

**DOENÇAS BACTERIANAS EM BAGRES SUL AMERICANOS:  
ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E PATOGENIA**

**Santiago Benites de Pádua**

Médico Veterinário

**DOENÇAS BACTERIANAS EM BAGRES SUL AMERICANOS:  
ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E PATOGENIA**

**Santiago Benites de Pádua**

**Orientadora: Dra. Fabiana Pilarski**

**Co-orientadora: Dra. Márcia Mayumi Ishikawa**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Aquicultura, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aquicultura.

P125d Pádua, Santiago Benites de  
Doenças bacterianas em bagres sul americanos: isolamento,  
caracterização e patogenia/ Santiago Benites de Pádua. --  
Jaboticabal, 2013  
x, 65 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro  
de Aquicultura, 2013  
Orientadora: Fabiana Pilarski  
Co-orientadora: Márcia Mayumi Ishikawa  
Banca examinadora: Ricardo Massato Takemoto, Luiz Augusto do  
Amaral, Fabiana Pilarski  
Bibliografia

1. Gastrenterite bacteriana. 2. Meningoencefalite infecciosa. 3.  
Multiresistência a antimicrobianos I. Título. II. Jaboticabal-Centro de  
Aquicultura da Unesp.

CDU 639.3.09

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

*“Há momentos na vida em que é necessário sair de cena, não por covardia, mas pela virtude de aguardar até que o fruto alcance o ponto mais doce de seu amadurecimento”.*

***Santiago Benites de Pádua***

## **AGRADECIMENTOS**

*Agradeço a Deus, por essa nova benção concedida, pelas vitórias de cada dia, pelo aprendizado com os tropeços e, principalmente, pelo crescimento humano.*

*Agradeço também...*

*À minha orientadora, Dr.<sup>a</sup> Fabiana Pilarski, por me receber em Jaboticabal com toda sua equipe de braços abertos, pelos ensinamentos, apoio e amizade.*

*À minha co-orientadora, Dr.<sup>a</sup> Márcia Mayumi Ishikawa, por abrir as portas da Ciência para mim, por ser meu baluarte, pela confiança depositada ao longo desses sete anos de trabalho em conjunto, e por nunca me desamparar frente às adversidades.*

*Sou grato à toda equipe do Laboratório de Piscicultura da Embrapa Agropecuária Oeste que fizeram parte de minha formação e ajudaram direta ou indiretamente na execução deste trabalho. Um agradecimento especial à Débora Marques pela enorme ajuda com o isolamento e purificação bacteriana, à Aline Lopes e Juliana Simeão dos Santos pelo auxílio com as provas bioquímicas de triagem, e não posso me esquecer de Bianca Rafaela Fiori Tamporoski que sempre ajudou a manter tudo em ordem e sempre nos auxiliou com as técnicas laboratoriais.*

*Sou grato a toda equipe do Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos (LAPOA) do Centro de Aquicultura da Unesp (CAUNESP) que fizeram parte de minha formação e ajudaram direta ou indiretamente na execução deste trabalho. Um agradecimento especial à M.Sc. Fernanda Alexandre Sebastião pelos ensinamentos em Microbiologia Clínica, pelas dicas ao preparar os meios de cultura, pela paciência ao ensinar o manuseio com as bactérias, rotina laboratorial e pelas análises moleculares.*

*Agradeço à equipe do Laboratório de Enfermidade de Animais Aquáticos da APTA de Votuporanga (LENAQ), pela grande ajuda na execução das análises bioquímicas de identificação bacteriana. Um agradecimento especial à Daiane Mompean Romera e Katia Suemi Gozi pela paciência ao ensinar o manuseio com os kits e à Dr.<sup>a</sup> Fabiana Garcia Scaloppi por abrir as portas de seu laboratório para nos auxiliar.*

*Sou grato à Dr.<sup>a</sup> Juliana Rosa Carrijo-Mauad da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), por todo apoio durante a execução deste trabalho, pela inspiração e empolgação que fazem de todo trabalho novo uma dádiva.*

*Sou grato à Dr.<sup>a</sup> Simone Simionatto da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), pela paciência e grandes ensinamentos com as técnicas de PCR e de filogenia molecular bacteriana.*

*Agradeço à M.Sc. Gabriela Tomas Jerônimo pelo apoio durante a execução deste trabalho, por sempre ter um tempo para ouvir murmurações e me fazer rir nos momentos tensos da vida.*

*Agradeço ao Roney Nogueira de Menezes Filho que em pouco tempo de amizade proporcionou muitos aprendizados e lições que levarei por toda a vida. Valeu Guru!*

*Agradeço ao Dr. Maurício Laterça Martins por abrir novas perspectivas de pesquisas paralelas aos experimentos de minha dissertação. Pesquisas essas que resultaram em dezenas de artigos científicos publicados em conjunto durante o período de mestrado.*

*Sou muito grato a todas as pisciculturas que abriram as portas e forneceram peixes para execução deste estudo. Em especial, agradeço à Pirai Piscicultura, Terenos, Mato Grosso do Sul e à Douradense Piscicultura, Dourados, Mato Grosso do Sul. Este trabalho tem como objetivo fornecer o amparo diagnóstico que há muito tempo carece no campo.*

*Não poderia de deixar de agradecer à minha família, mãe Felicit Venialgo Benites Pádua e pai Luiz Antonio Faustino de Pádua, além de minhas irmãs Ariana Benites Pádua & Juliana Benites Pádua e irmãos agregados Luiz Alberto Camposano Morel & Pedro Daniel Camposano Morel. Muito obrigado pelo apoio incondicional e por sempre acreditarem em mim!*

*Agradeço à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela bolsa de mestrado concedida (Processo: 10/14490-1), ao projeto Aquabrazil-Embrapa e CNPq (Processo: 48418620116) pelo apoio financeiro.*

*A todos aqueles que contribuíram para a minha formação...*

*Um cordial abraço e o meu Muito Obrigado!*

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	12
<b>ABSTRACT</b> .....	12
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	16
2.1. Doenças bacterianas na aquicultura mundial.....	16
2.2. Doenças bacterianas em peixes criados no Brasil.....	18
2.3. Métodos diagnósticos e identificação bacteriana.....	19
2.4. Métodos de controle e profilaxia .....	21
3. REFERÊNCIAS .....	22
CAPÍTULO I.....	32
Infecção por <i>Citrobacter freundii</i> em cachara, <i>Pseudoplatystoma reticulatum</i> : isolamento, caracterização e patologia .....	32
RESUMO .....	32
1. INTRODUÇÃO.....	33
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
2.1. Fonte dos peixes.....	34
2.2. Mortalidade e detecção do agente causador .....	34
2.3. Identificação bacteriana .....	35
2.4. Susceptibilidade aos antimicrobianos .....	35
2.5. Infecção experimental.....	36
3. RESULTADOS .....	37
3.1. Detecção do agente causador .....	37
3.2. Susceptibilidade aos antimicrobianos .....	37

3.3. Infecção experimental.....	39
4. DISCUSSÃO.....	43
5. CONCLUSÃO.....	45
6. REFERÊNCIAS.....	46
CAPÍTULO II.....	50
Infecção por <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> e <i>Enterococcus faecalis</i> em bagres Sul Americanos: isolamento, caracterização bioquímica e antibiograma .....	50
RESUMO .....	50
1. INTRODUÇÃO.....	51
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	52
2.1. Área de estudo e fonte de peixes .....	52
2.2. Detecção do agente causador .....	52
2.3. Identificação bacteriana .....	53
2.4. Susceptibilidade aos antimicrobianos .....	53
3. RESULTADOS .....	53
3.1. Detecção do agente causador .....	53
3.2. Susceptibilidade aos antimicrobianos .....	54
4. DISCUSSÃO.....	56
5. CONCLUSÃO.....	58
6. REFERÊNCIAS.....	58

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Características bioquímicas de <i>Citrobacter freundii</i> isolado de cachara, <i>Pseudoplatystoma reticulatum</i> . .....	38
Tabela 2. Análise de susceptibilidade antimicrobiana de isolados de <i>Citrobacter freundii</i> de cachara, <i>Pseudoplatystoma reticulatum</i> . R: resistente; S: sensível; I: intermediário. ....	39
Tabela 3. Características bioquímicas de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> e <i>Enterococcus faecalis</i> isolados de bagres carnívoros. ....	55
Tabela 4. Análise de susceptibilidade antimicrobiana de isolados de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> e <i>Enterococcus faecalis</i> isolados de bagres carnívoros. R: resistente; S: sensível; I: intermediário. ....	56

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Alterações patológicas em cachara infectada experimentalmente com *Citrobacter freundii* após 96h da infecção. Hemorragia petequial no abdômen (a) e nadadeira caudal (b), discreta corrosão de nadadeira (b), peritonite com pontos hemorrágicos multifocais a coalescentes sobre o mesentério e peritônio (c), hemorragia difusa no encéfalo (d), hemopericárdio (e), hemorragia do tipo petequial sobre as brânquias (f), intestino edemaciado e hemorrágico (g) com conteúdo exibindo aspecto sanguinolento (h). .....40
- Figura 2. Secções histológicas do rim de cachara infectada experimentalmente com *Citrobacter freundii* após 96h da infecção. Degeneração, necrose coagulativa e hemorragia intersticial disseminada (a), com aumento do espaço de Bowman (a – seta no detalhe superior). Degeneração, necrose coagulativa e hemorragia (b), com detalhe dessas alterações no túbulo renal em corte transversal (c), exibindo ainda presença de substância acidófila no lúmen tubular em corte transversal (d). Coloração HE. ....42
- Figura 3. Secções histológicas do fígado, átrio e brânquias de cachara infectada experimentalmente com *Citrobacter freundii* após 96h da infecção. Fígado exibindo necrose centro-lobular (a). Átrio exibindo focos de inflamação mononuclear (b – asteriscos) e hemorragia (b – seta). Brânquia exibindo marcada presença de hemorragia intersticial, com telangiectasia (c - cabeça das setas),

edema intersticial (c - asteriscos), degeneração (d – asterisco) e  
necrose coagulativa. Coloração HE.....43

## RESUMO

Neste trabalho foi registrada a primeira ocorrência de infecção por *Citrobacter freundii*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Enterococcus faecalis* associadas a surtos de doenças em bagres Sul Americanos. Além do isolamento das bactérias, também foi realizada a caracterização bioquímica e o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos dos isolados. Para o isolamento, foram utilizados bagres provenientes de surtos em diferentes fazendas-berçário no Estado do Mato Grosso do Sul e também de criações em laboratório. Os peixes com sinais clínicos de bacteriose foram submetidos à necropsia e biópsia de rim e encéfalo para isolamento bacteriano em meios de cultura apropriados. Os isolados obtidos foram submetidos à coloração de Gram, teste da oxidase, catalase, produção de hemólise e identificação presuntiva através de kits comerciais API 20E ou API 20 Strep. A análise de susceptibilidade a 15 antimicrobianos foi realizada pelo método da difusão em disco com o Agar Muller Hinton. Foram obtidos dois isolados de *C. freundii* proveniente de cachara, que apresentaram multiresistência a 66,7 % dos antimicrobianos testados. Nos ensaios de infecção experimental, a doença foi reproduzida com sucesso, caracterizada como septicemia hemorrágica, com enterite acentuada e com reisolamento de *C. freundii* dos tecidos acometidos. Outros 57 isolados obtidos do rim e do encéfalo da cachara foram caracterizadas como cocos gram positivos associadas a meningoencefalite, identificadas como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Enterococcus faecalis*. Todos os isolados apresentaram multiresistência aos antimicrobianos testados. A bactéria *L. lactis* subsp. *lactis* foi sensível somente a ampicilina e penicilina. Todos nossos isolados de *E. faecalis* foram sensíveis a sulfazotrim e a amoxicilina e ao ácido clavulânico.

**Palavras-chave:** Gastreenterite bacteriana, meningoencefalite infecciosa, multi resistência a antimicrobianos, *Pseudoplatystoma* spp.

## ABSTRACT

The first occurrence of infection by *Citrobacter freundii*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Enterococcus faecalis* associated with outbreaks of diseases in South American catfish was recorded in this study. The isolates were biochemically characterized and the profile antimicrobial susceptibility performed. For isolation, fingerlings of catfish from sequential outbreaks at different farms nursery in the state of Mato Grosso do Sul and also creations in the laboratory were used. Fingerlings with clinical signs of bacterial infection were necropsied and biopsy of the kidney and brain obtained for bacterial isolation in appropriate culture media. The isolates were subjected to Gram staining, oxidase and catalase test, hemolysis production and presumptive identification using commercial kits API 20E and API 20 Strep. The analysis of susceptibility to 15 antimicrobials was performed by the disc diffusion method with the Muller Hinton Agar. Were obtained two isolates of *C. freundii* from cachara, which showed multiresistance to 66.7% of the antimicrobials tested. In experimental challenge, the disease was successfully reproduced, characterized as hemorrhagic septicemia, with severe enteritis, and reisolation of *C. freundii* from infected tissue was obtained. Another 57 isolates obtained from kidney and brain of catfish were characterized as gram-positive cocci associated with meningoencephalitis, identified as *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Enterococcus faecalis*. All isolates showed multidrug resistance to antimicrobials. The bacteria *L. lactis* subsp. *lactis* was only sensitive to ampicillin and penicillin. All our isolates of *E. faecalis* were sensitive to sulfazotrim and amoxilin and to clavulanic acid.

