço aos meus pais, Vanilda Barbosa e David Santos, por não medirem esforços para que eu conquistasse meus objetivos e sonhos. Ao meu irmão e confidente, David Jr.

À Caren por ser paciente e me apoiar em todos os momentos e decisões.

À equipe Pathovet, em especial Miguel, Renata, Mariene e Mateus, fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. Vocês tornaram meus dias mais leves e abriram caminhos importantes para a finalização deste trabalho.

Ao meu orientador Leonardo Takahashi, por não ter desistido do nosso projeto, e ter compreendido os caminhos que tivemos que percorrer para chegar até aqui.

Aos amigos, por serem um porto seguro nos dias mais conturbados.

Aos membros da banca pelas orientações e correções concedidas.

A todos os funcionários e amigos da Unesp Dracena, por toda atenção e trabalho prestado durante esse tempo em que estive neste processo.

E por fim, a todos que estiveram ao meu lado, me apoiando e acreditando que iria dar tudo certo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento nº 88887.610721/2021-00.



“A persistência é o caminho do êxito.” (Charles Chaplin, 1997).

## Comissão de Ética no Uso de Animais

# Certificado

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo de *Lactococcus spp.* e *Aeromonas veronii* isoladas de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) cultivadas no Brasil" (**Study of *Lactococcus spp.* and *Aeromonas veronii* isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultivated in Brazil**), registrada com o nº **16/2023 – CEUA**, sob a responsabilidade do(a) Prof(a). Dr(a). **Leonardo Susumu Takahashi** – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de **pesquisa científica** – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas da UNESP - Câmpus de Dracena, em **24 de outubro de 2023**.

Dracena, 24 de outubro de 2023.



**Prof. Dr. Paulo Renato Matos Lopes**

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

**Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas – Diretoria**

Rod. Cmte. João Ribeiro de Barros, km 651- Bairro das Antas – CEP: 17900-000 – Dracena/SP - Brasil  
Tel. (18) 3821-8200 – [www.dracena.unesp.br](http://www.dracena.unesp.br) - [diretoria.dracena@unesp.br](mailto:diretoria.dracena@unesp.br)

## RESUMO

A intensificação da piscicultura é uma prática crescente em todo o mundo, incluindo no Brasil. Essa prática envolve o uso de técnicas avançadas de produção, tais como a criação de peixes em alta densidade e o uso de alimentos e medicamentos específicos para aumentar o crescimento e a produção. As condições do ambiente, como a qualidade da água, temperatura e oxigênio dissolvido, podem afetar a saúde dos peixes. Desta forma, a intensificação da atividade pode levar a um maior risco de doenças em peixes, devido a uma maior exposição a patógenos e ao estresse causado pelo ambiente em que vivem. Algumas das doenças mais comuns em peixes em sistemas intensivos incluem as causadas por vírus, parasitas, fungos e principalmente bactérias, com destaque para o *Streptococcus sp.* e *Aeromonas sp.*, que provocam um número elevado de morbidade e mortalidade nos peixes. Recentemente estudos relataram o aparecimento de problemas causados por *Lactococcus sp.* no Brasil. Além disso, uma outra espécie de *Aeromonas sp.* mostra grande potencial para infecções responsáveis por grandes prejuízos a criação de tilápia no Brasil. Contudo, o objetivo deste trabalho foi de avaliar a sobrevivência e sinais clínicos de tilápias do Nilo (*O. niloticus*) infectadas com duas bactérias emergentes causadoras de doenças em peixes no Brasil: *Lactococcus spp.* e *Aeromonas veronii*, além de identificar a resistência desses patógenos frente aos principais antimicrobianos utilizados na piscicultura nacional.

**Palavras-chave:** Tilápia-do-Nilo. Aeromonas.. Anti-infecciosos. Septicemia. Bactéria.

## ABSTRACT

The intensification of fish farming is a growing practice all over the world, including in Brazil. This practice involves the use of advanced production techniques, such as raising fish at high density and using specific foods and medicines to increase growth and production. Environmental conditions such as water quality, temperature and dissolved oxygen can affect fish health. In this way, the intensification of activity can lead to a greater risk of disease in fish, due to greater exposure to pathogens and the stress caused by the environment in which they live. Some of the most common diseases in fish in intensive systems include those caused by viruses, parasites, fungi and mainly bacteria, with emphasis on *Streptococcus* sp. and *Aeromonas* sp., which cause a high number of morbidity and mortality in fish. Recently studies have reported the appearance of problems caused by *Lactococcus* sp. in Brazil. Furthermore, another species of *Aeromonas* sp. shows great potential for infections responsible for great damage to tilapia farming in Brazil. However, the objective of this work was to evaluate the survival and clinical signs of Nile tilapia (*O. niloticus*) infected with two emerging bacteria that cause disease in fish in Brazil: *Lactococcus* spp. and *Aeromonas veronii*, in addition to identifying the resistance of these pathogens to the main antimicrobials used in national fish farming.

**Keywords:** Nile Tilapia. *Aeromonas*. Anti-infective agentes. Septicemia. Bacterial infections.

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

- Figura 1** - Isolado bacteriano em placa de *Petri* cultivado 24 h em BOD à 28 °C em meio ágar *Brain Heart Infusion* e resultado após a coloração de Gram. .... 37
- Figura 2** - Representação das curvas de amplificação do DNA de *Lactococcus sp.*..... 38
- Figura 3** - Percentual de mortes acumuladas de tilápias-do-Nilo, infectadas via intraperitoneal com 300 µL de *A. veronii* após 15 dpi. (CN: tilápias inoculadas via intraperitoneal com solução salina)..... 40

### Capítulo 2

- Figura 1** - Isolado bacteriano em placa com meio de cultivo ágar Brain Heart Infusion suplementado com 5% de sangue de carneiro após 24 h em BOD à 28°C e resultado após a coloração de Gram. .... 64
- Figura 2** - Percentual de mortes acumuladas de tilápias-do-Nilo, infectadas via intraperitoneal com 100 µL de *A. veronii* após 15 dpi. (CN: tilápias inoculadas via intraperitoneal com solução salina)..... 71
- Figura 3** - Sinais clínicos observados em juvenis de tilápias-do-Nilo experimentalmente infectados com uma cepa patogênica de *A. veronii*. A) opacidade ocular; B) líquido ascítico; C) presença de líquido no intestino e inchaço; D) lesão no opérculo (seta) e hemorragia na nadadeira; E) corrosão da nadadeira; F) Fígado pálido.....72

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

- Tabela 1** - Formulação e composição química estimada das dietas experimentais de tilápia do nilo, *O. niloticus*..... 32
- Tabela 2** - Tamanho em mm do diâmetro de halo de resistência formado por discos de antimicrobianos e CIM determinados para *Lactococcus sp* ..... 38
- Tabela 3** - Parâmetros de qualidade da água de tilápias-do-Nilo, *O. niloticus*, desafiadas com diferentes concentrações de *Lactococcus sp.* durante 15 dias..... 39
- Tabela 4** - Evolução do aparecimento de sinais clínicos (SC) de tilápia-do-Nilo após o desafio com *Lactococcus sp.* ..... 43

### Capítulo 2

- Tabela 1** - Parâmetros de qualidade da água de tilápias-do-nilo, *O. niloticus*, desafiadas com diferentes concentrações de *A. veronii* durante 15 dias..... 63
- Tabela 2** - Valores de halo de resistência e CIM encontrados para *Lactococcus spp.* frente a diferentes antimicrobianos..... 65

## LISTA DE QUADROS

### Capítulo 2

|                                                                                                                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Quadro 1</b> – Primers utilizados na detecção de genes codificadores de $\beta$ -lactamases e quinolonas, temperatura de anelamento e tamanho dos fragmentos. .... | 62 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

## SUMÁRIO

### Capítulo 1 – Considerações gerais

|                                                      |    |
|------------------------------------------------------|----|
| 1 INTRODUÇÃO .....                                   | 17 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA .....                        | 17 |
| 2.1 Tilapicultura Intensiva.....                     | 17 |
| 2.2 Problemas relacionados à sanidade no Brasil..... | 19 |
| 3 OBJETIVO.....                                      | 21 |
| 3.1Objetivos específicos.....                        | 21 |
| 4 REFERÊNCIAS.....                                   | 22 |

### Capítulo 2 – Avaliação da sobrevivência e sinais clínicos de tilápias do Nilo desafiadas com *Lactococcus spp.* e determinação da resistência à antimicrobianos *in vitro* .....

|                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 INTRODUÇÃO .....                                                             | 27 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA .....                                                  | 28 |
| 2.1 <i>Lactococcus sp</i> .....                                                | 28 |
| 2.2 Diagnóstico.....                                                           | 29 |
| 2.3 Tratamento e profilaxia.....                                               | 30 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS .....                                                     | 31 |
| 3.1 Instalações e condições experimentais.....                                 | 31 |
| 3.2 Delineamento experimental.....                                             | 33 |
| 3.3 Preparação do inóculo e desafio bacteriano por <i>Lactococcus sp</i> ..... | 33 |
| 4 VARIÁVEIS ANALISADAS .....                                                   | 34 |
| 4.1 Sobrevivência.....                                                         | 34 |
| 4.2 Análise dos sinais clínicos.....                                           | 34 |
| 4.3 Diagnóstico microbiológico e molecular .....                               | 34 |
| 4.4 Perfil de resistência antimicrobiana.....                                  | 35 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....                                                  | 36 |
| 6 CONCLUSÃO.....                                                               | 44 |
| 7 REFERÊNCIAS.....                                                             | 45 |



|                                                                                                                                                                             |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Capítulo 3 – Primeiro relato de <i>Aeromonas veronii</i> como um patógeno bacteriano emergente de Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) cultivada no Brasil</b> | <b>51</b> |
| 1 INTRODUÇÃO                                                                                                                                                                | 52        |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA                                                                                                                                                     | 53        |
| 2.1 <i>Aeromonas sp</i>                                                                                                                                                     | 53        |
| 2.2 Resistência à antimicrobianos                                                                                                                                           | 54        |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS                                                                                                                                                        | 57        |
| 3.1 Recebimento de animais doentes                                                                                                                                          | 57        |
| 3.2 Exame bacteriológico                                                                                                                                                    | 57        |
| 3.3 Sequenciamento bacteriano 16s rRNA                                                                                                                                      | 57        |
| 3.4 Infecção experimental                                                                                                                                                   | 58        |
| 3.4.1 Alojamento dos animais                                                                                                                                                | 58        |
| 3.4.2 Delineamento experimental                                                                                                                                             | 59        |
| 3.4.3 Preparação do inóculo e desafio bacteriano por <i>Aeromonas veronii</i> .                                                                                             | 59        |
| 3.5 Variáveis analisadas                                                                                                                                                    | 59        |
| 3.5.1 Sobrevivência e sinais clínicos                                                                                                                                       | 59        |
| 3.5.2 Diagnóstico microbiológico e molecular                                                                                                                                | 59        |
| 3.5.3 Perfil de resistência a antimicrobianos                                                                                                                               | 60        |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO                                                                                                                                                    | 63        |
| 4.1 Condições experimentais                                                                                                                                                 | 63        |
| 4.2 Isolamento, caracterização e análise da sequência 16s rRNA                                                                                                              | 63        |
| 4.3 Perfil de resistência a antimicrobianos                                                                                                                                 | 65        |
| 4.4 Desafio experimental                                                                                                                                                    | 70        |
| 5 CONCLUSÃO                                                                                                                                                                 | 73        |
| 6 REFERÊNCIAS                                                                                                                                                               | 73        |

## 1 INTRODUÇÃO

A piscicultura é uma das atividades mais promissoras para o agronegócio brasileiro, além da elevada disponibilidade dos recursos hídricos, tem-se condições climáticas favoráveis e espécies passíveis de cultivo. Além da vasta quantidade de terras, o Brasil possui a maior reserva de água doce do planeta, com mais de 8 mil km<sup>3</sup>, muito superior à do segundo colocado, a Rússia, com cerca de 4,5 mil km<sup>3</sup>. Por conta disso, o país possui um alto potencial para a atividade, e isto vem sendo observado através do crescimento expressivo do setor, que apresentou um crescimento acumulado de 45%, desde 2014. No país a tilápia consolida-se cada vez mais como a espécie mais cultivada. Em 2021, foram produzidas 534.005 toneladas, com aumento de 9,8% sobre o desempenho do ano anterior (486.155 t). Com esse resultado, a tilápia participou com 63,5% da produção nacional de peixes de cultivo (Peixe BR, 2022).

À medida que a aquicultura se expande e intensifica, aumentam também os desafios ambientais dentro desses sistemas. São utilizadas altas densidades de estocagem, sendo comum o surgimento de problemas de manejo, má qualidade da água, questões nutricionais, entre outros (Kubitza, 1999; 2009). Estes fatores de estresse refletem-se na homeostasia dos peixes, predispondo-os ao ataque de organismos patogênicos (Dias *et al.*, 2008).

Assim como outras espécies de peixes de aquicultura, em condições de estresse nos sistemas de produção intensivo, a tilápia também é suscetível a várias doenças bacterianas, como a estreptococose causada por *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus iniae* ou *Lactococcus garviae* (Suanyuk *et al.* 2008; Anshary *et al.*, 2014; Kayansamruaj *et al.*, 2014); franciselose causada por *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* (Soto *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2015) columnaris causada por *Flavobacterium columnare* (Figueiredo *et al.* 2005; Dong *et al.* 2016); septicemia hemorrágica causada por *Aeromonas* spp. (Li & Cai 2011); entre outros.

## 1 REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1 Tilapicultura intensiva

No âmbito da produção de alimentos, a aquicultura vem se consolidando como o setor que cresceu mais rapidamente nos últimos anos (Garlock *et al.*, 2020). A produção aquícola ultrapassou 82 milhões de toneladas de pescados e

a atividade já ultrapassou a pesca em mais de 30 países, representando 53% de toda a produção da carne de peixes (FAO, 2020).

O Brasil ocupa a oitava colocação no ranking mundial dos maiores produtores de peixes e a atividade gera resultados socioeconômicos expressivos, sendo que a piscicultura é o grande destaque no país, com mais de 200 mil fazendas de piscicultura de água doce em atividade (Valenti *et al.*, 2021).

O sucesso produtivo brasileiro se deve, especialmente, a grandes extensões territoriais, boa disponibilidade de recursos hídricos, áreas para construções de tanques e açudes e muitas espécies passíveis de cultivo (FAO, 2018; Ana, 2020; Menezes *et al.*, 2003). Soma-se a isto, o fato de a carne de peixe ser reconhecida como um dos alimentos mais saudáveis pela boa composição de aminoácidos e ácidos-graxos poli-insaturados (Xu *et al.*, 2019).

De acordo com os dados divulgados pela Peixe BR, o país produziu 841.005 toneladas de peixe de cultivo em 2021 e esse resultado representa um aumento de 4,7% quando comparado com a produção de 2020 (Peixe BR, 2022). A tilápia consolida-se como o peixe mais cultivado no Brasil, correspondendo a 534.005 toneladas no país, o equivalente a 63,5% da produção nacional de peixes de cultivo.

Originária da África e Palestina (Phillippart e Ruwet, 1982), o nome tilápia é comum para várias espécies da família Cichlidae e engloba os gêneros *Oreochromis* e *Sarotherodon* (Trewavas, 1983). A tilápia possui o corpo lateralmente comprido, coberto com grandes escamas cicloides e nadadeiras dorsais (El-Sayed, 2019).

A consolidação da tilápia como a segunda espécie mais cultivada no mundo pode ser justificada pela boa adaptação aos diferentes tipos de cultivo, rusticidade e fácil reprodução, resistência à baixos teores de oxigênio dissolvido e à alta densidade populacional. Além disso, sabe-se que quando submetidas ao cultivo intensivo, a tilápia apresenta um crescimento acelerado (Schwarz *et al.*, 2010; El-Sayed; Kawanna 2004; Kubitzka, 2000; Gall; Bakar, 1999). No Brasil, sua criação é realizada em tanques-redes, de maneira intensiva, e nos grandes reservatórios hidroelétricos (Scorvo Filho *et al.*, 2010).

Contudo, a intensificação da atividade, tem levado a uma maior ocorrência de enfermidades ocasionadas por agentes oportunistas podendo resultar em grandes perdas econômicas (Farias *et al.*, 2016). Nos sistemas

intensivos, a criação de peixes em tanques-rede, *raceway* e sistema de recirculação se baseiam em altas densidades de estocagem, aumentando o contato físico entre os animais e a transmissão desses agentes. Sabe-se ainda, que quando expostos a uma situação de estresse, a concentração plasmática de cortisol se eleva e os mecanismos de defesa diminuem, deixando-os predispostos às doenças (Pilarski; Sakabe, 2009; Urbinati; Carneiro, 2004).

O surgimento de doenças, muitas vezes, é causado pelo desequilíbrio da relação hospedeiro-patógeno-ambiente (Moraes; Martins, 2004). Os problemas sanitários como manejo inadequado e má qualidade de água, são responsáveis por predispor o surgimento de doenças, especialmente as de etiologia bacteriana (Mallasen *et al.*, 2008).

### **1.2 Problemas relacionados a sanidade no Brasil**

O aumento significativo das atividades relacionadas à aquicultura, observado no Brasil e no mundo, tem aumentado consideravelmente a relevância dos estudos desenvolvidos com parasitas, bactérias e outros patógenos de organismos aquáticos, principalmente daqueles hospedeiros com potencial para o cultivo e para a comercialização (Thatcher; Brites-Neto, 1994).

Embora os peixes tenham a capacidade natural de responder fisiologicamente adaptando-se às alterações provocadas por essas condições estressantes, em casos de estresse crônico, o animal perde a capacidade de adaptabilidade, tornando-se mais susceptível às doenças e, em casos mais extremos, a morte é inevitável (Merighe *et al.*, 2004). Desta forma, nos sistemas de produção intensiva de peixes, a sanidade é um dos aspectos mais relevantes para a criação comercial de qualquer espécie.

As bactérias constituem o grupo de agentes etiológicos economicamente mais significantes para a aquicultura, pois todas as espécies de peixes são susceptíveis às infecções, além da fácil propagação, uma vez que estes microorganismos ocorrem naturalmente no ambiente aquático (Costa, 2001), além de ocasionar grande impacto econômico devido a doenças que provocam.

As taxas de mortalidade podem ser bastante elevadas em surtos causados por esses organismos, uma vez que o tratamento é bastante difícil e muitas vezes ineficaz. Por esta razão, tais doenças são de declaração obrigatória em muitos países (Pavanelli *et al.*, 2008). Ademais, as perdas causadas por

diferentes patógenos representam um fator determinante para o sucesso da piscicultura, pois além de disseminar agentes patogênicos para o ambiente, representam riscos à saúde pública (Braccini *et al.*, 2008). Neste cenário, destaca-se a importância do diagnóstico laboratorial para a realização do tratamento, uma vez que a utilização inadequada de um produto pode causar impacto negativo, tanto nos peixes como no meio ambiente, bem como levar ao surgimento de espécies de bactérias resistentes (Vargas, 2004).

Embora existam inúmeras bactérias patogênicas, algumas delas são de ocorrência frequente e apresentam maior impacto econômico na produção comercial de peixes cultivados, como: *Streptococcus spp.* (Rosenbach, 1884), *Aeromonas spp.* (Kluyver; Van Niel, 1936), *Pseudomonas spp.* (Migula, 1894) e *Flavobacterium columnare* (Bernardet *et al.*, 2002) (Kubtiza; Kubtiza, 2004).

Recentemente o Brasil lida com o surgimento de problemas relacionados à lactococose, uma doença emergente causada pela bactéria *Lactococcus spp.* Duas principais espécies de *Lactococcus* têm sido associadas com infecções em peixes, sendo *Lactococcus garvieae* e, mais recentemente, *Lactococcus petauri*. Ambos patógenos compartilham muitas similaridades fenotípicas, genéticas, bem como na patologia que ocasionam nos animais, causando ainda doenças similares às estreptococoses, que são amplamente conhecidas pelos criadores de tilápia.

Quando surtos de doenças ocorrem, a utilização de antimicrobianos e quimioterápicos é a maneira mais efetiva de controlar as enfermidades e reduzir a oportunidade de transmissão de patógenos para todo o plantel. Na aquacultura, os antibióticos são frequentemente administrados, por curtos períodos, em níveis terapêuticos, por via oral.

Todavia a utilização dessas substâncias na piscicultura pode contaminar o corpo hídrico, contribuir para o aparecimento de microorganismos resistentes e provocar impactos adversos em espécies não-alvo, colocando em risco toda a cadeia trófica e a saúde do ser humano (Midlen; Redding, 1998; Treves-Brown, 2000; Cabello *et al.*, 2013).

### 3 OBJETIVO

Avaliar tilápias do Nilo (*O. niloticus*) infectadas com duas bactérias emergentes causadoras de doenças em peixes no Brasil: *Lactococcus spp.* e *Aeromonas veronii*.

#### 3.1 Objetivos específicos

I. Avaliar o efeito da infecção com diferentes concentrações de *Lactococcus spp.* e *Aeromonas veronii* em tilápia do Nilo: sobrevivência e sinais clínicos.

