

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP – CAUNESP

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

**MONITORAMENTO DA RESISTÊNCIA À ANTIMICROBIANOS NA
AQUICULTURA: ISOLAMENTO E INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE
TILÁPIA DO NILO COM *Klebsiella pneumoniae***

Daiane Vaneci da Silva

Engenheira de pesca

JABOTICABAL – SÃO PAULO

FEVEREIRO, 2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP – CAUNESP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

**MONITORAMENTO DA RESISTÊNCIA À ANTIMICROBIANOS NA
AQUICULTURA: ISOLAMENTO E INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE
TILÁPIA DO NILO COM *Klebsiella pneumoniae***

Discente: Daiane Vaneci da Silva
Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Pilarski

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

JABOTICABAL – SÃO PAULO

FEVEREIRO, 2020

S586m Silva, Daiane Vaneci da
Monitoramento da resistência à antimicrobianos na aquicultura : isolamento e infecção experimental de tilápia-do-Nilo com *Klebsiella pneumoniae* / Daiane Vaneci da Silva. -- Jaboticabal, 2020
vi, 59 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2020
Orientadora: Fabiana Pilarski
Banca examinadora: André Pitondo da Silva, Marita Vedovelli Cardozo
Bibliografia

1. Aquicultura. 2. *Oreochromis niloticus*. 3. Bactéria. 4. Infecção. 5. *Klebsiella pneumoniae*. 6. Zoonose. 7. Saúde Pública. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3.09

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Jaboticabal/SP - Karina Gimenes Fernandes - CRB 8/7418

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Monitoramento da resistência à antimicrobianos na aquicultura: Isolamento e infecção experimental de tilápia-do-Nilo com *Klebsiella pneumoniae*

AUTORA: DAIANE VANECI DA SILVA

ORIENTADORA: FABIANA PILARSKI

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

Fabiana Pilarski

Profa. Dra. FABIANA PILARSKI

Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos / Centro de Aquicultura da UNESP, CAUNESP, Jaboticabal-SP

Andre Pitondo
Prof. Dr. ANDRÉ PITONDO DA SILVA

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP, Ribeirão Preto-SP / Departamento de Análises Clínicas Toxicológicas e Dermatológicas

Marta Sedovelli
Pós-doutoranda MARTHA SEDOVELLI CARDOZO

Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 21 de fevereiro de 2020

EPÍGRAFE

*De tudo ficaram três coisas...
A certeza de que estamos começando.
A certeza de que é preciso continuar.
A certeza de que podemos ser
interrompidos antes de terminar.*

Fernando Sabino

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo sublime dom da vida.

Agradeço imensamente aos meus pais Tereza e José Pedro, apoiadores incondicionais, por terem adotado para eles um sonho escolhido por mim, acreditando e me dando forças em momentos que pensei não conseguir. O amor, a paciência e empenho de vocês aumentam cada vez mais à certeza de que são o meu porto seguro e minha maior riqueza. Amo vocês imensamente.

Aos meus irmãos Luiza e João Pedro pelos incentivos e alegrias compartilhadas.

Agradeço imensamente a minha orientadora professora Dra. Fabiana Pilarski, que mesmo sem me conhecer acreditou na minha capacidade, me recebendo de braços abertos, me ensinando com sabedoria, dedicação e generosidade.

Só tenho a agradecer e desejar muita luz e conquistas na sua vida.

Ao professor Dr. Dario Falcon por ter me orientado na graduação e me direcionado para a vida acadêmica, acreditando em mim e me incentivando buscar cada vez mais os meus sonhos. Agradeço pelos momentos de tempestade e calmaria, eles foram fundamentais para o meu crescimento. Sem eles, certamente o resultado seria outro.

Ao Professor André Pitondo, pelo apoio e pelos ensinamentos valiosos que compartilhou comigo para a realização desse trabalho.

Aos meus amigos Evandro Moro e Gabrielly Lima pela amizade e por não medirem esforços para me apoiar.

À Andressa Tellechea, Rafael de Graaf, Monique Virões e Joseane Silva. Agradeço grandemente a amizade de vocês, e principalmente, por se portarem como minha família aqui no estado de São Paulo.

À minha amiga Talita Novaes por ser a minha irmã de alma, a minha pessoa e meu grande exemplo de ser humano.

À todos os colegas do Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos da Caunesp - LAPOA pela ajuda na realização das atividades, pelo convívio diário e descontração.

À equipe de pesquisa Laboratório de Bacteriologia e Biotecnologia Molecular da UNAERP - LABAC pelo apoio e contribuição nesse estudo.

GRATIDÃO A TODOS VOCÊS!

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Os autores agradecem a Dra. Vany P. Ferraz responsável pelo de Laboratório de Cromatografia, Departamento de Química (UFMG) pela análise dos OEs.

Sumário

EPÍGRAFE.....	i
AGRADECIMENTOS.....	ii
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	v
CAPÍTULO 1	1
1. Introdução	4
2. Revisão Bibliográfica.....	6
4. Referências Bibliográficas	9
CAPÍTULO 2	16
1. Introdução	19
2. Material e Métodos.....	20
3. Resultados	23
4. Discussão.....	27
Referências Bibliográficas	30
CAPÍTULO 3	35
1. Introdução	37
2. Material e métodos.....	38
3. Resultados	40
3. Discussão.....	43
Referências Bibliográficas	44
CAPÍTULO 4.....	50
AGRADECIMENTOS.....	53

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO 2 - *Klebsiella pneumoniae* CAUSANDO MORTALIDADE EM JUVENIS DE TILÁPIA-DO-NILO: IDENTIFICAÇÃO E PATOLOGIA DA DOENÇA

Figura 1. Sinais clínicos identificados em tilápia inoculada intracelomaticamente com *K. pneumoniae* [A] Hemorragias na superfície corporal, [B] Acúmulo de líquido no estômago (seta), rim friável (*), [C] Brânquias pálidas e lamelas branquiais comprometidas [D] Exoftamia ocular hemorrágica.....23

Figura 2. Curva de mortalidade de tilápia-do-Nilo após infecção com *K. pneumoniae*. Linha verde indica a mortalidade do grupo desfiado com a bactéria e a linha azul o grupo controle.....25

Figura 3. Alterações histológicas identificadas por setas observadas em tilápia inoculada intracelomaticamente com *K. pneumoniae* [A] Fígado com degeneração hidrópica difusa, [B] Fígado com degeneração gordurosa difusa. Acúmulos de centro de melanomacrófagos no baço [C] e no rim [D]. Presença de hiperplasia (seta) e edema (*) difusos nas brânquias [E] e presença de edema difuso, atrofia e fusão das vilosidades no intestino delgado. H & E.....26

CAPÍTULO 3 - AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL DE ÓLEOS ESSENCIAIS CONTRA *Klebsiella pneumoniae* ISOLADA DE TILÁPIA-DO-NILO

Figura 1. Composição química do óleo essencial do *Thymus vulgaris*.....40

Figura 2. Composição química do óleo essencial de *Melleuca alternifolia*.....41

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 3 - AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL DE ÓLEOS ESSENCIAIS CONTRA *Klebsiella pneumoniae* ISOLADA DE TILAPIA-DO-NILO

Tabela 1. Avaliação de óleos essenciais contra *K. pneumoniae* isoladas de rim, baço e fígado de tilapia-do-Nilo e uma cepa padrão de *E. coli* ATCC® 25922TM.....48

Tabela 2. Valores em porcentagem da taxa de hemólise de células sanguíneas de tilapia causadas pela ação dos óleos essenciais.....49

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Análise comportamental e sinais clínicos de tilápia-do-Nilo desafiadas com as bactérias *Edwardsiella tarda* e *Klebsiella pneumoniae***", protocolo nº 017663/18, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Fabiana Pilarski, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 06 de dezembro de 2018.

Vigência do Projeto	15/12/2018 a 15/01/2019
Espécie / Linhagem	Tilápia-do-Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)
Nº de animais	30
Peso / Idade	30-70 gramas
Sexo	Indefinido
Origem	Tilapicultura- CAUNESP

Jaboticabal, 06 de dezembro de 2018.


Prof. Dr. Everlon Cid Rigobelo
Vice-Coordenadora – CEUA

CAPITULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

Resumo

O surgimento de enfermidades em peixes, principalmente de origem bacteriana, tem aumentado significativamente nos últimos anos. Esse fato, está associado a fatores, como a intensificação da produção aquícola, manejos errôneos, ausência de medidas sanitárias preventivas e principalmente, má qualidade de água. Sabe-se que, a microbiota dos peixes é idêntica a microbiota da água em que está inserido, o que tem provocado o aumento crescente do número de gêneros bacterianos encontrados nos peixes, incluindo a ocorrência de patógenos de interesse em saúde pública. Coliformes termotolerantes, *Enterococcus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus* spp., *Salmonella*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Acinetobacter* spp., *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* são alguns dos inúmeros patógenos que acometem humanos severamente e estão sendo encontrados comumente em organismos aquáticos. Essas bactérias em contato com humanos seja através de contato tópico direto e manipulação com feridas abertas, ou mesmo com a ingestão de pescado cru ou mal cozido, podem ocasionar danos severos, inclusive com risco de morte. Dentre estes, destaca-se a *K. pneumoniae*, um patógeno oportunista que compõe naturalmente a microbiota do trato gastrointestinal de humanos e animais saudáveis e está associado a infecções no trato urinário, além de apresentarem resistência a um elevado número de antimicrobianos, e vem sendo relatado em diversos países. Com intuito de combater esses microrganismos, evitar danos severos aos peixes, e consequentemente aos consumidores, antimicrobianos são utilizados para o tratamento desses patógenos. Entretanto, no Brasil, existem apenas duas moléculas licenciados para uso na aquicultura, o florfenicol e a oxitetraciclina. Devido a carência de produtos licenciados, a prática errônea de se utilizar produtos não licenciados torna-se cada vez mais comum. Assim, a utilização de antimicrobianos na produção animal de forma indiscriminada e sem critérios tem contribuído para o aumento da resistência antimicrobiana, contaminação ambiental e consequentemente a qualidade inadequada do pescado, pontuando a necessidade de medidas alternativas que visem solucionar esta problemática. Diante do exposto, a utilização de fitoterápicos, que são medicamentos à base de plantas medicinais, utilizados no controle de doenças vem ganhando força ao longo dos anos. A utilização desses compostos como alternativa para o tratamento de doenças em peixes está amplamente relacionada às suas ações antioxidantes e efeitos anti-inflamatórios, além de ser utilizado no tratamento de patógenos, também são fornecidos aos animais como imunoestimulantes, melhorando a resistência a doenças e prevenindo infecções.

Palavras-chave: Aquicultura, fitoterápicos, patógenos, saúde pública, tratamento.

Abstract

The appearance of diseases in fish, mainly of bacterial origin, has increased significantly in recent years. This fact is associated with factors such as the intensification of aquaculture production, mismanagement, the absence of preventive sanitary measures and, mainly, poor water quality. It is known that the fish microbiota is identical to the water microbiota in which it is inserted, which has caused an increasing increase in the number of bacterial genera found in fish, including the occurrence of pathogens of public health interest. Thermotolerant coliforms, *Enterococcus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus spp.*, *Salmonella*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Acinetobacter spp.*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* are some of the numerous pathogens that severely affect humans and are commonly found in organisms. These bacteria in contact with humans, either through direct topical contact and handling open holidays, or even eating raw or undercooked fish, can cause severe damage, including the risk of death. Among these, *K. pneumoniae* stands out, an opportunistic pathogen that naturally composes the microbiota of the gastrointestinal tract of healthy humans and animals and is associated with urinary tract infections, in addition to being resistant to a high number of antimicrobials, and has been reported in several countries. In order to combat these microorganisms, avoid severe damage to fish, and consequently to consumers, antimicrobials are used to treat these pathogens. However, in Brazil, there are only two molecules licensed for use in aquaculture, florfenicol and oxytetracycline. Due to the lack of licensed products, the erroneous practice of using unlicensed products is becoming increasingly common. Thus, the use of antimicrobials in animal production indiscriminately and without criteria has contributed to the increase in antimicrobial resistance, environmental contamination and, consequently, the inadequate quality of the fish, emphasizing the need for alternative measures to solve this problem. Given the above, the use of herbal medicines, which are medicines based on medicinal plants, used in disease control has been gaining strength over the years. The use of these compounds as an alternative for the treatment of diseases in fish is largely related to their antioxidant and anti-inflammatory effects, in addition to being used in the treatment of pathogens, they are also provided to animals as immunostimulants, improving resistance to diseases and preventing infections.

Key-words: Aquaculture, herbal medicines, pathogens, public health, treatment.

1. Introdução

A expansão da aquicultura no Brasil tem alavancado a produção de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), espécie mais produzida no país. A atividade cresceu 10,78% no ano de 2018, gerando uma receita de 1,98 bilhões, sendo responsável por 60% da produção nacional de peixes (IBGE, 2019).

Contudo, fatores atrelados a esta intensificação como subalimentação ou sobrealimentação, mudanças bruscas de temperatura, qualidade da água inadequada, acúmulo de matéria orgânica ou poluição, além propiciarem o aumento de parasitos no sistema, comprometem o bem estar e a saúde dos peixes favorecendo a proliferação e a infecção de bactérias, consideradas uma das maiores ameaças para produção de peixes pelos impactos negativos que ocasionam nos animais (Yu et al., 2005; Dash et al., 2009).

Dentre as bactérias de importância na piscicultura destacam-se os gêneros *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Streptococcus* (Figueiredo & Leal 2008) *Edwardsiella* (Klesius et. al, 2008) e *Francisella* (Soto et al., 2009), no entanto, métodos moleculares permitiram a caracterização correta e a identificação de gêneros de bactérias anteriormente não identificados na produção aquícola, que além de causar doença nos animais podem ser zoonóticos para humanos (Gauthier, 2015).