**Key words:** Bacterial gastroenteritis, infectious meningoencephalitis, multiresistance to antimicrobials, *Pseudoplatystoma* spp.

## 1. INTRODUÇÃO

A produção de bagres nativos é uma atividade em expansão no Brasil, cuja produção concentra-se na região Centro-Oeste, sendo explorados inúmeros cruzamentos entre diferentes espécies provenientes de duas principais bacias hidrográficas, a bacia do Prata que inclui a região do Pantanal e a bacia Amazônica. Entre os peixes utilizados nestes cruzamentos artificiais encontram-se, principalmente, peixes carnívoros pertencentes ao gênero *Pseudoplatystoma*, que reúne espécies de grande importância econômica como *P. corruscans*, *P. tigrinum* (*sensu lato*) e *P. fasciatum* (*sensu lato*) (Carvalho-Costa et al., 2011).

O Estado do Mato Grosso do Sul se destaca na produção do surubim híbrido (*P. corruscans* ♂ x *P. reticulatum* ♀), enquanto que os Estados do Mato Grosso e Goiás do híbrido pintado da Amazônia (*Leiarius marmoratus* ♂ x *Pseudoplatystoma* spp. ♀). No entanto, a produção de peixes híbridos com habilidade reprodutiva, como o surubim híbrido, pode causar impactos irreparáveis aos estoques naturais quando estes escapam das fazendas de criação e ganham o ambiente natural, como demonstrado recentemente (Prado et al., 2012).

Uma alternativa para minimizar este problema e assegurar a conservação das espécies puras, é a adequação de sua criação aliadas a fatores que tornem sua produção competitiva à criação de híbridos. O cachara pantaneiro (*Pseudoplatystoma reticulatum* Eigenmann & Eigenmann 1889) possui grande similaridade genética com o cachara amazônico (*P. fasciatum* Linnaeus 1766), o que torna a validade da espécie duvidosa (Carvalho-Costa et al., 2011), mas até o momento é considerada uma espécie válida conforme o FishBase (<http://www.fishbase.org/summary/Pseudoplatystoma-reticulatum.html>). Este bagre carnívoro sul americano possui grande potencial para a exploração em escala industrial, na qual sua reprodução está consolidada (Leonardo et

al., 2004; Batlouni et al., 2006) e estão disponíveis estratégias para o treinamento alimentar nas fases iniciais (Inoue et al., 2009).

Embora os bagres nativos estejam entre os principais peixes produzidos no Centro Oeste do Brasil (Brasil, 2012), pouco se conhece sobre os aspectos sanitários desses animais. Vários parasitos têm sido descritos nesses peixes provenientes de ambiente natural (Machado et al., 1995; Campos et al. 2008; 2009; Naldoni et al., 2011; Adriano et al., 2012). Em condições de criação, estes estudos são mais recentes e apontam a problemática da infestação parasitária do hospedeiro com comprometimento de seu rendimento produtivo (Pinto, 2008; Naldoni et al., 2009; Pinto et al., 2009; Pádua et al., 2012; 2013). No entanto, as infecções bacterianas estão entre as principais causas de mortalidade, com perdas de até 80% em fazendas produtoras de surubim (Campos, 2004). Entre as bactérias envolvidas nos surtos de doenças com mortalidade em surubins, foram descritas a *Plesiomonas shigelloides* e *Staphylococcus* sp. (Costa, 2003), *Pseudomonas* sp. (Tavares-Dias et al., 2009), *Lactococcus garvieae* e *Streptococcus* sp. (Evans et al., 2009), *Anaplasmataceae*-like (Ishikawa et al., 2011) e *Aeromonas hydrophila* (Silva et al., 2012). No entanto, pouco se conhece sobre os aspectos patológicos envolvidos na infecção ocasionada por esses agentes e seu real impacto na produção.

A consolidação da produção industrial de bagres carnívoros no Brasil depende, entre outros fatores, da produção constante de alevinos saudáveis para suprir a demanda de animais para engorda. Para isso, é fundamental o conhecimento das enfermidades que acometem estes peixes em criação e estabelecer medidas profiláticas direcionadas para estas doenças.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Doenças bacterianas na aquicultura mundial

Inúmeros agentes bacterianos são responsáveis por doenças hiperagudas, agudas ou crônicas, sistêmicas ou localizadas, em crustáceos, peixes, anfíbios e répteis em criação por todo o mundo. A infecção bacteriana provoca perdas na produção com a ocorrência de mortalidade dos peixes ou devido ao aspecto repugnante que causa aos animais acometidos, comprometendo sua comercialização. Ainda, várias bactérias patogênicas aos animais aquáticos criados em água doce ou salgada podem atuar como agentes zoonóticos (Miller e Neely, 2005; Wang et al., 2009; Ishikawa et al., 2011; Kim et al., 2012), com impacto na saúde pública. Dessa forma, torna-se essencial o conhecimento dos agentes bacterianos que acometem os organismos aquáticos, bem como sua relação com os hospedeiros e ambiente para que sejam elaboradas estratégias eficazes na contenção de sua dispersão e circulação.

Atualmente, várias espécies bactérias são consideradas patógenos emergentes na aquicultura mundial. Cocos gram positivos, como o *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Lactococcus garvieae* estão entre as principais bactérias causadoras de meningoencefalite bacteriana em várias espécies de peixes na aquicultura continental e na maricultura (Abdelsalam et al., 2010; Bowater et al., 2012; Figueiredo et al., 2012a; Geng et al., 2012; Ricci et al., 2012), sendo reconhecidos como patógenos de inúmeros animais há décadas. No entanto, recentemente foram inclusos na lista de patógenos de peixes outros cocos gram positivos, como o *Streptococcus ictaluri* (Shewmaker et al., 2007), *Weissella* sp. (Figueiredo et al., 2012b), *Aerococcus viridans* (Ke et al., 2012) e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Chen et al., 2012).

Entre as bactérias gram negativas, o grupo das *Aeromonas* móveis, *Edwardsiella tarda*, *Vibrio* spp. e *Pseudomonas* spp. são os principais agentes causadores das doenças ulcerativas hemorrágicas e gastroenterite hemorrágica bacteriana (Burr et al., 2012; Yang et al., 2012; López et al., 2012; Sankar et al., 2012); enquanto *Flavobacterium columnare*, *Flavobacterium psychrophilum*, *Flavobacterium johnsoniae*, *Flavobacterium branchiophilum* e *Flavobacterium aquatile* causam a doença ulcerativo-necrotizante não hemorrágica sobre o corpo e brânquias dos peixes em todo o mundo (Elkamel e Mohamed, 2012).

Algumas espécies de bactérias causam doenças sistêmicas granulomatosas crônicas em peixes, acometendo, principalmente, peixes adultos em fase final de engorda ou reprodutores. Entre elas, encontram-se os bacilos álcool-ácido resistentes tais como o *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium gordonae* e *Mycobacterium fortuitum* (Novotny et al., 2010), além de *Nocardia seriolae*, *Nocardia asteroides*, *Nocardia salmonicida* e *Nocardia crassostreae* (Labrie et al., 2008), que são amplamente reconhecidos como patógenos de peixes, sendo as micobactérias patógenos de alto potencial zoonótico. A nocardiose em peixes, atualmente, é considerada uma doença emergente em países asiáticos, sendo *N. seriolae* a espécie com maior incidência (Labrie et al., 2008). A partir de pesquisas recentes sobre a resposta vacinal cruzada foi descoberto que a vacina viva atenuada contra *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette e Guérin (BCG), amplamente utilizada em mamíferos, proporciona proteção efetiva contra *N. seriolae* em linguado japonês *Paralichthys olivaceus* (Kato, et al., 2012), o que facilita o processo de imunoprofilaxia contra este patógeno.

Por outro lado, bactérias coco-bacilares gram negativas pertencentes ao gênero *Francisella* também são conhecidas por causar doença granulomatosa crônica em peixes de água doce e salgada (Birkbeck et al., 2011). Uma única espécie tem sido reconhecida

como patógeno de peixes, sendo dividida em duas subespécies: *Francisella noatunensis* subsp. *noatunensis* e *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* (Ottem et al., 2009). O potencial zoonótico das espécies que acometem peixes não tem sido descrito na literatura, o que leva a acreditar que, dificilmente, esses patógenos possuem a habilidade de serem transmitidos aos humanos e atuar como zoonoses com impacto na saúde pública (Colquhoun e Duodu, 2011).

## **2.2. Doenças bacterianas em peixes criados no Brasil**

As infecções bacterianas que acometem os peixes no Brasil têm sido pouco estudadas, especialmente pelo fato da piscicultura ser uma atividade recente, e sua intensificação ter ocorrido a partir dos anos 90. Os primeiros surtos de bacterioses no Brasil, com a identificação do agente envolvido, foram realizados por Shama et al. (2000) em jundiá *Rhamdia quelen* criados no estado do Rio Grande do Sul. Desde então, os estudos sobre as bactérias que acometem a piscicultura foram intensificados. Apesar do maior número de estudos sobre diagnósticos de agentes causadores das bacterioses, ainda poucas alternativas estão disponíveis para o manejo controle de infecções bacterianas em peixes no Brasil.

Entre os agentes com maior impacto na tilapicultura brasileira, estão os cocos gram positivos causadores de meningoencefalite. As espécies *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae* e *S. iniae* foram identificados em diferentes regiões (Figueiredo et al., 2006; 2012a; Netto et al., 2011). *Lactococcus garvieae* também foi registrado em surtos acometendo tilápia (Evans et al., 2009). Essas bacterioses, usualmente, causam septicemia e meningoencefalite, com a ocorrência de panoftalmite, exoftalmia, efusão celomática, hepato e esplenomegalia, com variadas alterações histopatológicas (Salvador et al., 2005; Inocente-Filho et al., 2009; Pretto-Giordano et al., 2010).

A ocorrência de cocos gram positivos em peixes nativos criados no Brasil foi notificada somente em surubim *Pseudoplatystoma corruscans* (Evans et al., 2009), não sendo registrada em outras espécies. Recentemente, foi registrada a ocorrência de *Weissella* sp., que também pertence ao grupos dos cocos gram positivos, causando surtos em truticulturas brasileiras (Figueiredo et al., 2012b).

Entre as bactérias gram negativas causadoras de surtos no Brasil, encontra-se a *Edwardsiella tarda* como agente da septicemia hemorrágica em tilápias (Muratori et al., 2001), com ocorrência de ulceração hemorrágica sobre a cabeça dos animais (Albinati et al., 2006). No entanto, *Aeromonas hydrophila* também tem sido descrita em infecções sistêmicas em tilápia e pacu (Belém-Costa e Cyrino, 2006) e surubim híbrido (Silva et al., 2012), sendo neste ultimo ainda descrita a infecção por *Plesiomonas shigelloides* (Costa, 2003) e *Pseudomonas* sp. (Tavares-Dias et al., 2009), que apresentam manifestações clínicas similares à edwardsielose. A necrose ulcerativa de pele e brânquia causada pela *Flavobacterium columnare* tem sido registrada em peixes exóticos (Figueiredo et al., 2005) e nativos (Pilarski et al., 2008; Sebastião et al., 2010) criados em diferentes regiões no Brasil, que por sua vez impacta, principalmente, larvas e alevinos (Pilarski et al., 2011).

### **2.3. Métodos de diagnósticos e identificação bacteriana**

Para diagnóstico das doenças bacterianas em peixes devem ser observadas as alterações comportamentais dos animais acometidos, sinais clínicos, taxa de mortalidade e associar ao isolamento bacteriano pelos métodos microbiológicos tradicionais, levando em consideração as peculiaridades de cada agente etiológico e características da doença. No entanto, algumas bactérias que infectam peixes são fastidiosas, o que dificulta os processos de isolamento e cultivo laboratorial (Pilarski et

al., 2008) e outras não são passíveis de isolamento e cultivo pelos métodos usuais (Ishikawa et al., 2011; Toenshoff et al., 2012).

Para a identificação genérica e específica das bacterioses de importância clínica, são utilizadas as características morfológicas, cinética de multiplicação em meio de cultura associadas às provas bioquímicas baseadas na metabolização de substratos. No entanto, estes critérios são ineficientes para designação segura da grande maioria dos microrganismos de interesse clínico (Sebastião, F.A., comunicação pessoal). Dessa forma, os métodos mais acurados para identificação específica de bactérias são baseados em análises de sequenciamento da subunidade ribossomal 16S RNAr (Janda e Abbott, 2007). Este fragmento codificante-estrutural do DNA genômico possui tamanho médio de 1500 pb, sendo conservado entre as bactérias, o que permite avaliações evolucionárias acuradas entre os microorganismos a partir do sequenciamento de segmentos internos hipervariáveis (Clarridge, 2004).

Outra ferramenta complementar no diagnóstico das bacterioses em peixes são as análises histopatológicas. Por meio desta técnica, a etiologia pode ser estabelecida a partir de reconhecimento das alterações teciduais encontradas, associadas a técnicas de imuno-histoquímica que permitem a marcação de bactérias (Romano et al., 2012). Em contrapartida, bactérias não cultiváveis como a *Anaplasmataceae*-like são diagnosticadas presuntivamente a partir de extensões sanguíneas (Ishikawa et al., 2011), enquanto bactérias como *Chlamydia*-like causadoras da epitelociste em peixes são diagnosticadas somente por meio de análises histopatológicas (Nowak e LaPatra, 2006) ou ainda associadas com hibridização *in situ* (Toenshoff et al., 2012).