II. Determinar, fenotipicamente, o perfil de resistência aos principais antimicrobianos utilizados na aquicultura nacional, para ambas as bactérias estudadas.

III. Caracterizar, genotipicamente, a resistência aos antimicrobianos em *Aeromonas veronii*.

#### 4 REFERÊNCIAS

- ANSHARY, H.; KURNIAWAN, R. A.; SRIWULAN, S.; RAMLI, R.; BAXA, D. V. Isolation and molecular identification of the etiological agents of streptococcosis in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in net cages in Lake Sentani, Papua, Indonesia. **SpringerPlus**, v. 3, p. 627, 2014. DOI 10.1186/2193-1801-3-627.
- BRACCINI, G. L.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R. P.; FILHO, L. A.; DIGMAYER, M. Ectoparasitos de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) cultivados em tanques-rede nos rios do Corvo e Guairacá, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, p. 24-29, 2008.
- CABELLO, F. C.; GODFREY, H. P.; TOMOVA, A.; IVANOVA, L.; DÖLZ, H.; MILLANAO, A.; BUSCHMANN, A. H. Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. **Environmental Microbiology**, v. 15, p. 1917-1942, 2013.
- COSTA, A. B. BACTERIOSES EM PISCICULTURA: MANEJO E PREVENÇÃO. IN: MATTOS, W. R. S. **A produção animal na visão dos brasileiros**. Piracicaba: Sociedade Brasileira de Zootecnia; FEALQ, 2001. p. 551-558.
- DIAS, P. G.; FURUYA, W. M.; PAVANELLI, G. C.; MACHADO, M. H.; TAKEMOTO, R. M. Carga parasitária de Rondonia rondoni, Travassos, 1920 (Nematoda, Atractidae) e fator de condição do armado, *Pterodoras granulosus*, Valenciennes, 1833 (Pisces, Doradidae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 26, p. 151-156, 2008.
- DONG, H. T.; SENAPIN, S.; LAFRENTZ, B.; RODKHUM, C. Virulence assay of rhizoid and non-rhizoid morphotypes of *Flavobacterium columnare* in red tilapia, *Oreochromis sp.*, fry. **Journal of Fish Diseases**, v. 39, p. 649–655, 2016.
- EL-SAYED, A. F. M. Tilapia Culture. 2. ed. [S.l.]: Academic Press, 2019. 358 p.
- EL-SAYED, A. F. M.; KAWANNA, M. Effects of photoperiod on the performance of farmed Nile tilapia *Oreochromis niloticus* I-Growth, feed utilization efficiency and survival of fry and fingerlings. **Aquaculture**, v. 231, p. 393-402, 2004.
- FAO. **The state of world fisheries and aquaculture 2018**: meeting the sustainable development goals. Rome: FAO, 2018.
- FAO. **The state of world fisheries and aquaculture 2020**: sustainability in action. Rome: FAO, 2020. DOI 10.4060/ca9229en
- FARIAS, T. H. V., LEVY-PEREIRA, N., DE OLIVEIRA ALVES, L., DE CARLA DIAS, D., TACHIBANA, L., PILARSKI, F., RANZANI-PAIVA, M. J. T. (2016). Probiotic feeding improves the immunity of pacus, *Piaractus mesopotamicus*, during *Aeromonas hydrophila* infection. *Animal Feed Science and Technology*, 211, 137–144. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2015.11.004

FIGUEIREDO, H. C. P.; KLESIOUS, P. H.; ARIAS, C. R.; EVANS, J.; SHOEMAKER, C. A.; PEREIRA, D. J.; PEIXOTO, M. T. D. Isolation and characterization of strains of *Flavobacterium columnare* from Brazil. **Journal of Fish Diseases**, v. 28, n. 4, p. 199–204, abr. 2005. DOI 10.1111/j.1365-2761.2005.00616.x

GALL, G. A. E.; BAKAR, Y. Stocking density and tank size in the design of breed improvement programs for body size of tilapia. **Aquaculture**, v. 173, n. 1–4, p. 197–205, mar. 1999. DOI 10.1016/S0044-8486(98)00487-6

GARLOCK, T.; ASCHE, F.; ANDERSON, J.; BJØRNDAL, T.; KUMAR, G.; LORENZEN, K.; ROPICKI, A.; SMITH, M. D.; TVETERÅS, R. A Global Blue Revolution: Aquaculture Growth Across Regions, Species, and Countries. **Reviews in Fisheries Science & Aquaculture**, v. 28, n. 1, p. 107–116, 2 jan. 2020. DOI: 10.1080/23308249.2019.1678111

KUBITZA, F. **Qualidade da água na produção de peixes**. Piracicaba: ESALQ, 1999.

KUBITZA, F. **Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial**. Jundiaí: F. Kubitz, 2000. 285 p.

KUBITZA, F. Manejo na produção de peixes. **Panorama da Aquicultura**, v. 19, p. 14-23, 2009.

KUBTIZA, F.; KUBTIZA, L. M. M. Principais parasitoses e doenças dos peixes cultivados, 4. ed. Jundiaí: F. Kubitz, 2004. 118 p.

LIN, Q.; LI, N.; FU, X.; HU, Q.; CHANG, O.; LIU, L.; ZHANG, D.; WANG, G.; SAN, G.; WU, S. An outbreak of granulomatous inflammation associated with *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* in farmed tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) in China. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v. 33, p. 1-7, 2015.

MALLASEN, M.; BARROS, H. P.; YAMASHITA, E. Y. Produção de peixes em tanques-rede e a qualidade da água. **Revista Tecnologia e Inovação Agropecuária**, v. 1, n. 1, p. 48-51, 2008.

MENEZES, N. A.; BUCKUP, P. A.; FIGUEIREDO, J. L.; MOURA, R. L. **Catálogo das espécies de peixes marinhos do Brasil**. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003. 159 p.

MERIGHE G. K. F.; PEREIRA-DA-SILVA E. M.; NEGRÃO J. A.; RIBEIRO S. Efeito da cor do ambiente sobre o estresse social em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 4, p. 828-837, 2004.

MIDLEN, A.; REDDING, T. A. Environmental management for aquaculture. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998.



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

PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M. **Doença de peixes, profilaxia, diagnóstico e tratamento**. Maringá: Eduem, 2008. 311 p.

PEIXE BR. **Anuário PeixeBr da piscicultura**. [S.l.]: Associação Brasileira da Piscicultura, 2022.

PHILIPPART, J. C.; RUWET, J. C. Ecology and Distribution of Tilapias. *In*: PULLIN; LOWE-MCCONEL (ed.). THE BIOLOGY AND CULTURE OF TILAPIAS - ICLARM CONFERENCE, 1982, Manila. **Proceedings** [...]. Manila: Int. Center for Living Aquatic Resources Management, 1982. p. 15-59.

PILARSKI, F.; SAKABE, R. Principais enfermidades diagnosticadas no Estado de São Paulo: profilaxia ou tratamento? *In*: Palestras do SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE NUTRIÇÃO E SAÚDE DE PEIXES, 2009, São Paulo. **Palestras** [...]. Bocutatu: [s.n.], 2009.

SCHWARZ, K. K.; FURUYA, W. M.; NATALI, M. R. M.; MICHELATO, M.; GUALDEZI, M. C. Mananoligossacarídeo em dietas para juvenis de tilápias do Nilo. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 32, n. 2, p. 197–203, 6 jul. 2010.

SCORVO FILHO, J. D.; FRASCÁ-SCORVO, C. M. D.; ALVES, J. M. C.; SOUZA, F. R. A. A tilapicultura e seus insumos, relações econômicas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39 (suplemento especial), p. 112-118, 2010.

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, n. 1, p. 35–40, 1 nov. 2008.

THATCHER, V. E.; BRITES-NETO, J. Diagnóstico, prevenção e tratamento das enfermidades de peixes neotropicais de água doce. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 16, p. 111-128, 1994.

TREVES-BROWN, K. M. **Anaesthetics in applied fish pharmacology**. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, 2000.

TREWAVAS, E. **Tilapine fishes of the Genera Sarotherodon, Oreochromis and Danakilia**. London: British Museum (Natural History), 1983. 583 p.

URBINATI, E. C.; CARNEIRO, P. C. F. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. *In*: CYRINO, J. E. P.; URBINATE, E. C.; FRACALLOSSI, D. M.; CASTAGNOLLI, N. (ed.), **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004. cap. 6. p. 171-193.

VALENTI, W. C.; BARROS, H. P.; MORAES-VALENTI, P.; BUENO, G. W.; CAVALLI, R. O. Aquaculture in Brazil: past, present and future. **Aquaculture Reports**, v. 19, 2021. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/207202>. Acesso em: 01 jan. 2023.

VARGAS, L. Efeito da vitamina C, da vitamina E, do cloreto de sódio e da formalina na ocorrência de ectoparasitos em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *In*: RANZANI-PAIVA, M. J. T.; TAKEMOTO, R. M.; LIMA, M. L. A. P. **Sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo: Livraria Varela, 2004. p. 371-382.

XU, H.; LIAO, Z.; ZHANG, Q.; WEI, Y.; LIANG, M. A moderately high level of dietary lipid inhibited the protein secretion function of liver in juvenile tiges puffer *Takifugu rubripes*. **Aquaculture**, v. 498, p. 17-27, 2019.

**Capítulo 2** – Avaliação da sobrevivência e sinais clínicos de tilápias do Nilo desafiadas com *Lactococcus spp.* e determinação da resistência à antimicrobianos *in vitro*.

## RESUMO

Um novo patógeno da tilápia tem se espalhado pelo país nos últimos anos. Relatos no aumento da frequência de infecções por bactérias do gênero *Lactococcus* em tilápias no Brasil. Apesar de haver frequência mais elevada de infecção por este patógeno em outras espécies de peixes em diversos lugares no mundo, apenas alguns casos esporádicos tinham sido relatados em nosso país até 2020. Esta bactéria é o agente causador da lactococose, uma septicemia hemorrágica hiperaguda de peixes, responsável por perdas econômicas significativas na aquicultura. Este trabalho teve como objetivo avaliar a sobrevivência e sinais clínicos em tilápias do Nilo infectadas com *Lactococcus sp.* e determinar o perfil de resistência à antimicrobianos desta bactéria. 240 animais de 9 a 10 g foram distribuídos em 24 aquários, sendo 6 repetições de quatro tratamentos (CN = Controle negativo, INF  $10^5 = 1,2 \times 10^5$ , INF  $10^6 = 1,2 \times 10^6$  e INF  $10^8 = 41,2 \times 10^8$ ). A taxa de mortalidade variou de 5 a 13% entre os tratamentos. Foi possível observar o aparecimento de sinais clínicos da doença durante o período experimental, como apatia, natação errática, opacidade ocular, escurecimento de pele, ascite e corrosão de nadadeiras. A cepa estudada demonstrou perfil de resistência intermediário para quatro antimicrobianos testados, amoxicilina, enrofloxacina, florfenicol e oxitetraciclina.

## 1 INTRODUÇÃO

A piscicultura constitui-se de um tipo de exploração animal que vem se tornando cada vez mais importante como fonte de proteínas para o consumo humano. No contexto internacional, o Brasil se coloca como um dos países com grande potencial para a piscicultura, pois possui um vasto território e suas condições climáticas favorecem o implemento de cultivo de peixes de água doce (Pavanelli; Eiras & Takemoto; 2008).

A tecnologia de piscicultura em tanques-rede vem sendo amplamente difundida no Brasil, uma vez que possibilita o aproveitamento de recursos aquáticos já existentes e exige menores investimentos quando comparado à piscicultura tradicional, praticada em tanques escavados ou revestidos (Ono & Kubtiza, 1999).

O sistema de cultivo de peixes em tanques-rede é caracterizado pela utilização de altas densidades de estocagem, sendo comuns neste tipo de exploração problemas de manejo, má qualidade da água, questões nutricionais, entre outros (Thatcher & Brites-Neto, 1994; Kubtiza, 2000). Estes fatores de estresse ambiental podem afetar a homeostasia dos peixes, predispondo-os ao ataque de organismos patogênicos (Pavanelli *et al.* 2008).

A lactococose é uma doença emergente que pode ocasionar grandes prejuízos na produção. O agente etiológico associado têm sido o *Lactococcus garvieae* (Bwalya *et al.*, 2020; Nishiki *et al.*, 2016; Ortega *et al.*, 2020; Rao *et al.*, 2021). A infestação bacteriana já foi encontrada para diferentes espécies, além da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), como na truta arco-íris (*Onchorhynchus mykiss*), no surubim (*Pseudoplatystoma sp*), bijupirá (*Ranchycentron canadum*), no olho-de-boi (*Seriola quinquardadiata*) e no amberjack (*Seriola dumerili*) (Nishiki *et al.*, 2011; Tavares *et al.*, 2018; Sebastião *et al.*, 2019; Karami *et al.*, 2019; Rao *et al.*, 2021; Bwalya *et al.*, 2020). Entretanto, existem estudos que identificam o *Lactococcus petauri* como responsável por altas taxas de mortalidade em tilápia (Egger *et al.*, 2023).

## 1 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 *Lactococcus* sp.

*Lactococcus* spp. são pertencentes ao filo *Firmicutes*, família *Streptococcus*, ordem *Lactobacillus* são consideradas uma bactéria emergente, responsável por causar altas mortalidades (Vendrell *et al.*, 2006).

É uma bactéria Gram-positiva de cocos ovoides, anaeróbica facultativa, não esporulada, possuindo dois sorotipos, KG+ e KG-, sendo o segundo o mais virulento (Teixeira, 1996; Zlotkin, 1998; Fefer *et al.*, 1998; Soltani *et al.*, 2021).

A doença pode ser transmitida de forma horizontal, ou seja, de peixe para peixe, através da contaminação da água, por meio de bactérias liberadas por peixes moribundos ou já mortos, via fecal-oral ou de forma oportunista, que ocorre através da penetração deste patógeno através de injúrias no peixe causadas por parasitas. Além disso, a infecção pode variar entre as formas agudas e crônicas de acordo com a espécie, idade dos animais e condições ambientais (Chang *et al.*, 2002; Evans *et al.*, 2009; Avci *et al.*, 2014; Türe *et al.*, 2014).

A lactococose pode trazer prejuízos tanto à piscicultura marinha como a de água doce, acometendo a produção de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), yellowtail (*Seriola quinqueradiata*), bijubirá (*Ranchycentron canadum*) e amberjack (*Seriola dumerili*) (Bwalya *et al.*, 2020; Karami *et al.*, 2019; Nishiki *et al.*, 2011; Rao *et al.*, 2021). No cultivo da tilápia do Nilo, infecções por *L. garvieae*, passaram a ser frequentemente reportadas (Anshary *et al.*, 2014; Osman *et al.*, 2017; Tsai *et al.*, 2012). No Brasil, a primeira identificação e caracterização dessa bactéria foi feita por Evans & Shoemaker em 2009.

Os sintomas clínicos são os semelhantes aos causados pelas bactérias do gênero *Streptococcus*, tais como: exoftalmia, conjuntivite, melanose, natação errática, anorexia, hemorragia interna e congestão vascular (Bwalya *et al.*, 2021). Nota-se também que os tecidos mais irrigados como região bucal, perianal e nadadeiras são intensamente afetados (Domenech *et al.*, 1993). Foi observado em testes experimentais que o tempo de incubação da doença é muito curto, demonstrando que a bactéria age com alta virulência em seus hospedeiros (Vendrell *et al.*, 2006).

As tilápias apresentam os sinais clínicos mais graves quando a infecção ocorre em temperaturas próxima a 20°C, combinado com nível baixo de oxigênio

dissolvido e concentração de amônia em excesso (Vendrell *et al.*, 2006), ocasionando o rebaixamento de carcaça, lesões cutâneas, redução da taxa de crescimento e elevadas mortalidades (Bwalya *et al.*, 2021).

A crescente ocorrência de lactococose indicam a importância do monitoramento da produção, garantindo a biossegurança dos animais.

Apesar da existência de diagnósticos através de testes bioquímicos e antigênicos, o resultado é incerto devido à dificuldade em diferenciar as várias espécies de *Lactococcus* sp. Desta maneira, o único teste capaz de diferenciá-los com exatidão são os ensaios utilizando a técnica de reação em cadeia a polimerase (Eldar *et al.*, 1999).

## 2.2 Diagnóstico

Diante das doenças que acometem a produção, a comunidade científica desenvolveu diversos protocolos para o diagnóstico molecular dos principais patógenos de peixes (Vendrell *et al.*, 2006). A utilização desses protocolos moleculares demonstra uma ferramenta segura, eficiente e rápida para diagnóstico das doenças, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Caracterizada como uma técnica que permite a replicação *in vitro* do DNA de uma maneira extremamente rápida.

O gene 16S rRNA é reconhecido por apresentar regiões conservadas ou variáveis em todos os seres procariotos, sendo que o sequenciamento de fragmentos que combinam estas regiões é utilizado para a distinção e identificação de espécies. O interesse em utilizar esse gene pode ser explicado pelo fato dos primeiros nucleotídeos do terminal 5' do segmento 16s rRNA conterem informações necessários para um sequenciamento (Claesson *et al.*, 2010).

Por outro lado, a PCR quantitativa em tempo real (qPCR) se dá numa reação de PCR cuja detecção dos amplicons é simultânea à amplificação. Esta estratégia não possui etapas posteriores, como a utilização do gel de eletroforese, ELISA ou Blots. Essa técnica tem sido utilizada a fim de detectar patógenos e analisar expressões gênicas.

A qPCR têm o seu princípio na fluorescência da reação à medida que o DNA dupla fita é gerado, necessitando da presença de uma gente fluorescente

que se incorpora ao DNA dupla fita (Peirson & Butler, 2007). A reação de amplificação em tempo real, representou um grande avanço nos diagnósticos por facilitar a quantificação da expressão gênica em amostras biológicas (Wilson & Carson, 2001).

### 2.3 Tratamento e profilaxia

Os antimicrobianos são utilizados como uma medida eficiente no controle de doenças no cultivo de peixes. Contudo, o uso desenfreado dessas substâncias químicas tem levado a um aumento na resistência bacteriana frente a este tipo de tratamento (Robinson *et al.*, 1966; Katao *et al.*, 1982). Os medicamentos mais utilizados em surtos de lactococose em trutas arco-íris foram oxitetraciclina, amoxilina, eritromicina e doxiciclina de baixo nível. Embora essas substâncias demonstrem alguma eficiência em condições produtivas, a bactéria condiciona o animal rapidamente à uma situação anoréxica, além do desenvolvimento de cepas resistentes aos princípios ativos desses fármacos.

Outra opção que tem sido utilizada e demonstra-se como uma medida bastante eficiente no controle da lactococose é a vacinação dos peixes. Vacinas autógenas na forma inativada de *L. garvieae* estão sendo comumente implantadas como medidas preventivas na piscicultura (Bercovier *et al.*, 1997). As primeiras vacinas experimentais preparadas contra *L. garvieae* estimularam a imunidade de linguado (*Scophthalmus maximus*), truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e tilápia (*Oreochromis niloticus*), quando administradas via intraperitoneal (Toranzo *et al.*, 1995; Bercovier *et al.*, 1997). Vendrell *et al.*, (2007) avaliaram a eficiência da vacina Ichtiovac-Lg emulsificada com o adjuvante mineral Aquamun aplicada intraperitonealmente em trutas arco-íris e o resultado foi de 100% na sobrevivência pós desafio.

Como manejos diários de uma piscicultura, o manejo sanitário é um ponto chave para garantir a biossegurança da produção. Tal medida, evita ou tenta evitar a introdução de patógenos no ambiente aquático (Vendrell *et al.*, 2006). A limpeza periódica dos tanques, desinfecção de todos os utensílios da piscicultura, eliminação de peixes mortos ou moribundos são medidas importantes na prevenção de doenças. Além disso, exigir documentos certificando a garantia que os peixes do novo lote estão livres de doenças, mantê-los em quarentena por um período, são medidas que podem impedir os

surtos de lactococose na piscicultura (Yasunaga *et al.*, 1982; Romalde *et al.*, 2004; Brown *et al.*, 1996).

Outra ação fundamental é o monitoramento dos parâmetros físico-químicos da água de cultivo, pois sabe-se que o *Lactococcus spp.* começa a causar alta taxa de mortalidade quando a temperatura da água se encontra fora da zona de conforto térmico para determinada espécie, somado à baixos teores de oxigênio dissolvido com grande concentração de amônia total na água (Fukuda *et al.*, 1997; Hurvitz, 1997; Brown *et al.*, 1993).

### **3 MATERIAL E MÉTODO**

#### **3.1 Instalações e condições experimentais**

O estudo foi realizado nas instalações do laboratório Pathovet, situado em Ribeirão Preto/SP. O alojamento de 1000 tilápias, com peso médio de 9 a 10 g, foi realizado no dia 30/08/2022. Imediatamente após a chegada dos peixes nas instalações do laboratório Pathovet, estes foram alocados em tanques de 500 L e 250 L, em média 14 g de peixe vivo por litro de água em ambas as caixas.