Essas bactérias tem sido relatadas constantemente na piscicultura, principalmente na produção em tanques-rede instalados em reservatórios ou braços de rios onde não há possibilidade de controle da qualidade da água, muitas vezes com o despejo ilegal de efluentes tanto de origem doméstica quanto industrial. Além disso, outras produções animais nas proximidades (bovinos, suínos e aves) da piscicultura, presença de aves e outros animais na produção, que facilitam a propagação de bactérias potencialmente patogênicas tanto para os peixes quanto para humanos, causando infecções (Sarker et al. 2017).

Com a ocorrência de doenças na piscicultura, os antimicrobianos são amplamente utilizados durante todas as etapas da produção, muitas vezes de forma inadequada e não controlada, potencializando o surgimento de cepas altamente resistentes (Pandiyan et al., 2013; Watts et al., 2017), colocando em risco a produção, o ambiente e a saúde do consumidor (Muziasari et al., 2017). Além disso, a transferência de genes de resistência entre bactérias do ambiente e bactérias potencialmente patogênicas é um risco à saúde pública, pois todos os anos têm se observado um aumento na frequência de cepas multirresistentes, comprometendo toda a cadeia produtiva e a segurança alimentar, visto

que o trato gastrointestinal é um local apropriado para a troca de genes de resistência entre bactéria da microbiota e até bactérias patogênicas (Smith & Lewin, 1993).

O número de antimicrobianos liberados para utilização em peixes é muito pequeno quando comparado com outras espécies animais (Valladão et al., 2015). No Brasil, atualmente só existem duas moléculas licenciadas para a piscicultura, o florfenicol e a oxitetraciclina (Sindan, 2018), o que propicia o uso irregular de outras moléculas licenciadas para outros animais e até mesmo humanos, acarretando em prejuízos à saúde animal, meio ambiente e consumidores de pescado.

Os fitoterápicos surgem como uma alternativa viável para solucionar esta problemática, sendo eles produtos obtidos de plantas medicinais com a finalidade profilática ou curativa, e sua utilização na piscicultura pode contribuir para a redução no uso de produtos químicos e antimicrobianos, propiciando sustentabilidade à produção, por não poluir o ambiente (Valladão et al., 2015). Entretanto, apesar dos relatos positivos sobre a utilização desses produtos, estudos sobre sua eficácia em organismos aquáticos são recentes (Bandeira Juntior et al., 2017).

Diante do exposto, são altamente encorajados estudos sobre tratamentos alternativos na piscicultura, como os fitoterápicos, os quais vêm sendo muito difundidos mundialmente tanto para animais de produção quanto domésticos e humanos, devido seu alto potencial antimicrobiano e baixa toxicidade.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Doenças bacterianas em peixes

A ocorrência de doenças em organismos aquáticos vem aumentando anualmente e causando danos severos à aquicultura, comprometendo negativamente o ambiente, ocasionado redução da renda e insegurança alimentar. Estudos apontam que a ocorrência desses patógenos em países em desenvolvimento seja responsável por 50% das perdas na produção, gerando um prejuízo econômico anual de cerca de seis bilhões de dólares (Rico et al., 2012; Martins et al., 2019).

A intensificação da produção aliada à manejo incorretos, descontrolado da produção e qualidade inapropriada da água, tem ocasionado o surgimento de doenças, principalmente de origem bacteriana, as quais provocam lesões muitas vezes irreversíveis e uma taxa elevada de mortalidade (Tavares-Dias 2011; Bagum et al. 2013).

As bactérias que acometem os peixes são consideradas oportunistas, e encontram-se comumente presentes na água e microbiota dos animais saudáveis, acometendo-os em situações de estresse (Leira et al., 2016). Dentre as bactérias de importância para a piscicultura, as mais comumente identificadas são as do grupo das *Aeromonas* móveis, com destaque para a *Aeromonas hydrophila* (Sebastião et al., 2015), *Streptococcus agalactiae* (Figueiredo & Leal 2008), *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* (Soto et al., 2009), *Flavobacterium columnare* (Pilarski et al., 2008), *Edwardsiella tarda* (Acharya et al., 2007).

Uma questão importante a ser ressaltada é que a microbiota dos peixes é idêntica a microbiota da água em que está inserido, o que tem provocado o aumento crescente do número de gêneros bacterianos encontrados nos peixes, devido a qualidade da água inadequada, principalmente dos rios, que está cada vez mais poluída pelo aporte de efluentes domésticos e industriais, tornando os peixes hospedeiros acidentais de bactérias potencialmente patogênicas tanto para animais quanto para humanos (Orús et al., 2015).

2.2 Patógenos de interesse em saúde pública

A ocorrência de patógenos considerados zoonóticos em peixes tem se tornado cada vez mais comum e pode apresentar riscos significativos a saúde das pessoas. Os coliformes termotolerantes, *Enterococcus*, *Clostridium perfringens* e *Staphylococcus* spp. (Harwood et al., 2005), *Salmonella*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Acinetobacter* spp., *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (Wogu & Maduakol, 2010) são exemplos de patógenos que acometem humanos severamente e estão sendo

encontrados em organismos aquáticos. Essa incidência reflete as condições inadequadas do ambiente de criação, como utilização de águas com contaminação fecal para a produção.

Uma água de boa qualidade é primordial para uma produção rentável de peixes, em qualquer fase da criação, portanto, águas poluídas, principalmente por esgotos domésticos, efluentes industriais ou fontes dispersas não localizadas comprometem significativamente a produção de espécies aquáticas e à saúde pública (Machado et al., 2009).

As bactérias potencialmente patogênicas aos humanos e que podem estar presentes no ambiente de criação ou até mesmo nos peixes (portadores assintomáticos), não demonstram sinais clínicos característicos, sendo facilmente confundidas com bactérias de ocorrência comum na piscicultura, sendo observado nos peixes sinais de letargia, inapetência, isolamento do cardume, mortalidades esporádicas, melanose ou hemorragia na superfície corporal. Todavia, essas bactérias em contato com humanos seja através de contato tópico direto e manipulação com feridas abertas, ou mesmo com a ingestão de pescado cru ou mal cozido, podem ocasionar danos severos, inclusive com risco de morte (Huss et al., 2000; Butt et al., 2004).

2.3 *Klebsiella pneumoniae*

Pertencente à família Enterobacteriaceae, a *Klebsiella pneumoniae* é uma bactéria Gram-negativa, não móvel, encapsulada, podendo sobreviver em diversos ambientes, incluindo solos e ambientes aquáticos (Friedlander, 1882 & Merino et al., 1992). É um patógeno oportunista que compõe naturalmente a microbiota do trato gastrointestinal de humanos e animais saudáveis (Podschun & Ullmann 1998) e está associado à infecções extra-intestinais, como por exemplo infecções no trato urinário, cistite, pneumonia, infecções de feridas cirúrgicas, endocardite e septicemia (Navon-Venezia et al., 2017). Pessoas infectadas pela bactéria em hospitais têm demonstrado como principais sintomas o aparecimento de abscessos hepáticos (McIver & Janda, 2008), associados com outras lesões, como embolia pulmonar, meningite piogênica e endoftalmite (Cheng et al., 1991; Chang et al., 1995; Wang et al., 1998).

A ocorrência da infecção por *Klebsiella pneumoniae* ocorre pelo rompimento das barreiras imunológicas e pelo comprometimento das células de defesa (Zhang et al., 2000). Tem caráter emergente pelo aumento no número pessoas com infecções graves

provocada por ela principalmente no ambiente hospitalar e pela ausência de tratamentos eficazes, devido ao surgimento de cepas altamente virulentas (Navon-Venezia et al., 2017), que contém genes capazes de codificar a produção de enzimas tornando os antimicrobianos ineficazes, devido as alterações estruturais que a bactéria provoca na molécula (Lee et al., 2017; Lam et al., 2018).

2.4 Tratamentos comumente utilizados no tratamento de doenças na piscicultura

A utilização de produtos veterinários para o tratamento de doenças em alguma fase da produção é comum na piscicultura (Valladão et al, 2015), sendo utilizados para reduzir a carga de patógenos existentes nos animais devido a sua rápida ação (Burka et al., 1997).

Mundialmente, o uso de antimicrobianos na produção animal tem aumentado significativamente, com projeção de crescimento de 67% até 2030, equivalente a 82,1 toneladas, sendo o Brasil um dos países com maior estimativa de consumo (Van Boeckel et al., 2015).

No Brasil, existe apenas dois antimicrobianos licenciados para uso na aquicultura, o florfenicol e a oxitetraciclina (Sindan, 2018). Devido a carência de produtos licenciados, a prática errônea de se utilizar produtos não licenciados torna-se cada vez mais comum. Dentre os produtos mais utilizados em todo mundo para o controle de patógenos em organismos aquáticos, destacam-se o cloreto de sódio em altas concentrações, permanganato de potássio, azul de metileno, formaldeído, verde malaquita, sulfato de cobre, triclorfon, e os antimicrobianos, tetraciclina e eritromicina (Maximiano et al., 2005). Assim, a utilização de antimicrobianos na produção animal de forma indiscriminada e sem critérios tem contribuído para o aumento da resistência antimicrobiana, contaminação ambiental (Regitano et al., 2010) e consequentemente a qualidade inadequada do pescado (Pilarski et al., 2008).

2.5 Uso de fitoterápicos no tratamento de doenças de peixes

A utilização excessiva de antimicrobianos tem gerado não só resistência bacteriana, mas acúmulo de resíduos nos peixes e no ambiente aquático (Bandeira Junior et al., 2017), pontuando a necessidade de medidas alternativas que visem solucionar esta problemática. Diante do exposto, a utilização de fitoterápicos, que são medicamentos à base de plantas medicinais, utilizados no controle de doenças vem ganhando força ao

longo dos anos. Além de ser utilizado no tratamento de patógenos, também são fornecidos aos animais como imunoestimulantes, melhorando a resistência às doenças e prevenindo infecções (Dügenci et al., 2013).

Sabe-se que as plantas possuem uma ampla variedade de constituintes metabólicos e fitoquímicos, que atuam contra diferentes doenças (Pandey & Madhuri, 2010; Ravikumar et al., 2010) e sua ação está associada a quantidade de seus componentes, visto que os de menor quantidade exercem atividade sinérgica com os componentes principais ou majoritários (Paster et al., 1995).

A utilização desses compostos como alternativa para o tratamento de doenças em peixes está amplamente relacionada às suas ações antioxidantes e efeitos anti-inflamatórios (Zahn et al., 2019).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Estudar a patogênese da *Klebsiella pneumoniae* em tilápia-do-Nilo infectadas experimentalmente, bem como avaliar potenciais métodos de controle desta bactéria na piscicultura.

3.2 Específicos

- Identificar e caracterizar o agente causador de mortalidades em tilápias-do-Nilo na piscicultura;
- Estudar a patogênese de *Klebsiella pneumoniae* em tilápia-do-Nilo através do Postulado de Koch e das possíveis alterações causadas pela bactéria nos órgãos internos dos peixes através de análise histopatológica;
- Avaliar a eficácia *in vitro* de diferentes óleos essenciais no tratamento da *Klebsiella pneumoniae*;

4. Referências Bibliográficas

Bandeira Junior, G., Sutili, F.J., Gressler, L.T., Ely, V.L., Silveira, B.P., Tasca, C., Reghelin, M., Matter, L.B., Vargas, A.P.C., Baldisserotto, B., 2018. Antibacterial potential of phytochemicals alone or in combination with antimicrobials against fish pathogenic bacteria. J Appl Microbiol 125, 655–665. <https://doi.org/10.1111/jam.13906>

- Bagum N., Monir MS, Khan, M.,H. 2013. Present status of fish diseases and economic losses due to incidence of disease in rural freshwater aquaculture of Bangladesh. *J Innov Dev Strateg* 7:48–53
- Butt, A.A., Aldridge, K.E., Sanders, C.V., 2004. Infections related to the ingestion of seafood Part I: viral and bacterial infections. *The Lancet Infectious Diseases* 4, 201–212. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(04\)00969-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(04)00969-7)
- Chang, F.Y., Chou, M.Y., 1995. Comparison of pyogenic liver abscesses caused by *Klebsiella pneumoniae* and non-K. pneumoniae pathogens. *J. Formos. Med. Assoc.* 94, 232–237.
- Cheng, D.L., 1991. Septic metastatic lesions of pyogenic liver abscess. Their association with *Klebsiella pneumoniae* bacteremia in diabetic patients. *Archives of Internal Medicine* 151, 1557–1559. <https://doi.org/10.1001/archinte.151.8.1557>
- Dash, S.S., Das, B.K., Pattnaik, P., Samal, S.K., Sahu, S., Ghosh, S., 2009. Biochemical and Serological Characterization of *Flavobacterium columnare* from Freshwater Fishes of Eastern India. *Journal of the World Aquaculture Society* 40, 236–247. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2009.00246.x>
- Düğenci, S.K., Arda, N., Candan, A., 2003. Some medicinal plants as immunostimulant for fish. *Journal of Ethnopharmacology* 88, 99–106. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00182-X](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00182-X)
- Figueiredo, H.C.P., Leal, C.A.G., 2008. Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. *R. Bras. Zootec.* 37, 8–14. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982008001300002>
- Friedlander C. 1882. Über die scizomyceten bei der acuten fibrosen pneumonie. *Arch Pathol Anat Physiol Klin Med* 87:319 –324. 2.
- Gauthier, D.T., 2015. Bacterial zoonoses of fishes: A review and appraisal of evidence for linkages between fish and human infections. *The Veterinary Journal* 203, 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.10.028>