## 2.4. Métodos de controle e profilaxia

Atualmente os principais métodos de controle das doenças bacterianas em peixes no Brasil são baseados no uso de antimicrobianos ou imunoprofilaxia por meio da vacinação. Em busca realizada no Compêndio de Produtos Veterinários – SINDAN – pode-se verificar o registro de três moléculas de antimicrobianos com uso autorizado no Brasil, sendo elas: duas moléculas de florfenicol, oxitetraciclina e neomicina; embora este último seja destinado ao tratamento de doenças bacterianas em peixes ornamentais. O uso de vacinas na piscicultura brasileira é uma prática recente, havendo apenas um único produto comercial destinado para prevenção da estreptococose causada por *S. agalactiae* em tilápias (Aquavac<sup>®</sup> Strep, MSD).

Em países economicamente forte, com atividade aquícola tradicional, o uso de antimicrobianos é alvo de controle rigoroso e restritivo. Nestas ocasiões, a prevenção das infecções bacterianas ocorre principalmente pelo uso de vacinas polivalentes e da adoção de boas práticas de manejo associadas às medidas de biossegurança (Somerset et al., 2005; Burridge et al., 2010). No entanto, especialmente em países emergentes, como o Brasil, ocorre o uso indiscriminado e sem critérios de grandes quantidades de antibióticos (Cabello, 2006), que pode resultar na seleção de bactérias resistentes no ambiente próximo às criações (Chelossi et al., 2003) e nos peixes da piscicultura (Akinbowale et al., 2006), que por sua vez representa riscos à saúde pública com a circulação de plasmídeos que carregam genes de resistência entre diferentes bactérias (Cabello, 2006).

Dessa forma, a melhor opção frente ao uso indiscriminado de antimicrobianos é a implementação de programas de vacinação, a exemplo da indústria do salmão chileno (Bravo e Midtlyng, 2007). Com isso, pode-se obter uma produção estável e segura, sem causar potenciais riscos ao meio ambiente e à saúde pública.

### 3. REFERÊNCIAS

- Abdelsalam, M., Chen, S.-C., Yoshida, T. 2010. Phenotypic and genetic characterizations of *Streptococcus dysgalactiae* strains isolated from fish collected in Japan and other Asian countries. *FEMS Microbiology Letters* 302, 32-38.
- Adriano, E.A., Carriero, M.M., Maia, A.A.M., Silva, M.R.M., Naldoni, J., Ceccarelli, P.S., Arana, S., 2012. Phylogenetic and host–parasite relationship analysis of *Heneguya multiplasmodialis* n. sp. infecting *Pseudoplatystoma* spp. in Brazilian Pantanal wetland. *Veterinary Parasitology* 185, 110-120.
- Akinbowale, O.L., Peng, H., Barton, M.D. 2006. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. *Journal of Applied Microbiology* 100, 1103-1113.
- Albinati, A.C.L., Albinati, R.C.B., Oliveira, E.D.D., Laborda, S.S., Vidal, L.V.O. 2006. Edwardsiellase em Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal* 7, 164-168.
- Batlouni, S.R., Romagosa, E., Borella, M.I., 2006. The reproductive cycle of male catfish *Pseudoplatystoma fasciatum* (Teleostei, Pimelodidae) revealed by changes of the germinal epithelium an approach addressed to aquaculture. *Animal Reproduction Science* 96, 116-132.
- Belem-Costa, A., Cyrino, J.E.P. 2006. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) and *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). *Scientia Agricola* 63, 281-284.
- Birkbeck, T.H., Feist, S.W., Verner–Jeffreys, D.W. 2011. *Francisella* infections in fish and shellfish. *Journal of Fish Diseases*, 34: 173–187.
- Bowater, R.O., Forbes-Faulkner, J., Anderson, I.G., Condon, K., Robinson, B., Kong, F., Gilbert, G.L., Reynolds, A., Hyland, S., McPherson, G., Brien, J.O., Blyde, D.

2012. Natural outbreak of *Streptococcus agalactiae* (GBS) infection in wild giant Queensland grouper, *Epinephelus lanceolatus* (Bloch), and other wild fish in northern Queensland, Australia. *Journal of Fish Diseases* 35, 173-186.
- Brasil. Ministério da Pesca e Aquicultura. 2012. Boletim estatístico da pesca e aquicultura: Brasil 2010. Brasília, DF, 2012. 129 p. in: [http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes\\_e\\_Estatisticas/Boletim%20Estat%20C3%ADstico%20MPA%202010.pdf](http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20Estat%20C3%ADstico%20MPA%202010.pdf). Accessed January 30<sup>th</sup> 2013.
- Bravo, S., Midtlyng, P.J. 2007. The use of fish vaccines in the Chilean salmon industry 1999-2003. *Aquaculture* 270, 36-42.
- Burr, S.E., Goldschmidt-Clermont, E., Kuhnert, P., Frey, J. 2012. Heterogeneity of *Aeromonas* populations in wild and farmed perch, *Perca fluviatilis* L. *Journal of Fish Diseases* 35, 607-613.
- 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, 7-23.
- Cabello, F.C. 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology* 8, 1137-1144.
- Campos, C.M., Fonseca, V.E., Takemoto, R.M., Moraes, F.R. 2008. Fauna parasitária de cachara *Pseudoplatystoma fasciatum* (Siluriforme: Pimelodidae) do rio Aquidauana, Pantanal Sul Mato-grossense, Brasil. *Acta Scientiarum Biological Science* 30, 91-96.
- Campos, C.M., Fonseca, V.E., Takemoto, R.M., Moraes, F.R. 2009. Ecology of the parasitic endohelminth community of *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus,

- 1776) (Siluriformes: Pimelodidae) from the Aquidauana River, Pantanal, State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 69, 93-99.
- Campos, J.L. 2004. Pintado culture in Brazil. *Global Aquaculture Advocate* 42, 42-43.
- Carvalho-Costa, L.F., Piorski, N.M., Willis, S.C., Galetti, P.M., Orti, G., 2011. Molecular systematics of the neotropical shovelnose catfish genus *Pseudoplatystoma* Bleeker 1862 based on nuclear and mtDNA markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 59, 177-194.
- Chelossi, E., Vezzulli, L., Milano, A., Branzoni, M., Fabiano, M., Riccardi, G., Banat, I. M. 2003. Antibiotic resistance of benthic bacteria in fish-farm and control sediments of the Western Mediterranean. *Aquaculture* 219, 83-97.
- Chen, M. H., Hung, S. W., Shyu, C. L., Lin, C. C., Liu, P. C., Chang, C. H., Wang, W. S. 2012. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* infection in Bester sturgeon, a cultured hybrid of *Huso huso* × *Acipenser ruthenus*, in Taiwan. *Research in Veterinary Science* 93, 581-588.
- Clarridge, J. E. 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical Microbiology reviews*, 17, 840-862.
- Colquhoun, D. J., Duodu, S. 2011. *Francisella* infections in farmed and wild aquatic organisms. *Veterinary Research*, 42, 1-15.
- Costa, A.B. 2003. Caracterização de bactérias do complexo *Aeromonas* isoladas de peixes de água doce e sua atividade patogênica. Piracicaba, 2003. 68 p. Tese de Doutorado em Agronomia, Universidade de São Paulo.
- Elkamel, A.A., Mohamed, A.M. 2012. Differential identification of *Flavobacterium* species by sequence analysis of genus-specific hypervariable 16S-23S rDNA intergenic spacer target. *World Journal of Fish and Marine Sciences* 4, 597-603.

- Evans, J.J., Klesius, P.H., Shoemaker, C.A. 2009. First isolation and characterization of *Lactococcus garvieae* from Brazilian Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), and pintado, *Pseudoplathystoma corruscans* (Spix & Agassiz). *Journal of Fish Diseases* 32, 943-951.
- Figueiredo, H.C.P., Carneiro, D.O.; Faria, F.C., Costa, G.M. 2006. *Streptococcus agalactiae* associado à meningoencefalite e infecção sistêmica em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 58, 678-680.
- Figueiredo, H.C.P., Klesius, P., Arias, C., Evans, J., Shoemaker, C., Pereira-Júnior, D.J., Peixoto, M.T.D. 2005. Isolation and characterization of strains of *Flavobacterium columnare* from Brazil. *Journal of Fish Diseases* 28, 199-204.
- Figueiredo, H.C.P., Nobrega-Netto, L., Leal, C.A.G., Pereira, U.P., Mian, G.F. 2012a. *Streptococcus iniae* outbreaks in Brazilian Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) farms. *Brazilian Journal of Microbiology* 43, 576-580.
- Figueiredo, H.C.P., Costa, F.A.A., Leal, C.A.G., Carvalho-Castro, G.A., Leite, R.C. 2012b. *Weissella* sp. outbreaks in commercial rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Brazil. *Veterinary Microbiology* 156, 359-366.
- Geng, Y., Wang, K.Y., Huang, X.L., Chen, D.F., Li, C.W., Ren, S.Y., Liao, Y.T., Zhou, Z.Y., Liu, Q.F., Du, Z.J., Lai, W.M. 2012. *Streptococcus agalactiae*, an emerging pathogen for cultured ya-fish, *Schizothorax prenanti*, in China. *Transboundary and Emerging Diseases*, 59: 369–375.
- Inocente-Filho, C., Müller, E.E., Pretto-Giordano, L.G., Bracarense, A.P.F.R.L. 2009. Histological findings of experimental *Streptococcus agalactiae* infection in Nile Tilapias (*Oreochromis niloticus*). *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, 2, 12-15.

- Inoue, L.A.K.A., Hisano, H., Ishikawa, M.M., Rotta, M.A., Senhorini, J.A., 2009. Princípios básicos para produção de alevinos de surubins (pintado e cachara). Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental; Corumbá: Embrapa Pantanal. 26 p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Documentos, 99; Embrapa Amazônia Ocidental. Documentos, 68; Embrapa Pantanal. Documentos, 100).
- Ishikawa, M.M., Pádua, S.B., Satake, F., Martins, M.L., Tavares-Dias, M. 2011. Identificação morfológica de organismos semelhantes à Anaplasmataceae em monócitos de surubim híbrido (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *P. corruscans*). *Revista Brasileira de Medicina Veterinária* 33, 225-228.
- Janda, J.M., Abbott, S.L. 2007. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology* 45, 2761–2764.
- Kato, G., Kondo, H., Aoki, T., Hirono, I. 2012. *Mycobacterium bovis* BCG vaccine induces non-specific immune responses in Japanese flounder against *Nocardia seriolae*. *Fish & Shellfish Immunology* 33, 243–250.
- Ke, X., Lu, M., Ye, X., Gao, F., Zhu, H., Huang, Z. 2012. Recovery and pathogenicity analysis of *Aerococcus viridans* isolated from tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in Southwest of China. *Aquaculture* 342–343, 18-23.
- Kim, J.H., Go, J., Cho, C.R., Kim, J.I., Lee, M.S., Park, S.C. 2012. First Report of human acute acalculous cholecystitis caused by fish pathogen, *Lactococcus garvieae*. *Journal of Clinical Microbiology*, doi:10.1128/JCM.02369-12.
- Labrie, L., Ng, J., Tan, Z., Komar, C., Ho, E., Grisez, L. 2008. Nocardial infections in fish: an emerging problem in both freshwater and marine aquaculture systems in Asia, pp. 297-312. In Bondad-Reantaso, M.G., Mohan, C.V., Crumlish, M. and

- Subasinghe, R.P. (eds.). Diseases in Asian Aquaculture VI. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines. 505 pp.
- Leonardo, A.F.G., Romagosa, E., Borella, M.I., Batlouni, S.R., 2004. Induced spawning of hatchery-raised Brazilian catfish, cachara *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766). *Aquaculture* 240, 451-461.
- López, J.R., Diéguez, A.L., Doce, A., De la Roca, E., De la Herran, R., Navas, J.I., Toranzo, A.E., Romalde, J.L. 2012. *Pseudomonas baetica* sp. nov., a fish pathogen isolated from wedge sole, *Dicologlossa cuneata* (Moreau). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62, 874-882.
- Machado, M.H., Pavanelli, G.C., Takemoto, R.M. 1995. Influence of the type of environment and the hidrological level variation in the endoparasitic infrapopulations of *Pseudoplatystoma corruscans* and *Schizodon borelli* (Osteichthyes) of the high river Paraná. *Revista Brasileira de Zoologia* 12, 961-976.
- Miller, J.D., Neely, M.N. 2005. Large-scale screen highlights the importance of capsule for virulence in the zoonotic pathogen *Streptococcus iniae*. *Infection and Immunity*, 73, 921-934.
- Muratori, M.C.S., Martins, N.E., Peixoto, M.T.D., Oliveira, A.L. 2001. Mortalidade por "septicemia dos peixes tropicais" em tilápias criadas em consorciação com suínos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 53, 658-662.
- Naldoni, J., Arana, S., Maia, A.A., Ceccarelli, P.S., Tavares, L.E., Borges, F.A., Pozo, C.F., Adriano, E.A. 2009. *Heneguya pseudoplatystoma* n.sp causing reduction in epithelial area of gills in the farmed pintado, a Suth American catfish: Histopathology and ultrastructure. *Veterinary Parasitology* 166, 52-59
- Naldoni, J., Arana, S., Maia, A.A., Silva, M.R., Carriero, M.M., Ceccarelli, P.S., Tavares, L.E., Adriano, E.A., 2011. Host-parasite-environment relationship,