Após o alojamento dos peixes, foi iniciado o tratamento preventivo com sal (1 ppm) por 7 dias e fornecimento de ração contendo oxitetraciclina (TM®-700, Phibro Saúde Animal Internacional Ltda, Brasil) respeitando a recomendação do produto de 11,85 g de TM-700 por kg de peso vivo/dia. Foi utilizada uma ração formulada para atender aos níveis de nutrientes exigidos para tilápia, produzida pela Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios - Instituto de Pesca, São José do Rio Preto com formulação demonstrada na Tabela 1.



**Tabela 1.** Formulação e composição química estimada das dietas experimentais de tilápia do Nilo, *O. niloticus*.

| <b>Ingredientes %</b>                       |          |
|---------------------------------------------|----------|
| Farelo de soja                              | 17,11    |
| Concentrado protéico de soja (60% PB)       | 14,11    |
| Farinha de vísceras de aves                 | 18,00    |
| Milho moído                                 | 18,58    |
| Farelo de trigo                             | 9,00     |
| Quirera de arroz                            | 8,00     |
| Farinha de carne                            | 6,69     |
| Protenose                                   | 3,45     |
| Fosfato bicálcico                           | 0,75     |
| Premix                                      | 0,60     |
| Óleo de soja                                | 3,00     |
| Antifúngico (Filax)                         | 0,20     |
| Sal                                         | 0,30     |
| DL-Metionina                                | 0,17     |
| Antioxidante (Banox)                        | 0,05     |
| <b>Composição química calculada*(%)</b>     |          |
| Umidade                                     | 9,36     |
| Proteína bruta                              | 36       |
| Lipídio total                               | 9,18     |
| Fibra                                       | 3,02     |
| Amido                                       | 25       |
| Cinzas                                      | 8,97     |
| Cálcio                                      | 2,36     |
| Fósforo                                     | 1,4      |
| Energia digestível (kcal.kg <sup>-1</sup> ) | 3.100,00 |
| Proteína digestível                         | 30,93    |
| Lisina total                                | 2,7      |
| Metionina + Cisteína total                  | 0,95     |
| Triptofano                                  | 0,39     |
| Treonina                                    | 1,35     |

<sup>1</sup>Premix: vit A 12,000 IU; vit D3 3000 IU; vit E 150 mg; vit K3 15 mg; vit B1 20 mg; vit B2 20 mg; vit B6 17,50 mg; vit B12 40 mg; vit C 300 mg; ácido nicotínico 100 mg; ácido pantotênico 50 mg; biotina 1 mg; ácido fólico 6 mg; antioxidante 25 mg; Cu 17,50 mg; Fe 100 mg; Mn 50 mg; Zn 120 mg; I 0,80 mg; Se 0,50 mg; Co 0,40 mg; 125 mg de inositol; colina 500 mg.

Posteriormente os animais foram pesados e distribuídos em 24 aquários de 62,5 L de volume útil para aclimação por 7 dias.

Durante o tratamento preventivo e na aclimação dos peixes foi realizado o controle de qualidade da água, através da mensuração dos níveis de oxigênio e temperatura por meio de um medidor de oxigênio dissolvido e

temperatura (HI9146, Hanna Instruments Brasil Imp. e Exp. LTDA, Barueri/SP, Brasil), pH, amônia, Cl livre e nitrito utilizando kits e equipamento Fotômetro Multi-parâmetros com CQO (HI83399, Hanna Instruments Brasil Imp. e Exp. LTDA, Barueri/SP, Brasil). Ademais, a temperatura média da água nos tanques foi mantida a 23°C por meio de aquecedores com termostato integrado Roxin Ht1300/Q3 e sala climatizada a 23°C durante todo período experimental.

Após o período de aclimação, os peixes foram anestesiados com uma solução de óleo de cravo 1 g 10 L<sup>-1</sup> (Gonçalves *et al.*, 2008), pesados em balança semi-analítica (BL320H, Shimadzu do Brasil Comércio Ltda., Barueri/SP, Brasil) e distribuídos nos aquários, sendo 10 peixes por aquário. Os animais foram alimentados 3 vezes ao dia e o período experimental foi de 15 dias.

### **3.2 Delineamento experimental**

O experimento foi realizado seguindo um delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 4 tratamentos e 6 repetições, totalizando 24 unidades experimentais. Cada aquário foi considerado como uma unidade experimental e o valor médio de cada unidade foi utilizado para as análises estatísticas.

### **3.3 Preparação do inóculo e desafio bacteriano por *Lactococcus* sp.**

Para o preparo dos inóculos, o isolado de *Lactococcus garvieae* (BR-M-1553) foi semeado em meio de cultivo ágar BHI (Agar Brain Heart Infusion - Heel do Brasil Biomedica Ltda., São José dos Pinhais/PR, Brasil) e incubado em estufa tipo BOD por 24 h à 28°C. As colônias puras foram transferidas para tubos contendo 30 mL de meio de cultivo caldo BHI + sangue e incubados à 28°C por 22 h. Em seguida os tubos foram centrifugados à 4°C em 3200 G por 10 minutos. O pellet formado foi lavado três vezes com solução fisiológica e ressuspendido em 6 mL de solução fisiológica estéril. A densidade ótica da solução bacteriana foi medida em densitometro obtendo-se uma solução mãe a 3x10<sup>9</sup> UFC/mL. Subsequentemente, diluições seriadas de 10 vezes foram realizadas em solução fisiológica para obter as concentrações de 1,2 x 10<sup>5</sup>, 1,2 x 10<sup>6</sup> e 1,2 x 10<sup>8</sup> UFC/mL de solução salina 0,85%. As concentrações de 1,2 x 10<sup>4</sup>, 1,2 x 10<sup>5</sup>, 1,2 x 10<sup>6</sup>, 1,2 x 10<sup>7</sup>, 1,2 x 10<sup>8</sup> e 1,2 x 10<sup>9</sup> UFC/mL foram semeadas em placas de meio BHI e

incubadas em estufa tipo BOD por 24 h à 28°C. Após a incubação foi realizada a contagem de UFC.

O desafio bacteriano foi realizado intraperitonealmente após o período de aclimação dos animais. Foi realizado o desafio em 10 animais por aquário, nas concentrações  $3 \times 10^5$ ,  $3 \times 10^6$  e  $3 \times 10^8$  UFC/mL.

## **4 VARIÁVEIS ANALISADAS**

### **4.1 Sobrevivência**

A taxa de mortalidade no decorrer do experimento foi monitorada através da observação e registro diário (manhã e tarde) de peixes mortos.

### **4.2 Análise dos sinais clínicos**

O acompanhamento dos sinais clínicos no decorrer do experimento foi realizado através da observação das seguintes alterações: peixes apáticos e com nadar lento, corrosão de nadadeiras, ascite, pele escura e natação errática.

### **4.3 Diagnóstico microbiológico e molecular**

#### *Diagnóstico Microbiológico*

Durante o período experimental (14 dias pós infecção) todos os animais mortos foram congelados para posterior necropsia e coleta de órgãos para exame microbiológico. Coletou-se de forma asséptica amostras de rim e baço e semeadas em meio ágar BHI e incubado em estufa por 24 h à 28°C. Após às 24 horas de incubação foi realizada a técnica de coloração Gram nas colônias para confirmação da morfologia de todos os isolados.

#### *Diagnóstico Molecular*

Ao final do experimento, durante a necropsia, o rim, fígado e baço foram amostrados de forma asséptica. Foram selecionados animais por tratamento para realização da análise de PCR em tempo real, a fim de detectar a presença da bactéria *Lactococcus spp.* Cada amostra foi composta por um *pool* de no mínimo 3 animais.

### Extração do DNA

A extração foi realizada utilizando-se o MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification (Thermo Fisher Scientific Inc., São Paulo/SP, Brasil). Foram utilizados apenas os reagentes fornecidos pelo kit e as etapas seguiram conforme descrito. Os tecidos foram homogeneizados em solução PBS, pH 7.4 e agitadas em disruptor L-BEADER 24 (Loccus do Brasil LTDA., Cotia/SP, Brasil). Após disrupção das amostras, estas foram centrifugadas para adquirir o sobrenadante e prosseguir com a extração de forma automatizada, utilizando o equipamento KingFisher™ Duo prime system (Thermo Fisher Scientific Inc., São Paulo/SP, Brasil).

### PCR em Tempo Real

Para o diagnóstico molecular foi realizada a PCR em tempo real em pool de órgãos dos animais de cada tratamento. Considerou-se que uma amostra foi positiva para a presença de DNA de *Lactococcus sp.* empregando-se a técnica de PCR em Tempo Real quando a curva exponencial cruzou a linha do threshold, ou seja, o nível de fluorescência no início do crescimento exponencial. Os dados de amplificação foram obtidos e analisados por meio do equipamento QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System for Human Identification, da Applied Biosystem, USA. A reação de PCR foi constituída de 2,6 µL de água ultrapura, 5 µL de sybr green mix (Applied Biosystems, EUA), 1,4 primers (F+R), 1 µL da amostra do DNA e 1 µL de água ultrapura (NTC). Primers Forward (5'-AGATAGAGAAGATTGCGTTGAGAGAA -3') e Reverse – (5'-ACCTCCTGCGTGCAAAGC -3') utilizados foram descritos por Shahin *et al.*, 2021. As condições da PCR Sybr® green foram: 1 ciclo de 02 minutos a 50°C e 02 minutos a 95°C, 40 ciclos de 01 segundos a 95°C e 30 segundos para 60°C; e 1 ciclo de 01 segundos a 95°C, 20 segundos a 60°C e 01 segundo a 95°C, para avaliação de temperatura-de-Melting.

## **4.4 Perfil de resistência antimicrobiana**

### Antibiograma e Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

O Antibiograma ou teste de sensibilidade a antimicrobianos é uma técnica que determina a sensibilidade bacteriana *in vitro*. Sua interpretação é

realizada de acordo com o tamanho do halo de inibição em resistente, intermediário ou sensível.

Após isolamento bacteriano e antibiograma as bactérias foram inoculadas em meio de cultura contendo concentrações seriadas dos antimicrobianos a serem testados. A menor concentração responsável por inibir totalmente o crescimento bacteriano foi considerada como valor de Concentração Mínima Inibitória (CIM). A metodologia descrita seguiu as diretrizes disponibilizadas pelo European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) e pelo Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCast).

Para a realização deste teste, foram utilizadas placas estéreis com 96 poços de fundo achatado. Com a placa na vertical, 50 µL de Mueller Hinton Broth (MHB) foram distribuídos, utilizando-se de um pipetador multicanal, em todos os poços das colunas 1 a 11. Na coluna 12, 100 µL de MHB foram distribuídos em todos os poços. A solução com antimicrobianos a serem testados foi preparada a uma concentração duas vezes maior que a concentração desejada. 100 µL desta solução foram adicionados em cada poço de toda a coluna 2. A diluição seriada dos antimicrobianos foi realizada com pipeta multicanal iniciando-se da coluna 2 (mais concentrado) até a coluna 11.

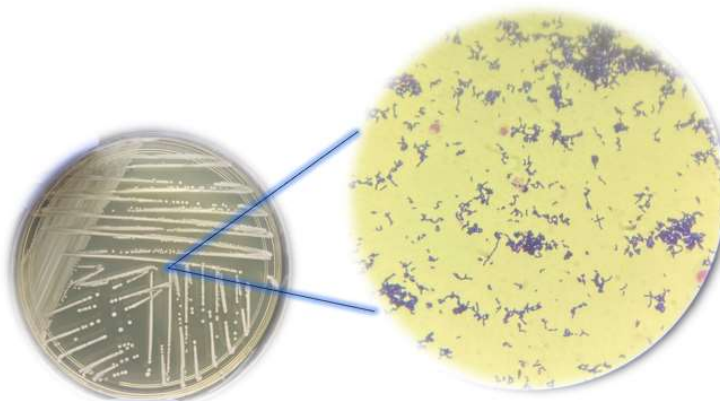
A suspensão bacteriana foi preparada em solução aquosa de NaCl a 0,85% (solução fisiológica) ou MHB correspondente a escala 0,5 de McFarland. A solução bacteriana foi diluída em MHB na proporção 1:150 e 50 µL desta solução foi distribuída em todos os poços da coluna 11 até a coluna 1.

A placa foi incubada à 28°C por 24 h. Após incubação, a visualização do crescimento bacteriano foi realizada através da turvação do meio de cultura ou presença de precipitado. Para determinar a CIM, a menor concentração do antibiótico que inibiu o crescimento bacteriano foi observada a olho nu.

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

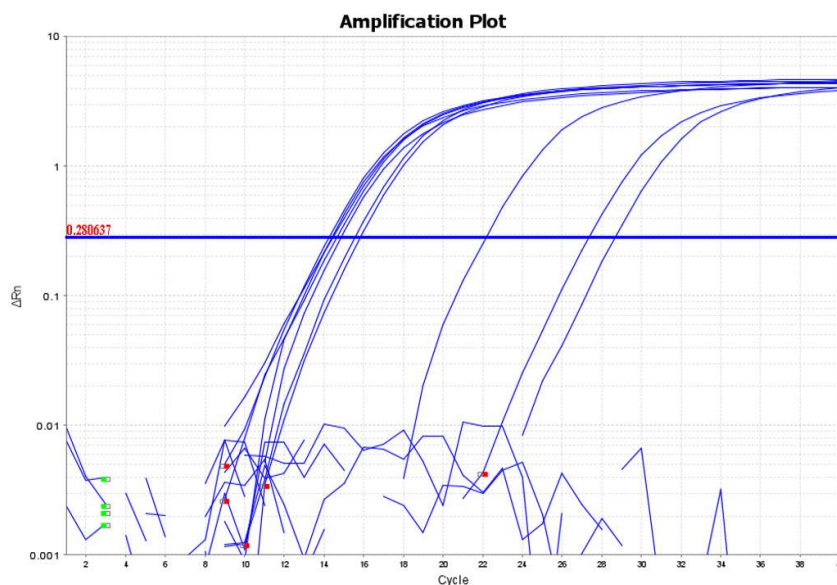
Durante o período experimental todos os animais mortos foram reservados para posterior necropsia e coleta de órgãos para exame microbiológico. Houve crescimento bacteriano em placas cultivadas para as três dosagens testadas. As bactérias apresentaram coloração Gram-positiva com

morfologia em cocos ovóides em pequenos agrupamentos (Vendrell *et al.*, 2006), podendo ser consideradas colônias de *Lactococcus sp.* (Figura 1).



**Figura 1.** Isolado bacteriano em placa de *Petri* cultivado 24 h em BOD à 28 °C em meio ágar *Brain Heart Infusion* e resultado após a coloração de Gram.

A impressão digital genética tem sido frequentemente usada como uma ferramenta epidemiológica robusta para tipar patógenos bacterianos de peixes, incluindo *L. garvieae* (Ravelo *et al.*, 2003; Ortega *et al.*, 2020;). Após o término da análise, o gráfico emitido pelo software (Figura 2) em conjunto com seus respectivos dados foram analisados e comparados com um controle positivo interno da reação. A inclusão do controle positivo nas reações, além de confirmar o rendimento de todos os reagentes, previne a ocorrência de resultados falsos negativos decorrentes da possível presença de substâncias inibidoras da PCR (APPLIED BIOSYSTEM, USA, 2008)



**Figura 2.** Representação das curvas de amplificação do DNA de *Lactococcus sp.*

A sensibilidade observada no presente estudo encontra respaldo em Sacchi (2007), que atribui a sensibilidade da PCR em Tempo Real, ao fato da detecção da amplificação ser realizada por meio da captação de fluorescência. Além disso, a amplificação e detecção do DNA são realizadas simultaneamente em um sistema fechado, dispensando procedimentos adicionais como a corrida eletroforética dos produtos em gel de agarose e foto documentação.

No presente estudo foi verificado o perfil de resistência do *Lactococcus sp.* (BR-M-1553) frente à quatro antimicrobianos diferentes. O resultado da CIM e antibiograma podem ser observados na Tabela 2. Para florfenicol e oxitetraciclina a MIC resultou em 16 e 32 µg/mL, respectivamente, enquanto para enrofloxacin e amoxicilina o resultado foi de 1 µg/mL.

**Tabela 2.** Tamanho em mm do diâmetro de halo de resistência formado por discos de antimicrobianos e CIM determinados para *Lactococcus sp.*

| PRODUTO | ANTIBIOGRAMA (mm) | CIM µg/mL |
|---------|-------------------|-----------|
| FFC     | 26                | 16        |
| OTC     | 24                | 32        |
| AML     | 27                | 1         |
| ENR     | 21                | 1         |

A cepa utilizada demonstrou sensibilidade intermediária para os quatro antimicrobianos testados. Estudos realizados anteriormente relataram sensibilidade de *L. garvieae* frente ao amoxicilina, enrofloxacin (Abu-Elala *et al.*, 2020; Soltani *et al.*, 2008). Na truta arco-íris, a oxitetraciclina e amoxicilina são utilizados principalmente para tratar surtos de lactococose (Meyburgh *et al.*, 2017). Entretanto, estudos demonstram resistência deste patógeno aos antibióticos comumente utilizados, como tetraciclina, doxiciclina, eritromicina e à estreptomicina (Raissy & Ansari, 2011).

A literatura demonstra perfil de susceptibilidade variável para o *L. garvieae*, o que provavelmente pode ser explicado devido ao perfil de genes de resistência a antimicrobianos intrínsecos a cada cepa bacteriana estudada (Maki *et al.*, 2008), além da resistência adquirida devido ao uso abundante de diferentes antibióticos na aquicultura.

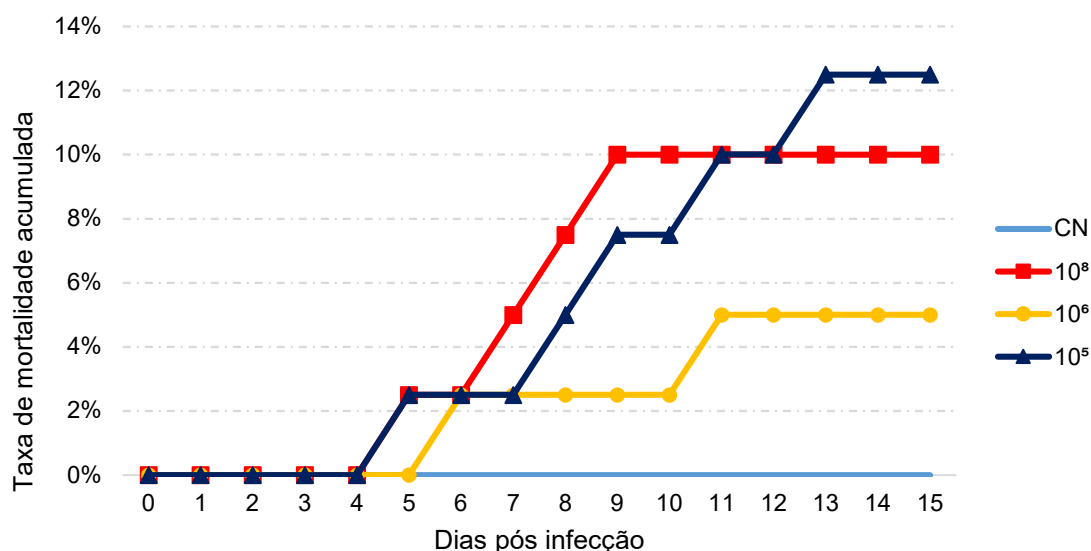
Durante todo o período experimental, os parâmetros físico-químicos da água foram monitorados com o intuito de garantir os níveis seguros para a tilápia-do-Nilo (Tabela 3). Sabe-se que o manejo da qualidade de água é um requisito básico para garantir além do bem-estar animal, o bom desempenho e impedir surtos de agentes patogênicos durante o cultivo. A temperatura média da água nos aquários foi monitorada e mantida o mais próximo possível de 23°C ao longo do período experimental, já que os surtos de *Lactococcus sp.* observados em literatura ocorrem em baixas temperaturas.

**Tabela 3.** Parâmetros de qualidade da água de tilápias-do-Nilo, *O. niloticus*, desafiadas com diferentes concentrações de *Lactococcus sp.* durante 15 dias.

| <b>Parâmetros de qualidade da água</b> |               |                |             |                  |
|----------------------------------------|---------------|----------------|-------------|------------------|
| Oxigênio (mg/L)                        | Amônia (mg/L) | Nitrito (ug/L) | pH          | Temperatura (°C) |
| 5,22 ± 1,13                            | 0,44 ± 0,13   | 0,45 ± 0,36    | 6,59 ± 0,22 | 23,13 ± 1,38     |

A taxa de mortalidade foi acompanhada diariamente (manhã e tarde) no período após o desafio, em grupos de tilápias desafiadas com três diferentes concentrações de inóculo, como demonstrado na Figura 3.





**Figura 3.** Percentual de mortes acumuladas de tilápias-do-Nilo, infectadas via intraperitoneal com 300  $\mu$ L de *A. veronii* após 15 dpi. (CN: tilápias inoculadas via intraperitoneal com solução salina)

Os animais que foram infectados apresentaram valores de mortalidade variando de 5%, na concentração de bactérias INF 10<sup>6</sup>, a 13%, na INF 10<sup>5</sup> ao final do experimento. Ademais, as taxas de mortalidade finais nos grupos INF 10<sup>8</sup> foi de 10%. Neste contexto, destaca-se que não houve mortalidade no grupo controle, evidenciando que o ambiente estava controlado e não foi o responsável pelos valores de mortalidade observados nos grupos desafiados, demonstrando que a metodologia de inoculação experimental intraperitoneal foi realizada de maneira correta.