- Harwood, V.J., Levine, A.D., Scott, T.M., Chivukula, V., Lukasik, J., Farrah, S.R., Rose, J.B., 2005. Validity of the Indicator Organism Paradigm for Pathogen Reduction in Reclaimed Water and Public Health Protection. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 3163–3170. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.3163-3170.2005>
- Hossain, Mk, Islam, K., Hossain, Md, Rahman, M., 2013. Environmental Impact Assessment of Fish Diseases on Fish Production. *J Sci Found* 9, 125–131. <https://doi.org/10.3329/jsf.v9i1-2.14655>
- Huss, H.H., Reilly, A., Karim Ben Embarek, P., 2000. Prevention and control of hazards in seafood. *Food Control* 11, 149–156. [https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(99\)00087-0](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(99)00087-0)
- IBGE-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2019. SIDRA-Sistema IBGE de Recuperação Automática. Disponível em: [http:// www2.sidra.ibge.gov.br/](http://www2.sidra.ibge.gov.br/)
- Klesius, P.H., Shoemaker, C.A., & Evans, J.J. 2008. Streptococcus: A worldwide fish health problem. 8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture (pp. 83-107). Cairo.
- Lam, M.M.C., Wyres, K.L., Duchêne, S., Wick, R.R., Judd, L.M., Gan, Y.-H., Hoh, C.-H., Archuleta, S., Molton, J.S., Kalimuddin, S., Koh, T.H., Passet, V., Brisse, S., Holt, K.E., 2018. Population genomics of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* clonal-group 23 reveals early emergence and rapid global dissemination. *Nat Commun* 9, 2703. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05114-7>
- Lee, C.-R., Lee, J.H., Park, K.S., Jeon, J.H., Kim, Y.B., Cha, C.-J., Jeong, B.C., Lee, S.H., 2017. Antimicrobial Resistance of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Hypervirulence-Associated Determinants, and Resistance Mechanisms. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7, 483. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00483>

- Leira, M.H., De Assis Lago, A., Botelho, H.A., Melo, C.C.V., Mendonça, F.G., Nascimento, A.F. do, Freitas, R.T.F. de, 2016. Principais Infecções Bacterianas na Criação de Peixes de Água Doce do Brasil – Uma Revisão. Rev. Ci. Vet. Saúde Pub. 3, 44. <https://doi.org/10.4025/revcivet.v3i1.32436>
- Maximiano, A. de A., Fernandes, R.O. de, Nunes, F.P., Assis, M.P. de, Matos, R.V. de, Barbosa, C.G.S., Oliveira-Filho, E.C., 2005. Utilização de drogas veterinárias, agrotóxicos e afins em ambientes hídricos: demandas, regulamentação e considerações sobre riscos à saúde humana e ambiental. Ciênc. saúde coletiva 10, 483–491. <https://doi.org/10.1590/S1413-81232005000200026>
- McIver, C.J., Janda, J.M., 2008. Pathogenesis and Laboratory Identification of Emerging Hepatovirulent *Klebsiella pneumoniae*. Clinical Microbiology Newsletter 30, 127–131. <https://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2008.08.001>
- Merino, S., Camprubí, S., Albertí, S., Benedí, V.J., Tomás, J.M., 1992. Mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* resistance to complement-mediated killing. Infect. Immun. 60, 2529–2535.
- Navon-Venezia, S., Kondratyeva, K., Carattoli, A., 2017. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. FEMS Microbiology Reviews 41, 252–275. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux013>
- Orús, P., Gomez-Perez, L., 2015. Increasing antibiotic resistance in preservative-tolerant bacterial strains isolated from cosmetic products. International Microbiology 51–59. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.234>
- Paczosa, M.K., Mecsas, J., 2016. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 80, 629–661. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00078-15>
- Pandey Govind, 2014. Significance of fruits and vegetables in malnutrition cancer. <https://doi.org/10.13140/2.1.1431.9685>

- Paster, N., Menasherov, M., Ravid, U., Juven, B., 1995. Antifungal Activity of Oregano and Thyme Essential Oils Applied as Fumigants Against Fungi Attacking Stored Grain. *Journal of Food Protection* 58, 81–85. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-58.1.81>
- Pilarski, F., Rossini, Aj., Ceccarelli, Ps., 2008. Isolation and characterization of *Flavobacterium columnare* (Bernardet et al. 2002) from four tropical fish species in Brazil. *Braz. J. Biol.* 68, 409–414. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842008000200025>
- Ravikumar, S., G. Palani Selvan and N. Anitha Anandha Gracelin, 2010. Antimicrobial activity of medicinal plants along Kanyakumari coast, Tamil Nadu, India. *Afr. J. Basic Appl. Sci.*, 2(5-6) : 153-157.
- Regitano, J.B., Leal, R.M.P., 2010. Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira. *Rev. Bras. Ciênc. Solo* 34, 601–616. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832010000300002>
- Rico, A., Satapornvanit, K., Haque, M.M., Min, J., Nguyen, P.T., Telfer, T.C., van den Brink, P.J., 2012. Use of chemicals and biological products in Asian aquaculture and their potential environmental risks: a critical review: Environmental risks of Asian aquaculture. *Reviews in Aquaculture* 4, 75–93. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2012.01062.x>
- Rock, C., Thom, K.A., Masnick, M., Johnson, J.K., Harris, A.D., Morgan, D.J., 2014. Frequency of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)–Producing and Non-KPC-Producing *Klebsiella* Species Contamination of Healthcare Workers and the Environment. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 35, 426–429. <https://doi.org/10.1086/675598>
- Sarker, S., Abraham, T.J., Banerjee, S., Adikesavalu, H., Patra, A., 2017. Characterization, virulence and pathology of *Flavobacterium* sp. KG3 associated with gill rot in carp, *Catla catla* (Ham.). *Aquaculture* 468, 579–584. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.11.024>

- Sebastião, F.A., Furlan, L.R., Hashimoto, D.T., Pilarski, F., 2015. Identification of Bacterial Fish Pathogens in Brazil by Direct Colony PCR and 16S rRNA Gene Sequencing. *AiM* 05, 409–424. <https://doi.org/10.4236/aim.2015.56042>
- SINDAN. Compêndio de Produtos Veterinários, 2018. Disponível em: <http://www.cpvS.com.br/cpvS/>.
- Soto, E., Hawke, J.P., Fernandez, D., A Morales, J., 2009. *Francisella* sp., an emerging pathogen of tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), in Costa Rica. *Journal of Fish Diseases* 32, 713–722. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2009.01070.x>
- Tavares-Dias, M. 2011. Piscicultura continental no estado do Amapá: diagnóstico e perspectivas. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* 81. Macapá: Embrapa Amapá
- Valladão, G.M.R., Gallani, S.U., Pilarski, F., 2015. Phytotherapy as an alternative for treating fish disease. *J. vet. Pharmacol. Therap.* 38, 417–428. <https://doi.org/10.1111/jvp.12202>
- Van Boeckel, T.P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B.T., Levin, S.A., Robinson, T.P., Teillant, A., Laxminarayan, R., 2015. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc Natl Acad Sci USA* 112, 5649–5654. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112>
- Wang, J., Liu, Y., Lee, S.S., Yen, M., Wang, Y.C., Jao-Hsien, Wann, S., Lin, H., 1998. Primary Liver Abscess Due to *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *CLIN INFECT DIS* 26, 1434–1438. <https://doi.org/10.1086/516369>
- Watts, J., Schreier, H., Lanska, L., Hale, M., 2017. The Rising Tide of Antimicrobial Resistance in Aquaculture: Sources, Sinks and Solutions. *Marine Drugs* 15, 158. <https://doi.org/10.3390/md15060158>
- Wogu, M., Maduakor, C., 2011. Evaluation of Microbial Spoilage of Some Aquacultured

Fresh Fish in Benin City Nigeria. *Ethiop. J. Env Stud & Manag* 3.
<https://doi.org/10.4314/ejesm.v3i3.63960>

Yu, V.L., Hansen, D.S., Ko, W.C., Sagnimeni, A., Klugman, K.P., von Gottberg, A., Goossens, H., Wagener, M.M., Benedi, V.J., the International Klebsiella Study Group, 2007. Virulence Characteristics of *Klebsiella* and Clinical Manifestations of *K. pneumoniae* Bloodstream Infections. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 986–993.
<https://doi.org/10.3201/eid1307.070187>

Zahn, R., Perry, N., Perry, E., Mukaetova-Ladinska, E.B., 2019. Use of herbal medicines: Pilot survey of UK users' views. *Complementary Therapies in Medicine* 44, 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.ctim.2019.02.007>

Zhang, P., Summer, W.R., Bagby, G.J., Nelson, S., 2000. Innate immunity and pulmonary host defense. *Immunol Rev* 173, 39–51. <https://doi.org/10.1034/j.1600-065X.2000.917306.x>

CAPÍTULO 2

***Klebsiella pneumoniae* causando mortalidade em juvenis de tilapia-do-Nilo
(*oreochromis Niloticus*): Identificação e patologia da doença**

Klebsiella pneumoniae causando mortalidade em juvenis de tilapia-do-Nilo
(*oreochromis Niloticus*): identificação e patologia da doença

Resumo

O setor de produção aquícola vem em crescimento ao longo dos anos, com a produção de várias espécies de peixes, como a tilapia-do-Nilo (*Oreochromis Niloticus*), quinta espécie mais produzida no mundo, e a principal espécie produzida no Brasil, com valores de produção superiores a 311 mil toneladas, em sistemas cada vez mais intensivos. Entretanto, a atividade pode ser altamente estressante para os peixes, devido à elevada densidade de estocagem, manejos constantes, alimentação inapropriada e qualidade inadequada da água, favorecendo o surgimento de doenças, principalmente de origem bacteriana. Desta maneira, este estudo teve por objetivo identificar e caracterizar o agente causador de mortalidades em tilapia-do-Nilo oriundas de uma piscicultura comercial, localizada no estado de São Paulo, que apresentavam hemorragias subcutâneas, sangramento urogenital e ascite. A bactéria, oriunda de peixes doentes foi isolada, identificada, caracterizada molecularmente através do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA e inoculada intracelomaticamente (10^7 UFC/mL) em peixes saudáveis para estudo da patogênese. Os peixes foram monitorados durante 15 dias, e os sinais clínicos e a taxa de mortalidade avaliados diariamente. A identificação das estirpes apresentou identidade superior a 98% com *Klebsiella pneumoniae*. A infecção experimental evidenciou nos peixes os mesmos sinais clínicos observados nos animais estavam morrendo na piscicultura. Com relação a histopatologia dos principais órgãos, esta evidenciou degeneração hidrópica e gordurosa no fígado, presença de centros de melanomacrófagos no baço e rim, edema difuso, atrofia das vilosidades e fusão no intestino delgado. Já nas brânquias foi observada hiperplasia nas lamelas secundárias e edema. Este estudo é o primeiro a descrever a patogênese de *K. pneumoniae* em juvenis de tilápia no Brasil, e reforça a importância de diagnóstico microbiológico em surtos que ocorrem nas pisciculturas, uma vez que essa bactéria provoca sinais clínicos semelhantes a outras bactérias patogênicas para peixes, todavia, é um potencial risco para a saúde pública, especialmente para consumidores e manipuladores de pescado.

Palavras-chave: aquicultura, *Oreochromis niloticus*, bactéria, infecção, *Klebsiella pneumoniae*, zoonose, saúde pública.

1. Introdução

A aquicultura destaca-se como o setor de produção animal com os maiores índices de expansão ao longo dos anos, denotando uma taxa crescimento anual de 8%. Dentre a diversidade de peixes produzidos, a tilápia-do-Nilo destaca-se como a segunda espécie mais produzida no mundo (FAO, 2018), e a principal espécie produzida no Brasil, com valores superiores a 311 mil toneladas, nos diferentes sistemas de produção (IBGE, 2019).

Entretanto, a intensificação da produção de tilápia no Brasil ocorre principalmente em tanques-rede, devido ao grande número de rios, represas e reservatórios públicos e privados, localizados em todos os estados, onde não há possibilidade de controlar a qualidade da água. A presença constante de aves e descarga de efluentes tanto de origem industrial quanto doméstico nos corpos d'água, propiciam maior risco de contato dos peixes com bactérias potencialmente patogênicas presentes no ambiente. Estas situações têm provocado um aumento significativo no número e diversidade de bactérias encontradas nos peixes, incluindo bactérias até então consideradas não patogênicas para esses organismos.

A presença de enterobactérias zoonóticas em peixes representa riscos significativos para humanos. Dentre os enteropatógenos, *Acinetobacter* spp., *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Raoultella terrigena* e *Salmonella*, são as que representam maior risco à saúde pública, devido a ampla distribuição na natureza, podendo ser encontradas em diversos ambientes, incluindo os aquáticos, sendo associadas a contaminação fecal (Wogu & Maduakol, 2010; Haenen et al., 2013).

O gênero *Klebsiella* subdivide-se em várias espécies, entre elas *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. planticola*, *K. variicola*, *K. granulomatose*, *K. mobilis*, *K. granulomatose*, *K. mobilis*, *K. ornithinolytica* e *K. trevisanii* (Euzéby, 1997; Drancourt et al., 2001). Dentre essa diversidade de espécies, *K. pneumoniae* se destaca mundialmente como um dos principais patógenos emergentes (Janda & Abbott, 2005; Sunilkumar Biradar & Roopa, 2015).

Todavia, até o momento poucos relatos foram descritos sobre a patogenicidade *K. pneumoniae* para organismos aquáticos, como na Índia, Califórnia, (EUA) e na Nova Zelândia, em sargo japonês, *Nemipterus japonicus*, leão marinho, *Zalophus californianus*, peixe palhaço, *Amphiprion nigripes*, tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus* e duas espécies de carpa, *Carpa rohu*, *Labeo rohita* e Carpa comum, *Cyprinus carpio* (Al-

Imarah, 2008; Jang et al., 2010; Diana & Manjulatha 2012; Takyi et al., 2012; Oliveira et al., 2014; Roe et al., 2015; Gopi et al., 2016; Das et al., 2018; Whitaker et al., 2018).

A identificação e prevalência de *K. pneumoniae* na produção de animais aquáticos e sua capacidade de causar infecções severas denotam a importância de estudá-lo, afim de evitar o comprometimento da saúde dos animais. Além disso, é importante fazer a identificação e caracterização correta, uma vez que, a bactéria não é comumente encontrada em organismos aquáticos e os sinais clínicos provocados nos peixes doentes são semelhantes aos expressos por outras bactérias.