- morphology and molecular analyses of *Henneguya eirasi* n. sp. parasite of two wild *Pseudoplatystoma* spp. in Pantanal Wetland, Brazil. *Veterinary Parasitology* 177, 247-255.
- National Committee for Clinical Laboratory Studies. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility Tests. 4 th ed. NCCLS document M2-A4. Villanova, USA, 2004.
- Netto, L.N., Leal, C.A.G., Figueiredo, H.C.P. 2011. *Streptococcus dysgalactiae* as an agent of septicemia in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Journal of Fish Diseases* 34, 251-254.
- Nowak, B.F., LaPatra, S.E. 2006. Epitheliocystis in fish. *Journal of Fish Diseases* 29, 573–588.
- Novotny, L., Halouzka, R., Matlova, L., Vavra, O., Bartosova, L., Slany, M., Pavlik, I. 2010. Morphology and distribution of granulomatous inflammation in freshwater ornamental fish infected with mycobacteria. *Journal of Fish Diseases* 33, 947-955.
- Ottem, K.F., Nylund, A., Karlsbakk, E., Friis-Møller, A., Kamaishi, T. 2009. Elevation of *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* Mikalsen et al. (2007) to *Francisella noatunensis* comb. nov. [syn. *Francisella piscicida* Ottem et al. (2008) syn. nov.] and characterization of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* subsp. nov., two important fish pathogens. *Journal of Applied Microbiology* 106, 1231-1243.
- Pádua, S.B., Ishikawa, M.M, Kasai, R.Y.D., Jerônimo, G.T., Carrijo-Mauad, J.R. 2012. Parasitic infestations in hybrid surubim catfish fry (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *P. corruscans*). *Revista Brasileira de Medicina Veterinária* 34, 235-240.
- Pádua, S.B., Ishikawa, M.M., Ventura, A.S., Jerônimo, G.T., Martins, M.L., Tavares, L.E.R. 2013. Brazilian catfish parasitized by *Epistylis* sp. (Ciliophora,

- Epistylididae), with description of parasite intensity score. *Parasitology Research* 112, 443-446.
- Pilarski, F., Ishikawa, M.M., Sebastiao, F.A., Pádua, S.B., Sakabe, R. 2011. Columnariose: etiologia, sinais clínicos e envio de amostras para análise laboratorial. Documentos (Embrapa Agropecuária Oeste. Impresso), nº 109, 37 pp.
- Pilarski, F., Rossini, A.J., Ceccarelli, P.S. 2008. Isolation and characterization of *Flavobacterium columnare* (Bernardet et al. 2002) from four tropical fish species in Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 68, 409-414.
- Pinto E. 2008. Infecções parasitárias em pintados (*Pseudoplatystoma corruscans*, Agassiz 1829), em sistema de cultivo intensivo no município de Dourados, MS. 45 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal de Lavras.
- Pinto, E., Garcia, A.M., Figueiredo, H.C.P., Rodrigues, M.P., Martins, M.L. 2009. Primeiro relato de *Tripartiella* sp. (Ciliophora: Peritrichia) em *Pseudoplatystoma corruscans* (Osteichthyes: Pimelodidae) cultivado no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil, com descrição de nova espécie. *Boletim do Instituto de Pesca* 35, 91-97.
- Prado, F.D.D., Hashimoto, D.T., Senhorini, J.A., Foresti, F., Porto-Foresti, F., 2012. Detection of hybrids and genetic introgression in wild stocks of two catfish species (Siluriformes: Pimelodidae): The impact of hatcheries in Brazil. *Fisheries Research* 125-126, 300-305.
- Pretto-Giordano, L.G., Muller, E.E., Freitas, J.C., Silva, V.G. 2010 Evaluation on the pathogenesis of *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Brazilian Archives of Biology and Technology* 53, 87-92.
- Ricci, G., Ferrario, C., Borgo, F., Rollando, A., Fortina, M.G. 2012. Genome sequences of *Lactococcus garvieae* TB25, isolated from Italian cheese, and *Lactococcus*

- garvieae* LG9, isolated from Italian rainbow trout. *Journal of Bacteriology* 194, 1249-1250.
- Romano, L.A., Sampaio, L.A., Teser, B.M. 2012. Micobacteriose por *Mycobacterium marinum* em “linguado” *Paralichthys orbignyanus* e em “barber goby” *Elacatinus figaro*: diagnóstico histopatológico e imuno-histoquímico. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 32, 254-258.
- Salvador, R., Muller, E.E., Freitas, J.C., Leonhardt, J.H., Pretto, L.G., Dias, J.A. 2005. Isolation and characterization of *Streptococcus* spp group B in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in hapas nets and earth nurseries in the northern region of Paraná State, Brasil. *Ciência Rural* 35, 1374-1378.
- Sankar, G., Saravanan, P., Krishnamurthy, P., Chandrakala, N., Rajendran, K. 2012. Isolation and identification of *Vibrio* spp. in diseased *Channa punctatus* from aquaculture fish farm. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences* 41, 159-163.
- Sebastião, F.A., Pilarski, F., Lemos, M.V.F. 2010. Isolation and molecular characterization of *Flavobacterium columnare* strains from fish in Brazil. *Journal of Bacteriology Research*, 2 22-29.
- Shama, S., Brandão, D.A., Vargas, A.C., Costa, M.M., Pedrozo, A.F. 2000. Bactérias com potencial patogênico nos rins e lesões externas de jundiás (*Rhamdia quelen*) cultivados em sistema semi-intensivo. *Ciência Rural* 30, 293-298.
- Shewmaker, P.L., Camus, A.C., Bailiff, T., Steigerwalt, A.G., Morey, R.E., Carvalho, M.G.S. 2007. *Streptococcus ictaluri* sp. nov., isolated from Channel Catfish *Ictalurus punctatus* broodstock. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 1603-1606.
- Silva, B.C., Mouriño, J.L.P., Vieira, F.N., Jatobá, A., Seiffert, W.Q., Martins, M.L. 2012. Haemorrhagic septicaemia in the hybrid surubim (*Pseudoplatystoma*

- corruscans* x *Pseudoplatystoma fasciatum*) caused by *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Research* 43, 908-916.
- Sommerset, I., Krossøy, B., Biering, E., Frost, P. 2005. Vaccines for fish in aquaculture. *Expert Review of Vaccines* 4, 89-101.
- Tavares-Dias, M., Ishikawa, M.M. Martins, M.L., Satake, F., Hisano, H., Pádua, S.B., Jerônimo, G.T., Sant Ana, A.R. 2009. Hematologia: ferramenta para o monitoramento do estado de saúde de peixes em cultivo. In: Saran-Neto, A; Mariano, W.S.; Pozzobon-Soria, S.F.. (Org.). Tópicos especiais em saúde e criação animal. 1ª ed. São Carlos: Pedro & João Editores, v. 1, p. 43-80.
- Toenshoff, E.R., Kvellestad, A., Mitchell, S.O., Steinum, T., Falk, K., Colquhoun, D.J., Horn, M. 2012. A novel betaproteobacterial agent of gill epitheliocystis in seawater farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Plos One* 7, e32696.
- Wang, Q., Yang, M., Xiao, J., Wu, H., Wang, X., Lv, Y., Xu, L., Zheng, H., Wang, S., Zhao, G., Liu, Q., Zhang, Y. 2009. Genome sequence of the versatile fish pathogen *Edwardsiella tarda* provides insights into its adaptation to broad host ranges and intracellular niches. *PLoS One* 4, e7646.
- Yang, M., Lv, Y., Xiao, J., Wu, H., Zheng, H., Liu, Q., Zhang, Y., Wang, Q. 2012. *Edwardsiella* comparative phylogenomics reveal the new intra/inter-species taxonomic relationships, virulence evolution and niche adaptation mechanisms. *PLoS One* 7, e36987.

**Infecção por *Citrobacter freundii* em cachara, *Pseudoplatystoma reticulatum*: isolamento, caracterização e patologia****RESUMO**

Neste estudo descrevemos o primeiro registro de infecção causada por *Citrobacter freundii* em cachara, com a caracterização bioquímica, perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados e aspectos patológicos da doença. Juvenis de cachara moribundos, exibindo sinais clínicos não específicos foram utilizados para diagnóstico parasitológico e bacteriológico. Não foram diagnosticadas infestações parasitárias nos animais analisados, no entanto foram obtidos dois isolados provenientes do rim e encéfalo dos peixes, caracterizados como bastonetes gram negativos, catalase positiva e oxidase negativa. Os isolados foram submetidos à identificação presuntiva através do kit comercial API 20E. A análise de susceptibilidade a 15 antimicrobianos foi realizada pelo método de difusão de discos com Agar Muller Hinton. Ensaios de infecção experimental foram realizados para cumprir o postulado de Koch. Nossos isolados apresentaram perfil bioquímico correspondente a *Citrobacter freundii*. Foi observada multi resistência dos isolados a 66,7 % das moléculas de antibióticos testadas. Nos ensaios de infecção experimental a doença foi reproduzida com sucesso, sendo caracterizada como septicemia hemorrágica, com enterite acentuada, na qual *C. freundii* foi reisolado dos tecidos acometidos.

**Palavras-chave:** Enterobacteriaceae, enterite hemorrágica, multi resistência aos antimicrobianos.

## 1. INTRODUÇÃO

*Citrobacter freundii* membros da família Enterobacteriaceae, compreendem bastonetes gram negativos, catalase positiva e oxidase negativa. Este agente infeccioso é reconhecido como patógeno oportunista de importância médica e veterinária (Toranzo et al., 1994; Chuang et al., 2006), responsável por causar distúrbios hemorrágicos sistêmicos e gastroenterite em animais (Austin et al., 1992), inclusive em humanos (Prager et al., 1995). No entanto, manifestações clínicas diferentes a estas foram descritas em paciente que relatou a ocorrência de lesão ao manipular tilápia, ocorrendo evolução da infecção para fascíte necrotizante e osteomielite (Chuang et al., 2006).

A distribuição dessa bacteriose em peixes pelo mundo é ampla, sendo registrada em países da Europa (Austin et al., 1992; Jeremic et al., 2003), Ásia meridional (Karunasagar et al., 1992), Ásia oriental (Sato et al., 1982; Baeck et al., 2009; Lü et al., 2011) e América do norte (Nawaz et al., 2008). A infecção por *C. freundii*, geralmente, está relacionada com períodos de altas temperaturas da água, associada com baixa qualidade ambiental e fatores estressantes que comprometem as condições de defesa orgânica dos animais (Austin et al., 1992; Karunasagar et al., 1992; Baeck et al., 2009). A doença pode se manifestar de forma aguda, com ocorrência de mortalidade rápida e acentuada (Baeck et al., 2009) ou de forma crônica, com mortalidade baixa e progressiva (Austin et al., 1992).

A produção de bagres nativos sul americanos é uma atividade em expansão no Brasil central. Entre as espécies criadas, os peixes pertencentes ao gênero *Pseudoplatystoma* estão entre os mais produzidos (Brasil, 2012). No entanto, os aspectos sanitários da produção desses animais são pouco conhecidos, e as infecções bacterianas são responsáveis por perdas apreciáveis em pisciculturas (Campos, 2004). Atualmente, estão disponíveis poucos registros com a caracterização dos agentes

bacterianos que impactam a produção de surubins. Relatos encontrados referem-se à ocorrência de *Plesiomonas shigelloides* e *Staphylococcus* sp. (Costa, 2003), *Pseudomonas* sp. (Tavares-Dias et al., 2009), *Lactococcus garvieae* e *Streptococcus* sp. (Evans et al., 2009), *Anaplasmataceae*-like (Ishikawa et al., 2011) e *Aeromonas hydrophila* (Silva et al., 2012). No entanto, esses relatos foram em pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) ou surubim híbrido (*Pseudoplatystoma corruscans* x *Pseudoplatystoma reticulatum*), não havendo registros em cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*).

Neste estudo registramos a primeira ocorrência de infecção por *Citrobacter freundii* em cachara, incluindo a caracterização bioquímica, perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e aspectos patológicos da doença.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Peixes**

Juvenis de cachara (n = 200) aparentemente saudáveis, com comprimento médio de 20 cm foram adquiridos de piscicultura comercial localizada no município de Terenos, Mato Grosso do Sul. Os peixes foram transportados até o Laboratório de Piscicultura da *Embrapa Agropecuária Oeste*, localizada no município de Dourados, Mato Grosso do Sul, onde foram aclimatados em tanques circulares de fibra de vidro com capacidade de 1.000 L, abastecidos com fluxo contínuo de água proveniente de poço artesiano (10 L min<sup>-1</sup>) e arraçoados com dieta extrusada comercial (45% PB).