Juvenis de surubim (*Pseudoplatystoma spp*) foram infectados com *L. garvieae* na concentração de 1,5x10<sup>8</sup> UFC/mL, sendo a taxa de mortalidade monitorada até os 21 dias pós inoculação. No fim do período experimental, os autores não constaram mortalidade durante esse período (Rodrigues *et al.*, 2020), corroborando com os dados obtidos no presente estudo.

Diferentemente do exposto, quando inoculadas cepas de *L. garvieae* na concentração 10<sup>8</sup> UFC/mL em tilápias do Nilo, a mortalidade mensurada foi de 70% (Bwalya & Simukoko *et al.*, 2020). Resultados semelhantes foram encontrados por Evans *et al.* (2009) e Tsai *et al.* (2012, 2013).

Diversos estudos relatam que quando se inocula cepas letais, os sinais de doença e as altas taxas de mortalidade ocorrem em poucos dias, incluindo os

animais mais jovens (Chen *et al.*, 2002; Vendrell *et al.*, 2006; Avci *et al.*, 2013). Além da idade dos peixes, a mortalidade ocasionada pela lactococose está associada a diversos fatores, como status do sistema imune do animal, qualidade de água, espécie e a virulência da cepa (Tsai *et al.*, 2012; Vendrell *et al.*, 2006).

Yoshida *et al.* (1996) relataram que a virulência dessa bactéria está intimamente relacionada com os exopolissacarídeos celulares, os chamados EPS. Ainda, os autores mencionam que o estado mórbido e as elevadas taxas de mortalidade estão associadas com infecções ocasionadas por cepas encapsuladas de *L. garvieae*. Isto pode ser justificado pelo fato de o encapsulamento restringir o processo de opsonização, enfraquecendo a eficiência dos leucócitos e permitindo o avanço da doença.

Por outro lado, as cepas não encapsuladas ou são pobres em patogenicidade ou sofreram alguma heterogeneidade genética. Como consequência, os sinais clínicos são meramente visíveis, apresentando baixa ou nenhuma mortalidade dos animais (Kang *et al.*, 2004; Eraclio *et al.*, 2018). Partindo do exposto, a baixa mortalidade observada nesse estudo sugere que a cepa utilizada apresentava baixa virulência e ainda, a ausência de EPS (Kang *et al.*, 2004; Tsai *et al.*, 2012; Barnes *et al.*, 2002; Kawanishi *et al.*, 2006).

Recentemente, o *Lactococcus petauri* foi descrito como uma espécie do gênero *Lactococcus*. As espécies *L. garvieae* e *L. petauri* possuem em comum uma gama de genes, o que dificulta na diferenciação durante o diagnóstico da doença (Goodman *et al.*, 2017; Martinovic *et al.*, 2021; Ou *et al.*, 2020). Alguns pesquisadores buscam, a partir de análises filogenéticas, determinar de maneira assertiva a taxonomia dessa bactéria (Egger *et al.*, 2023). Utilizando o 16S rRNA, os mesmos autores não conseguiram obter todas as informações necessárias para diferenciar a *L. garvieae* de *L. petauri*, resultado também encontrando por Ou *et al.* (2020).

O primeiro surto de *L. petauri* ocorreu em meados de 2020 e voltou à atenção da comunidade científica e de produtores reforçando a importância desse patógeno na tilapicultura (Egger *et al.*, 2022). Semelhantemente com as infecções de *L. garvieae*, os registros da doença são notados quando as temperaturas ultrapassam 20°C, os registros de *L. petauri* aparentam seguir o mesmo padrão (Kotzamanidis *et al.*, 2020; Bwalya *et al.*, 2020; Ortega *et al.*,

2020; Rao *et al.*, 2021), demonstrando que ambas as doenças acometem os animais quando a temperatura da água está elevada. Conforme demonstrado por Bwalya *et al.*, 2020 e Egger *et al.*, 2023, quando infectados com *L. petauri*, a mortalidade inicia-se entre o terceiro e oitavo dia após inoculação, demonstrando uma infecção mais agressiva e rápida.

A Identificação e diferenciação das espécies de *Lactococcus sp.* é emergente, não fazendo parte da rotina dos laboratórios de diagnóstico, em peixes, até meados de 2019 (Egger *et al.*, 2023). Como mencionado no item 2.1, as duas principais espécies de *Lactococcus sp.* associadas à morbimortalidade em aquicultura, *L. garvieae* e *L. petauri*, possuem características fenotípicas e genotípicas muito semelhantes o que torna difícil a diferenciação das espécies.

Diante dos resultados de baixa mortalidade obtidos neste estudo, não é possível sugerir qual espécie exata foi inoculada nos animais, embora estudos sugiram que alta mortalidade seja relacionada à *Lactococcus petauri* (Egger *et al.*, 2023).

Ao decorrer do período experimental, os sinais clínicos foram observados diariamente, como pode ser observado na Tabela 4. Não foram observados sinais clínicos nos animais do grupo controle. Entretanto, foram observados sinais clínicos em peixes de todos os grupos desafiados (INF10<sup>5</sup>, INF10<sup>6</sup>, INF10<sup>8</sup>), com início entre 0-2 dpi e seguindo até 14 dpi.

**Tabela 4.** Evolução do aparecimento de sinais clínicos (SC) de tilápia-do-Nilo após o desafio com *Lactococcus sp.*

| Sinais Clínicos              | Grupos experimentais |                        |                        |                        |
|------------------------------|----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
|                              | Controle (n=40)      | 10 <sup>8</sup> (n=40) | 10 <sup>6</sup> (n=40) | 10 <sup>5</sup> (n=40) |
| <b>Apático/Nadar Lento</b>   |                      |                        |                        |                        |
| 0-2 dpi                      | 0                    | 3                      | 2                      | 3                      |
| 3-5 dpi                      | 0                    | 4                      | 2                      | 4                      |
| 6-8 dpi                      | 0                    | 4                      | 3                      | 4                      |
| 9-11 dpi                     | 0                    | 1                      | 1                      | 2                      |
| 12-14 dpi                    | 0                    | 0                      | 2                      | 0                      |
| Episódios de SC              | 0                    | 12                     | 10                     | 13                     |
| <b>Natação errática</b>      |                      |                        |                        |                        |
| 0-2 dpi                      | 0                    | 0                      | 0                      | 0                      |
| 3-5 dpi                      | 0                    | 0                      | 0                      | 0                      |
| 6-8 dpi                      | 0                    | 0                      | 0                      | 1                      |
| 9-11 dpi                     | 0                    | 0                      | 1                      | 0                      |
| 12-14 dpi                    | 0                    | 0                      | 1                      | 0                      |
| Episódios de SC              | 0                    | 0                      | 2                      | 1                      |
| <b>Opacidade ocular</b>      |                      |                        |                        |                        |
| 0-2 dpi                      | 0                    | 0                      | 0                      | 0                      |
| 3-5 dpi                      | 0                    | 1                      | 0                      | 1                      |
| 6-8 dpi                      | 0                    | 1                      | 0                      | 0                      |
| 9-11 dpi                     | 0                    | 0                      | 0                      | 0                      |
| 12-14 dpi                    | 0                    | 0                      | 1                      | 0                      |
| Episódios de SC              | 0                    | 2                      | 1                      | 1                      |
| <b>Pele escura</b>           |                      |                        |                        |                        |
| 0-2 dpi                      | 0                    | 2                      | 2                      | 3                      |
| 3-5 dpi                      | 0                    | 1                      | 0                      | 3                      |
| 6-8 dpi                      | 0                    | 2                      | 2                      | 5                      |
| 9-11 dpi                     | 0                    | 1                      | 1                      | 2                      |
| 12-14 dpi                    | 0                    | 0                      | 0                      | 0                      |
| Episódios de SC              | 0                    | 6                      | 5                      | 13                     |
| <b>Ascite</b>                |                      |                        |                        |                        |
| 0-2 dpi                      | 0                    | 0                      | 0                      | 1                      |
| 3-5 dpi                      | 0                    | 0                      | 0                      | 0                      |
| 6-8 dpi                      | 0                    | 2                      | 0                      | 0                      |
| 9-11 dpi                     | 0                    | 0                      | 0                      | 0                      |
| 12-14 dpi                    | 0                    | 0                      | 0                      | 0                      |
| Episódios de SC              | 0                    | 2                      | 0                      | 1                      |
| <b>Corrosão da nadadeira</b> |                      |                        |                        |                        |
| 0-2 dpi                      | 0                    | 0                      | 0                      | 1                      |
| 3-5 dpi                      | 0                    | 0                      | 0                      | 0                      |
| 6-8 dpi                      | 0                    | 0                      | 0                      | 0                      |
| 9-11 dpi                     | 0                    | 0                      | 0                      | 0                      |
| 12-14 dpi                    | 0                    | 1                      | 0                      | 0                      |
| Episódios de SC              | 0                    | 1                      | 0                      | 1                      |

Os sinais clínicos foram mais evidentes nos animais do grupo INF10<sup>5</sup>, e foi possível observar efeitos adversos como peixes com: apático/nadar lento (n=13), pele escura (n=13), ascite (n=1), opacidade ocular (n=1), natação errática (n=1) e corrosão de nadadeira (n=1). Embora os animais dos demais grupos infectados apresentaram menor frequência de sinais clínicos em relação ao grupo INF10<sup>5</sup>, esses grupos também apresentaram alterações.

De maneira similar, em uma condição experimental, Bwalya *et al.* (2020) inocularam *L. garvieae* em tilápia-do-Nilo e os peixes começaram a exibir coloração escura na pele e opacidade ocular. Natação errática dos animais também foi encontrada por Osman *et al.* (2017), além da pele com coloração escura. Outros diversos experimentos também encontraram os sinais clínicos relatados de *L. garvieae* quando os peixes estavam doentes com esse patógeno (Prieta *et al.*, 1993; Itami *et al.*, 1996; Eldar *et al.*, 1999; Múzquiz *et al.*, 1999).

Os resultados obtidos na avaliação dos sinais clínicos dão embasamento na hipótese de que a cepa utilizada no presente estudo foi a *L. garvieae* e não *L. petauri*, uma vez que os sinais clínicos dos animais foram mais brandos e menos invasivos. Estudos prévios relatam que quando infectadas com *L. petauri*, a tilápia do Nilo desenvolveu a hiporexia, comprometendo o apetite do peixe, além da alta taxa de mortalidade entre os dias 3-8 após a inoculação (Bwalya *et al.*, 2021), indicando que *L. petauri* é mais virulento do que *L. garvieae*.

## 6 CONCLUSÃO

Com base no exposto neste trabalho é possível concluir que os efeitos do *Lactococcus spp.* isolado de uma piscicultura no Brasil e utilizado para desafiar juvenis de tilápia, apresentaram baixo impacto na sanidade e sobrevivência destes animais. O que é elucidado devido a variedade de sorotipos e espécies que possuem esta bactéria. Desta maneira, torna-se necessário confrontar a cepa bacteriana utilizada no presente estudo com outras espécies de *Lactococcus spp.* e verificar os efeitos apresentados por ambas, realizando, portanto, a diferenciação adequada entre as cepas.

## 7 REFERÊNCIAS

- ABU-ELALA, NERMEEN; ABD-ELSALAM, REHAM; ABOUEL KARAMAT, NEHAL. (2020). Streptococcosis, Lactococcosis and Enterococcosis are potential threats facing cultured Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) production. *Aquaculture Research*. 51. 10.1111/are.14760.
- ANSHARY, H.; KURNIAWAN, R. A.; SRIWULAN, S.; RAMLI, R.; BAXA, D. V. (2014). Isolation and molecular identification of the etiological agents of streptococcosis in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in net cages in Lake Sentani, Papua, Indonesia. *SpringerPlus*, 3(1), 1-11.
- AVCI, H.; BIRINCIIOGLU, S. S.; TANRIKUL, T. T.; EPIKMEN, E. T.; METIN, N.; AVSEVER, M. L. (2014). Experimental *Lactococcus garvieae* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792: a comparative histopathological and immunohistochemical study. *Journal of Fish Diseases*, 37(5), 481–495. doi:10.1111/jfd.12132.
- BARNES, A. C.; GUYOT, C.; HANSEN, B. G.; HORNE, M. T.; ELLIS, A. (2002). Antibody increases phagocytosis and killing of *Lactococcus garvieae* by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, L.) macrophages. *Fish Shellfish Immunol*. 12, 181–186.
- BERCOVIER, H.; GHITTINO, C.; ELDAR, A. (1997). Immunization with bacterial antigens: infections with streptococci and related organisms. *Developments in Biological Standardization*, 90, 153-160. PMID: 9270844.
- BROWN, L. (1993). *Aquaculture for veterinarians: fish husbandry and medicine*. Oxford: Pergamon Press Ltd.
- BWALYA, P.; HANG'OMBE, B. M.; GAMIL, A. A.; MUNANG'ANDU, H. M.; EVENSEN; MUTOLOKI, S. (2020). A whole-cell *Lactococcus garvieae* autovaccine protects Nile tilapia against infection.
- BWALYA, P.; HANG'OMBE, B. M.; EVENSEN, Ø.; MUTOLOKI, S. *Lactococcus garvieae* isolated from Lake Kariba (Zambia) has low invasive potential in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J Fish Dis*. 2021; 44: 721– 727. <https://doi.org/10.1111/jfd.13339>.
- CHANG PH, LIN CW, LEE YC. *Lactococcus garvieae* infection of cultured rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, in Taiwan and associated biophysical characteristics and histopathology. *Bull Eur Assoc Fish Pathol*, 22: 319-327, 2002.
- CHEN, S.-C.; LIAW, L.-L.; SU, H.-Y.; KO, S.-C.; WU, C.-Y.; CHAUNG, H.-C.; TSAI, Y.-H.; YANG, K.-L.; CHEN, Y.-C.; CHEN, T.-H.; LIN, G.-R.; CHENG, S.-Y.; LIN, Y.-D.; LEE, J.-L.; LAI, C.-C.; WENG, Y.-J.; CHU, S.-Y. *Lactococcus garvieae*, a cause of disease in grey mullet, *Mugil cephalus* L., in Taiwan. *Journal of Fish Diseases*, 25(12), 727–732, 2002. DOI: 10.1046/j.1365-2761.00415.

CLAEISSON, 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 Res.*, 38(22), e200, 2010. DOI: 10.1093/nar/gkq873. PMID: 20880993; PMCID: PMC3001100.

DOMENECH, A.; PRIETA, J.; FERNANDEZ-GARAYZABAL, J. F.; COLLINS, M. D.; JONES, D.; DOMINGUEZ, L. Phenotypic and phylogenetic evidence for a close relationship between *Lactococcus garviae* and *Enterococcus seriolicida*. *Microbiologia-Madrid*, 9, 63-63, 1993.

EGGER, R. C.; ROSA, J. C. C.; RESENDE, L. F. L.; PÁDUA, S. B.; BARBOSA, F. O.; ZERBINI, M. T.; TAVARES, G. C.; H.C.P., FIGUEIREDO. Emerging fish pathogens *Lactococcus petauri* and *L. garviae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) farmed in Brazil. *Aquaculture*, 565, 2023. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2022.739093.

ELDAR, A.; GORIA, M.; GHITTINO, C.; ZLOTKIN, A.; BERCOVIER, H. Biodiversity of *Lactococcus garviae* strains isolated from fish in Europe, Asia, and Australia. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(3), 1005-1008, 1999. DOI: 10.1128/AEM.65.3.1005-1008.1999. PMID: 10049855; PMCID: PMC91136.

ERACLIO, G.; RICCI, G.; QUATTRINI, M.; MORONI, P.; FORTINA, M. G. Detection of virulence-related genes in *Lactococcus garviae* and their expression in response to different conditions. *Folia Microbiol. (Praha)*, 63(3), 291-298, 2018. DOI: 10.1007/s12223-017-0566-z. PMID: 29134547.

EVANS, JJ.; KLESIUS, PH.; SHOEMAKER, CA. First isolation and characterization of *Lactococcus garviae* from Brazilian Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), and pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* (Spix & Agassiz). *J Fish Dis*, 32: 943-951, 2009.

FEFER, J.J.; RATZAN, K.R.; SHARP, S.E.; SAIZ, E. *Lactococcus garviae* endocarditis: report of a case and review of the literature. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 32(2):127-130, 1998.

FUKUDA, Y.; MAITA, M.; SATOH, K.; OKAMOTO, N. Influence of dissolved oxygen concentration on the mortality of yellowtail experimentally infected with *Enterococcus seriolicida*. *Fish Pathol*, 32: 129–30, 1997.

GOODMAN, LB.; LAWTON, MR.; FRANKLIN-GUILD, RJ.; ANDERSON, RR.; SCHAAN, L.; THACHIL, AJ.; WIEDMANN, M.; MILLER, CB.; ALCANE, SD.; KOVAC, J. *Lactococcus petauri* sp. nov., isolated from an abscess of a sugar glider. *Int J Syst Evol Microbiol*, 67(11): 4397–4404, 2017. DOI: 10.1099/ijsem.0.002303.

HURVITZ, A.; BERCOVIER, H.; VAN RIJN, J. Effect of ammonia on the survival and the immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) vaccinated against *Streptococcus iniae*. *Fish Shellfish Immunol*, 7: 45–53, 1997.

KANG, SH.; SHIN, GW.; SHIN, YS.; PALAKSHA, KJ.; KIM, YR.; YANG, HH.; LEE, EY.; LEE, EG.; HUH, NE.; JU, OM.; JUNG, TS. Experimental evaluation of

pathogenicity of *Lactococcus garvieae* in black rockfish (*Sebastes schlegeli*). *Journal of Veterinary Science*, 5(4): 387–390, 2004. DOI: 10.4142/jvs.2004.5.4.387.

KARAMI, E.; ALISHAHI, M.; MOLAYEMRAFTAR, T.; GHORBANPOUR, M.; TABANDEH, MR.; MOHAMMADIAN, T. Study of pathogenicity and severity of *Lactococcus garvieae* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Kohkilooieh and Boyerahmad province. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 22, 2019.

KATAO, H. Erithromycin: the application to streptococcal infections in yellowtails. *Fish Pathol*, 17: 77–82, 1982.

KAWANISHI, M.; YOSHIDA, T.; YAGASHIRO, S.; KIJIMA, M.; YAGYU, K.; NAKAI, T.; MURAKAMI, M.; MORITA, H.; SUZUKI, S. Differences between *Lactococcus garvieae* isolated from the genus *Seriola* in Japan and those isolated from other animals (trout, terrestrial animals from Europe) with regard to pathogenicity, phage susceptibility and genetic characterization. *Journal of Applied Microbiology*, Volume 101, Pages 496–504, 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02951.x>

KLESIOUS, JJ.; SHOEMAKER, PH. 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, 2009.

KOTZAMANIDIS, C.; MALOUSHI, A.; BITCHAVA, K. *et al.* First Report of Isolation and Genome Sequence of *L. petauri* Strain from a Rainbow Trout *Lactococcosis* Outbreak. *Curr Microbiol*, 77: 1089–1096, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-01905-8>.

KUBITZA, F. Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial. Jundiaí: F. Kubitza, 2000. 289 p.

MAKI, T.; HIRONO, I.; KONDO, H.; AOKI, T. Drug resistance mechanism of the fish-pathogenic bacterium *Lactococcus garvieae*. *Journal of Fish Diseases*, 31 (6), 461–468, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2008.00927.x>

MARTINOVIC, A.; CABAL, A.; NISIC, A.; SUCHER, J.; STÖGER, A.; ALLERBERGER, F.; RUPPITSCH, W. Genome Sequences of *Lactococcus garvieae* and *Lactococcus petauri* Strains Isolated from Traditional Montenegrin Brine Cheeses. *Microbiology Resource Announcements*, 10, 2021. <https://doi.org/10.1128/mra.00546-21>

MEYBURGH, CM.; BRAGG, RR.; BOUCHER, CE. *Lactococcus garvieae*: an emerging bacterial pathogen of fish. *Dis Aquat Org*, 123, 67–79, 2017. <https://doi.org/10.3354/dao03083>.

MUZQUIZ, JL.; ROYO, FM.; ORTEGA, C.; DE BLAS, I.; RUIZ, I.; ALLONSO, JL. Patogenicity of *Streptococcosis* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) dependence on age of diseased fish. *Bull Eur Ass Fish Pathol*, 19, 114–119, 1999.



NISHIKI, I.; FURUKAWA, M.; MATUI, S.; ITAMI, T.; NAKAI, T.; YOSHIDA, T. Epidemiological study on *Lactococcus garvieae* isolates from fish in Japan. *Fisheries Science*, 77, 367–373, 2011.

NISHIKI, I.; OINAKA, D.; IWASAKI, Y.; YASUIKE, M.; NAKAMURA, Y.; YOSHIDA, T.; FUJIWARA, A.; NAGAI, S.; KATOH, M.; KOBAYASHI, T. Complete genome sequence of nonagglutinating *Lactococcus garvieae* strain 122061 isolated from yellowtail in Japan. *Genome Announcements*, 4, 2016.