Muitas vezes, pela ausência de diagnósticos ou diagnósticos inconclusivos e/ou errôneos, podem comprometer o tratamento adequado, aumentar o índice de resistência aos antimicrobianos e propiciar perdas significativas na produção, e possíveis o risco a saúde dos manipuladores e consumidores de pescado. Assim, este estudo teve como objetivo identificar e caracterizar o agente etiológico de infecções, morbidade e mortalidade em juvenis de tilápia-do-Nilo, oriundos de piscicultura comercial do estado de São Paulo, e estudar a patogênese da bactéria.

2. Material e Métodos

Todos os procedimentos com os animais seguiram os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, sendo que o estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal, São Paulo, Brasil (protocolo nº 017663/18).

2.1 Isolamento e identificação de estirpes de *Klebsiella pneumoniae*

Juvenis de tilápia-do-Nilo com peso médio de 32 ± 6 g (n=10), provenientes de piscicultura comercial localizada no estado de São Paulo, Brasil, com hemorragias subcutâneas, sangramento urogenital e ascite foram devidamente eutanasiadas por aprofundamento do plano anestésico em solução alcoólica de benzocaína (Sigma-Aldrich, Brasil) em concentração equivalente a 100 mg/L. Posteriormente, os peixes foram lavados com água corrente e desinfetados com álcool a 70% para a realização do isolamento bacteriano em cabine de segurança biológica (Bio Seg®12, Veco, São Paulo, Brasil).

Amostras de rim, baço e fígado foram coletados e semeados em ágar BHI (Brain Heart Infusion, Himedia, Índia) e incubados a 37°C por 48 horas em estufa de crescimento (Quimis[®], São Paulo, Brasil).

Após o período de incubação, colônias foram selecionadas e repicadas para obtenção de pureza, transferência das estirpes para caldo BHI com glicerol a 15% e armazenadas em ultrafreezer a -80°C.

2.2 Identificação bacteriana

Os isolados bacterianos foram identificados molecularmente pelo sequenciamento do gene 16S rRNA. As reações foram realizadas por PCR direto da colônia conforme protocolo descrito por Sebastião et al. (2015), utilizando os primers

(27F 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3' e 1492R 5'GGTTACCTTGTTACGACTT 3'). O produto de PCR obtido foi analisado em gel de agarose 1,5% corado com Nancy[®] (ThermoFisher, CA, EUA). Os géis foram visualizados em luz UV, por meio de um sistema de imagem ChemiDoc MP (Bio-Rad).

O sequenciamento foi realizado em aparelho ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems, Foster City, CA). A sequência obtida teve sua leitura realizada o programa Sequencher 5.0 (Gene Codes Corporation) e visualizada no programa BioEdit Sequence Alignment Editor (versão 7.2.5). Por meio da ferramenta BLASTn (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome), a sequência foi comparado com as existentes no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

2.3 Teste de hipermucoviscosidade

A análise das estirpes bacterianas com relação a formação ou não de muco foi realizada através da inoculação das mesmas em ágar Mueller Hinton (Oxoid Ltd.) e incubação em estufa de crescimento (Quimis[®], São Paulo, Brasil) a 37°C durante 24 horas. Posteriormente, com o auxílio de uma alça de platina as colônias bacterianas foram tocadas e levantadas a fim de verificar a formação de muco filamento > 5 mm que as classificam como hipermucoides (Wiskur, et al., 2008).

2.4 Infecção experimental

Juvenis de tilápia-do-Nilo saudáveis (n=20), com peso médio de 48±4g foram distribuídas em caixas experimentais com capacidade para 200 L de água, com aeração

e renovação contínua e aclimatadas por um período de 10 dias. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial (Presence®, São Paulo, Brasil) contendo 32% de proteína bruta. Após o período de aclimação, os peixes foram divididos em dois grupos, identificados como G1 (10 peixes para o grupo controle), os quais receberam injeção intracelomatica com PBS e G2 (10 peixes), que foram inoculados intracelomaticamente com *K. pneumoniae*.

Uma das sete cepas de *K. pneumoniae* identificadas no isolamento bacteriano foi selecionada para utilização no estudo da patogênese, onde a mesma foi semeada em ágar BHI (Brain Heart Infusion, Himedia, India) pela técnica do esgotamento em estrias e incubada a 37°C por 48 horas em estufa de crescimento (Quimis®, São Paulo, Brasil).

As colônias isoladas foram coletadas com o auxílio de uma alça de platina e suspensas em tubos de ensaio contendo 45 mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion, Himedia, India) e incubadas a 37°C por 24 horas. Após o crescimento bacteriano, foram centrifugados (3000 g / 4 °C / 10min) para formação de pellets. O sobrenadante foi descartado e os pellets foram suspensos em PBS previamente esterilizado. O procedimento foi repetido duas vezes, e o sedimento resultante foi diluído em PBS estéril, até atingir a densidade óptica (OD) desejada (2100 Espectrofotômetro Único, Japão) em absorbância de 600nm (OD600). A concentração utilizada foi determinada em estudo prévio de dose letal (DL50%) em que 0 (controle PBS) e 0,600 correspondente a 10⁷ UFC/mL para a referida cepa.

Posteriormente os peixes foram anestesiados em solução alcoólica de benzocaína (Sigma-Aldrich, Brasil) em concentração equivalente a 100 mg/L e inoculados intracelomaticamente com 0,1mL da solução bacteriana por grama de peso do animal. Os peixes do grupo controle (G1) foram inoculados intracelomaticamente com PBS nas mesmas condições do grupo inoculado com a bactéria. A avaliação dos sinais clínicos, alterações comportamentais e taxa de mortalidade foram avaliadas quatro vezes ao dia durante trinta dias consecutivos.

Os animais recém-mortos foram coletados, necropsiados e o rim cranial, baço e fígado retirados para o reisolamento bacteriano e confirmação da mortalidade por *K. pneumoniae*.

Durante o período experimental, as variáveis limnológicas da água, mensuradas com auxílio de uma sonda multiparâmetro Horiba U-50® (Japão) se mantiveram dentro do recomendado para o conforto e bem estar dos peixes, com a concentração de oxigênio

dissolvido na água em torno de $7,2 \pm 0,16$ mg/L, temperatura de $28,73 \pm 1,28$, pH de $7,82 \pm 0,14$ e condutividade elétrica de $171,3 \pm 2,55$.

2.5 Análises histopatológicas

As tilápia-do-Nilo recém-mortas foram removidas das caixas experimentais, necropsiadas e tiveram as brânquias, fígado, rim, baço e intestino coletados e fixados em formalina 10% por 24 horas e transferidos para álcool 70% até o processo de inclusão em parafina e coradas em hematoxilina e eosina para análise de alterações nos órgãos, conforme protocolo descrito por Deivasigamani, (2007).

3. Resultados

3.1 Isolamento e identificação de estirpes de *K. pneumoniae*

As colônias bacterianas obtidas nas placas contendo ágar BHI eram morfologicamente idênticas e apresentaram-se em grande quantidade nas placas. A coloração de Gram evidenciou a presença de bactérias Gram-negativas, em forma de bastonetes e catalase positiva. Nos peixes, os principais sinais clínicos observados foram à presença de líquido na cavidade celomática, exoftalmia, órgãos friáveis e esbranquiçados, hemorragia em toda a superfície corporal, conforme a figura 1.

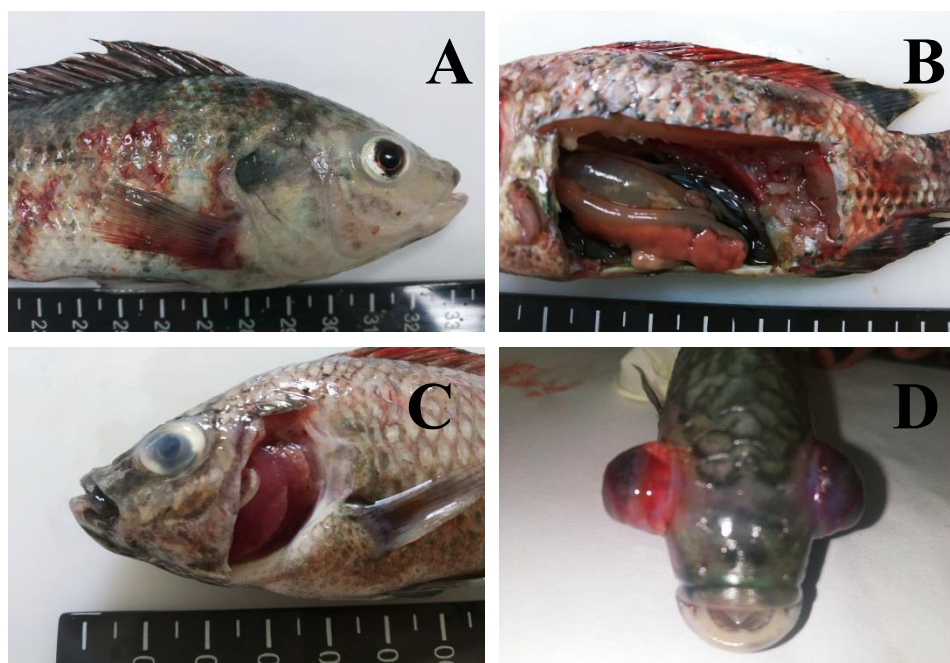


Figura 1. Sinais clínicos identificados em tilápia inoculada intracelomaticamente com *K. pneumoniae* [A] Hemorragias na superfície corporal, [B] Acumulo de líquido no estômago (seta), rim friável (*), [C] Brânquias pálidas e lamelas branquiais comprometidas [D] Exoftalmia ocular hemorrágica.

As análises microbiológicas realizadas permitiram o isolamento de bactéria com característica de *K. pneumoniae* em sete dos dez animais amostrados, denominadas de KP01D, KP02D, KP03D, KPO4D, KP05D, KP06D e KP07D. A identificação pelo sequenciamento parcial do gene 16S comprovou que os sete isolados eram de *K. pneumoniae*, apresentando valores de identidade $\geq 98\%$ de similaridade e 100% de cobertura.

3.2 Fenótipos de hipermucoviscosidade

Nenhuma cepa apresentou características de hipermucoviscosidade.

3.3 Infecção experimental

As mortalidades iniciaram no segundo dia após a inoculação da bactéria e foi estabilizada no sétimo dia, totalizando cinco animais mortos, equivalente a 50% dos animais, conforme demonstra o gráfico de mortalidade (Figura 2). As tilápias do G2 (Injeção com suspensão bacteriana) apresentaram infecção moderada a severa em toda a superfície corporal, e o G1 (Injeção com PBS) não apresentou mortalidades, alteração comportamental ou sinal clínico característico da bactéria, garantindo o controle de saúde dos animais.

Apesar dos sinais clínicos observados nos peixes inoculados com a bactéria, como hemorragia em toda a superfície corporal, os peixes continuaram a nadar e se alimentar normalmente. As mortalidades ocorreram subitamente. Os animais foram monitorados diariamente, quatro vezes ao dia, durante 30 dias pós-infecção, mesmo ocorrendo estabilidade da mortalidade para avaliação de sinais clínicos ou comportamentais tardios, que não ocorreram nesse estudo.

As análises microbiológicas realizadas permitiram o isolamento de bactéria com característica de *K. pneumoniae* em sete dos dez animais amostrados, denominadas de KP01D, KP02D, KP03D, KPO4D, KP05D, KP06D e KP07D. A identificação pelo sequenciamento parcial do gene 16S comprovou que os sete isolados eram de *K. pneumoniae*, apresentando valores de identidade $\geq 98\%$ de similaridade e 100% de cobertura.

3.2 Fenótipos de hipermucoviscosidade

Nenhuma cepa apresentou características de hipermucoviscosidade.

3.3 Infecção experimental

As mortalidades iniciaram no segundo dia após a inoculação da bactéria e foi estabilizada no sétimo dia, totalizando cinco animais mortos, equivalente a 50% dos animais, conforme demonstra o gráfico de mortalidade (Figura 2). As tilápias do G2 (Injeção com suspensão bacteriana) apresentaram infecção moderada a severa em toda a superfície corporal, e o G1 (Injeção com PBS) não apresentou mortalidades, alteração comportamental ou sinal clínico característico da bactéria, garantindo o controle de saúde dos animais.

Apesar dos sinais clínicos observados nos peixes inoculados com a bactéria, como hemorragia em toda a superfície corporal, os peixes continuaram a nadar e se alimentar normalmente. As mortalidades ocorreram subitamente. Os animais foram monitorados diariamente, quatro vezes ao dia, durante 30 dias pós-infecção, mesmo ocorrendo estabilidade da mortalidade para avaliação de sinais clínicos ou comportamentais tardios, que não ocorreram nesse estudo.

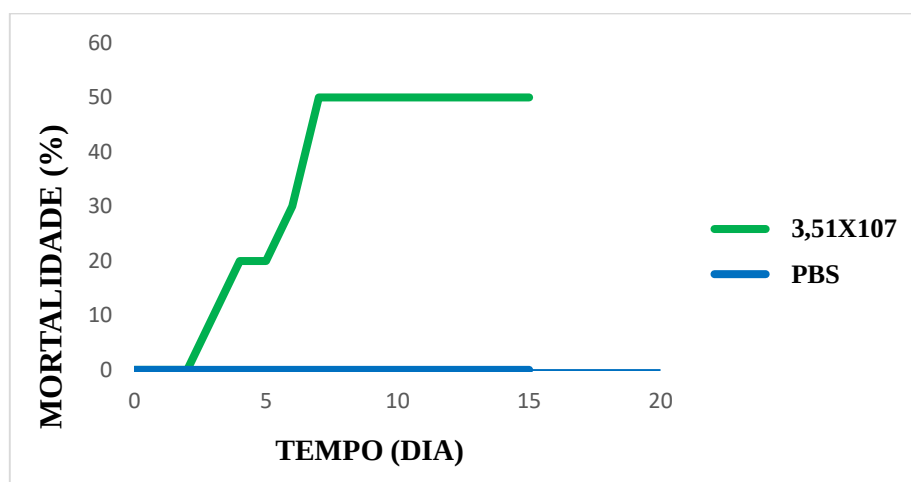


Figura 2. Curva de mortalidade de tilápia-do-Nilo após infecção com *K. pneumoniae*. Linha verde indica a mortalidade do grupo desafiado com a bactéria e a linha azul o grupo controle.