### **2.2. Mortalidade e detecção do agente etiológico**

Durante o período de aclimação, alguns animais apresentaram sinais clínicos anormais e algumas mortalidades foram registradas. Para diagnóstico da causa *mortis*,

oito animais moribundos foram utilizados. Foram realizadas raspagens de pele, nadadeiras e brânquias para pesquisa de ectoparasitos. Em seguida, os peixes foram eutanasiados por aprofundamento do plano anestésico utilizando óleo de cravo (100 mg L<sup>-1</sup>), lavados externamente com água e detergente neutro, desinfetados com solução de álcool-iodado e submetidos a biópsia renal e cerebral para cultivo bacteriano utilizando meio de cultura para organismos fastidiosos, conforme descrito por Pilarski et al. (2008).

### ***2.3. Identificação bacteriana***

Os isolados obtidos foram submetidos a coloração de Gram, teste de oxidase, catalase e identificação bioquímica utilizando kits comerciais API 20E (BioMérieux<sup>®</sup>, França), na qual foram seguidas as orientações do fabricante.

### ***2.4. Teste de susceptibilidade a antimicrobianos***

A análise de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados isoladas foi realizada pelo método de difusão de disco em Agar Muller Hinton (NCCLS, 2004). Foram utilizados suportes polidiscos contendo 15 antimicrobianos (DME, Brasil), compreendendo aos seguintes fármacos: Ampicilina (AMP), Gentamicina (GEN), Cefalotina (CFL), Ciprofloxacina (CIP), Sulfazotrim (SUT), Amoxicilina/ÁcidoClavulânico (AMC), Ceftriaxona (CRO), Tetraciclina (TET), Penicilina (PEN), Oxacilina (OXA), Eritromicina (ERI), Vancomicina (VAN), Clindamicina (CLI), Rifampicina (RIF) e Cloranfenicol (CLO). A sensibilidade e resistência das bactérias isoladas e zona de diâmetro interpretativo foram determinadas de acordo com as instruções do fabricante.

## 2.5. Infecção experimental

Para cumprir o postulado de Koch, 14 cacharas, com peso médio de 1.050,0 g e 51,8 cm, aparentemente saudáveis e sem sinais clínicos de doenças foram submetidas à infecção experimental com um isolado de *Citrobacter freundii*. Os animais foram distribuídos em dois tanques circulares de fibra de vidro com capacidade de 1.000 L, abastecidos com fluxo contínuo de água proveniente de poço artesiano (10 L min<sup>-1</sup>) e arraçados com dieta extrusada comercial (35% PB).

A temperatura da água e o nível de oxigênio dissolvido foram medidos diariamente utilizando aparelho multiparâmetro digital (YSI<sup>®</sup> 55, Incorporated, Yellow Spring, EUA). Os valores médios  $\pm$  desvio padrão destes parâmetros foram: oxigênio dissolvido  $5,1 \pm 0,3$  mg L<sup>-1</sup> e temperatura  $25,2 \pm 0,3$  °C, permanecendo dentro da faixa de conforto para a espécie. Diariamente, foi realizada a limpeza dos tanques por meio de sifonagem, para a retirada de eventuais resíduos orgânicos (fezes e sobras de ração).

O isolado de *C. freundii* foi inoculado em caldo BHI e incubado a 25°C durante 24 h. Em seguida, a suspensão bacteriana foi centrifugada (3000 g durante 10 min), lavadas três vezes com tampão fosfato estéril (PBS) e ressuspendidas na mesma solução. Sete animais foram anestesiados em solução de óleo de cravo (75 mg L<sup>-1</sup>) e inoculados intraperitonealmente com 0,7 mL da solução bacteriana contendo  $1,0 \times 10^8$  UFC/mL<sup>-1</sup>, sendo que os demais animais foram anestesiados e inoculados intraperitonealmente com 0,7 mL de PBS (controle). Após o desafio, os animais foram monitorados cinco vezes ao dia quanto à presença de sinais clínicos e/ou mortalidade por um período de 15 dias. Em caso de óbito, os peixes eram submetidos às análises microbiológicas do encéfalo, cavidade celomática e rim para reisolamento bacteriano. Fragmentos do coração, fígado, baço, rim, encéfalo e brânquias foram coletados e fixados em solução formalina tamponada (10%). O material foi submetido às técnicas

histológicas usuais, com inclusão em parafina histológica e realizados cortes a 5µm que foram corados Hematoxilina e Eosina. As lâminas obtidas foram analisadas, fotomicrografias foram obtidas por meio do fotomicroscópio óptico Nikon E200<sup>®</sup> equipado com o sistema de captura de imagens Moticom 2300<sup>®</sup>.

### **3. RESULTADOS**

#### ***3.1. Detecção do agente etiológico***

Os peixes moribundos analisados apresentaram sinais clínicos não específicos, tais como anorexia, escurecimento da pele e natação errática. Alguns animais exibiram lesões hemorrágicas cutâneas que, por vezes, evoluíram a úlceras. No exame parasitológico não foram diagnosticados ectoparasitos. Nas análises microbiológicas foram obtidos dois isolados de rim e encéfalo das cacharas, caracterizadas como bastonetes gram negativos, com morfologia de colônia convexa, medindo 2-4 mm de diâmetro e de coloração castanho-alaranjado. As análises bioquímicas dos isolados estão apresentadas na Tabela 1, na qual as características correspondem a 99,9% de identidade com *Citrobacter freundii*.

#### ***3.2. Susceptibilidade aos antimicrobianos***

Os resultados das análises de susceptibilidade aos antimicrobianos estão apresentados na Tabela 2. Pode-se notar que os isolados de *C. freundii* apresentaram multirresistência aos antimicrobianos, sendo sensível apenas a 33,3% das moléculas avaliadas.

Tabela 1. Características bioquímicas de *Citrobacter freundii* isolado de cachara, *Pseudoplatystoma reticulatum*, um bagre sul americano.

Reação	Sigla	Isolado 1	Isolado 2
2-nitrophenyl-βD-galactopyranoside	ONPG	+	+
L-arginine	ADH	+	+
L-lysine	LDC	-	-
L-ornithine	ODC	-	-
Trisodium citrate	CIT	+	+
Sodium thiosulfate	H <sub>2</sub> S	+	+
Urea	URE	-	-
L-tryptophane	TDA	-	-
L-tryptophane	IND	-	-
Sodium pyruvate	VP	-	-
Gelatin	GEL	-	+
D-glucose	GLU	+	+
D-mannitol	MAN	+	+
Inositol	INO	-	-
D-sorbitol	SOR	+	+
L-rhamnose	RHA	+	+
D-sucrose	SAC	+	+
D-melibiose	MEL	+	+
Amygdalin	AMY	-	+
L-arabinose	ARA	+	+
Oxidase	OX	-	-
Catalase	CAT	+	+

Tabela 2. Análise de susceptibilidade antimicrobiana de isolados de *Citrobacter freundii* de cachara, *Pseudoplatystoma reticulatum*, um bagre sul americano. R: resistente; S: sensível; I: intermediário.

Antimicrobianos ( $\mu\text{g}$ )	<i>C. freundii</i>	Antimicrobianos ( $\mu\text{g}$ )	<i>C. freundii</i>
Ampicilina (10)	R	Penicilina (10)	R
Gentamicina (10)	S	Oxacilina (01)	R
Cefalotina (30)	R	Eritromicina (15)	R
Ciprofloxacina (05)	S	Vancomicina (30)	R
Sulfazotrim (25)	S	Clindamicina (02)	R
Amo/ Ac. Clavulânico (20/10)	R	Rifampicina (05)	R
Ceftriaxona (30)	R	Cloranfenicol (30)	S
Tetraciclina (30)	S	-	-

### 3.4 Infecção experimental

Os peixes infectados experimentalmente com isolado homólogo de *C. freundii* apresentaram os primeiros sinais clínicos 24 h após a inoculação da bactéria, apresentando escurecimento da pele e hiporexia. Foi registrada a mortalidade de 12,5 % dos peixes desafiados após 96 h do desafio, não ocorrendo mais mortalidades após este período. Entre as alterações patológicas externas foram observadas a presença de poucos pontos hemorrágicos do tipo petequial no abdômen e nadadeira caudal, com ocorrência de discreta corrosão de nadadeiras (Figura 1a,b) e pontos hemorrágicos multifocais sobre as brânquias (Figura 1f). Internamente, foram observados sinais de peritonite, com pontos hemorrágicos multifocais a coalescentes sobre o mesentério e peritônio (Figura 1c), intestino edemaciado e hemorrágico (Figura 1g), exibindo conteúdo com aspecto sanguinolento e com odor fétido (Figura 1h). Hemorragia difusa

foi observada no encéfalo (Figura 1d), bem como a ocorrência de hemopericárdio (Figura 1e).

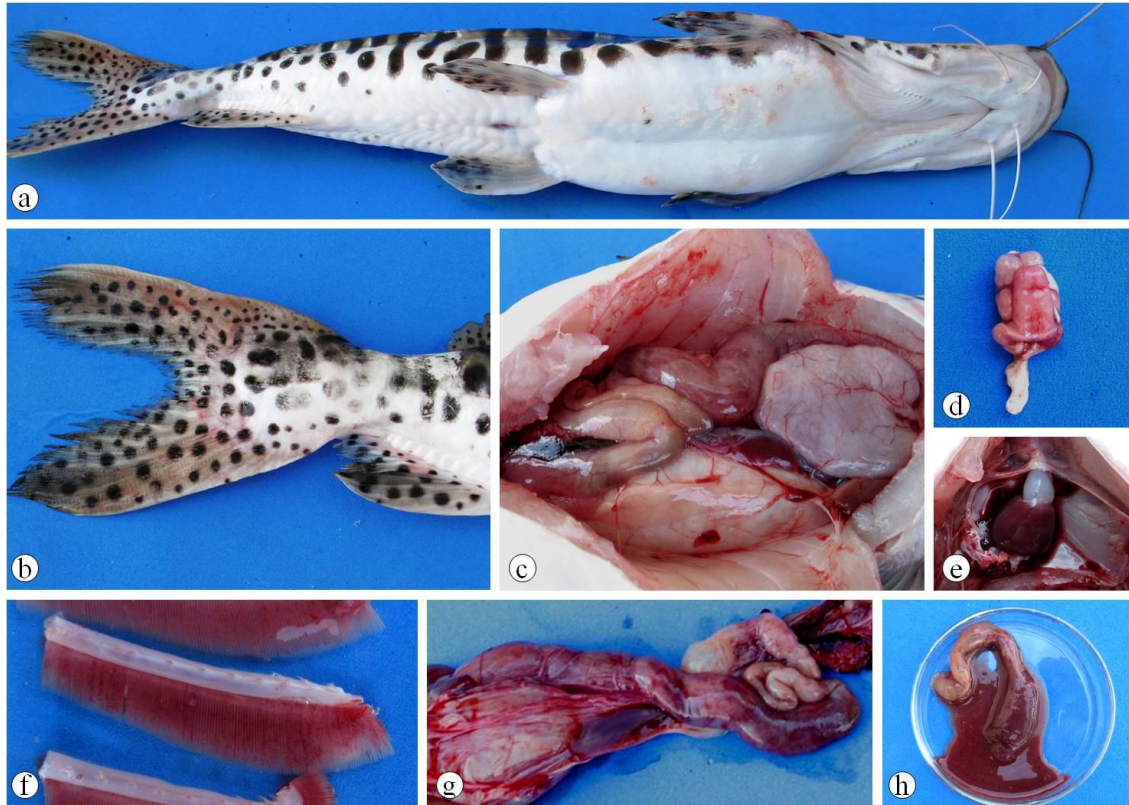


Figura 1. Alterações patológicas em cachara infectada experimentalmente com *Citrobacter freundii* após 96h da infecção. Hemorragia petequiral no abdômen (a) e nadadeira caudal (b), discreta corrosão de nadadeira (b), peritonite com pontos hemorrágicos multifocais a coalescentes sobre o mesentério e peritônio (c), hemorragia difusa no encéfalo (d), hemopericárdio (e), hemorragia do tipo petequiral sobre as brânquias (f), intestino edemaciado e hemorrágico (g) com conteúdo exibindo aspecto sanguinolento (h).

### ***3.5. Análises histopatológicas***

As principais alterações histopatológicas observadas foram nos rins e brônquias, sendo observada a ocorrência de hemorragia intersticial acentuada. Nos rins foram observadas ainda aumento do espaço de Bowman, degeneração e necrose tubular disseminada, com presença de substância acidófila no lúmen tubular, zonas necrose coagulativa e áreas de deposição de fibrina também foram encontradas. Nas brônquias, foram observadas áreas de degeneração hidrópica, com pontos focais de necrose coagulativa, presença de infiltrado inflamatório mononuclear, edema intersticial, ulceração, descamação celular e marcada presença de telangiectasias. No fígado houve degeneração hidrópica moderada, com necrose centro-lobular. No átrio foi observada a presença de focos inflamatórios, hemorragia e necrose coagulativa, enquanto no encéfalo, hemorragias e congestão foram as principais alterações patológicas observadas.