ONO, E. A. & KUBITZA, F. Cultivo de peixes em tanques-rede. F. Kubitza, Jundiaí, 1999.

ORTEGA, C.; IRGANG, R.; VALLADARES-CARRANZA, B.; COLLARTE, C.; AVENDAÑO-HERRERA, R. First identification and characterization of *Lactococcus garvieae* isolated in Mexico. *Animals*, 10, 1–15, 2020.

OSMAN, K. M.; AL-MAARY, K. S.; MUBARAK, A. S.; DAWOUD, T. M.; MOUSSA, I. M.; IBRAHIM, M. D.; ... & FAWZY, N. M. Characterization and susceptibility of streptococci and enterococci isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) showing septicaemia in aquaculture and wild sites in Egypt. *BMC veterinary research*, 13(1), 1-10, 2017.

OU, Y.J.; REN, Q.Q.; FANG, S.T.; WU, J.G.; JIANG, Y.X.; CHEN, Y.R.; ZHONG, Y.; WANG, D.D.; ZHANG, G.X. Complete Genome Insights into *Lactococcus petauri* CF11 Isolated from a Healthy Human Gut Using Second- and Third-Generation Sequencing. *Frontiers in Genetics*, 11, 2020. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00119>

PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C. & TAKEMOTO, R. M. Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento. 3ª ed. Maringá: Eduem, 2008. 311 p.

PEIRSON, S. N.; BUTLER, J. N. RNA extraction from mammalian tissues. In *Circadian Rhythms* (pp. 315-327). Humana Press, 2007.

RAISSY, M.; ANSARI, M. Antibiotic susceptibility of *Lactococcus garvieae* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *African Journal of Biotechnology*, v. 8, p. 1473-1476, 2011.

RAO, S.; PHAM, T.H.; POUDYAL, S.; CHENG, L.; NAZARETH, S.C.; WANG, P.; CHEN, S. First report on genetic characterization, cell-surface properties and pathogenicity of *Lactococcus garvieae*, emerging pathogen isolated from cage-cultured cobia (*Rachycentron canadum*). *Transboundary and Emerging Diseases*, 2021.

RAVELO, C.; MAGARINOS, B.; LÓPEZ-ROMALDE, S.; TORANZO, A.E.; ROMALDE, J.L. Molecular fingerprintings of fish-pathogenic *Lactococcus garvieae* strains by random amplified polymorphic DNA analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, p. 751-756, 2003.

ROBINSON, J.A.; MEYER, F.P. Streptococcal fish pathogen. *Journal of Bacteriology*, v. 92, p. 512, 1966.

RODRIGUES, R.A.; DO NASCIMENTO SILVA, A.L.; SIQUEIRA, M.S. *et al.* Hematological, biochemical, and histopathological responses in sorubim *Pseudoplatystoma* spp. experimentally infected with *Lactococcus garvieae*. *Aquaculture International*, v. 28, p. 1907-1923, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10499-020-00566-5>.

ROMALDE, J.L. Present and future of aquaculture vaccines against fish bacterial diseases. In: Seminario internacional enfermedades emergentes en la acuicultura. Chile: Puerto Varas, 2004.

SOLTANI, M.; BALDISSEROTTO, B.; HOSSEINI SHEKARABI, S.P.; SHAFIEI, S.; BASHIRI, M. Lactococcosis a re-emerging disease in aquaculture: disease significant and phytotherapy. *Veterinary Sciences*, v. 8, n. 9, p. 181, 2021.

SOLTANI, M.; NIKBAKHT, G.H.; MOUSAVI, H.A.E.; AHMADZADEH, N. Epizootic outbreaks of lactococcosis caused by *Lactococcus garvieae* in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, v. 28, n. 5, p. 207, 2008.

TAVARES, G.C.; DE QUEIROZ, G.A.; ASSIS, G.B.N.; LEIBOWITZ, M.P.; TEIXEIRA, J.P.; FIGUEIREDO, H.C.P.; LEAL, C.A.G. Disease outbreaks in farmed Amazon catfish (*Leiarus marmoratus* x *Pseudoplatystoma corruscans*) caused by *Streptococcus agalactiae*, *S. iniae*, and *S. dysgalactiae*. *Aquaculture*, v. 495, p. 384-392, 2018.

TEIXEIRA, L.M.; MERQUIOR, V.L.C.; VIANNI, M.C.; CARVALHO, M.G.S.; FRACALANZZA, S.E.L.; STEIGERWALT, A.G.; BRENNER, D.J.; FACKLAN, R.R. Phenotypic and genotypic characterization of atypical *Lactococcus garvieae* strains isolated from water buffalos with subclinical mastitis and confirmation of *L. garvieae* as a senior subjective synonym of *Enterococcus seriolicida*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 46, n. 3, p. 664-668, 1996.

THATCHER, V. E.; BRITES-NETO, J. Diagnóstico, prevenção e tratamento das enfermidades de peixes neotropicais de água doce. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 16, n. 3, p. 111-128, 1994.

TORANZO, A.E.; DEVESA, S.; ROMALDE, J.L.; LAMAS, J.; RIAZA, A.; LEIRO, J.; BARJA, J.L. Efficacy of intraperitoneal and immersion vaccination against *Enterococcus* sp. infection in turbot. *Aquaculture*, v. 134, n. 1-2, p. 17-27, 1995.

TSAI, M.-A.; WANG, P.-C.; LIAW, L.-L.; YOSHIDA, T.; CHEN, S.-C. Comparison of genetic characteristics and pathogenicity of *Lactococcus garvieae* isolated from aquatic animals in Taiwan. *Diseases of Aquatic Organisms*, v. 102, n. 1, p. 43-51, 2012. <https://doi.org/10.3354/dao02516>. Retrieved from <https://www.int-res.com/abstracts/dao/v102/n1/p43-51/>

TURE, M.; HALILOGLU, H.I.; ALTUNTAS, C.; BORAN, H.; KUTLU, I. Comparison of experimental susceptibility of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), turbot (*Psetta maxima*), Black Sea trout (*Salmo trutta labrax*) and sea bass

(*Dicentrarchus labrax*) to *Lactococcus garvieae*. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, v. 14, p. 507-513, 2014.

VENDRELL, D.; BALCA'ZAR, J.L.; RUIZ-ZARZUELA, I.; DE BLAS, I.; GIRONE'S, O.; MUZQU'IZ, J.L. Safety and efficacy of an inactivated vaccine against *Lactococcus garvieae* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Preventive Veterinary Medicine, v. 80, p. 222-229, 2007.

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, n. 4, p. 177-198, 2006.

WILSON, T.; CARSON, J. Rapid, high-throughput extraction of bacterial genomic DNA from selective-enrichment culture media. Letters in Applied Microbiology, v. 32, n. 5, p. 326-330, 2001.

YASUNAGA, N. Occurrence of *Streptococcus* sp., a pathogen of cultured yellowtail, in muscle of sardine for diets. Fish Pathol, v. 17, p. 195-198, 1982.

YOSHIDA, T.; ESHIMA, T.; WADA, Y.; YAMADA, Y.; KAKIZAKI, E.; SAKAI, M.; KITAO, T.; INGLIS, V. Phenotypic variation associated with an antiphagocytic factor in the bacterial fish pathogen *Enterococcus seriolicida*. Diseases of Aquatic Organisms, v. 25, p. 6, 1996. <https://doi.org/10.3354/dao025081>

ZLOTKIN, A.; ELDAR, A.; GHITTINO, C.; BERCOVIER, H. Identification of *Lactococcus garvieae* by PCR. Journal of Clinical Microbiology, v. 36, n. 4, p. 983-985, 1998.

**Capítulo 3** – Primeiro relato de *Aeromonas veronii* como um patógeno bacteriano emergente de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) cultivada no Brasil.

## RESUMO

*Aeromonas sp.* é um gênero de bactérias que pode ser encontrado em diversos ambientes aquáticos, incluindo água doce, salobra e salgada. Algumas espécies desse gênero são conhecidas por causar doenças em peixes, incluindo infecções na pele, nadadeiras e brânquias, além de septicemia e hemorragias internas. Esta bactéria pode afetar diversas espécies de peixes, incluindo tilápias, trutas, carpas e salmões, e as infecções podem ser particularmente problemáticas em sistemas de criação intensiva, onde a densidade de peixes é alta e as condições ambientais são propícias para a proliferação de bactérias. Existem várias espécies de *Aeromonas* que podem causar doenças em peixes, sendo a *A. hydrophila* a mais relacionada com surtos responsáveis por grandes prejuízos na produção. Recentemente outra bactéria do gênero *Aeromonas* isolada de peixes doentes causou alta mortalidade e acometimento de juvenis de tilápia em propriedade localizada em Ilha Solteira – SP, Brasil. Este trabalho teve como objetivo avaliar a sobrevivência e sinais clínicos em tilápias do Nilo infectadas com *A. veronii*. e determinar genotipicamente e fenotipicamente o perfil de resistência à antimicrobianos desta bactéria. Para isso, foi realizado ensaio experimental com juvenis de tilápia. A mortalidade ocorreu nas primeiras 24 horas, chegando a 100% na concentração na  $1,2 \times 10^8$  e 3% em  $1,2 \times 10^4$  UFC/mL. A bactéria causou lesões clássicas para a espécie nos peixes infectados, além de demonstrar resistência, frente aos antimicrobianos testados (amoxicilina, oxitetraciclina e enrofloxacina), confirmado pela presença de genes relacionados a resistência à quinolonas, sendo sensível apenas ao florfenicol.

## 1 INTRODUÇÃO

Dados obtidos pelo anuário PEIXE BR (2022) em consultorias internacionais e a FAO, apontam para um ligeiro crescimento na produção de tilápias, de 2% em 2021. As informações dos principais países produtores consolidam a tilápia como o peixe de cultivo mais produzido no mundo, seguido por pangásio e salmão, sendo a tilápia, o peixe de cultivo mais produzido no território nacional, de forma intensiva, em tanques-rede situados, principalmente, nos grandes reservatórios hidroelétricos (Scorvo Filho *et al.*, 2010; Garcia *et al.*, 2014).

No Brasil, a espécie está presente em todas as regiões do país, com maior ou menor relevância. Mesmo na região Norte, tradicional polo de criação de peixes nativos, a tilápia começa a aparecer, a partir da liberação de cultivo por alguns governos estaduais. Naquela região, em 2021 foram produzidas 860 toneladas, o que representa incremento de quase 40% sobre o ano anterior. O Sul lidera, com folga, a produção de tilápia, tendo como principal produtor o estado do Paraná, com 182.000 t. O Sudeste vem a seguir com cerca de 27%, representado por São Paulo, responsável por 76.140 t de tilápia produzida. Juntos, os estados brasileiros foram responsáveis pela produção de 841.005 toneladas no mesmo ano (PEIXE BR, 2022).

As bactérias com importância econômica para a piscicultura são consideradas oportunistas, pois para atender o aumento elevado da demanda por alimento é necessário que haja a intensificação da produção, caracterizada por elevada densidade de estocagem, manejos altamente estressantes e qualidade da água, muitas vezes, inapropriada, provocando estresse exacerbado nos peixes, predispondo-os à ação desses agentes patogênicos e provocando surtos de doenças (Pavanelli *et al.*, 2008; Oba *et al.*, 2009).

Além de sinais clínicos que comprometem a vida dos peixes, outros sinais, como por exemplo as lesões cutâneas, depreciam a qualidade do produto, impossibilitando sua comercialização (Figueiredo *et al.*, 2008).

Entre as principais causadoras de morbidade e mortalidade na tilapicultura estão as doenças de origem bacteriana, principalmente as provocadas pelos gêneros *Streptococcus*, bactéria Gram-positiva que provoca quadros de septicemia, meningoencefalite e abscessos multifocais na musculatura, e *Aeromonas* móveis, responsáveis por quadros de septicemia

hemorrágica (Figueiredo *et al.*, 2006; Pavanelli *et al.*, 2008; Li & Cai, 2011; Li *et al.*, 2013a; Li *et al.*, 2013b). Diversos estudos evidenciam surtos de *Aeromonas* spp em tilápias em diversas regiões do Brasil (Suhel, 2011; Kim *et al.*, 2019).

Os antimicrobianos são principalmente utilizados no tratamento e prevenção de infecções bacterianas, através da sua mistura com a ração a ser ofertada (Mota *et al.*, 2005; Cabello *et al.*, 2013). Contudo, o monitoramento de resíduos de antimicrobianos no meio ambiente vem evidenciando a presença frequente de tais substâncias em águas naturais e sedimentos (Chelossi *et al.*, 2003; Cabello *et al.*, 2013; Moore *et al.*, 2014; Monteiro *et al.*, 2016). Assim, o uso desenfreado de antibióticos implica não somente à contaminação do ambiente aquático e terrestre, mas também em impactos adversos em organismos não-alvo e, principalmente, na seleção de microorganismos resistentes (Billa & Dezotti, 2003; Pilarski & Sakabe, 2009; Cabello *et al.*, 2013).

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 *Aeromonas* sp.**

As bactérias do gênero *Aeromonas* abrangem cerca de 36 espécies descritas, são bastonetes gram negativos, anaeróbios facultativos, podendo ser móveis ou imóveis 18 (Janda & Abbott, 2010; Euzéby, 2020).

Pertencentes a família *Aeromonadaceae* (Cowell *et al.*, 1986) por possuírem diversas espécies e características genéticas e fenotípicas próprias, *Aeromonas* possuem uma taxonomia muito confusa e na avaliação fenotípica, inúmeras características bioquímico-metabólicas são necessárias para uma classificação acurada (Martin-Carnahan & Joseph, 2005). Entre os fatores que complicam a identificação dessas bactérias estão o elevado número de grupos taxonômicos reconhecidos e necessidade de testes os quais não são utilizados na rotina dos laboratórios clínicos para diferenciação de outros grupos (Janda & Abbott, 2010).

Um esquema clássico de taxonomia as divide em dois grupos: o primeiro inclui cepas psicrófilas, com crescimento entre 22 e 28°C, o qual inclui espécies capazes de determinar patogenia em peixes de importância econômica. O segundo grupo, as mesófilas com crescimento entre 36 e 37°C (Horneman *et al.*, 2007) entre as quais se encontram espécies capazes de determinar infecções no homem (Hofer *et al.*, 2006; Janda & Abbott, 2010).

Embora outras *Aeromonas* móveis também causem doenças em peixes, como a *Aeromonas caviae* (Kozíńska, 2007), *Aeromonas veronii* (Kozíńska, 2007; Nawaz *et al.*, 2006;), *Aeromonas sobria* (Kozíńska, 2007, Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010), *Aeromonas jandaei* (Kozíńska, 2007) entre outras, a *Aeromonas hydrophila* é a mais referenciada (Joseph & Carnahan, 1994; Nielsen *et al.*, 2001; Deng *et al.*, 2014).

Janda & Abbott (2010) relataram a presença de bactérias deste gênero em animais domésticos, aves, invertebrados, insetos, no conteúdo gastrointestinal de ovelhas, gado e cavalo saudáveis, em alimentos como frutos do mar, leite cru, frango e carnes de cordeiro, vitela, porco, carne moída e peixes. São encontrados em vários tipos de ambientes aquáticos: marinho; doce; água potável, mesmo clorada; poluída (Monfort & Baleux, 1991; Krovacek *et al.*, 1994, Seshadri *et al.*, 2006; Trabulsi & Alterthum, 2008) e no solo (Brandi *et al.*, 2008; Samie, *et al.*, 2012).

Em peixes, são considerados invasoras secundárias, pois se instalam ao mesmo tempo que outros organismos patológicos (Pavanelli *et al.*, 2008).

É responsável pela septicemia hemorrágica, caracterizado por pequenas lesões hemorrágicas na superfície corpórea que progridem para úlceras hemorrágicas; outros sinais clínicos associados incluem exoftalmia, ascite, necrose das nadadeiras e cauda, perda de escamas e hemorragia em brânquias, (Cipriano, 2001; Pavanelli *et al.*, 2008). *A. caviae*, *A. hydrophila* e *A. veronii* *bv sobria*, estão recebendo maior atenção por estarem associadas a uma variedade de doenças humanas tais como: infecções cutâneas, gastroenterite a septicemia (WHO, 1993; Figueras *et al.*, 2005; Skwor *et al.*, 2014).

## **2.2 Resistência à antimicrobianos**

A indústria da aquicultura enfrenta o desafio do surgimento e disseminação de doenças. Vários compostos têm sido utilizados no controle dessas doenças, dentre as quais os agentes antimicrobianos são os mais populares (Ibrahim *et al.*, 2020). Os antimicrobianos são usados em vários estágios da aquicultura, de variados métodos, como a medicação através da ração, bioencapsulação e banhos de imersão (Smith *et al.*, 2008).

Em estudo realizado por Lulijwa *et al.* (2020) relatou-se que um total de 67 compostos antimicrobianos foram usados em todo o mundo como profiláticos ou terapêuticos para derrotar infecções microbianas na aquicultura.

Tetraciclinas, sulfonamidas, florfenicol, amoxilinas e as quinolonas são os principais grupos usados como compostos antimicrobianos. Dentre esses, no Brasil, somente dois antimicrobianos são legalizados para uso na piscicultura, a oxitetraciclina (OTC) e o florfenicol (FFC) (Sindan, 2018). Este cenário, associado ao crescente número de surtos de bacterioses, propicia o uso inadequado de substâncias não autorizadas na atividade.

Embora os antimicrobianos sejam importantes para reduzir a propagação de doenças bacterianas, a liberação contínua de antimicrobianos para o ambiente leva ao aumento da resistência antimicrobiana entre peixes e mariscos (Navarrete *et al.*, 2008).

*Aeromonas sp.* é conhecido por ser resistente a uma ampla gama de antimicrobianos, incluindo aminoglicosídeos, cefalosporinas, fluoroquinolonas, penicilinas e sulfonamidas.

Atualmente é possível observar um aumento da resistência bacteriana às quinolonas. Sinha *et al.* (2004) detectaram elevado nível de resistência cromossomal as quinolonas: ácido nalidixico, ciprofloxacina e norfloxacina em isolados de *A. caviae* de pacientes com diarreia. Essa resistência pode ser codificada pela presença do gene *qnr* integrado a um cassete gênico como descrito por Cattoir *et al.* (2008). A presença de QnrS com 41% a 60% identidade nas sequências de aminoácidos de QnrA foi verificada em dois isolados ambientais de *A. media* e *A. caviae* e um isolado clínico de *A. veronii*, sendo que esta última apresentou resistência a quinolona e as fluoroquinolonas, ciprofloxacina e levofloxacina (Sanchez-Cespedes *et al.*, 2008).

Já foi observada resistência a tetraciclina codificada por variantes do gene *tet*, como *tetD* em *A. hydrophila* (Aoki *et al.*, 1987). Na última década alguns autores constataram a presença dos genes *tetA* e *tetE* em amostras provenientes de alimentos e amostras clínicas (Balassiano *et al.*, 2007).

Ao longo dos anos relatos sobre resistência em *Aeromonas spp.* têm sido descritos. Em estudo realizado por Goñi-Urriza *et al.* (2000) foi observado atividade de 19 agentes antimicrobianos frente a *Aeromonas spp.* isoladas de



dois rios na Europa e verificou-se cepas resistentes a maioria das drogas avaliadas.

Os mecanismos de resistência bacteriana podem ocorrer por mutação ou por aquisição de elementos genéticos. A mutação espontânea ocorre de forma rara, com frequência de uma célula bacteriana em um bilhão, mas em condições de alta pressão de seleção antimicrobiana, podem selecionar bactérias que apresentem maiores taxas de mutação (Rodríguez-Rojas *et al.*, 2013). Entre as consequências provocadas por este mecanismo estão as várias alterações: da permeabilidade via porinas, do sítio de ação do antimicrobiano, da bomba de efluxo e de mecanismos enzimáticos de degradação (Livermore, 2003). Esse tipo de resistência é transferido verticalmente, sendo adquirida pelas progênes somente pela aquisição dos genes de resistência durante a divisão celular bacteriana, quando o material genético da célula mãe duplica-se dando origem às células filhas.

A resistência mediada por aquisição de elementos genéticos ocorre por meio de plasmídios, transposons e integrons. Plasmídios são moléculas extracromossomais circulares de DNA, com replicação própria ou em conjunto com a célula hospedeira. São dispensáveis para a bactéria, mas podem conferir vantagens seletivas, como por exemplo a resistência a um antimicrobiano (Carattoli, 2013). Transposons são elementos genéticos móveis capazes de mudar de posição dentro do genoma, independente da homologia entre a região onde se encontram inseridos e o local ao qual se destinam (Trabulsi & Alterthum, 2008).

Ainda as bactérias podem permutar simultaneamente genes de resistência a diversos antibióticos, estabelecendo o fenômeno da multirresistência (Radu *et al.*, 2003, Livermore, 2003).