Os peixes recém-mortos, necropsiados e avaliados internamente, demonstraram acúmulo de líquido na cavidade celomática, presença de gás no estômago, rim, baço e fígado friáveis e esbranquiçados, além de lesões nas brânquias. Após a finalização do

desafio experimental, pôde-se caracterizar a bactéria *K. pneumoniae* como patogênica para a tilápia.

3.4 Análises histopatológicas

A histopatologia dos principais órgãos evidenciou degeneração hidrópica e gordurosa no fígado, (Figura 3A e 3B), a presença de centros de melanomacrófagos no baço e no rim (Figura 3C e 3D), hiperplasia e edema difuso nas brânquias (Figura 3E) e alterações no intestino delgado, como edema difuso, atrofia e fusão das vilosidades (Figura 3F). Outras alterações macroscópicas foram observadas, como fígado, ruim e baço apresentaram-se friáveis e com volume aumentado.

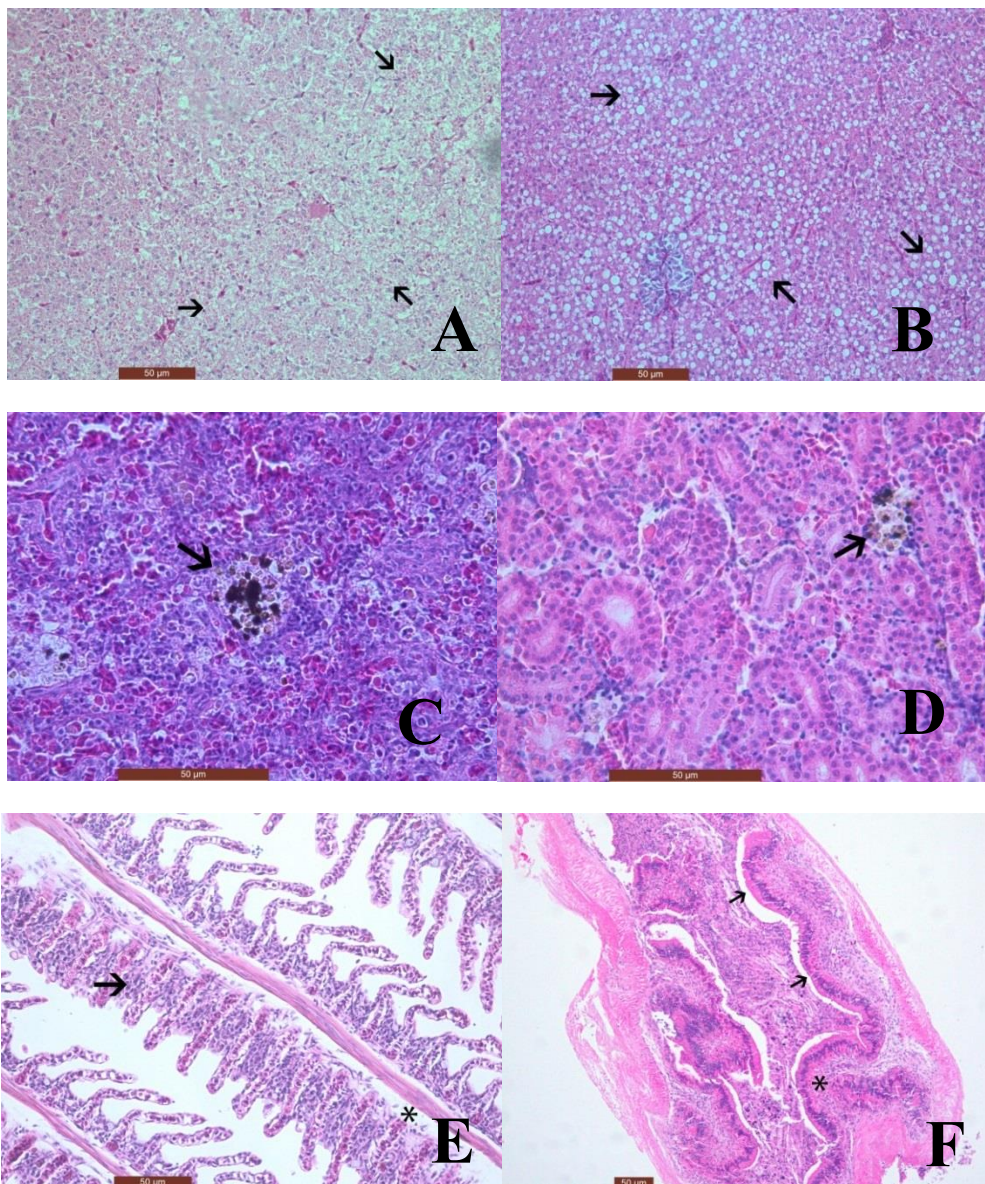


Figura 3. Alterações histológicas identificadas por setas observadas em tilápia inoculada intracelomaticamente com *K. pneumoniae* [A]Fígado com degeneração hidrópica difusa, [B]

Fígado com degeneração gordurosa difusa. Acúmulos de centro de melanomacrófagos no baço [C] e no rim [D]. Presença de hiperplasia (seta) e edema (*) difusos nas brânquias [E] e presença de edema difuso, atrofia e fusão das vilosidades no intestino delgado. Coloração com Hematoxilina e Eosina.

4. Discussão

A bactéria *K. pneumoniae* é reconhecida na medicina humana devido a elevada prevalência no ambiente nosocomial, causando pneumonia, infecção urinária e septicemia em neonatos e pessoas imunossuprimidas, sendo relacionada a taxas elevadas de morbimortalidade, por isso seu monitoramento deve ser constante (Azevedo et. al., 2019), entretanto, recentemente este patógeno vem sendo descrito em organismos aquáticos, como no leão marinho, *Zalophus californianus* (Jang et al., 2010), sargo japonês, *Nemipterus japonicus* (Diana & Manjulatha 2012), carpa comum, *Cyprinus carpio* (Takyi et al., 2012), carpa rohu, *Labeo rohita* (Das et al., 2018), peixe palhaço, *Amphiprion nigripes* (Gopi et al., 2016) e tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus* (Al-Imarah, 2008; Oliveira et al., 2014), a segunda espécie mais produzida mundialmente, apresentando sinais clínicos como intensa hemorragia por toda a superfície corporal, áreas de descoloração na pele e exoftalmia (Oliveira et al., 2014; Das et al., 2018). No Brasil este patógeno foi isolado em pele e cavidade oral de tilápia-do-Nilo em reservatórios situados no estado do Ceará. Lima Jr. et al., (2016).

Este estudo permitiu o isolamento de *K. pneumoniae* em sete dos dez juvenis de tilápia-do-Nilo amostrados como agente etiológico da doença, onde, na piscicultura, estes animais apresentavam mortalidade diária, presença de hemorragia subcutânea, sangramento urogenital e ascite, sinais clínicos comumente observados em várias enfermidades bacterianas, o que pode levar a erros de diagnóstico e falhas terapêuticas.

O isolamento desta bactéria em peixes de produção é extremamente relevante por se tratar de um patógeno que causa doenças em humanos e ser altamente resistente a vários agentes antimicrobianos devido à possibilidade de cepas produtoras da enzima betalactamase, que degrada os antimicrobianos betalactâmicos, correspondentes a uma classe amplamente empregada no tratamento de infecções graves.

A possível causa da infecção de peixes pela bactéria está relacionada ao fato desta ser encontrada em diferentes ambiente e fazer parte da microbiota do solo e corpos de água (Oliveira et al., 2014; Sharif et al., 2018). No Brasil, como a maior parte da produção de tilápia é realizada em tanques-rede de pequeno, médio e grande volume, localizados em represas, rios e braços de rios, o despejo ilegal de efluentes tanto doméstico como

industrial nesses ambientes é comum, o que possivelmente está causando a contaminação dos peixes de produção por estes estarem mais estressados e imunossuprimidos (Leira et al., 2016) devido a produção intensiva, permitindo que estes passem a albergar um grande número de patógenos pouco conhecidos na piscicultura.

Para avaliar ou comprovar a patogenicidade desta bactéria em juvenis de tilápia-do-Nilo proveniente de piscicultura comercial foi realizado um desafio experimental com cepa homóloga da bactéria. Após a inoculação experimental em peixes saudáveis, foi possível relatar que a bactéria é patogênica, sendo possível classificar a infecção como moderada a severa, com elevada taxa de mortalidade até o sétimo dia pós-inoculação. Os peixes inoculados apresentaram como principal sinal clínico hemorragia em toda a superfície corporal, todavia, mesmo assim os animais continuaram a nadar e se alimentar normalmente. Resultados semelhantes foram obtidos por Gopi et al., (2016) após inoculação da bactéria em *Amphiprion nigripes*.

Na necropsia dos peixes inoculados com a bactéria foi possível observar várias alterações, como rim, baço e fígado friáveis e com volume aumentado, corroborando Das et al., (2018), que evidenciaram os mesmos sinais clínicos no postulado de Koch realizado com esta bactéria em *Labeo rohita*.

Com relação às análises histopatológicas, podem-se observar várias alterações nos principais órgãos dos peixes após inoculação com a bactéria. No fígado, a principal alteração observada foi a degeneração hidrópica, que demonstra a incapacidade das células em manter o balanço de sódio e potássio dentro de seu citoplasma e a degeneração gordurosa, que ocorre pela incapacidade do órgão em metabolizar lipídios. Essas alterações indicam lesão no órgão, devido à bactéria utilizada no experimento causar doença sistêmica.

No baço e no rim, foi possível observar a presença de centros de melanomacrófagos. Essas estruturas têm analogia primitiva com os centros germinativos de linfonodos de aves e mamíferos (Ellis, 1980) e contém diferentes pigmentos, como a melanina, hemossiderina, linpofucsina entre outros que podem auxiliar nos mecanismos de defesa do hospedeiro (Brown & George, 1985). Assim, a presença destes centros indica uma resposta do organismo à agressão causada pela inoculação bacteriana, uma vez que a melanina, liberada após a ruptura dos centros melanomacrófagos pode absorver ou neutralizar radicais livres e agentes tóxicos e produzir compostos bactericidas, como o peróxido de hidrogênio (Wolke et al., 1985; Zuasti et al., 1998, Agius & Roberts, 2003;

Steinel & Bolnick, 2017). Esses centros também foram observados no fígado e no rim de peixes infectados com *Aeromonas hydrophila* (Roberts, 1989).

O intestino delgado apresentou edema difuso, atrofia das vilosidades e fusão, decorrentes da inoculação da bactéria, causando falhas em seu funcionamento, uma vez que tanto a atrofia quanto a fusão das vilosidades resultam em menor área de absorção e em menor aproveitamento dos alimentos. O edema também dificulta a funcionalidade normal do órgão, pois há maior pressão sobre as células. Alterações semelhantes também foram descritas em *Carpa Rohu* (*Labeo rohita*) infectadas experimentalmente com *Aeromonas hydrophila* (Anand Prasad et al., 2019).

Nas brânquias foi observada hiperplasia nas lamelas secundárias e edema difuso. Essas alterações atuam como um mecanismo de defesa do órgão em resposta a inoculação bacteriana, todavia, essas alterações provocam aumento da distância entre as células epiteliais e os capilares sanguíneos, com prejuízo às trocas gasosas e à osmorregulação, essenciais à sobrevivência dos peixes (Davies et al., 2018). Essas alterações são comuns em infecções bacterianas, como demonstrado em bagres africanos (*Clarias gariepinus*) infectados por *Aeromonas hydrophila* (Najiah et al., 2014).

Este é o primeiro estudo que demonstra a patogenicidade da *K. pneumoniae* para tilápia-do-Nilo no país, reforçando a importância da realização de um diagnóstico laboratorial acurado nos surtos de doenças que ocorrem na piscicultura, principalmente em peixes produzidos em tanques-rede, pois bactérias presentes na água ou no solo dos rios, ou mesmo em efluentes podem causar surtos de morbidade e mortalidade elevada nos peixes, além de colocar em risco à saúde dos trabalhadores da piscicultura e dos consumidores de pescado. Outro ponto chave do diagnóstico correto de infecções na piscicultura é o tratamento correto que será realizado, dificultando a disseminação de resistência bacteriana e a poluição dos corpos d'água, torando a aquicultura mais sustentável e segura.