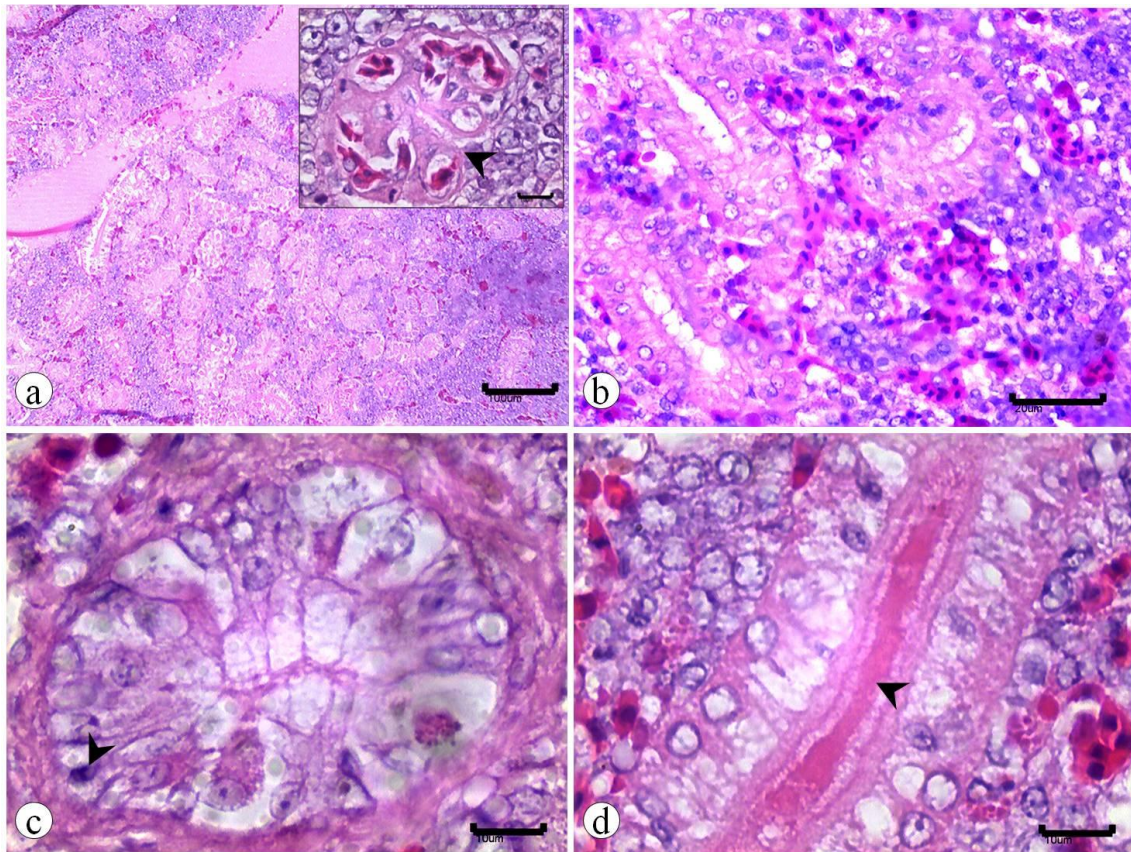


Figura 2. Secções histológicas do rim de cachara infectada experimentalmente com *Citrobacter freundii* após 96h da infecção. Degeneração, necrose coagulativa e hemorragia intersticial disseminada (a), com aumento do espaço de Bowman (a – seta no detalhe superior). Degeneração, necrose coagulativa e hemorragia (b), com detalhe dessas alterações no túbulo renal em corte transversal (c), exibindo ainda presença de substância acidófila no lúmen tubular em corte transversal (d). Coloração HE.

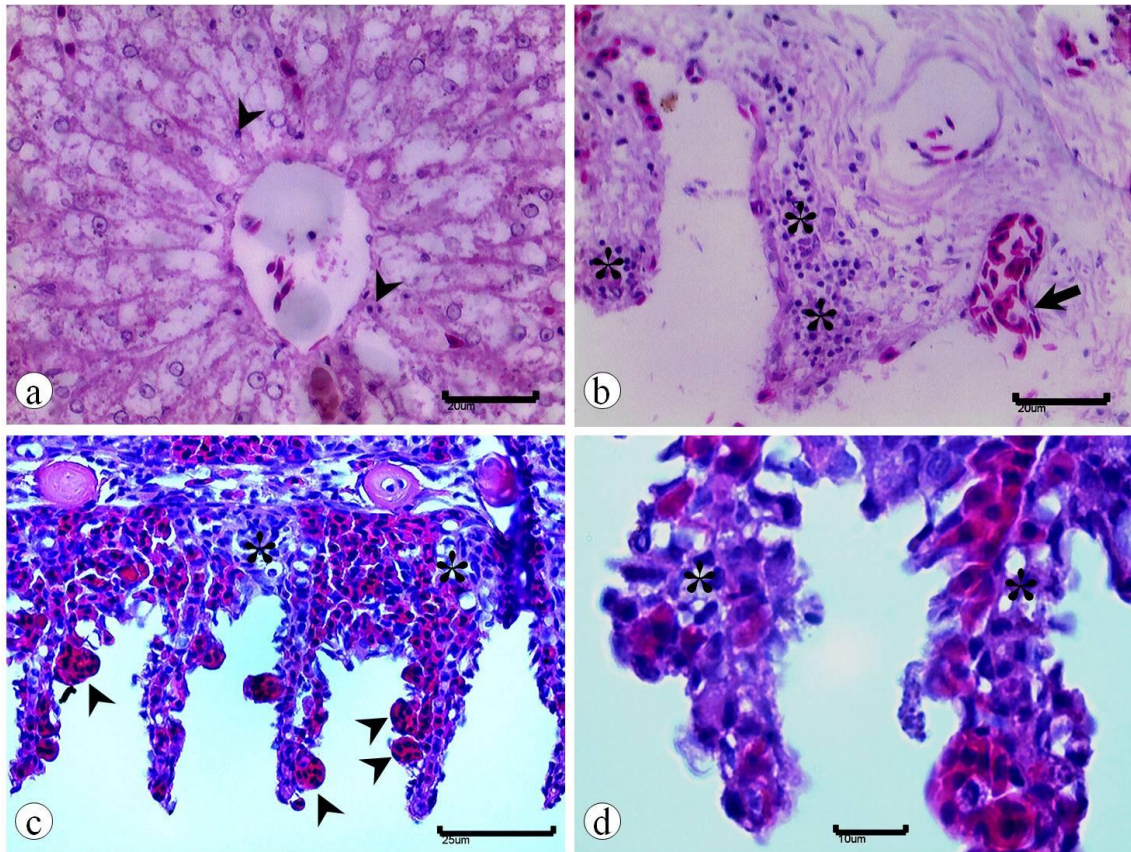


Figura 3. Secções histológicas do fígado, átrio e brânquias de cachara infectada experimentalmente com *Citrobacter freundii* após 96h da infecção. Fígado exibindo necrose centro-lobular (a). Átrio exibindo focos de inflamação mononuclear (b – asteriscos) e hemorragia (b – seta). Brânquia exibindo marcada presença de hemorragia intersticial, com telangiectasia (c - cabeça das setas), edema intersticial (c - asteriscos), degeneração (d – asterisco) e necrose coagulativa. Coloração HE.

#### 4. DISCUSSÃO

*Citrobacter freundii* é um patógeno oportunista com amplo espectro de hospedeiros susceptíveis, sendo registrada sua primeira ocorrência em bagres sul americanos neste estudo. Esta bacteriose é responsável por infecção sistêmica com pronunciada gastroenterite hemorrágica em sunfish *Mola mola* (Sato et al., 1982), truta

arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (Austin et al., 1992), carpa comum *Cyprinus carpio* (Karunasagar et al., 1992), peixe doutor, *Garra rufa obtusa* (Baeck et al., 2009) e cachara, como descrito neste trabalho. Além de peixes, esta bactéria é responsável por causar doenças infecciosas em crustáceos (Shen et al., 2005), anfíbios (Mauel et al., 2002), répteis (Novak e Seigel, 1986), aves (Toranzo et al., 1994) e mamíferos (Chuang et al., 2006), na qual suas principais manifestações clínicas estão relacionadas com distúrbios gastrintestinais.

O perfil bioquímico dos isolados obtidos neste estudo foi similar aos descritos na literatura (Austin et al., 1992; Karunasagar et al., 1992; Jeremic et al., 2003), no entanto, algumas provas apresentaram variações nas reações, como na atividade de gelatinase e amygdaline. Isolados de truta arco-íris e ciprinídeos apresentaram variações na atividade de arginine dihydrolase, ornithine decarboxylase, fermentação da sucrose e fermentação da rhamnose (Austin et al., 1992; Karunasagar et al., 1992; Jeremic et al., 2003). Toranzo et al. (1994) também observaram reações bioquímicas variáveis em isolados provenientes de diferentes fontes e hospedeiros, sendo comum a este grupo de bactérias. Apesar das variações encontradas, os testes bioquímicos presuntivos por meio do kit API 20E conferem resultados adequados para identificação bacteriana (Austin et al., 1992; Toranzo et al., 1994).

A multirresistência aos antimicrobianos está entre os principais problemas para bactérias de importância médica, como *C. freundii*. Furushita et al. (2003) demonstraram que os genes de resistência a tetraciclina *Tet<sup>r</sup>* identificados em bactérias isoladas de pisciculturas, entre elas *Citrobacter* sp., possuem a mesma origem de isolados clínicos. Toranzo et al. (1994), descreveram a ocorrência de isolados de *C. freundii* em peixes que apresentaram resistência a tetraciclina e oxitetraciclina, pois estes fármacos estão entre os principais antimicrobianos utilizados no tratamento de

infecções na aquicultura. Nawaz et al. (2008), investigaram a ocorrência de genes *Tet<sup>r</sup>* em isolados provenientes do intestino de bagres norte americanos de pisciculturas, sendo encontrada alta prevalência de bactérias resistentes. No entanto, neste estudo não foi observado resistência à tetraciclina, todavia, *C. freundii* foi resistente à maioria das moléculas analisadas.

As alterações clínicas e patológicas observadas neste ensaio são similares às descrições encontradas em outros estudos (Austin et al., 1992; Karunasagar et al., 1992; Jeremic et al., 2003; Baeck et al., 2009). As principais manifestações clínicas envolvem um quadro de enterite hemorrágica, com ocorrência de hemorragia em outros órgãos. A ocorrência de hemorragia difusa no encéfalo e hemopericárdio ainda não haviam sido associadas à infecção por *C. freundii*, mas *Aeromonas hydrophila* causa lesões similares em surubim híbrido (*Pseudoplatystoma corruscans* x *P. fasciatum*) (Silva et al., 2012). Possivelmente toxinas bacterianas hemolíticas ocasionam lesão endotelial que propiciam a ocorrência desse distúrbio vascular. Atualmente sabe-se que os fatores de virulência dessa bactéria estão relacionados à aderência agregativa na mucosa gastrintestinal e citotoxicidade (Bai et al., 2012).

## 5. CONCLUSÃO

Este é o primeiro registro de *Citrobacter freundii* em cachara, *Pseudoplatystoma reticulatum*. A doença é caracterizada por septicemia hemorrágica, com enterite acentuada. Nossos isolados apresentaram multiresistência à maioria dos antimicrobianos avaliados, sendo, portanto, de relevante importância clínica e de maior risco ao circular entre diferentes hospedeiros.

## 6. REFERÊNCIAS

- Austin, B., Stobie, M., Robertson, P.A.W. 1992. *Citrobacter freundii*: the cause of gastro-enteritis leading to progressive low level mortalities infarmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum, in Scotland. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 12, 166-168.
- Baeck, G-W., Kim, J-H., Choresca Jr, C., Gomez, D.K., Shin, S-P., Han, J-E., Park, S-C. 2009. Mass mortality of doctor fish (*Garra rufa obtusa*) caused by *Citrobacter freundii* infection. *Journal of Veterinary Clinics* 26, 150-154.
- Bai, L., Xia, S., Lan, R., Liu, L., Ye, C., Wang, Y., Jin, D., Cui, Z., Jing, H., Xiong, Y., Bai, X., Sun, H., Zhang, J., Wang, L., Xu J. 2012. Isolation and characterization of cytotoxic, aggregative *Citrobacter freundii*. *PLoS ONE* 7, e33054.
- Brasil. Ministério da Pesca e Aquicultura. 2012. Boletim estatístico da pesca e aquicultura: Brasil 2010. Brasília, DF, 2012. 129 p. in: [http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes\\_e\\_Estasticas/Boletim%20Estat%20C3%ADstico%20MPA%202010.pdf](http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estasticas/Boletim%20Estat%20C3%ADstico%20MPA%202010.pdf). Accessed January 30<sup>th</sup> 2013.
- Campos, J.L. 2004. Pintado culture in Brazil. *Global Aquaculture Advocate* 42, 42-43.
- Chuang, Y. M., Tseng, S. P., Teng, L. J., Ho, Y. C., Hsueh, P. R. 2006. Emergence of cefotaxime resistance in *Citrobacter freundii* causing necrotizing fasciitis and osteomyelitis. *Journal of Infection* 53, e161-e163.
- Costa, A.B. 2003. Caracterização de bactérias do complexo *Aeromonas* isoladas de peixes de água doce e sua atividade patogênica. Piracicaba, 2003. 68 p. Tese de Doutorado em Agronomia, Universidade de São Paulo.
- Evans, J.J., Klesius, P.H., Shoemaker, C.A. 2009. First isolation and characterization of *Lactococcus garvieae* from Brazilian Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), and

- pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* (Spix & Agassiz). *Journal of Fish Diseases* 32, 943-951.
- Furushita, M., Shiba, T., Maeda, T., Yahata, M., Kaneoka, A., Takahashi, Y., Torii, K., Hasegawa, T., Ohta, M. 2003. Similarity of tetracycline resistance genes isolated from fish farm bacteria to those from clinical isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 5336-5342.
- Ishikawa, M.M., Pádua, S.B., Satake, F., Martins, M.L., Tavares-Dias, M. 2011. Identificação morfológica de organismos semelhantes à Anaplasmataceae em monócitos de surubim híbrido (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *P. corruscans*). *Revista Brasileira de Medicina Veterinária* 33, 225-228.
- Jeremic, S., Jakic-Dimic, D., Veljovic L. 2003. *Citrobacter freundii* as a cause of disease in fish. *Acta veterinaria* 53, 399-410.
- Karunasagar, I., Karunasagar, I., Pari, R. 1992. Systemic *Citrobacter freundii* infection in common carp, *Cyprinus carpio* L. fingerlings. *Journal of Fish Diseases* 15, 95-98.
- Lü, A., Hu, X., Zheng, L., Zhu, A., Cao, C., & Jiang, J. 2011. Isolation and characterization of *Citrobacter* spp. from the intestine of grass carp *Ctenopharyngodon idellus*. *Aquaculture* 313, 156-160.
- Mauel, M. J., Miller, D. L., Frazier, K. S., & Hines, M. E. 2002. Bacterial pathogens isolated from cultured bullfrogs (*Rana castesbeiana*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 14, 431-433.
- National Committee for Clinical Laboratory Studies. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility Tests. 4 th ed. NCCLS document M2-A4. Villanova, USA, 2004.