Ao mesmo tempo em que o uso excessivo de antimicrobianos é amplamente considerado como um dos fatores que contribuem para a evolução da resistência aos antimicrobianos, a falta de medidas eficazes para controlar a disseminação de bactérias resistentes e a falta de desenvolvimento de novos antimicrobianos também são preocupações importantes.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Recebimento de animais doentes

Ao final de dezembro de 2022, no início do verão no Brasil, foram observadas mortalidades em seis tanques de uma fazenda comercial de tilápia-do-Nilo, localizada em Ilha Solteira - SP. Os peixes apresentavam, em geral, sinais clínicos de acúmulo de líquido ascítico no abdômen, natação errática, exoftalmia, opacidade ocular e úlceras na pele. Dez animais foram coletados dos seguintes tanque-rede: TR36 n=1; TR619 n=1; TR208 n=2, TR453 n=1; TR114 n=2, TR303 n=3) e imediatamente transportados ao laboratório para análises bacteriológicas e de qPCR.

#### 3.2 Exame bacteriológico

Amostras de baço e rim foram assepticamente semeadas em ágar BHI suplementado com 5% de sangue de carneiro desfibrinado (Newprov) para o isolamento de patógenos bacterianos dos gêneros *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Aeromonas*, *Edwardsiella*, *Plesiomonas* e *Pseudomonas*. As placas foram imediatamente incubadas a 28°C em estufa BOD por 48 horas. Os isolados foram submetidos à coloração de Gram. Foi realizado repique secundário dos isolados obtidos para posterior extração do DNA e análise de sequenciamento utilizando o gene 16s rRna.

#### 3.3 Sequenciamento bacteriano 16s rRna

A reação de PCR foi constituída de 10 µL de tampão para PCR 5X, 1 µL de primer fD1 (10 µM), 1 µL de primer rP1 (10 µM), 1 µL de dNTPs (10 mM), 0,2 µL de GoTaq DNA polimerase (5 U/µL Promega) e 36,8 µL de H<sub>2</sub>O MilliQ autoclavada. Os primers fD1 (5' – AGAGTTTGATCCTGGCTCAG – 3') e rP1 (5' – ACGGTTACCTTGTTACGACTT – 3') foram descritos por Weisburg *et al.* (1991). A amplificação foi realizada em termociclador (modelo T100, BioRad) com o seguinte programa: desnaturação inicial a 94°C/4 min, 40 ciclos de 94°C/30 s – 60°C/30 s – 72°C/90 s e extensão final a 72°C/4 min. A verificação da amplificação foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8%, acrescido de brometo de etídio (100 ng/mL), e registrada em fotodocumentador acoplado a transiluminador UV. Os produtos amplificados foram purificados através de precipitação com polietilenoglicol, segundo protocolo de Schmitz e

Riesner (2006). Os produtos purificados foram submetidos à reação de sequenciamento pelo método de terminação de cadeia (Sanger *et al.*, 1977). A reação constituiu de 5 µL de produto de PCR, 1 µL de reagente Big Dye 3.1 (Applied Biosystems), 1,5 µL de tampão de diluição, 0,3 µL de primer fD1 ou rP1 (10 M) e 2,2 µL de H<sub>2</sub>O MilliQ autoclavada. A reação foi realizada em termociclador (modelo T100, BioRad) com o seguinte programa: desnaturação inicial a 95°C/1 min seguida de 25 ciclos de 95°C/5 s – 60°C/4 min. Os produtos da reação de sequenciamento foram precipitados pela adição de 40 µL de isopropanol 75%, seguida de centrifugação a 12.000 g/10 min. Foram adicionados mais 100 µL de isopropanol 75% e novamente centrifugado a 12.000 g/5 min. Após descartar o sobrenadante, o sedimento foi seco e ressuspenso em 10 µL de formamida e desnaturado a 95°C/2 min. O sequenciamento foi realizado em sequenciador capilar 3500XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

### **3.4 Infecção experimental**

#### **3.4.1 Alojamento dos animais**

O estudo foi realizado nas instalações do laboratório Pathovet, situado em Ribeirão Preto/SP. O alojamento de 300 tilápias com peso médio de 3 g foi realizado no dia 12/12/2022. Imediatamente após a chegada dos peixes nas instalações do laboratório Pathovet, estes foram alocados em tanque de 500 L, em média 3 g de peixe vivo por litro de água.

Após alojamento dos peixes, foi iniciado o tratamento preventivo com sal (1 ppm) por 7 dias e fornecimento de ração contendo oxitetraciclina (TM®-700, Phibro Saúde Animal Internacional Ltda, Brasil) respeitando a recomendação do produto de 11,85 g de TM-700 por kg de peso vivo/dia. Foi utilizada uma ração formulada para atender aos níveis de nutrientes exigidos para tilápia, produzida pela Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios - Instituto de Pesca, São José do Rio Preto com formulação demonstrada na Tabela 1 do capítulo 1.

Posteriormente os animais foram pesados e distribuídos em 24 aquários de 62,5 L para aclimação por 7 dias.

Durante o tratamento preventivo e na aclimação dos peixes foi realizado o controle de qualidade da água, através da mensuração dos níveis de oxigênio e temperatura por meio de um medidor de oxigênio dissolvido e

temperatura (HI9146, Hanna Instruments Brasil Imp. e Exp. LTDA, Barueri/SP, Brasil), pH, amônia, Cl livre e nitrito utilizando kits e equipamento Fotômetro Multi-parâmetros com CQO (HI83399, Hanna Instruments Brasil Imp. e Exp. LTDA, Barueri/SP, Brasil). Ademais, a temperatura média da água nos tanques foi mantida a 28°C por meio de aquecedores com termostato integrado Roxin Ht1300/Q3 e sala climatizada a 27°C durante todo período experimental.

Após o período de aclimação, os peixes foram anestesiados com uma solução de óleo de cravo 1 g 10 L<sup>-1</sup> (Gonçalves *et al.*, 2008), pesados em balança semi-analítica (BL320H, Shimadzu do Brasil Comércio Ltda., Barueri/SP, Brasil) e distribuídos nos aquários, sendo 10 peixes por aquário. Os animais foram alimentados 3 vezes ao dia e o período experimental foi de 15 dias.

### **3.4.2 Delineamento experimental**

O experimento foi realizado seguindo um delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 6 tratamentos e 4 repetições, totalizando 24 unidades experimentais. Cada aquário foi considerado como uma unidade experimental e o valor médio de cada unidade foi utilizado para as análises estatísticas.

### **3.4.3 Preparação do inóculo e desafio bacteriano por *Aeromonas veronii***

O preparo do inóculo e desafio bacteriano foi realizado conforme metodologia descrita no capítulo 1 item 3.4 desta dissertação.

## **3.5 Variáveis Analisadas**

### **3.5.1 Sobrevivência e sinais clínicos**

A sobrevivência, sinais clínicos e diagnóstico microbiológico foram analisados conforme descritos no capítulo 1, item 4.1 e 4.2 desta dissertação.

### **3.5.2 Diagnóstico microbiológico e molecular**

#### **Diagnóstico Microbiológico**

Durante o período experimental (14 dias após infecção) todos os animais mortos foram congelados para posterior necropsia e coleta de órgãos para exame microbiológico. Coletou-se de forma asséptica amostras de rim e encéfalo e semeadas em meio ágar BHI suplementado com sangue de carneiro

desfibrinado 5% e incubado em estufa por 48 h à 28°C. Após às 48 horas de incubação foi realizada a técnica de coloração Gram nas colônias para confirmação da morfologia de todos os isolados.

#### Detecção do patógeno através do gene 16s rRNA

Ao final do experimento, durante a necropsia, o rim, fígado e baço foram amostrados de forma asséptica. Foram selecionados animais por tratamento para realização da análise de PCR em tempo real, a fim de detectar a presença da bactéria *Lactococcus spp.* Cada amostra foi composta por um *pool* de no mínimo 3 animais.

#### **3.5.3 Perfil de resistência à antimicrobianos**

Foi realizado antibiograma e MIC para as cepas bacterianas obtidas dos peixes recebidos da piscicultura de Ilha Solteira. A metodologia utilizada é descrita no item 4.4 do capítulo 1 desta dissertação.

#### Detecção molecular de genes de resistência

Os genes codificadores de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido - ESBLs (blaCTX-M dos grupos 1, 2, 8, 9 e 25), carbapenemases (blaNDM, blaIMP, blaVIM, blaKPC e blaOXA-48) e determinantes de resistência às quinolonas mediadas por plasmídeos (qnrA, qnrB e qnrS) foram pesquisados por PCR convencional. A PCR foi realizada para um volume final de 25  $\mu$ L sendo adicionados: 60ng de DNA genômico, 0,2 mM de cada um dos quatro nucleotídeos (Thermo-Scientific, EUA), 2,5  $\mu$ L de tampão PCR 10X concentrado (Thermo-Scientific, EUA), 2,0 mM de solução de MgCl<sub>2</sub> (Thermo-Scientific, EUA), 0,625U de Taq DNA polimerase (Thermo-Scientific, EUA), 21 pmol de cada um dos primers (Invitrogen Life Technologies) e água ultra-pura (q.s.p. 25  $\mu$ L, Sigma). Para amplificação dos genes em estudo foi usado, inicialmente, um ciclo de desnaturação de 94°C por 5 minutos, posteriormente 30 ciclos com as seguintes temperaturas de 94°C por 1 minuto (desnaturação), temperatura de anelamento por 1 minuto e 72°C por 1 minuto (extensão). Posteriormente, uma única etapa de extensão final a 72°C por 10 minutos. O termociclador utilizado para os experimentos foi Mastercycler Gradiente (Eppendorf, Hamburg, Alemanha). Os genes amplificados nas PCR, primers utilizados, temperaturas

de anelamento e tamanhos dos fragmentos obtidos estão descritos nos Quadro 1.

**Quadro 1** – Primers utilizados na detecção de genes codificadores de  $\beta$ -lactamases e quinolonas, temperatura de anelamento e tamanho dos fragmentos

| Gene                           | Primers                                | Sequência (5' – 3')                             | Temperatura de anelamento (°C) | Tamanho (pb) | Referência                          |
|--------------------------------|----------------------------------------|-------------------------------------------------|--------------------------------|--------------|-------------------------------------|
| <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>  | CTX-M1 f<br>CTX-M1 r                   | AAAAATCACTGCGCCAGTTC<br>AGCTTATTCATCGCC ACGTT   | 52                             | 415          | (Woodford, Fagan & Ellington, 2006) |
| <i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>  | CTX-M2 f<br>CTX-M2 r                   | CGACGCTACCCCTGCTAT<br>CCAGCGTCAGATTTTTCAGG      | 52                             | 552          |                                     |
| <i>bla</i> <sub>CTX-M-8</sub>  | CTX-M8 f<br>CTX-M8 r                   | TCGCGTTAAGCGGATGATGC<br>AACCCACGATGTGGGTAGC     | 52                             | 666          |                                     |
| <i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub>  | CTX-M9 f<br>CTX-M9 r                   | CAAAGAGAGTGCAACGGATG<br>ATTGGAAAGCGTTCATCACC    | 52                             | 205          |                                     |
| <i>bla</i> <sub>CTX-M-25</sub> | CTX-M25 f<br>CTX-M25 r                 | GCACGATGACATTCGGG<br>AACCCACGATGTGGGTAGC        | 52                             | 327          |                                     |
| <i>bla</i> <sub>NDM</sub>      | IsoCarba_NDM f<br>IsoCarba_NDM r       | ACTTGGCCTTGCTGTCCTT<br>CATTAGCCGCTGCATTGAT      | 66                             | 603          | (Bogaerts <i>et al.</i> , 2013)     |
| <i>bla</i> <sub>VIM</sub>      | IsoCarba_VIM f<br>IsoCarba_VIM r       | TGTCCGTGATGGTGATGAGT<br>ATTCAGCCAGATCGGCATC     | 66                             | 437          |                                     |
| <i>bla</i> <sub>IMP</sub>      | IsoCarba_IMP f<br>IsoCarba_IMP r       | ACAYGGYTTRGTDGKCTTG<br>GGTTTAAYAAARCAACCACC     | 66                             | 387          |                                     |
| <i>bla</i> <sub>KPC</sub>      | IsoCarba_KPC f<br>IsoCarba_KPC r       | TCGCCGTCTAGTTCTGCTGTCTTG<br>ACAGCTCCGCCACCGTCAT | 66                             | 353          |                                     |
| <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>   | IsoCarba_OXA-48 f<br>IsoCarba_OXA-48 r | ATGCGTGTATTAGCCTTATCG<br>CATCCTTAACCACGCCCAAATC | 66                             | 265          |                                     |
| <i>qnrA1 a</i><br><i>qnrA6</i> | QnrAm-f<br>QnrAm-r                     | AGAGGATTTCTCACGCCAGG<br>TGCCAGGCACAGATCTTGAC    | 54                             | 580          | (Cattoir <i>et al.</i> , 2007)      |
| <i>qnrB1 a</i><br><i>qnrB6</i> | QnrBm-f<br>QnrBm-r                     | GGMATHGAAATTCGCCACTG<br>TTTGCYGYCGCCAGTCGAA     | 54                             | 264          |                                     |
| <i>qnrS1 a</i><br><i>qnrS2</i> | QnrSm-f<br>QnrSm-r                     | GCAAGTTCATTGAACAGGGT<br>TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG   | 54                             | 428          |                                     |
| <i>qnrC</i>                    | QnrC-f                                 | GGGTTGTACATTTATTGAATC                           | 50                             | 447          | (Wang <i>et al.</i> , 2009)         |
|                                | QnrC-r                                 | TCCACTTTACGAGGTTCT                              |                                |              |                                     |
| <i>qnrD</i>                    | QnrD-f                                 | CGAGATCAATTTACGGGGAATA                          | 62                             | 581          | (Cavaco <i>et al.</i> , 2009)       |
|                                | QnrD-r                                 | AACAAGCTGAAGCGCCTG                              |                                |              |                                     |

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Condições experimentais

Durante todo o período experimental, os parâmetros físico-químicos da água foram monitorados com o intuito de garantir os níveis seguros para a tilápia-do-Nilo (Tabela 1). A temperatura média da água nos aquários foi monitorada e mantida o mais próximo possível de 28°C ao longo do período experimental, já que os surtos de *Aeromonas sp.* observados em literatura ocorrem em temperaturas elevadas.

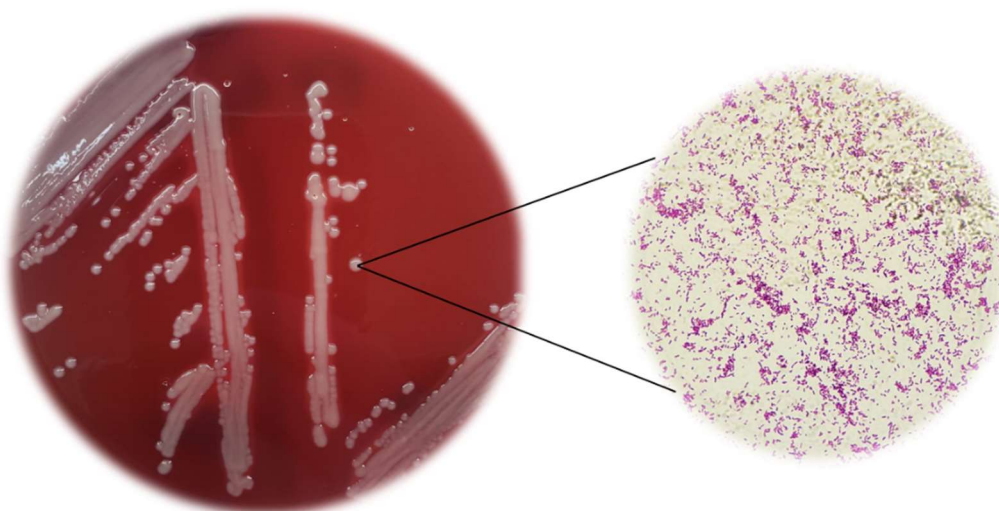
**Tabela 1.** Parâmetros de qualidade da água de tilápias-do-Nilo, *O. niloticus*, desafiadas com diferentes concentrações de *A. veronii* durante 15 dias.

| <b>Parâmetros de qualidade da água</b> |               |                |             |                  |
|----------------------------------------|---------------|----------------|-------------|------------------|
| Oxigênio (mg/L)                        | Amônia (mg/L) | Nitrito (ug/L) | pH          | Temperatura (°C) |
| 4,79 ± 1,11                            | 0,44 ± 0,10   | 0,45 ± 0,27    | 6,82 ± 0,35 | 27,21 ± 1,05     |

### 4.2 Isolamento, caracterização e análise da sequência 16s rRNA

Após cultivo bacteriano dos animais mortos durante o experimento, os isolados obtidos foram analisados. A coloração de Gram realizada em todos os isolados (T2, T3, T4, T5 e T6) apresentou morfologia compatível com a espécie *Aeromonas*, bastonetes Gram-negativos (Figura 1). O gênero *Aeromonas* é composto por bactérias Gram negativas em forma de bacilos ou cocobacilos com as extremidades arredondadas (0,3 – 1,0 µm de largura e 1,5 – 3,5 µm de comprimento), que ocorrem isoladas, aos pares ou raramente em cadeias curtas (Brenner *et al.*, 2005).





**Figura 1.** Isolado bacteriano em placa com meio de cultivo ágar Brain Heart Infusion suplementado com 5% de sangue de carneiro após 24 h em BOD à 28°C e resultado após a coloração de Gram.

A confirmação da espécie e gênero deu-se através de sequenciamento do gene 16S rRNA, correspondente à *Aeromonas veronii*, apresentando 99,51% de semelhança com *Aeromonas veronii* cepa CH-GX-FC-3-1A-2021 (sequência parcial de gene 16S RNA ribossomal) (acesso Genbank nº ON203099.1). *Aeromonas veronii* foi a única bactéria isolada dos tratamentos T2, T3, T4, T5, entretanto para T6 (menor concentração estudada) não foi possível isolar a bactéria do animal selecionado durante a mortalidade no período experimental. Assim, os isolados utilizados neste estudo devem ser classificados como *A. veronii*.

### 4.3 Perfil de resistência a antimicrobianos

#### Antibiograma e concentração inibitória mínima

*A. veronii* demonstrou sensibilidade somente para florfenicol, enquanto foi resistente a outros três antimicrobianos testados, oxitetraciclina, enrofloxacina e amoxicilina.

A CIM observada foi 32 µg/mL para oxitetraciclina, 4 µg/mL para enrofloxacina e maior ou igual 256 µg/mL para amoxicilina. Conforme observado no antibiograma a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano foi observado frente ao florfenicol, menor ou igual a 0,5 µg/mL (Tabela 2).

**Tabela 2.** Valores de halo de resistência e CIM encontrados para *A. veronii* frente a diferentes antimicrobianos.

| PRODUTO | ANTIBIOGRAMA (mm) | CIM µg/mL |
|---------|-------------------|-----------|
| OTC     | 0                 | 32        |
| ENR     | 20                | 4         |
| AML     | 0                 | ≥ 256     |
| FFC     | 34                | ≤ 0,5     |

Em geral, *Aeromonas sp.* apresentam sensibilidade à quinolonas (classe a qual pertence o antimicrobiano enrofloxacina), tetraciclina (oxitetraciclina) e anfenicóis (florfenicol), e resistência para penicilinas (amoxicilina) (Janda & Abbott, 2010).

Em contrapartida alguns pesquisadores isolaram cepas de *A. caviae*, *A. hydrophila* e *A. veronii bv sobria* resistentes – mesmo em baixa frequência – à tetraciclina, com percentuais de resistência entre 25 e 90% em relação a cepas isoladas de diferentes fontes alimentares (Costa *et al.*, 2003; Carneiro & Rossi Junior, 2006; Evangelista-barreto *et al.*, 2006; Palú *et al.*, 2006; Awan *et al.*, 2009; Evangelista-barreto *et al.*, 2010). Yano *et al.* (2015) estudando cepas isoladas de camarão encontraram resultados semelhantes aos nossos, relatando um percentual de 18% de amostras resistentes à tetraciclina.

Da mesma forma, nos últimos anos, autores publicaram relatos sobre estirpes resistentes a tetraciclina e fluoroquinolonas (Castro-Escarpulli *et al.*, 2003; Gao *et al.*, 2012; Skwor *et al.*, 2014; Osińska & Harnisz, 2016; Van Alphen *et al.*, 2016). Na aquicultura, a oxitetraciclina é principalmente utilizada no tratamento de infecções por bactérias Gram-negativas (Rigos *et al.*, 2006), como

septicemia hemorrágica por *A. liquefaciens* e doenças por *Pseudomonas* em bagres.

Um fator que pode estar relacionado a resistência a este antimicrobiano observada neste estudo é o uso abundante desta molécula na aquicultura nacional, provocado pela restrição legal no uso de outras moléculas como forma de controle no surto de doenças.

Outro fator a ser considerado está no uso indiscriminado de antimicrobianos. De acordo com o histórico de cada antimicrobiano, o grupo das tetraciclinas apresentou lançamento comercial entre 1950 e 1970 (Pereira-Maia *et al.*, 2010). Em meados de 1950, a maioria das bactérias comensais e patogênicas mostravam-se sensíveis a tetraciclinas, mas em 1953, foi isolada a primeira bactéria tetraciclina resistente, *Shigella dysenteriae*, e após 2 anos, a primeira *Shigella* multidroga resistente (Chopra & Roberts, 2001).