Referências Bibliográficas

- Agius, C., Roberts, R.J., 2003. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. J Fish Diseases 26, 499–509. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2003.00485.x>
- Al-Imarah, E.A., 2008. Distribution of some aerobic bacteria in an infected *Cyprinus carpio* L. fish farm in Basrah and its resistance to antibiotics. JKU. 6 (4): 209-215.
- Anand Prasad, P. H. Shivanandamuthy, D. Ravindra Kumar Reddy, M. Ganapathy Naik, Gangadhara Gowda, K. Mansingh Naik, T.V. Ramana And Akshaya Panigrahi, 2019. Histopathology of Rohu *labeo rohita* (hamilton) after infecting with *Aeromonas hydrophila*. International Journal of Zoology and Applied Bioscience Volume 4, Issue 6, pp: 269-274. <https://doi.org/10.5281/zenod>
- Azevedo, P.A.A., Furlan, J.P.R., Gonçalves, G.B., Gomes, C.N., Goulart, R. da S., Stehling, E.G., Pitondo-Silva, A., 2019. Molecular characterisation of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* belonging to CC258 isolated from outpatients with urinary tract infection in Brazil. Journal of Global Antimicrobial Resistance 18, 74–79. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.01.025>
- Brown, C.L., George, C.J., 1985. Age-dependent accumulation of macrophage aggregates in the yellow perch, *Perca flavescens* (Mitchill). J Fish Diseases 8, 135–138. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1985.tb01195.x>
- Das, A., Acharya, S., Behera, B.K., Paria, P., Bhowmick, S., Parida, P.K., Das, B.K., 2018. Isolation, identification and characterization of *Klebsiella pneumoniae* from infected farmed Indian major carp *Labeo rohita* (Hamilton 1822) in West Bengal, India. Aquaculture 482:111–116
- Deivasigamani, B., 2007. Structure of immune organ in edible catfish, *Mystus gulio*. J Environ Biol 28, 757–764.
- Diana, T.C., Manjulatha, C., 2012. Incidence and Identification of *Klebsiella pneumoniae*

- in Mucosal Buccal Polyp of *Nemipterus japonicus* of Visakhapatnam Coast, India. J. of Fisheries and Aquatic Science 7, 454–460. <https://doi.org/10.3923/jfas.2012.454.460>
- Drancourt, M., Bollet, C., Carta, A., Rousselier, P., 2001. Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 51, 925–932. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-3-925>
- Ellis, A.E., 1980. Antigen-trapping in the spleen and kidney of the plaice *Pleuronectes platessa* L. J Fish Diseases 3, 413–426. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1980.tb00425.x>
- Euzéby, J.P., 1997. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a Folder Available on the Internet. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 47, 590–592. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-2-590>
- FAO-Food and agriculture organization of the United Nations, 2018. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018 (SOFIA): cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. Food & Agriculture Org, Place of publication not identified.
- Gopi M., Kumar T.T., Prakash, S., 2016. Opportunistic pathogen *Klebsiella pneumoniae* isolated from Maldives' clown fish *Amphiprion nigripes* with hemorrhages at Agatti Island, Lakshadweep archipelago. Int J Fisheries Aquatic Studies 4:464–467.
- Haenen, O.L.M., Evans, J.J., Berthe, F., 2013. Bacterial infections from aquatic species: potential for and prevention of contact zoonoses: -EN- -FR- Infections bactériennes d'origine aquatique : risques d'exposition zoonotique par contact et prévention -ES- Infecciones bacterianas procedentes de especies acuáticas: probabilidad y prevención de las zoonosis por contacto. Rev. Sci. Tech. OIE 32, 497–507. <https://doi.org/10.20506/rst.32.2.2245>

IBGE-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2019. SIDRA-Sistema IBGE de Recuperação Automática. Disponível em: [http:// www2.sidra.ibge.gov.br/](http://www2.sidra.ibge.gov.br/)

Janda, J.M., Abbott, S.L., 2005. The genera *Klebsiella* and *Raoultella*. In: The Enterobacteria, 3rd ed. ASM Press, Washington, DC, pp. 115–135.

Jang, S., Wheeler, L., Carey, R.B., Jensen, B., Crandall, C.M., Schrader, K.N., Jessup, D., Colegrove, K., Gulland, F.M.D., 2010. Pleuritis and suppurative pneumonia associated with a hypermucoviscosity phenotype of *Klebsiella pneumoniae* in California sea lions (*Zalophus californianus*). Veterinary Microbiology 141, 174–177. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.07.032>

Leira, M.H., De Assis Lago, A., Botelho, H.A., Melo, C.C.V., Mendonça, F.G., Nascimento, A.F. do, Freitas, R.T.F. de, 2016. Principais Infecções Bacterianas na Criação de Peixes de Água Doce do Brasil – Uma Revisão. Rev. Ci. Vet. Saúde Pub. 3, 44. <https://doi.org/10.4025/revcivet.v3i1.32436>

Lima-Junior, E.M., Bandeira, T.J.P.G., de Miranda, M.J.B., Ferreira, G.A., Parente, E.A., Piccolo, N.S., Moraes Filho, M.O, 2016. Characterization of the microbiota of the skin and oral cavity of *Oreochromis niloticus* Caracterização da microbiota da pele e cavidade oral de *Oreochromis niloticus*. J. Health Biol Sci. 4(3):193-197. <http://dx.doi.org/10.12662/2317-3076jhbs.v4i3.767.p193-197.2016>

Najiah M, L.A., 2014. *Aeromonas hydrophila*: Antimicrobial Susceptibility and Histopathology of Isolates from Diseased Catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell). J Aquac Res Development 05. <https://doi.org/10.4172/2155-9546.1000215>

Oliveira, R.V., Peixoto, P .G., Ribeiro, D.C., Araujo, M.C., Santos, C.T. B., Hayashi, C., Pedreira, M .M., Pelli, A., 2014.

Roberts, R.J., 1989. The pathophysiology and systematic pathology of teleosts. In: Roberts, R.J. (Ed.) Fish pathology. 2nd ed. London: Baillière Tindall. p. 56-134.

- Roe, W.D., Rogers, L., Pinpimai, K., Dittmer, K., Marshall, J., Chilvers, B.L., 2015. Septicaemia and meningitis caused by infection of New Zealand sea lion pups with a hypermucoviscous strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Veterinary Microbiology* 176, 301–308. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.01.019>
- Sharif, U., Sadhan C. S., Debashis K. M., 2018. Health risk from contaminated aquaculture fish. *International Journal of Natural and Social Sciences*, 5(2): 01-16.
- Sebastião, F.A., Furlan, L.R., Hashimoto, D.T., Pilarski, F., 2015. Identification of Bacterial Fish Pathogens in Brazil by Direct Colony PCR and 16S rRNA Gene Sequencing. *AiM* 05, 409–424. <https://doi.org/10.4236/aim.2015.56042>
- Steinel, N.C., Bolnick, D.I., 2017. Melanomacrophage Centers As a Histological Indicator of Immune Function in Fish and Other Poikilotherms. *Front. Immunol.* 8, 827. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00827>
- Sunilkumar B. and Roopa. C., 2015. Isolation and Antibigram of *Klebsiella* species from Various Clinical Specimens. *Int.J.Curr.Microbiol.App. Sci*; 4(9): 991-995.
- Takyi, R., Nunoo, F. K. E., Ziddah, P., Oddoye, J., 2012. Occurrence of bacterial infection in two commonly cultured fish species on two fish farms in southern Ghana. *WJBR*. 2 ,81-92.
- Whitaker, D.M., Reichley, S.R., Griffin, M.J., Prager, K., Richey, C.A., Kenelty, K.V., Stevens, B.N., Lloyd-Smith, J.O., Johnson, C.K., Duignan, P., Johnson, S., Rios, C., DeLong, R., Halaska, B., Rust, L., Byrne, B.A., Struve, C., Barnum, S., Soto, E., 2018. Hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* Isolates From Stranded And Wild-Caught Marine Mammals of The Us Pacific Coast: Prevalence, Phenotype, And Genotype. *Journal of Wildlife Diseases* 54, 659–670. <https://doi.org/10.7589/2017-07-178>
- Wiskur, B.J., Hunt, J.J., Callegan, M.C., 2008. Hypermucoviscosity as a Virulence Factor

in Experimental *Klebsiella pneumoniae* Endophthalmitis. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 49, 4931. <https://doi.org/10.1167/iovs.08-2276>

Wolke, R.E., Murchelano, R.A., Dickstein, C.D., George, C.J., 1985. Preliminary evaluation of the use of macrophage aggregates (MA) as fish health monitors. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 35, 222–227. <https://doi.org/10.1007/BF01636502>

Zuasti, A.; Jimenez-cervantes, C.; Garciaboron, J.C; Serrer, C. 1998. The melanogenic system of *Xenopus laevis*. Archives für Histologie and Cytologie, v. 61, n. 4, p. 305-316.

CAPÍTULO 3

Avaliação *in vitro* do potencial antimicrobiano de óleos essenciais contra *Klebsiella pneumoniae* isolada de tilapia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Resumo

Este estudo avaliou *in vitro* o efeito antibacteriano e a atividade hemolítica dos óleos essenciais (OEs) de artemisia (*Artemisia vulgaris*), bergamota (*Citrus bergamia*), cedro (*Cedrela fissilis*), citronela (*Cymbopogon winterianus*), copaíba (*Copaifera langsdorffii*), eucalipto (*Eucalyptus*), eucalipto citriodora (*Corymbia citriodora*), gengibre (*Zingiber officinale*), gerânio (*Pelargonium peltatum*), hortelã-pimenta (*Mentha x piperita*), manjerição (*Ocimum basilicum*), melaleuca (*Melleuca alternifolia*), olíbano (*Boswellia carterii*), petitgrain (*Citrus aurantium*), tomilho (*Thymus vulgaris*), ylang ylang (*Cananga odorata*), e dos antimicrobianos florfenicol (FFC), oxitetraciclina (OTC) contra sete cepas de *Klebsiella pneumoniae* isoladas de tilápia-do-Nilo. Os testes foram realizados através de micro diluições em placas de Elisa com concentrações variando de 4% a 0,00781% para os óleos e de 256 a 0.0075 µg.mL⁻¹ para os antimicrobianos, para determinar a Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB) por plaqueamento e incubação a 28°C por 24h. Os resultados demonstraram que o óleo essencial de tomilho foi o composto que demonstrou maior atividade contra a bactéria, com a CMI e o CMB variando de 1,25 µg mL⁻¹ a 2,5 µg mL⁻¹. O OE de melaleuca apresentou CMI e CMB de 10 µg mL⁻¹ em 100% das cepas. Os OEs de eucalipto, artemisia, bergamota, ylang ylang, olíbano e gerânio também demonstraram bons resultados contra a bactéria. Os antimicrobianos florfenicol (FFC), oxitetraciclina (OTC) não apresentaram atividade contra as estirpes utilizadas no estudo. Dos oito OEs que evidenciaram atividade contra as cepas, os componentes majoritários do tomilho foram o timol (53.3%) e o p-cimeno (20.8%), da melaleuca o 1- terpinen-4-ol (40.5%), γ-terpineno (19.7%) e α-terpineno (1.6%). A maioria dos óleos não demonstrou ser tóxico no teste da destruição de hemácias (menor que 1%), com exceção da melaleuca, que demonstrou valores de comprometimento hemolítico superiores a 33%. Concluímos assim a eficácia e segurança de oito dos 16 óleos essenciais testados, caracterizando-os como promissores para o tratamento da *K. pneumoniae*.

Palavras-chave: Aquicultura, Bacteriose, Fitoterápico, *Klebsiella pneumoniae*, Tratamento, Óleo essencial

1. Introdução

A intensificação da aquicultura tem desencadeado o surgimento de diversas doenças, principalmente de origem bacteriana, representando uma grande ameaça à contínua expansão da atividade aquícola. O surgimento dessas doenças em alguma das fases da produção animal tem se tornado cada vez mais comum, sendo necessário o uso frequente de produtos químicos e veterinários não só no tratamento, mas também na prevenção dessas doenças. Essa estratégia vem sendo adotada para evitar a disseminação de patógenos para todo o plantel, uma vez que, os sistemas intensivos, associados a fatores negativos, propiciam a infecção nos hospedeiros (Valladão et al., 2015).

O número de patógenos que acometem os organismos aquáticos tem aumentado anualmente, dentre eles, surtos de bacterioses, principalmente pela localização dos tanques-redes, que estão dispostos em rios, braços de rios ou represas e sujeitos à contaminação por efluentes, tanto de origem doméstica quanto industrial ou produção de animais em seu entorno, torando os peixes um reservatório de novas bactérias.

Dentre as bactérias que merecem destaque na aquicultura, encontra-se a *Klebsiella pneumoniae*, emergente, altamente resistente a vários agentes antimicrobianos. Muitas cepas são produtoras da enzima beta-lactamase a qual degrada os antimicrobianos beta-lactâmicos e também são reconhecidas na medicina humana por causarem infecção no trato urinário, pneumonia e septicemia em humanos (Queenan & Bush, 2007; Azevedo et al., 2019).

Quando um patógeno surge na piscicultura, rapidamente utiliza-se algum antimicrobiano na tentativa de controlar a infecção. Todavia, como no Brasil existe apenas dois antimicrobianos licenciados para uso na aquicultura, o florfenicol e a oxitetraciclina (SINDAN, 2018), muitos piscicultores utilizam moléculas, aprovadas para outras espécies animais, contribuindo significativamente para a problemática da resistência bacteriana ou mesmo da contaminação do ambiente e do pescado (Okocha et al., 2018).

Com toda essa problemática do aumento da resistência bacteriana, tanto em humanos quanto em animais, e pelo acúmulo de resíduos no pescado e no ambiente (Alderman & Hastings, 1998; Cabello, 2006; Bandeira Junior et al., 2017), a utilização de produtos naturais, como os óleos essenciais de plantas na prevenção ou no tratamento de doenças em piscicultura vem sendo encorajada e difundida, com a descrição de vários resultados benéficos em várias espécies de peixes (Carson et al. 2006; Bakkali et al., 2008;

Abd El-Galil and Aboelhadid, 2012; Valladão et al., 2016; Costa et al., 2017; Valladão et al., 2017; Majolo et al., 2018).

A maioria destes OEs possui componentes que atuam diretamente na parede celular bacteriana, provocando o processo de lise e bloqueio da síntese proteica e síntese de DNA, além de interferir no mecanismo de sinalização do patógeno por sensoriamento (Citarasu, 2010). Assim, este estudo teve como objetivo avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana e a toxicidade de 16 óleos essenciais e dois antimicrobianos licenciados contra *K. pneumoniae*.

2. Material e métodos

2.1 Cepas bacterianas

As cepas utilizadas no estudo, denominadas de KP01D, KP02D, KP03D, KP04D, KP05D, KP06D e KP07D foram isoladas de tilápias-do-Nilo com sinais clínicos de bacteriose e identificadas pela sequência do gene 16S rRNA.

2.2 Óleos essenciais

Os óleos essenciais de artemisia (*Artemisia vulgaris*), bergamota (*Citrus bergamia*), cedro (*Cedrela fissilis*), citronela (*Cymbopogon winterianus*), copaíba (*Copaifera langsdorffii*), eucalipto (*Eucalyptus*), eucalipto citriodora (*Corymbia citriodora*), gengibre (*Zingiber officinale*), gerânio (*Pelargonium peltatum*), hortelã-pimenta (*Mentha x piperita*), manjerição (*Ocimum basilicum*), melaleuca (*Melleuca alternifolia*), olíbano (*Boswellia carterii*), petitgrain (*Citrus aurantium*), tomilho (*Thymus vulgaris*), ylang ylang (*Cananga odorata*), foram fornecidos pela Phytoterapica® (São Paulo, SP, Brasil) e os antimicrobianos Florfenicol (FFC), e Tianfenicol (TAF) da Sigma-Aldrich® (São Paulo, SP, Brasil).