- Nawaz, M., Khan, A.A., Khan, S., Sung, K., Steele, R. 2008. Isolation and characterization of tetracycline-resistant *Citrobacter* spp. from catfish. *Food microbiology* 25, 85-91.
- Novak, S.S., Seigel, R.A. 1986. Gram-negative septicemia in American alligators (*Alligator mississippiensis*). *Journal of Wildlife Diseases* 22, 484-487.
- Pilarski, F., Rossini, A.J., Ceccarelli, P.S. 2008. Isolation and characterization of *Flavobacterium columnare* (Bernardet et al. 2002) from four tropical fish species in Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 68, 409-414.
- Prager, H.T.H., Tietze, V.S.A.F.E., Bohme, G. 1995. Verotoxinogenic *Citrobacter freundii* associated with severe gastroenteritis and cases of haemolytic uraemic syndrome in a nursery school: green butter as the infection source. *Epidemiology & Infection* 199, 441-450.
- Sato, N., Yamane, N., Kawamura, T. 1982. Systemic *Citrobacter freundii* infection among sunfish *Mola mola* in Matsushima aquarium. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish* 49, 1551-1557.
- Shen, J.Y., Gu, Z.M., Pan, X.Y., Zhou, B.Z., Yin, W.L., Cao, Z. 2005. Isolation and identification of *Citrobacter freundii* from *Cherax quadricarinatus*. *Journal of Fishery Sciences of China* 12, 197-200.
- Silva, B.C., Mouriño, J.L.P., Vieira, F.N., Jatobá, A., Seiffert, W.Q., Martins, M.L. 2012. Haemorrhagic septicaemia in the hybrid surubim (*Pseudoplatystoma corruscans* x *Pseudoplatystoma fasciatum*) caused by *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Research* 43, 908-916.
- Tavares-Dias, M., Ishikawa, M.M. Martins, M.L., Satake, F., Hisano, H., Pádua, S.B., Jerônimo, G.T., Sant Ana, A.R. 2009. Hematologia: ferramenta para o monitoramento do estado de saúde de peixes em cultivo. In: Saran-Neto, A;

Mariano, W.S.; Pozzobon-Soria, S.F.. (Org.). Tópicos especiais em saúde e criação animal. 1ª ed. São Carlos: Pedro & João Editores, v. 1, p. 43-80.

Toranzo, A.E., Cutrín, J.M., Roberson, B.S., Núñez, S., Abell, J.M., Hetrick, F.M., Baya, A.M. 1994. Comparison of the taxonomy, serology, drug resistance transfer, and virulence of *Citrobacter freundii* strains from mammals and poikilothermic hosts. *Applied and environmental microbiology* 60, 1789-1797.

### **Infecção por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Enterococcus faecalis* em bagres sul americanos: isolamento, caracterização bioquímica e antibiograma dos isolados**

#### **RESUMO**

Neste estudo registramos a primeira ocorrência da infecção por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Enterococcus faecalis* associadas a surtos de meningoencefalite infecciosa em bagres sul americanos, incluindo a caracterização bioquímica e perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados. Foram utilizados 132 bagres moribundos provenientes de surtos em diferentes fazendas-berçário. Os peixes foram submetidos à necropsia e biópsia de rim e encéfalo para o isolamento bacteriano. Os isolados obtidos foram submetidos à coloração de Gram, teste da oxidase, catalase, produção de hemólise e identificação presuntiva através de kit comercial API 20 Strep. A análise de susceptibilidade a 15 antimicrobianos foi realizada pelo método de difusão de disco em Agar Muller Hinton. Foram obtidos 57 isolados de rim e encéfalo, identificados como cocos gram positivos e que, após caracterização bioquímica, foram descritos como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Enterococcus faecalis*. Todos os isolados obtidos apresentaram resistência a grande maioria dos antimicrobianos testados, sendo sensíveis somente a ampicilina e a penicilina (*L. lactis* subsp. *Lactis*), e a sulfazotrim e amoxicilina/ácido clavulânico (*E. faecalis*).

**Palavras-chave:** Meningoencefalite infecciosa, resistência a antimicrobianos, *Pseudoplatystoma* spp.

## 1. INTRODUÇÃO

Um grande número de cocos gram positivos são responsáveis por causarem surtos de doenças em animais aquáticos de produção em todo o mundo. *Lactococcus garvieae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus iniae* e *Streptococcus dysgalactiae* são os principais agentes reconhecidos na etiologia de infecções sistêmicas e meningoencefalite infecciosa em peixes de vários países (Evans et al., 2009; Hernández et al., 2009; Netto et al., 2011; Baums et al., 2012; Geng et al., 2012). No entanto, novos agentes tem emergido e associados a surtos em diferentes locais, como a infecção por *Streptococcus ictaluri* (Shewmaker et al., 2007), *Weissella* sp. (Figueiredo et al., 2012a), *Aerococcus viridans* (Ke et al., 2012) e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Chen et al., 2012).

Entre os cocos gram positivos responsáveis por infecções em tilápia no Brasil destacam-se o *S. agalactiae*, *S. iniae*, *S. dysgalactiae*, *Lactococcus garvieae* e *Enterococcus faecalis* (Figueiredo et al., 2006; Evans et al., 2009; Netto et al., 2011; Figueiredo et al., 2012b), enquanto que em surubim foi descrita a ocorrência de *L. garvieae* e *Streptococcus* sp. (Evans et al., 2009) e em trutas arco-íris *Weissella* sp (Figueiredo et al., 2012a). No entanto, pouco se conhece sobre as infecções bacterianas que acometem os bagres nativos sul americanos, na qual os agentes descritos são em sua grande maioria, bactérias gram negativas (Costa, 2003; Tavares-Dias et al., 2009; Ishikawa et al., 2011; Silva et al., 2012).

Bagres nativos pertencentes ao gênero *Pseudoplatystoma* estão entre os mais produzidos no Centro-Oeste do Brasil (Brasil, 2012). No entanto, o estudo sobre as doenças responsáveis por mortalidades na criação desses peixes é recente (Pinto et al., 2008, 2009; Ishikawa et al., 2011, 2012; Silva et al., 2012; Pádua et al., 2012, 2013). Sabe-se que as doenças infecciosas são responsáveis por importantes prejuízos na

indústria (Campos, 2004), sendo necessária a adoção de medidas de controle e profilaxia baseadas nos patógenos que acometem esses peixes, associada aos conhecimentos sobre a biologia da espécie produzida (Ishikawa et al., 2012).

Neste estudo registramos a primeira ocorrência de infecção por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Enterococcus faecalis* associados a surtos de meningoencefalite infecciosa em bagres Sul Americanos, incluindo a caracterização bioquímica e perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Área de estudo e peixes**

Surtos sequenciais de mortalidade de alevinos e juvenis de bagres carnívoros proveniente de pisciculturas localizadas em Terenos e Dourados, Mato Grosso do Sul e Sorriso, Mato Grosso, foram investigados para isolamento bacteriano. Para o isolamento, foram selecionados animais moribundos com sinais clínicos variados nestas fazendas-berçário e também em juvenis de cachara moribundas criadas em condições laboratoriais na *Embrapa Agropecuária Oeste*, Dourados-MS. No total, foram amostrados 132 bagres silurídeos, sendo 35 cacharas (*Pseudoplatystoma reticulatum*) e 97 surubim híbrido (*Pseudoplatystoma corruscans* x *P. reticulatum*).

### **2.2. Detecção do agente etiológico**

Os peixes moribundos foram coletados nos diferentes locais, eutanasiados por aprofundamento do plano anestésico (óleo de cravo, 100 mg/L<sup>-1</sup>), embalados individualmente em sacos plásticos estéreis, refrigerados em gelo e transportados até o Laboratório de Piscicultura da *Embrapa Agropecuária Oeste*. No laboratório, os peixes foram lavados externamente com água e detergente neutro, realizada a assepsia com solução de álcool-iodado e submetidos à biópsia renal e cerebral para isolamento e

cultivo bacteriano utilizando meio de cultura para organismos fastidiosos, conforme descrito por Pilarski et al. (2008). As amostras foram incubadas a 25° C durante o período de até cinco dias, sendo posteriormente descartadas em caso de ausência de crescimento bacteriano até este período.

### ***2.3. Identificação bacteriana***

Os isolados, após crescimento em meio sólido, foram submetidos ao método de coloração de Gram, teste de oxidase, catalase, produção de hemólise em ágar sangue e identificação bioquímica utilizando kit comercial API 20 Strep (BioMérieux<sup>®</sup>, França), na qual foram seguidas as orientações do fabricante.

### ***2.4. Teste de susceptibilidade a antimicrobianos***

A análise da susceptibilidade a antimicrobianos foi realizada pelo método de difusão de disco em Agar Muller Hinton (NCCLS, 2004). Foram utilizados suportes polidiscos contendo 15 antimicrobianos (DME, Brasil): Ampicilina (AMP), Gentamicina (GEN), Cefalotina (CFL), Ciprofloxacina (CIP), Sulfazotrim (SUT), Amoxicilina/Ácido Clavulânico (AMC), Ceftriaxona (CRO), Tetraciclina (TET), Penicilina (PEN), Oxacilina (OXA), Eritromicina (ERI), Vancomicina (VAN), Clindamicina (CLI), Rifampicina (RIF) e Cloranfenicol (CLO). A sensibilidade e resistência das bactérias isoladas e a zona de diâmetro interpretativa foi determinada de acordo com as instruções do fabricante.

## **3. RESULTADOS**

### ***3.1. Detecção do agente etiológico***

Os peixes moribundos analisados apresentaram sinais clínicos variados, tais como natação em rodopio e escurecimento da pele. Alguns animais exibiram lesões hemorrágicas cutâneas, que por vezes evoluíram a úlceras. Ao proceder a necropsia para

as análises microbiológicas, foram observados sinais de meningoencefalite na maioria nos animais, com hemorragia difusa sobre o encéfalo e aspecto supurativo em alguns indivíduos.

Nas análises microbiológicas foram obtidos 57 isolados de rim e encéfalo, constituídos por cocos gram positivos. As colônias variaram na morfologia e coloração, sendo circulares, convexas, mas algumas demoravam até 48 h para um crescimento satisfatório, com tamanho de 1-2 mm e coloração creme. Outras apresentavam crescimento rápido (24 h), alcançando tamanho de 3-4 mm e apresentaram coloração castanha. Os resultados das provas bioquímicas estão apresentados na Tabela 3, pelos resultados das provas bioquímicas as bactérias puderam ser classificadas como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (52% dos isolados) e *Enterococcus faecalis* (28% dos isolados). Os demais isolados não obtiveram identificação conclusiva pelos métodos utilizados.

### ***3.2. Teste de susceptibilidade a antimicrobianos***

Os resultados das análises de susceptibilidade aos antimicrobianos estão apresentados na Tabela 4. Todos os isolados apresentaram multirresistência a maioria dos antimicrobianos testados. Os isolados de *L. lactis* subsp. *lactis* foram sensíveis somente a ampicilina e penicilina. Os isolados de *E. faecalis* foram sensíveis também ao sulfazotrim e amoxicilina/ácido clavulânico.

Tabela 3. Características bioquímicas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Enterococcus faecalis* isolados de bagres carnívoros criados no Brasil central.