As cepas de *Aeromonas* são quase universalmente sensíveis às fluoroquinolonas. No entanto, as grandes quantidades usadas na aquicultura na última década foram associadas a uma tendência crescente na prevalência de resistência às quinolonas. Nossos resultados foram condizentes com o relatado por Yang *et al.*, (2016), que observaram resistência de cepas *A. veronii* frente a antimicrobianos desta classe. Na Espanha, o mecanismo de resistência à quinolona foi detectado em 33 isolados, entre eles, *A. veronii*, oriundo de água doce (Alcaide *et al.*, 2009).

A resistência a amoxicilina observada neste estudo já era esperada, já que este comportamento geralmente ocorre para *Aeromonas* spp. Inúmeros estudos relatam uma alta frequência de cepas *A. veronii* resistentes a  $\beta$ -lactâmicos, classe farmacológica atribuída a amoxicilina. Costa *et al.* (2008), avaliaram a sensibilidade aos antimicrobianos de bactérias *Aeromonas* spp. isoladas de jundiás, observando resistência de 95% (n=13) dos isolados de *Aeromonas* spp. à penicilina. Várias são as estratégias de proteção da *Aeromonas* spp. aos  $\beta$ -lactâmicos, entre estes a destruição deste grupo de fármacos pela produção de  $\beta$ -lactamase.

O florfenicol foi o antimicrobiano que mostrou resultados mais satisfatórios para a inibição do crescimento da *A. veronii* isolada de juvenis de tilápia, tanto na análise de CIM quanto no antibiograma. Os valores de CIM ficaram próximo ao relatado por Schrader *et al.* (2013). Em estudo anteriormente

realizado por Akinbowale *et al.* (2007) a menor frequência de cepas resistentes a florfenicol foi observada, apenas 2,1%, enquanto 97,9% foram resistentes à amoxicilina.

Em 1994, o florfenicol foi licenciado para tratamento de infecções bacterianas na produção de salmão do Chile e, após 13 anos, já foi registrada a presença de bactéria resistente ao florfenicol oriundo da produção de salmão (Miranda & Rojas, 2007), fato que ressalta a importância do uso responsável e adequado deste produto no cultivo de peixes no Brasil

### Detecção molecular de genes de resistência

Em virtude da grande diversidade do setor aquícola, o uso de agentes antimicrobianos não pode ser generalizado em todas as situações. Devem-se considerar os aspectos do antimicrobiano, tais como dosagens, uso racional, espécies cultivadas, bem como a farmacodinâmica e a farmacocinética da droga a ser utilizada.

O uso indiscriminado de antibióticos na aquicultura leva ao desenvolvimento de bactérias com característica de múltipla resistência aos antimicrobianos (Frappaola & Guest, 1986). Mutações e outras alterações genéticas no genoma bacteriano geram a base da resistência antimicrobiana. Essas alterações genéticas podem ocorrer de diversas maneiras, incluindo mutação espontânea e aquisição de elementos genéticos móveis, tais como plasmídeos e integrons (Guardabassi *et al.*, 2010).

No presente estudo, a presença de genes ligados a resistência à duas classes farmacológicas de antimicrobianos,  $\beta$ -lactâmicos e quinolonas, foram verificadas. Não houve amplificação para genes codificadores de  $\beta$ -lactamases.

O mais importante mecanismo de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos é a sua inativação por  $\beta$ -lactamases, um catalisador do anel  $\beta$ -lactâmico, que é hidrolisado para inativar o agente antibacteriano e impossibilitar que ele aja contra as enzimas responsáveis pela síntese da parede celular bacteriana (Bertoncheli & Horner, 2008). A primeira  $\beta$ -lactamase foi identificada em uma cepa de *Escherichia coli* em 1940, antes mesmo da penicilina ser usada na prática clínica (Abraham & Chain, 1988). Dentre as carbapenemases mais importantes estão a IMP (imipenemase), a NDM (Nova Deli Metallo- $\beta$ -lactamases), de enterobactérias e as enzimas OXAs (Classe D) (Karaïskos & Giamarellou, 2014; Jean *et al.*, 2015). Os genes *bla<sub>VIM</sub>* e *bla<sub>IPM</sub>* já foram detectados em algumas espécies de *Aeromonas*, mas existem poucos relatos na literatura (Neuwirth *et al.*, 2007; Adler *et al.*, 2014; Antonelli *et al.*, 2016).

Muitos gêneros de bactérias Gram-negativas apresentam uma ocorrência natural, ou seja,  $\beta$ -lactamases mediadas cromossomicamente. Acredita-se que essas enzimas evoluíram a partir de proteínas de membrana externa (PBP), com as quais mostram alguma homologia de sequência (Drawz & Bonomo, 2010).

O fato de o presente estudo não constatar a presença dos genes de resistência propostos, não deve ser um fator determinante para conferir à bactéria estudada sensibilidade à esta classe de antimicrobianos. A permeabilidade da membrana celular é importante para que os antibióticos obtenham o efeito esperado, seja ele bactericida (morte bacteriana) ou bacteriostático (inibidor do crescimento bacteriano).

Diferentemente das bactérias Gram-positivas, as bactérias Gram-negativas possuem naturalmente uma resistência intrínseca (menor permeabilidade), devido sua parede celular apresentar uma membrana externa composta por fosfolipídeos, lipoproteínas, proteínas e lipopolissacarídeos (LPS), além da camada de peptidoglicanos (Machado *et al.*, 2019), este mecanismo pode dificultar ou até mesmo impedir a ação antimicrobiana.

As quinolonas têm sido amplamente utilizadas e este fato conduziu a um aumento da resistência bacteriana a esta classe de antimicrobianos. Desta maneira, foi realizada análise para verificar a presença ou ausência de genes *qnrA1* a *qnrA6*, *qnrB1* a *qnrB6*, *qnrC*, *qnrD* e *qnrS1* a *qnrS2*.

A resistência antimicrobiana foi confirmada pela presença do gene *qnrS*.

Essa resistência às quinolonas é principalmente devido a mecanismos mediados cromossomicamente, incluindo mutações em alvos da droga (DNA-girase e topoisomerase), diminuição da acumulação de quinolonas (bomba de efluxo e diminuição da expressão de porinas) (Zhang *et al.*, 2012). Múltiplos genes *qnr* já foram caracterizados: *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrC* e *qnrD* (Silva-Sánchez *et al.*, 2013).

Estudos recentes descobriram que os mecanismos de resistência às quinolonas também são mediados por vários plasmídeos (resistência às quinolonas mediada por plasmídeos - PMQR) e seus genes associados, incluindo o *qnr*. Sinha *et al.* (2004) reportaram altos índices de resistência intrínseca ao ácido nalidixico e a ciproloxacina (quinolonas) e relacionou essa resistência aos genes *gyr* de origem cromossomal e *qnr* de origem plasmidial.

Neste estudo, esta hipótese foi confirmada através de análise para verificar a presença do plasmídeo *ColE*, anteriormente já descrito como sendo um PMQR do gene *qnrS*. Carattoli (2009) havia associado a presença de genes plasmídicos de resistência ao plasmídeo *ColE*. Em geral, os plasmídeos semelhantes a *ColE* estão amplamente presentes nas enterobacteriaceae, bem

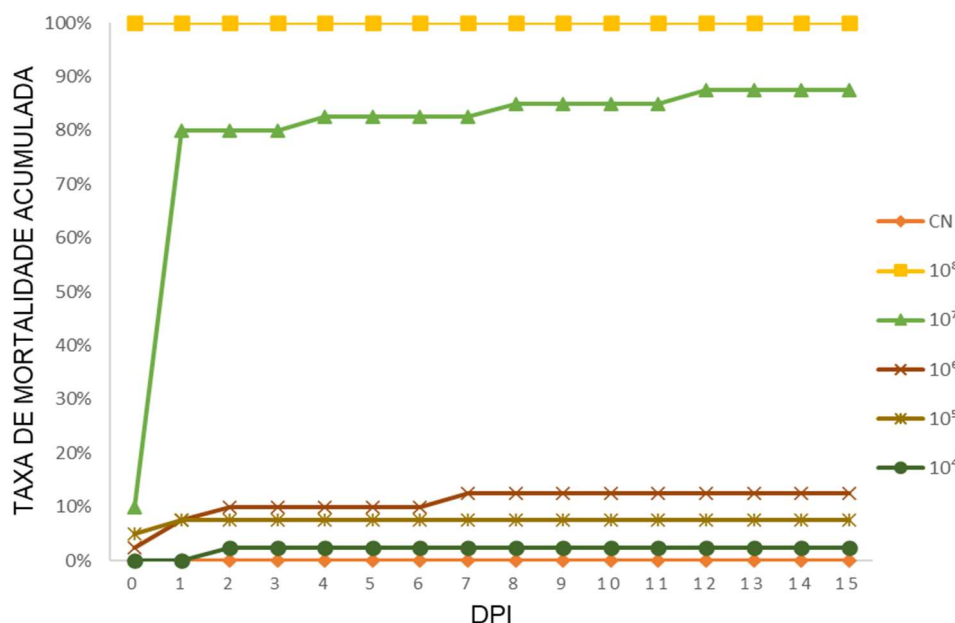
como *Aeromonas spp.* Ressalta-se que outros plasmídeos também tem um papel importante na disseminação destes genes (García-Fernández & Carattoli, 2009).

Os genes PMQR geralmente estão localizados em um plasmídeo, que não apenas aumenta a adaptabilidade das bactérias às drogas, mas também facilita a disseminação de genes de resistência entre bactérias de diferentes espécies. Uma vez que os plasmídeos, no geral, têm um grande impacto na evolução do genoma, torna-se essencial uma melhor compreensão do seu papel na transferência e disseminação de resistências a antibióticos.

#### **4.5 Desafio experimental**

Os resultados mostraram que a espécie de *A. veronii* testada foi patogênica para juvenis de tilápia e a taxa de mortalidade foi dependente da dose. A mortalidade teve início nas primeiras 24 horas pós desafio e prosseguiu até o décimo segundo dia pós infecção. Os animais que foram infectados com *A. veronii* apresentaram valores de mortalidade variando de 3% na concentração de bactérias  $1,2 \times 10^4$  a 100% na  $1,2 \times 10^8$  ao final do experimento.

Ademais, as taxas de mortalidade finais nos grupos  $1,2 \times 10^5$ ,  $1,2 \times 10^6$  e  $1,2 \times 10^7$  foram de 8, 13 e 88%, respectivamente (Figura 2). Neste contexto, destaca-se que não houve mortalidade no grupo controle, evidenciando que o ambiente estava controlado e não foi o responsável pelos valores de mortalidade observados nos grupos desafiados, demonstrando que a metodologia de inoculação experimental intraperitoneal foi realizada de maneira correta.



**Figura 2.** Percentual de mortes acumuladas de tilápias-do-Nilo, infectadas via intraperitoneal com 100  $\mu$ L de *A. veronii* após 15 dpi. (CN: tilápias inoculadas via intraperitoneal com solução salina).

As infecções causadas por *Aeromonas móveis* são provavelmente as doenças bacterianas mais importantes e comumente relatadas em peixes de água doce (Cipriano, Bullock & Pyle, 1984; Noga, 2010, Austin e Austin, 2012), e várias *Aeromonas*, incluindo *A. veronii*, *A. sobria* e *A. jandaei*, além de *A. hydrophila*, foram associadas a doenças em tilápia do Nilo (Li e Cai, 2011; Dong *et al.*, 2017).

Dong *et al.*, (2017) associaram *A. veronii* e *A. jandaei* a surtos de mortalidade em *Oreochromis niloticus*, e da mesma maneira, ocorrendo o maior índice de mortalidade dentro das primeiras 24 h de infecção. Amal *et al.* (2018) relataram uma co-infecção natural de TiLV e *A. veronii* em uma fazenda de tilápia vermelha híbrida da Malásia (*O. niloticus* x *O. mossambicus*).

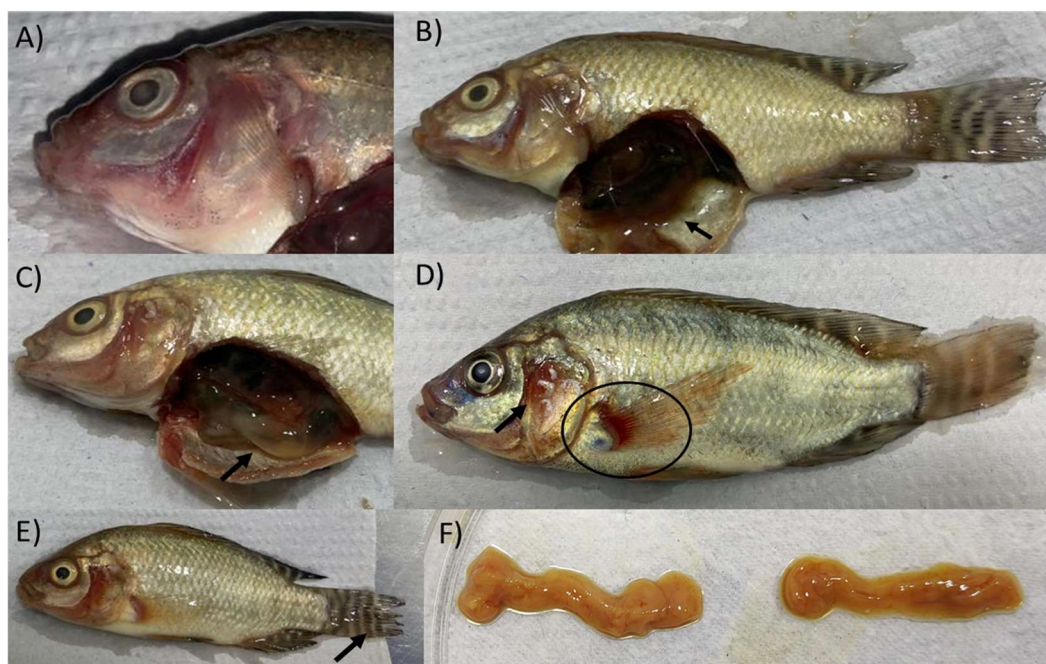
*A. veronii* foi relatada em vários peixes hospedeiros, como *Astronotus ocellatus* (Sreedharan *et al.*, 2011), *Leiocassis longirostris* (Cai *et al.*, 2012), *Trichogaster sp.* e *Carassius carassius* (Sreedharan *et al.*, 2013).

No entanto, no Brasil, as infecções por *Aeromonas* em peixes foram atribuídas principalmente a *A. hydrophila*, não havendo até o momento relatos de *A. veronii* relacionada a surtos de doenças responsáveis por alta mortalidade nos animais de cultivo em pisciculturas.



No presente estudo os animais infectados apresentaram sintomas clínicos comumente apresentados por doenças causadas por *Aeromonas*, como opacidade ocular, pontos hemorrágicos pelo corpo, lesões no opérculo, líquido ascítico na cavidade abdominal e acúmulo de líquido no intestino e inchaço (Dong *et al.*, 2017; Assane *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2021), conforme demonstrado na Figura 3.

Os resultados sugerem que *A. veronii* pode representar um risco para a saúde dos peixes e deve ser considerada como potencial ameaça no cultivo de tilápias, ressaltando a importância da ciência do produtor sobre a presença desse patógeno no ambiente aquático, especialmente quando os peixes são expostos a fatores estressores, como alta densidade de cultivo, presença excessiva de matéria orgânica no meio aquático, níveis considerados tóxicos de amônia e nitrito, ou até mesmo mudanças repentinas de temperatura.



**Figura 3.** Sinais clínicos observados em juvenis de tilápia do Nilo experimentalmente infectados com uma cepa patogênica de *A. veronii*. A) opacidade ocular; B) líquido ascítico; C) presença de líquido no intestino e inchaço; D) lesão no opérculo (seta) e hemorragia na nadadeira; E) corrosão da nadadeira; F) Fígado pálido.

## 5 CONCLUSÃO

No presente estudo, *A. veronii*, até onde sabemos, foi pela primeira vez relacionada a altos índices de mortalidade em piscicultura comercial localizada no estado de São Paulo, Brasil. Desta maneira, em ensaio experimental foi comprovadamente virulenta e patogênica, causando grande mortalidade. Além disso, a cepa mostrou um perfil multirresistente à antimicrobianos.

Tais observações ressaltam a importância de um monitoramento efetivo para identificação de patógenos responsáveis por surtos de doenças, a fim de possibilitar tomada de decisão eficiente e assertiva, bem como estabelecimento do uso criterioso de antimicrobianos, possibilitando uma piscicultura sustentável.

## 6 REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, E. P.; CHAIN, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Reviews of Infectious Diseases*, v. 10, n. 4, p. 677–8, 1988.
- ADLER, A., VAZ-MOREIRA, I., LOPES, A. R., NOVOTNY, L., BASTOS, A. S., GILLINGS, M., PEIXE, L., & MANTEIGA, P. Emergence of VIM-producing *Aeromonas caviae* in Israeli hospitals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 69, n. 5, p. 1211–1214, 2014.
- AKINBOWALE, O. L.; PENG, H.; GRANT, P.; BARTON, M. D. Antibiotic and heavy metal resistance in motile aeromonads and pseudomonads from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Australia. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 30, p. 177-182, 2007.
- ALCAIDE, E.; BLASCO, M. D; ESTEVE, C. Mechanisms of quinolone resistance in *Aeromonas* species isolated from humans, water and eels. *Research in Microbiology*, Paris, p. 1-6, 2009.
- AMAL, M. N. A., KOH, C. B., NURLIYANA, M., SUHAIBA, M., NOR-AMALINA, Z., SANTHA, S., DIYANA NADHIRAH, KP, YUSOF, MT, INA-SALWANY, MY, ZAMRI-SAAD, M. Um caso de co-infecção natural do Tilapia Lake Virus e *Aeromonas veronii* em uma fazenda de tilápia vermelha híbrida da Malásia (*Oreochromis niloticus* × *O. mossambicus*) apresentando alta mortalidade. *Aquicultura* 485, 12–16, 2018.
- ANTONELLI, A., MIRIAGOU, V., CARATTOLI, A., TZELEPI, E., COURVALIN, P., TZELEPOGLOU, F., ROSSOLINI, G. M. Newborn bacteraemia caused by an *Aeromonas caviae* producing the VIM-1 and SHV-12  $\beta$ -lactamases, encoded by a transferable plasmid. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 71, n. 1, p. 272–274.

AOKI, T., SATOH, T., KITAO, T. New tetracycline resistance determinant on R plasmids from *Vibrio anguillarum*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 31, n. 9, p. 1446– 1449, 1987.

ASSANE, I. M., DE SOUSA, E. L., VALLADÃO, G. M. R., TAMASHIRO, G. D., CRISCOULO-URBINATI, E., HASHIMOTO, D. T., PILARSKI, F. Phenotypic and genotypic characterization of *Aeromonas jandaei* involved in mass mortalities of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) in Brazil. *Aquaculture*, v. 541, p. 736848, 2021.

AUSTIN B. & AUSTIN D.A. *Bacterial Fish Pathogens. Diseases of Farmed and Wild Fish*. 5th edn. Springer, Netherlands, 2012.

AWAN, M. B.; MAQBOOL, A.; BARI, A.; KROVACEK, K. Antibiotic susceptibility profile of *Aeromonas* spp. isolates from food in Abu Dhabi, United Arab Emirates. *New Microbiologica*, v. 32, p. 17-23, 2009.

BALASSIANO, I. T., BASTO, M. C. F., MADUREIRA, D. J., SILVA I. G., FREITAS-ALMEIDA, OLIVEIRA, S. S. The involvement of *tetA* and *tetE* tetracycline resistance genes in plasmid and chromosomal resistance of *Aeromonas* in Brazilian strains. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 102, n. 7, p. 861-866, 2007.

BEAZ-HIDALGO, R., ALPERI, A., BUJÁN, N., ROMALDE, J.L., FIGUERAS, M.J. Comparison of phenotypical and genetic identification of *Aeromonas* strains isolated from diseased fish. *Syst Appl Microbiol*, v. 33, p. 149-153, 2010.

BERTONCHELI, C.M., HORNER, R. A review on metallo-beta-lactamases. *Rev Bras Cienc Farm*, v. 44, n. 4, p. 577-599, 2008.

BILA, D.M., DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. *Quim Nova*, v. 26, p. 523-530, 2003.

BOGAERTS, P., DE CASTRO, R.R., DE MENDONÇA, R., HUANG, T.D., DENIS, O., GLUPCZYNSKI, Y. Validation of carbapenemase and extended-spectrum  $\beta$ -lactamase multiplex endpoint PCR assays according to ISO 15189. *J Antimicrob Chemother*, v. 68, p. 1576-1582, 2013.

BRANDI, G., SISTI, M., SCHIAVANO, G.F., SALVAGGIO, L., ALBANO, A. Survival of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* and *Aeromonas sobria* in soil. *J Appl Bacteriol*, v. 81, p. 439-444, 2008.