2.3 Perfil cromatográfico

A caracterização química dos EOs foi realizada por cromatografia gasosa (GC) com detector de ionização de chama (FID) usando um sistema Agilent HP 780A (Agilent Technologies Inc., EUA) e confirmando com GC / espectrometria de massa, como descrito por Baldin et al. (2013).

2.4 Concentração Mínima Inibitória e Concentração Mínima Bactericida (CMI e CMB)

A CMI foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, como recomendada pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2014). Os OEs foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídos em água destilada estéril para atingir a concentração de 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de solução antimicrobiana estoque. Para os antimicrobianos, foi utilizada a metodologia descrita por Assane et al. (2019), os quais foram dissolvidos em etanol a 95% (FFC), metanol a 100% (OTC), para produzir as soluções antimicrobiana-mãe.

As bactérias foram repicadas em Ágar Muller Hinton (BD, USA), incubadas a 28° C durante 24 h em estufa de crescimento (Quimis®, São Paulo, Brasil). Após este período, 4 – 5 colônias foram transferidas para solução salina (0,85% NaCl) ajustando a densidade para 1×10^8 UFC mL^{-1} em espectrofotômetro com comprimento de onda de 625 nm.

Após a obtenção da solução antimicrobiana-mãe, 20 μL de cada uma foi retirado e transferido para o primeiro poço de uma placa padrão de 96 poços contendo 180 μL de meio de cultura e, em seguida, realizada uma diluição em série de duas vezes (intervalo de concentrações: EOs, 20 - 0,078125 $\mu\text{g mL}^{-1}$; FFC e OTC, 64 - 0,125 $\mu\text{g mL}^{-1}$). A CMI e a CMB foram realizadas em duplicata. Os pontos finais da CMI foram determinados usando o método CMI padrão.

Em cada placa do teste foi reservada uma linha para o controle de qualidade, que foi inoculada com uma cepa de *E. coli* ATCC® 25922TM, além do controle de qualidade para o meio de cultura sob as mesmas condições. Todos os compostos foram testados em duplicata e incubados a 28°C por 24h. Após o período de incubação, foi realizada a leitura das placas através da adição de 20 μL de cloreto de trifeniltetrazólio (CTT) (Sigma – Aldrich®) em todos os poços e incubadas por 15 minutos, conferindo a coloração vermelha apenas para poços que continham bactéria. Nesse momento, a CMI foi determinada. Após esta etapa, para a determinação do CMB, 10 μL foram retirados e transferidos para placas de Petri contendo Ágar Muller Hinton (BD, USA) e incubadas nas mesmas condições anteriores. Com presença ou ausência de crescimento, a atividade bacteriana foi classificada como bactericida e bacteriostática.

2.5 Análise da hemolítica dos OEs

A atividade hemolítica dos OEs foi monitorada através da incubação em tubos de ensaio de uma suspensão de eritrócitos coletados de peixes saudáveis, em concentrações 0 a 4% em PBS com diluições seriadas dos OEs (0,2 - 100 μm) e incubados por uma hora

em estufa de crescimento ajustada a 37°C. As suspensões foram centrifugadas (800 g por 5min) e a absorbância das alíquotas (100 µl) do sobrenadante mensurada em leitora de microplaca (540nm) (adaptado de Asthana, Yada e Ghosh, 2004). No controle positivo, os eritrócitos foram incubados nas mesmas condições com o composto Triton X-100 e o controle negativo com os mesmos volumes só que com adição de PBS. Através dos valores de absorbância dos testes e controles foi possível calcular o percentual de hemólise conforme equação a baixo:

$$\text{Hemólise (\%)} = \frac{\text{Absorbância (OEs)} - \text{Absorbância (controle negativo)} \times (100)}{\text{Absorbância (controle positivo)} - \text{Absorbância (controle negativo)}}$$

3. Resultados

3.1 Cromatografia

O perfil cromatográfico confirmou a identidade de todos os compostos presentes nos OEs utilizados neste estudo. Dentre os oito OEs que evidenciaram atividade *in vitro* contra a bactéria, o tomilho (*Thymus vulgaris*) apresentou como componente majoritário o timol (53.3%) e o p-cimeno (20.8%) (Figura 1).

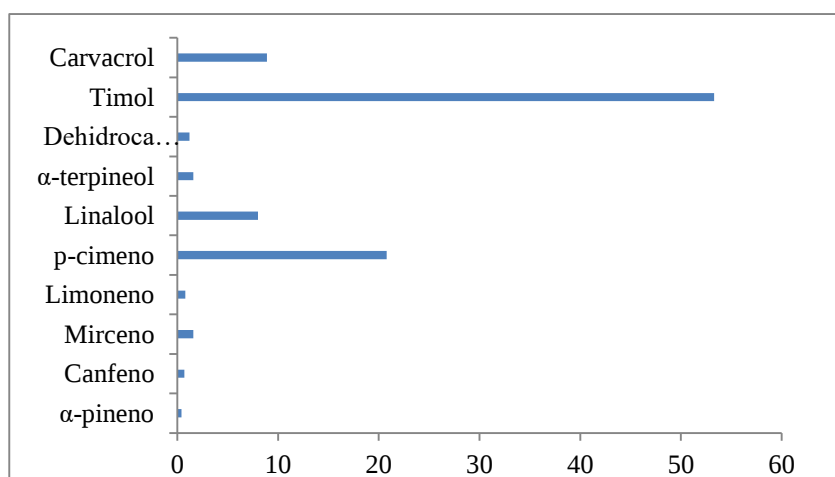
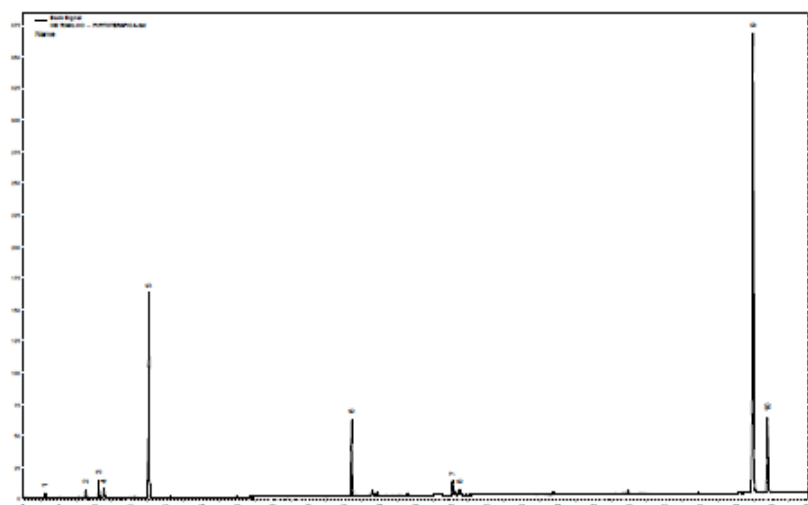


Figura 1. Composição química do óleo essencial do *Thymus vulgaris*.



Os constituintes majoritários da melaleuca (*Melleuca alternifolia*) foram o 1-terpinen-4-ol (40.5%), o γ -terpineno (19.7%) e o α -terpineno (10%) (Figura 2).

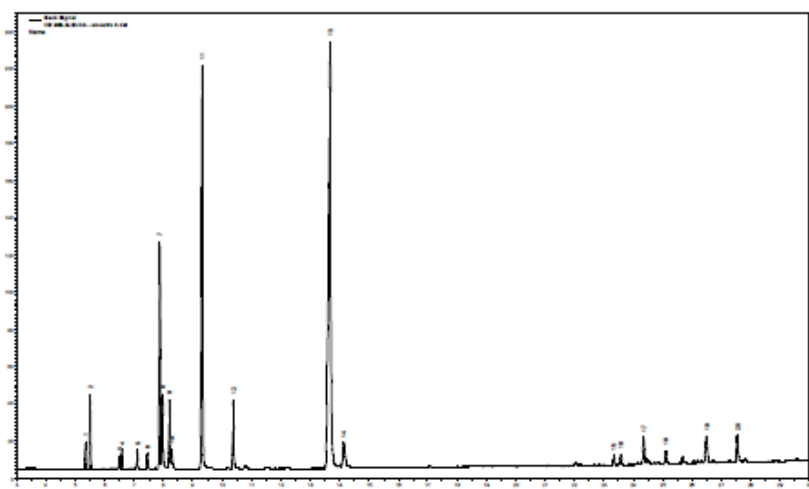
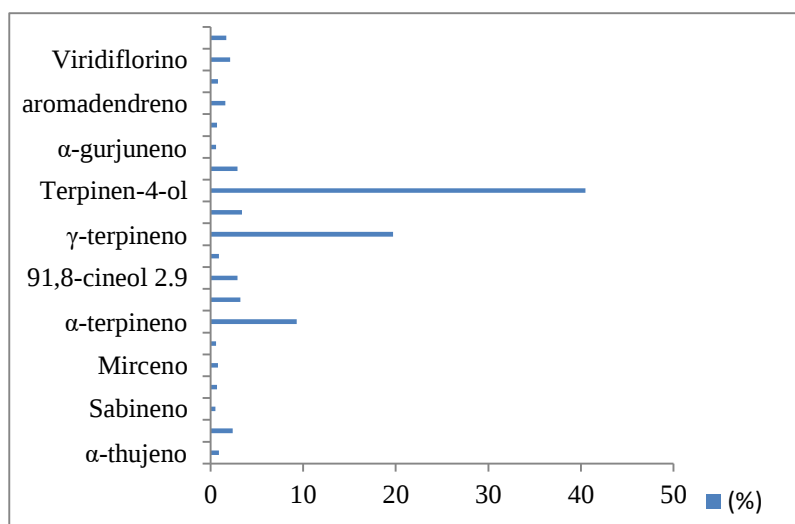


Figura 2. Composição química do óleo essencial de *Melleuca alternifolia*.

Na composição do *Artemisia* (*Artemisia vulgaris*) foram identificados eucaliptol (12,1%), e limoneno (14.2%), bergamota (*Citrus bergamia*) o acetato de linalila (33.1%) e o linalool (10.7%). No eucalipto (*Eucalyptus*) foram identificados os componentes 1,8-cineol (9.3%), limoneno (73%), no gerânio (*Pelargonium peltatum*) o citrônol (47.0%), formato citrônol (10.6%) e geraniol (10.1%). O olíbano (*Boswellia carterii*) o α -pineno (65.1%), p-cimeno (6.8%) e β -pineno (4.9%). Os principais componentes do ylang ylang (*Cananga odorata*) foram o germacreno d (24.9%), β -cariofileno (19.8%) e o β -farneseno (10.2%).

2.5 Concentração Mínima Inibitória e Concentração Mínima Bactericida (CMI e CMB)

Dos 16 óleos essenciais testados, oito apresentaram atividade *in vitro* contra as cepas de *K. pneumoniae*, sendo *Thymus vulgaris* o composto que demonstrou maior atividade, com a CMI e o CBM denotando atividade bactericida variando de 1,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (57,14% dos isolados) a 2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (42,86%). A *Melleuca alternifolia* apresentou CMI e CMB de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em 100% dos isolados, evidenciando seu potencial bactericida contra os isolados. A CMI e a CMB do *Eucalyptus* e da *Artemisia vulgaris* foi de 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e também apresentam propriedades bactericidas. A CMI dos óleos essenciais de *Citrus bergamia*, *Cananga odorata*, *Boswellia carterii* e *Pelargonium peltatum* também foi de 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, embora o CMB tenha sido maior que no intervalo de concentração testado, sendo os seus potenciais considerados bacteriostáticas (Tabela 1).

Na CMI do controle de qualidade realizado para as cepas de *K. pneumoniae* os antimicrobianos não apresentaram atividade contra a bactéria (Tabela 1).

2.6 Atividade hemolítica dos OEs

A maioria dos OEs testados não lisaram as hemácias de peixe, isto é, não foram tóxicos. O *Thymus vulgaris* com CMI entre 1,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ comprometeu apenas 0,251472 e 0,26332% das hemácias. Já a *Melleuca alternifolia* embora tenha apresentado resultados positivos na CMI contra a bactéria (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) demonstrou valores de comprometimento hemolítico superiores a 33%, o que pode ser preocupante. Os óleos essenciais de *Artemisia vulgaris*, *Boswellia carterii*, *Cananga odorata*, *Citrus bergamia*, *Eucalyptus* e *Pelargonium peltatum* que apresentaram valores de CMI equivalente a 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e valores de CMB diferentes, demonstraram lise significativa das hemácias,

visto que, em ambas as concentrações, os valores foram inferiores a 1%, como demonstrado na Tabela 2.

3. Discussão

A presença de bactérias resistentes, no ambiente aquático vem aumentando anualmente em todo o mundo causando preocupação e um alerta (Whitaker et al., 2018). Assim, o uso de óleos essenciais de plantas no controle de bactérias na piscicultura se mostra uma alternativa promissora, como demonstrado em nosso estudo.

Neste estudo, dos 16 óleos testados, o óleo essencial de tomilho demonstrou, *in vitro*, grande potencial para o controle de *K. pneumoniae* na tilápia corroborando estudos que descreveram o potencial deste OE contra bactérias, parasitos e insetos (Castro et al., 2006; Santuario et al., 2007; Ostrand et al., 2012; Albert & Ransangan, 2013; Valladão et al., 2015; Tomazelli Júnior et al., 2017).

O OE de tomilho tem elevada eficácia contra parasitos e bactérias (Zheng et al. (2009; Giarratana et al., 2014) devido aos seus compostos principais, que são o timol terpenóide, seu isômero fenol carvacrol, bem como aglomerados de flavonóides e glicosídeos de flavonoides. A lipofilia desses compostos parece desempenhar um importante papel no dano celular causado a bactéria. Neste estudo, a CMI do OEs de tomilho foi de 0,125 e 0,25 mg mL⁻¹, sendo o que apresentou a maior poder de inibição bacteriana.