BRENNER, D.J.; KRIEG, N.R.; STALEY, J.T.; GARRITY, G.M.; BRENNER, D.J.; VOS, P. De; GARRITY, G.M.; GOODFELLOW, M.; NOEL, R. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Proteobacteria, The Gammaproteobacteria*. Second Edition. [s.l.] Springer, 2005.

CABELLO, F.C., GODFREY, H.P., TOMOVA, A., IVANOVA, L., DÖLZ, H., MILLANAO, A., BUSCHMANN, A.H. Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. *Environ Microbiol*, v. 15, p. 1917-1942, 2013.

CARATTOLI, A. Plasmids and the spread of resistance. *Int J Med Microbiol*, v. 303, p. 298-304, 2013.

CARNEIRO, M.S.; ROSSI JUNIOR, O.D. Bactérias do gênero *Aeromonas* no fluxograma de beneficiamento do leite tipo A e seu comportamento frente à ação de antimicrobianos. *Arq Inst Biol*, São Paulo, v. 73, n. 3, p. 271-276, jul./set., 2006.

CASTRO-ESCARPULLI, G.; FIGUEIRAS, M.J.; AGUILERA-ARREOLA, G.; SOLER, L.; FERNÁNDEZRENDÓN, E.; APARICIO, G.O.; GUARRO, J.; CHACÓN, M.R. Characterisation of *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. *International Journal of Food Microbiology*, v. 84, p. 41-49, 2003.

CATTOIR, V., POIREL, L., ROTIMI, V., SOUSSY, C.J., NORDMANN, P. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *J Antimicrob Chemother*, v. 60, p. 394-397, 2007.

CATTOIR, V.; POIREL, L.; AUBERT, C.; SOUSSY, C.J.; NORDMANN, P. Unexpected occurrence of plasmid mediated quinolone resistance determinants in environmental *Aeromonas* spp. *Emerging Infect Dis*, v. 14, p. 231-237, 2008.

CAVACO, L.M.; HASMAN, H.; XIA, S.; AARESTRUP, F.M. *QnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and *Bovismorbificans* strains of human origin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 53, p. 603–608, 2009. <https://doi.org/10.1128/AAC.00997-08>

CHELOSSI, E.; VEZZULLI, L.; MILANO, A.; BRANZONI, M.; FABIANO, M.; RICCARDI, G.; BANAT, I.B. Antibiotic resistance of benthic bacteria in fish-farm and control sediments of the Western Mediterranean. *Aquaculture*, v. 219, p. 83-97, 2003.

CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol R*, v. 65, p. 232-260, 2001.

CIPRIANO, R. C.; BULLOCK, G. L.; PYLE, S. W. *Aeromonas hydrophila* and motile aeromonad septicemias of fish. US Fish & Wildlife Publications, 1984.

CIPRIANO, R.C. *Aeromonas hydrophila* and motile aeromonad septicemias of fish. U.S. Fish and Wildlife Service, Washington, DC, 2001.

COSTA, F.N.; ROSSI, O.D.J.; AMARAL, L.A. Ação de antimicrobianos sobre estirpes de *Aeromonas* isoladas em diferentes pontos da linha de processamento de frangos. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v. 98, n. 546, p. 95-99, 2003.

COSTA, M.M. da; PEIXOTO, R. de M.; BOIJINK, C. de L.; CASTAGNA, L.; MEURER, F.; VARGAS, A.C. Sensibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de Jundiá (*Rhamdia quelen*). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 28, n. 10, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2008001000006>

DENG, Y.T.; WU, Y.L.; TAN, A.P.; HUANG, Y.P.; JIANG, L.; XUE, H.J.; WANG, W.L.; ZHAO, F. Analysis of antimicrobial resistance genes in *Aeromonas* spp. isolated from cultured freshwater animals in China. *Microbial Drug Resistance*, v. 4, p. 350-356, 2014.

DONG, H.T.; TECHATANAKITARNAN, C.; JINDAKITTIKUL, P.; THAI PRAYOON, A.; TAENGPHU, S.; CHAROENSAPSRI, W.; KHUNRAE, P.; RATTANAROJPONG, T.; SENAPIN, S. *Aeromonas jandaei* and *Aeromonas veronii* caused disease and mortality in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of Fish Diseases*, v. 40, n. 10, p. 1395-1403, 2017. <http://dx.doi.org/10.1111/jfd.12617>

DRAWZ, S. M.; BONOMO, R. A. Three Decades of  $\beta$ -Lactamase Inhibitors. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 23, n. 1, p. 160–201, 1 jan. 2010.

EUZÉBY, J. P. Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire: *Aeromonas hydrophila*. 04 jun 2003. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/nomstaxons.html>>. Acessado em junho 2013.

EVANGELISTA-BARRETO, N. S., CARVALHO, F. C. T., VIEIRA, R. H. S. F., REIS, C. M. F., MACRAE, A., RODRIGUES, D.P. Characterization of *Aeromonas* species isolated from an estuarine environment. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 41, p. 452-460.

FIGUEIREDO, H. C. P., CARNEIRO, D. O., FARIA, F. C., COSTA, G. M. *Streptococcus agalactiae* associado à meningoencefalite e infecção sistêmica em tilápia-doNilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil. *Arq Bras Med Vet Zootec* 58: 678-680, 2006.

FIGUEIREDO, H. C. P., LEAL, C. A. G. Tecnologias aplicadas em sanidades de peixes. *R Bras Zootec* 37:8-14, 2008.

FRAPPAOLA, P. J.; GUEST, G. B. Regulatory status of tetracyclines, penicillin and other antibacterial drugs in animal feeds. *Journal Animal Science*, v.62, p.86-92, 1986.

GAO, P. *et al.* Occurrence of sulfonamide and tetracycline-resistant bacteria and resistance genes in aquaculture environment. *Water Research*, v. 46, n. 7, p. 2355–2364, 2012.

GARCIA, F., KIMPARA, J. M., VALENTI, W. C., AMBROSIO, L. A. Emergency assessment of tilapia cage farming in a hydroelectric reservoir. *Ecol Eng* 68:72-79, 2014.

GARCÍA-FERNÁNDEZ, A., FORTINI, D., VELDMAN, K., MEVIUS, D., CARATTOLI, A. Characterization of plasmids harbouring *qnrS1*, *qnrB2* and *qnrB19* genes in *Salmonella*. *J Antimicrob Chemother*. 63(2):274-81, 2009. doi: 10.1093/jac/dkn470.

GOÑI-URRIZA, M., M. CAPDEPUY, C. ARPIN, N. RAYMOND, P. CAUMETTE, C. QUENTIN. Impact of an urban effluent on antibiotic resistance of riverine

Enterobacteriaceae and *Aeromonas* spp. *Applied Environmental Microbiology*, v. 66, p. 125-132, 2000.

GUARDABASSI, L.; JENSEN, L.B.; KRUSE, H. Guia de antimicrobianos em veterinária. Porto Alegre: Artmed, 267p, 2010.

HOFER, E., REIS, C. M. F., THEOPHILO, G. N. D., CAVALCANTE, 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 da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 39, n. 2, p. 217-220, 2006.

HORNEMAN, A. J., ALI, A., ABBOTT, S. L. *Aeromonas* in MURRAY, P. R. *Manual of Clinical Microbiology*, 9<sup>a</sup> ed, p. 716-722, 2007.

IBRAHIM, M., AHMAD, F., YAQUB, B., RAMZAN, A., IMRAN, A., AFZAAL, M., ... AHMED, S. Mirza, S. A., MAZHAR, I., YOUNUS, M., AKRAM, Q., TASEER, M. S. A., AHMAD, A. and AHMED, S. Current trends of antimicrobials used in food animals and aquaculture. In *Antibiotics and Antimicrobial Resistance Genes in the Environment* ed. Hashmi M. Z. pp. 39-69. USA: National Library of Medicine, 2020.

JANDA, J. M., ABBOTT, S. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 23, n. 1, p. 35-73, 2010.

JEAN, S.-S. *et al.* Carbapenemase-producing Gram-negative bacteria: current epidemics, antimicrobial susceptibility and treatment options. *Future Microbiology*, v. 10, n. 3, p. 407-425, 2015.

JOSEPH, S. W., CARNAHAN, A. The isolation, identification, and systematics of the motile *Aeromonas* species. *Ann Rev Fish Dis* 4:315-343, 1994.

JOSEPH, S. W., CARNAHARAN, A. M. Update on the genus *Aeromonas*. *ASM News*, Philadelphia, v. 66, p. 218-223, 2000.

KARAIKOS, I.; GIAMARELLOU, H. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant Gram-negative pathogens: current and emerging therapeutic approaches. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, v. 15, n. 10, p. 1351-1370, 2014.

KIM, F. J. P., SILVA, A. E. M., SILVA, R. V. S., KIM, P. C. P., ACOSTA, A. C., SILVA, S. M. B. C., SENA, M. J., & MOTA, R. A. Detecção de *Aeromonas* spp. e do gene de virulência aerolisina em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com a técnica de mPCR. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 38(Pesq. Vet. Bras., 2018 38(9)). <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-5609>

KOZINSKA, A. Dominant pathogenic species of mesophilic aeromonads isolated from diseased and healthy fish cultured in Poland. *Journal of Fish Disease*, v. 30, p. 293-301, 2007.

KROVACEK, K., PASQUALE, V., BALODA, S.B., SOPRANO, V., CONTE, M., DUMONTET, S. Comparison of putative virulence factors in *Aeromonas hydrophila* strains isolated from the marine environment and human diarrheal

cases in southern Italy. *Applied Environmental Microbiology*, v. 90, p. 1379-1382, 1994.

LI, C., WANG, R., SU, B., LUO, Y., TERHUNE, J., BECK, B., PEATMAN, E. Evasion of mucosal defenses during *Aeromonas hydrophila* infection of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) skin. *Dev Comp Immunol*, v. 39, p. 447-455, 2013a.

LI, Y., CAI, S.H. Identification and Pathogenicity of *Aeromonas sobria* on tailrot disease in juvenile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Curr Microbiol*, v. 62, p. 623-627, 2011.

LI, Y.W., LIU, L., HUANG, P.R., FANG, W., LUO, Z.P., PENG, H.L., WANG, Y.X., LI, A.X. Chronic streptococcosis in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), caused by *Streptococcus agalactiae*. *J Fish Dis*, v. 37, p. 1-7, 2013b.

LIVERMORE, D.M. Bacterial Resistance: origins, Epidemiology and impact. *Clin Infect Dis*, v. 36, p. S11-S23, 2003.

LULIJWA, R., RUPIA, E. J., ALFARO, A. C. Antibiotic use in aquaculture, policies and regulation, health and environmental risks: a review of the top 15 major producers. *Rev Aquac*, v. 12, p. 640-663, 2020.

MACHADO, O. Antimicrobianos: Revisão Geral para Graduandos e Generalistas, 2019.

MARTIN-CARNAHAN, A., JOSEPH, S.W. Aeromoadaceae. In: BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T.; GARRITY, G. M. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, The Proteobacteria, Part B*. v. 2, 2 ed, Springer-Verlag. New York, USA, p. 556-578, 2005.

MIRANDA, C.D., ROJAS, R. Occurrence of florfenicol resistance in bacteria associated with two Chilean salmon farms with different history of antibacterial usage. *Aquaculture*, v. 266, p. 39-46, 2007.

MONFORT, P., BALEUX, B. Distribution and survival of motile *Aeromonas* spp. in brackish water receiving sewage treatment effluent. *Applied Environmental Microbiology*, v. 9, p. 2459-2467, 1991.

MONTEIRO, S.H., FRANCISCO, J.G., ANDRADE, G.C., BOTELHO, R.G., FIGUEIREDO, L.A., TORNISIELO, V.L. Study of spatial and temporal distribution of antimicrobial in water and sediments from caging fish farms by on-line SPE-LC-MS/MS. *J Environ Sci Health B*, v. 51, p. 634-643, 2016.

MOORE, J.E., HUANG, J., YU, P., MA, C., MOORE, P.J.A., MILLAR, B.C., GOLDSMITH, C.E., XU, J. High diversity of bacterial pathogens and antibiotic resistance in salmonid fish farm pond water as determined by molecular identification employing 16S rDNA PCR, gene sequencing and total antibiotic susceptibility techniques. *Ecotoxicol Environ Saf*, v. 108, p. 281-286, 2014.

MOTA, R.A., SILVA, K.P.C., FREITAS, M.F.L., PORTO, W.J.N., SILVA, L.B.G. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. *Braz J Vet Res Anim Sci*, v. 42, p. 465-470, 2005.

NAVARRETE, P., MARDONES, P., OPAZO, R., ESPEJO, R., ROMERO, J. Oxytetracycline treatment reduces bacterial diversity of intestinal microbiota of Atlantic salmon. *J Aquat Anim Health*, v. 20, p. 177-183, 2008.

NAWAZ, M., SUNG, K., KHAN, A.S., KHAN, A.A., STEELE, R. Biochemical and molecular characterization of tetracycline resistant *Aeromonas veronii* isolates from catfish. *Applied Environmental Microbiology*, v. 72, p. 6461-6466, 2006.

NEUWIRTH, C., *et al.* First occurrence of an IMP metallo-beta-lactamase in *Aeromonas caviae*: IMP-19 in an isolate from France. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 51, p. 4486-8, 2007.

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

NOGA, E.J. *Fish Disease: Diagnosis and Treatment*. 2nd edn. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, 2010.

OBA, E.T., MARIANO, W.S., SANTOS, L.R.B. Estresse em peixes cultivado: agravantes e atenuantes para o manejo rentável. In: Tavares-Dias, M. *Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo*. Embrapa Amapá, Macapá, Brasil, 2009, p. 226-247.

OSIŃSKA, A., HARNISZ, M., KORZENIEWSKA, E. Prevalence of plasmid-mediated multidrug resistance determinants in fluoroquinolone-resistant bacteria isolated from sewage and surface water. *Environmental Science and Pollution Research International*, v. 23, p. 10818-10831, 2016.

PALÚ, A.P., GOMES, L.M., MIGUEL, M.A., BALASSIANO, I.T., QUEIROZ, M.L., FREITAS-ALMEIDA, A.C., DE OLIVEIRA, S.S. Antimicrobial resistance in food and clinical *Aeromonas* isolates. *Food Microbiology*, v. 23, n. 5, p. 504-509, 2005.

PAVANELLI, G.C., EIRAS, J.C., TAKEMOTO, R.M. Bacterioses. In: *Doenças de Peixes: Profilaxia, Diagnóstico e Tratamento*. Eduem, Maringá, Brasil, 2008, p. 165-220.

PEIXE BR. Anuário PeixeBr da Piscicultura. Associação Brasileira da Piscicultura, 2022.

PEREIRA-MAIA, E.C., SILVA, P.P., ALMEIDA, W.B., SANTOS, H.F., MARCIAL, B.L., RUGGIERO, R., GUERRA, W. Tetraciclina e glicilciclina: uma visão geral. *Química Nova*, v. 33, p. 700-706, 2010.

PILARSKI, F., SAKABE, R. Principais enfermidades diagnosticadas no Estado de São Paulo: profilaxia ou tratamento? In: Pezzato, L.E., Barros, M.M., Furuya, W.M., Cyrino, J.E.P., Fernandes Júnior, A.C. *Anais do 3º Simpósio Internacional de Nutrição e Saúde de Peixes*, Botucatu, São Paulo, 2009, p. 101-130.



RADU, S., AHMAD, N., LING, F.H., REEZAL, A. Prevalence and resistance to antibiotics for *Aeromonas* species from retail fish in Malaysia. *International Journal of Food Microbiology*, v. 81, p. 261-266, 2003.

RIGOS, G., NENGAS, I., ALEXIS, M. Oxytetracycline (OTC) uptake following bath treatment in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, v. 261, p. 1151-1155, 2006.

RODRÍGUEZ-ROJAS, A., RODRÍGUEZ-BELTRÁN, J., COUCE, A., BLÁSQUEZ, J. Antibiotics and antibiotic resistance: a bitter fight against evolution. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 303, p. 293-297, 2013.

SAMIE, N., NOGHABI, K.A., GHAREGOZLOO, Z., ZAHIRI, H.S., AHMADIAN, G., SHARAFI, H., BEHROZI, R., VALI, H. Psychrophilic  $\alpha$ -amylase from *Aeromonas veronii* NS07 isolated from farm soils. *Process Biochemistry*, v. 47, p. 1381-1387, 2012.

SANCHEZ-CESPÉDES, J., BLASCO, M.D., MARTI, S., ALBA, V., ALCALDE, E., ESTEVE, C., VIDA, J. Plasmid-mediated QnrS determinant from a clinical *Aeromonas veronii* isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 52, p. 2990-2991, 2008.

SCORVO FILHO, J.D., FRASCÁ-SCORVO, C.M.D., ALVES, J.M.C., SOUZA, R.F.A. A tilapicultura e seus insumos, relações econômicas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 39, p. 112-118, 2010.

SESHARDRI, R., JOSEPH, S.W., CHOPRA, A.K., SHA, J., SHAW, J., GRAF, J., HAFT, D., WU, M., REN, Q., ROSOVITZ, M.J., MADUPU, R., TALLON, L., KIM, M., JIN, S., VUONG, H., COLIN STINE, O., ALI, A., HORNEMAN, A.J., HEIDELBERG, J. Genome sequence of *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966T: jack of all trades. *Journal of Bacteriology*, v. 188, p. 8272-8228, 2006.

SILVA-SÁINCHÉZ, J. *et al.* Characterization of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance (PMQR) Genes in Extended-Spectrum B-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae Pediatric Clinical Isolates in Mexico. *PLoS ONE*, v. 8, n. 10, 2013.

SINDAN. Compêndio de Produtos Veterinários, 2018. Disponível em: [www.cpvsv.com.br](http://www.cpvsv.com.br).

SINHA, S., SHIMADA, T., RAMAMURTHY, T., BHATTACHARYA, S.K., YAMASAKI, S., TAKEDA, Y., NAIR, G.B. Prevalence, serotype distribution, antibiotic susceptibility and genetic profiles of mesophilic *Aeromonas* species isolated from hospitalized diarrhoeal cases in Kolkata, India. *Journal of Medical Microbiology*, v. 53, p. 527-534, 2004.

SKWOR, T., SHINKO, J., AUGUSTYNIK, A., CHRISTOPHER, G., ANDRASO, G. *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* predominate among potentially pathogenic ciprofloxacin and tetracycline resistant *Aeromonas* isolates from Lake Erie. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 80, p. 841-848, 2014.

SMITH, P.R., BRETON, A.L., HORSBERG, T.E., CORSIN, F. Guidelines for Antimicrobial Use in Aquaculture. In: GUARDABASSI, L., JENSEN, L.B., KRUSE, H. Guide to Antimicrobial Use in Animals. Oxford: Blackwell Publishing, 2008, pp. 207–218.

SREEDHARAN, K., PHILIP, R., BRIGHT SINGH, I.S. Characterization and virulence potential of phenotypically diverse *Aeromonas veronii* isolates recovered from moribund freshwater ornamental fishes of Kerala, India. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 103, pp. 53–67, 2013.

SREEDHARAN, K., PHILIP, R., SINGH, I.B. Isolation and characterization of virulent *Aeromonas veronii* from ascitic fluid of Oscar *Astronotus ocellatus* showing signs of infectious dropsy. *Dis Aquat Org*, v. 94, pp. 29–39, 2011.

SUHET, M., SCHOCKEN-ITURRINO, R., AMARAL, L. Atividade hemolítica e resistência a antimicrobianos por *Aeromonas* spp. isoladas de criação intensiva de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*). *Ars Vet.*, v. 27, pp. 36–44, 2011.

TRABULSI, L.R., ALTERTHUM, F. Microbiologia. São Paulo: Atheneu, 2008.

VAN ALPHEN, N.A. *et al.* Ciprofloxacin-Resistant *Aeromonas* Infection Following Leech Therapy for Digit Replantation: Report of 2 Cases. *Journal of Hand Surgery*, v. 39, n. 3, pp. 499–502, 2016.

WANG, M., GUO, Q., XU, X., WANG, X., YE, X., WU, S., HOOPER, D.C., WANG, M. New plasmid-mediated quinolone resistance gene, *qnrC*, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 53, pp. 1892–1897, 2009.

WOODFORD, N., FAGAN, E.J., ELLINGTON, M.J. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother*, v. 57, pp. 154–155, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Aeromonas*. In: Guidelines for Drinking-Water Quality. Geneva: WHO, 1993, pp. 1–17.

YANG, Q. Multidrug-Resistant *Aeromonas veronii* Recovered from Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) in China: Prevalence and Mechanisms of Fluoroquinolone Resistance. *Microbial Drug Resistance*, p. mdr.2015.0296, 2016.

YANO, Y., HAMANO, K., TSUTSUI, I., AUE-UMNEOY, D., BAN, M., SATOMI, M. Occurrence, molecular characterization, and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas* spp. in marine species of shrimps cultured at inland low salinity ponds. *Food Microbiol Elsevier Ltd*, v. 47, pp. 21–27, 2015.

ZHANG, R. High Prevalence of *qnr* and *aac-Ib-cr* Genes in Both Water-Borne Environmental Bacteria and Clinical Isolates of *Citrobacter freundii* in China. *Microbes and Environments*, v. 27, n. 2, pp. 158–163, 2012.