Alguns estudos recentes têm demonstrado a eficácia dos óleos essenciais contra bactérias consideradas resistentes aos antimicrobianos, como a *K. pneumoniae*. Sakkas et al., (2016) demonstraram a eficácia de óleos essenciais (concentrações de 0,5% a 0,75%) contra microrganismos isolados de humanos em hospitais. O estudo ressalta o elevado potencial dos óleos no controle de bactérias e a importância dos estudos *in vivo* com aplicação de óleos, inclusive com resultados promissores *in vitro* contra *K. pneumoniae* em tilápias, principalmente do óleo de tomilho pelo melhor desempenho apresentado.

Os óleos essenciais de Artemisia, Bergamota, Eucalipto, Gerânio, Olíbano, e Ylang ylang, também apresentaram bons resultados na inibição do crescimento de *K. pneumoniae*. A grande variedade de plantas medicinais e o número elevado de componentes em sua composição evidenciam, na maioria das vezes, sinergia entre as moléculas, o que favorece a eficácia do óleo contra patógenos (Yap et al., 2014).

São escassos os trabalhos que avaliaram o comprometimento sanguíneo de OEs em animais aquáticos, assim como trabalhos sobre a eficácia de óleos, apesar de sua

utilização ser muito difundida nos últimos anos. O baixo comprometimento hemolítico de OEs é relatada em estudos, como o de Sobrinho et al., (2016) que avaliaram a ação hemolítica do óleo essencial de ewurô (*Vernonia scorpioides*) observando porcentagens de hemólises baixas, com valores de 0,9% a 1,08%, enfatizando baixos danos as células sanguíneas do hospedeiro. Amber et al., (2010) observaram apenas 5,1% de hemólise ao avaliarem a atividade hemolítica de *Ocimum sanctum* em células sanguíneas de humanos.

Diante dos resultados obtidos, podemos concluir que os OEs, principalmente o de tomilho, possuem excelente potencial de inibição *in vitro* contra a bactéria *K. pneumoniae*, pontuando-os como uma boa opção terapêutica e evitando o uso indiscriminados de antimicrobianos sintéticos. Além de ser uma alternativa viável para avaliar seus benefícios *in vivo* no tratamento contra este patógeno, e demais microrganismos que acometem organismos aquáticos.

Referências Bibliográficas

- Albert, V. & Ransangan, J. (2013) Antibacterial potential of plant crude extracts against Gram negative fish bacterial pathogens. International Journal of Research in Pharmaceutical and Biosciences, 3, 21–27
- Alderman, D.J., Hastings, T.S., 1998. Antibiotic use in aquaculture: development of antibiotic resistance - potential for consumer health risks*. Int J Food Sci Tech 33, 139–155. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.1998.3320139.x>
- Amber, K., Aijaz, A., Immaculata, X., Luqman, K. A., & Nikhat, M. (2010). Anticandidal effect of *Ocimum sanctum* essential oil and its synergy with fluconazole and ketoconazole. Phytomedicine, 17(12), 921–925. doi:10.1016/j.phymed.2010.02.012
- Bandeira Junior, G., Sutili, F.J., Gressler, L.T., Ely, V.L., Silveira, B.P., Tasca, C., Reghelin, M., Matter, L.B., Vargas, A.P.C., Baldisserotto, B., 2018. Antibacterial potential of phytochemicals alone or in combination with antimicrobials against fish pathogenic bacteria. J Appl Microbiol 125, 655–665. <https://doi.org/10.1111/jam.13906>

- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology* 46, 446–475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Burridge, L., Weis, J. S., Cabello, F., Pizarro, J., & Bostick, K. (2010). Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects. *Aquaculture*, 306(1-4), 7–23. doi:10.1016/j.aquaculture.2010.05.020
- Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology* 94, 223–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
- Cabello, F.C., 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ Microbiol* 8, 1137–1144. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01054.x>
- Castro, D.P.; Cardoso, M.G.; Moraes, J.C.; Santos, N.M.; Baliza, D.P. Não preferência de *Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera: Noctuidae) por óleos essenciais de *Achillea millefolium* L. e *Thymus vulgaris* L. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, v.8, n.4, p.27-32, 2006.
- Citarasu, T., 2010. Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. *Aquacult Int* 18, 403–414. <https://doi.org/10.1007/s10499-009-9253-7>
- Maron, D., Smith, T.J., Nachman, K.E., 2013. Restrictions on antimicrobial use in food animal production: an international regulatory and economic survey. *Global Health* 9, 48. <https://doi.org/10.1186/1744-8603-9-48>
- Ostrand, S.L., Glenn, R.A., Gannam, A.L., Hanson, K.C., 2012. Inhibitory Effects of Rosemary Oil on the In Vitro Growth of Six Common Finfish Pathogens. *North American Journal of Aquaculture* 74, 230–234. <https://doi.org/10.1080/15222055.2012.675995>

- Okocha, R.C., Olatoye, I.O., Adedeji, O.B., 2018. Food safety impacts of antimicrobial use and their residues in aquaculture. *Public Health Rev* 39, 21. <https://doi.org/10.1186/s40985-018-0099-2>
- Pruden, A., Larsson, D.G.J., Amézquita, A., Collignon, P., Brandt, K.K., Graham, D.W., Lazorchak, J.M., Suzuki, S., Silley, P., Snape, J.R., Topp, E., Zhang, T., Zhu, Y.-G., 2013. Management Options for Reducing the Release of Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes to the Environment. *Environmental Health Perspectives* 121, 878–885. <https://doi.org/10.1289/ehp.1206446>
- Santurio, J.M., Santurio, D.F., Pozzatti, P., Moraes, C., Franchin, P.R., Alves, S.H., 2007. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. *Cienc. Rural* 37, 803–808. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782007000300031>
- Sayes, C.M., Reed, K.L., Warheit, D.B., 2007. Assessing toxicity of fine and nanoparticles: comparing in vitro measurements to in vivo pulmonary toxicity profiles. *Toxicol. Sci.* 97, 163–180.
- SINDAN. Compêndio de Produtos Veterinários, 2018. . Disponível em: <http://www.cpvvs.com.br/cpvvs/>
- Sobrinho, A. C. N., de Souza, E. B., Rocha, M. F. G., Albuquerque, M. R. J. R., Bandeira, P. N., dos Santos, H. S., dos Santos Fontenelle, R. O. (2016). Chemical composition, antioxidant, antifungal and hemolytic activities of essential oil from *Baccharis trinervis* (Lam.) Pers. (Asteraceae). *Industrial Crops and Products*, 84, 108–115. doi:10.1016/j.indcrop.2016.01.051
- Souza, M. F. C.; Penteado, A.L.; Souza, D.R.N.; Queiroz, S. C. N. "In vitro" antimicrobial activity of essential oils against fish pathogens. *Braz. J. of Develop.*, Curitiba, v. 5, n. 10, p. 17911-17921. (2019).
- Tomazelli Júnior, O., Kuhn, F., Padilha, P.J.M., Vicente, L.R.M., Costa, S.W., Boligon, A.A., Scapinello, J., Nesi, C.N., Dal Magro, J., Castellví, S.L., 2017. Microencapsulation of essential thyme oil by spray drying and its antimicrobial

evaluation against *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Braz. J. Biol.* 78, 311–317. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.08716>

Valladão, G.M.R., Gallani, S.U., Pilarski, F., 2015. Phytotherapy as an alternative for treating fish disease. *J. vet. Pharmacol. Therap.* 38, 417–428. <https://doi.org/10.1111/jvp.12202>

Whitaker, D. M., Reichley, S. R., Griffin, M. J., Prager, K., Richey, C. A., Kenelty, K. V., Soto, E. (2018). Hypermucoviscous *Klebsiella Pneumoniae* Isolates From Stranded and Wild-Caught Marine Mammals Of The Us Pacific Coast: Prevalence, Phenotype, And Genotype. *Journal of Wildlife Diseases*. doi:10.7589/2017-07-178

Yap, P.S.X., Yiap, B.C., Ping, H.C., Lim, S.H.E., 2014. Essential Oils, A New Horizon in Combating Bacterial Antibiotic Resistance. *TOMICROJ* 8, 6–14. <https://doi.org/10.2174/187428580140801000>

APÊNDICES

Tabela 1. Avaliação de óleos essenciais contra *K. pneumoniae* isoladas de rim, baço e fígado de tilapia-do-Nilo e uma cepa padrão de *E. coli* ATCC® 25922TM.

Atividade Antimicrobiana µg.mL ⁻¹										
Cepa	Artemisia		Bergamota		Eucalipto		Gerânio		Melaleuca	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
KP01D	20	20	20	20	20	20	>20	20	10	10
KP02D	20	20	20	20	20	20	>20	20	10	10
KP03D	20	20	20	20	20	20	>20	20	10	10
KP04D	20	20	20	20	20	20	>20	20	10	10
KP05D	20	20	20	20	20	20	>20	20	10	10
KP06D	20	20	20	20	20	20	>20	20	10	10
KP07D	20	20	20	20	20	20	>20	20	10	10
Cepa	Olibano		Tomilho		YlangYlang		FFC		OXI	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
KP01D	>20	20	1,25	1,25	20	>20	>64	-	>64	-
KP02D	>20	20	1,25	1,25	20	>20	>64	-	>64	-
KP03D	>20	20	2,5	2,5	20	>20	>64	-	>64	-
KP04D	>20	20	1,25	1,25	20	>20	>64	-	>64	-
KP05D	>20	20	1,25	1,25	20	>20	>64	-	>64	-
KP06D	>20	20	2,5	2,5	20	>20	>64	-	>64	-
KP07D	>20	20	1,25	1,25	20	>20	>64	-	>64	-
ATCC®	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*CMI – Concentração mínima inibitória; *CMB – Concentração mínima inibitória; *FFC – Florfenicol; *OXI – Oxitetraciclina.

Tabela 2. Valores em porcentagem da taxa de hemólise de células sanguíneas de tilapia causadas pela ação dos óleos essenciais.

Concentração (% v/v) dos OEs e % de hemólise obtidas										
Identificação	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125	0,015625	0,007813
<i>A. vulgaris</i>	0,694111	0,005261	0,001718	0,001718	0,001718	0,001718	0,001718	0,001718	0,001718	0,001718
<i>B. carteri</i>	0,385089	0,381224	0,332914	0,332914	0,026627	0,0131	0,004404	0,004404	0,004404	0,004404
<i>C. odorata</i>	0,119833	0,03131	0,024023	0,017469	0,016009	0,006903	0,006173	0,005084	0,005084	0,005084
<i>C. bergamia</i>	0,4333	0,317954	0,260782	0,24674	0,044132	0,003009	0,002006	0	0	0
<i>E. globulus</i>	0,664463	0,554318	0,466423	0,08431	0,068991	0,055583	0,020523	0,009891	0,001099	0,000733
<i>M. alternifolia</i>	66,69838	33,30161	2,473834	1,427212	0,570884	0,190294	0	0	0	0
<i>P. graveolens</i>	0,631553	0,554082	0,543155	0,531329	0,530723	0,091123	0,052771	0,015079	0,002788	0
<i>T. vulgaris</i>	0,905093	0,312784	0,296755	0,292587	0,26332	0,251472	0,165655	0,069388	0,012158	0

CAPÍTULO 4

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A intensificação da produção aquícola tem aumentado significativamente os surtos de bacterioses em peixes, com destaque para bactérias de interesse em saúde pública, devido seu potencial zoonótico. Esse aumento no número de doenças bacterianas está intimamente ligado às condições inadequadas em que os peixes são produzidos, principalmente a má qualidade da água, que aumenta significativamente a carga bacteriana na água e no pescado e promove riscos à saúde humana, principalmente em pessoas imunocomprometidas.

Na busca pela solução de problemas relacionados a mortalidade de peixes na produção aquícola, provocados por estes patógenos, a utilização de antimicrobianos é realizada de forma indiscriminada, o que tem causado resistência bacteriana, uma vez que, na maioria das vezes este é administrado em doses elevadas sem nem mesmo haver a identificação do agente etiológico. Além disso, devido ao número reduzido de antimicrobianos licenciados, juntamente com a resistência bacteriana às moléculas liberadas para a utilização na aquicultura tem aumentado a utilização de antimicrobianos legalizados para outras espécies animais, comprometendo ainda mais o meio aquático, devido ao acúmulo de resíduos na água.

A realização de um diagnóstico correto e preciso, em laboratório especializado, por intermédio de análises microbiológicas para a identificação correta dos patógenos que provocam mortalidades no campo se faz necessária para evitar a utilização errônea e exacerbada de antimicrobianos. O diagnóstico é necessário porque as bactérias podem responder de forma distinta a ação de cada molécula, e sem o conhecimento do patógeno a utilização da mesma pode ser inútil.

Diante do exposto, este estudo identificou e caracterizou a bactéria *Klebsiella pneumoniae*, como um patógeno zoonótico que acomete severamente a saúde e o bem estar dos peixes e os impactos que a mesma provoca, reafirmando a necessidade de diagnóstico laboratorial em surtos de mortalidade que ocorrem nos organismos aquáticos. Além de alertar sobre os riscos que o patógeno encontrado nos peixes pode causar aos humanos. O estudo *in vitro* demonstrou que a utilização de fitoterápicos como alternativa para o tratamento do patógeno é viável e trata-se de uma das melhores opções para o controle desta bactéria, pois apresentou bons resultados e não há indícios de toxicidade dos óleos testados. Todavia, testes de eficácia *in vivo* devem ser realizados, para uma melhor utilização dos mesmos no controle de bactérias na produção de peixes.

Desta maneira, este estudo pontua a importância de um diagnóstico correto dos patógenos que ocasionam mortalidade na piscicultura e apresenta uma solução alternativa

ao uso de antimicrobianos, através da fitoterapia no controle de doenças de peixes, visando maior sustentabilidade da produção e segurança alimentar na piscicultura.