Reação	Sigla	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>E. faecalis</i>
Gram	GR	+	+
Hemólise	HM	$\gamma$	$\beta$
Oxidase	OX	-	-
Catalase	CAT	-	-
Piruvato de sódio	VP	+	+
Ácido hipúrico	HIP	-	-
Esculina citrato de ferro	ESC	+	+
ácido piroglutâmico $\beta$ -naftilamida	PYRA	-/+	+
6-bromo-2-naftil- $\alpha$ Dgalactopiranosido	$\alpha$ GAL	-	-
ácido naftol-ASBI-glucuronato	$\beta$ GUR	-	-
2-naftil- $\beta$ D-galactopiranosido	$\beta$ GAL	-	-
2-naftil fosfato	PAL	-	-
L-leucina- $\beta$ -naftilam	LAP	-/+	+
L-arginina	ADH	+	+
D-ribose	RIB	+	+
L-arabinose	ARA	+/-	-
D-manitol	MAN	+	+
D-sorbitol	SOR	-/+	+
D-lactose	LAC	+	+
D-trealose	TRE	+	+
Inulina	INU	+/-	-
D-rafinose	RAF	-	-
Amido	AMD	+	+
Glicogênio	GLYG	-	-

Tabela 4. Análise de susceptibilidade antimicrobiana de isolados de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Enterococcus faecalis* isolados de bagres carnívoros criados no Brasil central. R: resistente; S: sensível; I: intermediário.

Antimicrobianos ( $\mu\text{g}$ )	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
Ampicilina (10)	S	S
Gentamicina (10)	S/R	R
Cefalotina (30)	I/S	S/I
Ciprofloxacina (05)	I/R	S/I
Sulfazotrim (25)	I/S	S
Amo/ Ác. Clavulânico (20/10)	S/R	S
Ceftriaxona (30)	I/R	R
Tetraciclina (30)	R	R
Penicilina (10)	S	S
Oxacilina (01)	R	R
Eritromicina (15)	S/I/R	R
Vancomicina (30)	S/I	I
Clindamicina (02)	S/R	R
Rifampicina (05)	R	I/R
Cloranfenicol (30)	S/I/R	R

#### 4. DISCUSSÃO

Vários cocos gram positivos são amplamente reconhecidos como patógenos de peixes, no entanto, a infecção por *Lactococcus lactis* e *Enterococcus faecalis* não são usuais. Essas bactérias habitam naturalmente a microbiota intestinal dos peixes (Petersen e Dalsgaard, 2003; Itoi et al., 2008) e são facilmente encontradas em vários

ambientes terrestre e aquático (Hammerum, 2012). No entanto, recentemente vários agentes bacterianos tem emergido e associados a importantes perdas na aquicultura mundial (Shewmaker et al., 2007; Chen et al., 2012; Figueiredo et al., 2012; Ke et al., 2012). O primeiro registro de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* causando infecção em animais foi registrado num surto em aves (Goyache et al., 2001), sendo, posteriormente, ocorrências descritas também em bovinos (Wichtel et al. 2003), camarão (Wang et al., 2008) e, recentemente, peixes (Chen et al., 2012). Em humanos *L. lactis* é responsável por endocardite (Clark e Burnie, 1991; Zechini et al., 2006), artrite séptica (Campbell et al., 1993), abscesso cerebelar (Akhaddar et al., 2002), abscesso hepático (Denholm et al., 2006) e bacteremia neonatal (Glikman et al., 2010). Portanto, atualmente trata-se de um patógeno emergente de importância médica e veterinária.

A bactéria *Enterococcus faecalis* é amplamente reconhecida como patógeno oportunista de importância nosocomial (Hammerum, 2012). Este agente é responsável pela mastite bovina (Elhadidy e Elsayyad, 2012), septicemia, endocardite, peritonite e salpingite em aves (Olsen et al., 2012), além de infecções urinárias em pets (Pomba et al., 2010). Em humanos é responsável por endocardite, infecções do trato urinário, infecções dentária, bacteremia, abscesso cerebral, além de infecção de feridas (Hammerum, 2012; Mylona et al., 2012; Wang et al., 2012). Até o momento esta bactéria não é reconhecida como patógeno de peixes, no entanto, Evans et al. (2009) descreveu o isolamento de *E. faecalis* e *Lactococcus garvieae* em tilápia doente proveniente do Brasil, mas o potencial patogênico deste agente não foi confirmado. Os resultados deste estudo demonstraram que a *E. faecalis* pode atuar como um patógeno de importância para aquicultura, estando associado a casos de meningoencefalite em peixes criados na América do Sul. No entanto, são necessários ensaios de infecção

experimental para elucidar o potencial patogênico desta bactéria para organismos aquáticos cultivados.

Nossos isolados apresentaram multirresistência a maioria dos antimicrobianos testados, sendo poucas moléculas efetivas contra a proliferação bacteriana. O perfil de susceptibilidade foi diferente entre as espécies identificadas, bem como entre os diferentes isolados pertencentes à mesma espécie. A resistência aos antimicrobianos é a principal implicação desses agentes. Vários estudos demonstraram que bactérias proveniente de diferentes hospedeiros/origem podem carrear genes de resistência e de virulência de mesma origem clínico-hospitalar (Aarestrup et al., 2000; Hammerum, 2012; Liu et al., 2012), apresentando grande similaridade em análises de sequenciamento, o que suporta o potencial zoonótico desse agente infeccioso (Olsen et al., 2012). A tetraciclina está entre os principais antibióticos utilizados no controle de infecções bacterianas em peixes, por esse motivo é comum obter estirpes resistentes a esta molécula provenientes de piscicultura (Toranzo et al., 1994; Nawaz et al., 2008). No entanto, os isolados apresentaram resistência a antibióticos que não são utilizados na terapêutica de peixes, como a oxacilina, ceftriaxona e rifampicina. Essa evidência possivelmente deve estar relacionada com a obtenção de genes e plasmídeos que codificam a multirresistência presentes em bactérias que circulam entre diferentes hospedeiros e ambientes, como demonstrado por Liu et al. (2012).

## 5. CONCLUSÃO

Este estudo apresenta o primeiro registro de ocorrência de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Enterococcus faecalis* isolados de bagres carnívoros Sul Americanos, envolvidos em surtos de meningoencefalite bacteriana em diferentes fazendas-berçário. Todos nossos isolados apresentaram multi resistência aos antimicrobianos, sendo



- Chen, M. H., Hung, S. W., Shyu, C. L., Lin, C. C., Liu, P. C., Chang, C. H., Wang, W. S. 2012. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* infection in Bester sturgeon, a cultured hybrid of *Huso huso* × *Acipenser ruthenus*, in Taiwan. *Research in Veterinary Science* 93, 581-588.
- Clark, I., Burnie, J.P. 1991. Immunoblotting and culture positive endocarditis. *Journal of Clinical Pathology* 44, 152–156.
- Costa, A.B. 2003. Caracterização de bactérias do complexo *Aeromonas* isoladas de peixes de água doce e sua atividade patogênica. Piracicaba, 2003. 68 p. Tese de Doutorado em Agronomia, Universidade de São Paulo.
- Denholm, J., Horne, K., McMahon, J., Lindsay Grayson, M., Johnson, P. 2006. Yoghurt consumption and damaged colonic mucosa: A case of *Lactococcus lactis* liver abscess in an immunocompetent patient. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 38, 739-741.
- Elhadidy, M., Elsayyad, A. 2012. Uncommitted role of enterococcal surface protein, Esp, and origin of isolates on biofilm production by *Enterococcus faecalis* isolated from bovine mastitis. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, In Press.
- Evans, J.J., Klesius, P.H., Shoemaker, C.A. 2009. First isolation and characterization of *Lactococcus garvieae* from Brazilian Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), and pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* (Spix & Agassiz). *Journal of Fish Diseases* 32, 943-951.
- Figueiredo, H.C.P., Carneiro, D.O.; Faria, F.C., Costa, G.M. 2006. *Streptococcus agalactiae* associado à meningoencefalite e infecção sistêmica em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 58, 678-680.

- Figueiredo, H.C.P., Costa, F.A.A., Leal, C.A.G., Carvalho-Castro, G.A., Leite, R.C. 2012a. *Weissella* sp. outbreaks in commercial rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Brazil. *Veterinary Microbiology* 156, 359-366.
- Figueiredo, H.C.P., Nobrega-Netto, L., Leal, C.A.G., Pereira, U.P., Mian, G.F. 2012b. *Streptococcus iniae* outbreaks in Brazilian Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) farms. *Brazilian Journal of Microbiology* 43, 576-580.
- Geng, Y., Wang, K.Y., Huang, X.L., Chen, D.F., Li, C.W., Ren, S.Y., Liao, Y.T., Zhou, Z.Y., Liu, Q.F., Du, Z.J., Lai, W.M. 2012. *Streptococcus agalactiae*, an emerging pathogen for cultured ya-fish, *Schizothorax prenanti*, in China. *Transboundary and Emerging Diseases* 59, 369–375.
- Glikman, D., Sprecher, H., Chernokozinsky, A., Weintraub, Z. 2010. *Lactococcus lactis* Catheter-Related Bacteremia in an Infant. *Infection* 38, 145-146.
- Goyache, J., Vela, A.I., Gibello, A., Blanco, M.M., Briones, V., González, S., Téllez, S., Ballesteros, C., Domínguez, L., Fernández-Garayzábal, J.F. 2001. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* infection in waterfowl: first confirmation in animals. *Emerging infectious diseases* 7, 884–886.
- Hammerum, A.M. 2012. Enterococci of animal origin and their significance for public health. *Clinical Microbiology and Infection* 18, 619-625.
- Hernández, E., Figueroa, J., Iregui, C. 2009. Streptococcosis on a red tilapia, *Oreochromis* sp., farm: a case study. *Journal of fish diseases* 32, 247-252.
- Ishikawa, M.M., Pádua, S.B., Ventura, A.S., Jerônimo, G.T., Russo, M.R., Carrijo-Mauad, J.R., Martins, M.L. 2012. Biologia e estratégias na sanidade de alevinos de bagres carnívoros. Documentos (Embrapa Agropecuária Oeste. Impresso), v. 115, p. 1-35, 2012.

- Ishikawa, M.M., Pádua, S.B., Satake, F., Martins, M.L., Tavares-Dias, M. 2011. Identificação morfológica de organismos semelhantes à Anaplasmataceae em monócitos de surubim híbrido (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *P. corruscans*). *Revista Brasileira de Medicina Veterinária* 33, 225-228.
- Itoi, S., Abe, T., Washio, S., Ikuno, E., Kanomata, Y., & Sugita, H. 2008. Isolation of halotolerant *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from intestinal tract of coastal fish. *International journal of food microbiology* 121, 116-121.
- Ke, X., Lu, M., Ye, X., Gao, F., Zhu, H., Huang, Z. 2012. Recovery and pathogenicity analysis of *Aerococcus viridans* isolated from tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in Southwest of China. *Aquaculture* 342–343,18-23.
- Liu, Y., Wang, Y., Wu, C., Shen, Z., Schwarz, S., Du, X. D., Daib, L., Zhanga, W., Zhang, Q., Shen, J. 2012. First report of the multidrug resistance gene cfr in *Enterococcus faecalis* of animal origin. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 56, 1650-1654.
- Mylona, E., Vadala, C., Papastamopoulos, V., Skoutelis, A. 2012. Brain abscess caused by *Enterococcus faecalis* following a dental procedure in a patient with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Journal of clinical microbiology* 50, 1807-1809.
- National Committee for Clinical Laboratory Studies. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility Tests. 4 th ed. NCCLS document M2-A4. Villanova, USA, 2004.
- Nawaz, M., Khan, A.A., Khan, S., Sung, K., Steele, R. 2008. Isolation and characterization of tetracycline-resistant *Citrobacter* spp. from catfish. *Food microbiology* 25, 85-91.

- Netto, L.N., Leal, C.A.G., Figueiredo, H.C.P. 2011. *Streptococcus dysgalactiae* as an agent of septicaemia in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Journal of Fish Diseases* 34, 251-254.
- Olsen, R.H., Schønheyder, H.C., Christensen, H., Bisgaard, M. 2012. *Enterococcus faecalis* of human and poultry origin share virulence genes supporting the zoonotic potential of *E. faecalis*. *Zoonoses and public health* 59, 256-263.
- Pádua, S.B., Ishikawa, M.M, Kasai, R.Y.D., Jerônimo, G.T., Carrijo-Mauad, J.R. 2012. Parasitic infestations in hybrid surubim catfish fry (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *P. corruscans*). *Revista Brasileira de Medicina Veterinária* 34, 235-240.
- Pádua, S.B., Ishikawa, M.M., Ventura, A.S., Jerônimo, G.T., Martins, M.L., Tavares, L.E.R. 2013. Brazilian catfish parasitized by *Epistylis* sp. (Ciliophora, Epistylididae), with description of parasite intensity score. *Parasitology Research* 112, 443-446.
- Petersen, A., Dalsgaard, A. 2003. Antimicrobial resistance of intestinal *Aeromonas* spp. and *Enterococcus* spp. in fish cultured in integrated broiler-fish farms in Thailand. *Aquaculture* 219, 71-82.
- Pilarski, F., Rossini, A.J., Ceccarelli, P.S. 2008. Isolation and characterization of *Flavobacterium columnare* (Bernardet et al. 2002) from four tropical fish species in Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 68, 409-414.
- Pinto E. 2008. Infecções parasitárias em pintados (*Pseudoplatystoma corruscans*, Agassiz 1829), em sistema de cultivo intensivo no município de Dourados, MS. 45 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal de Lavras.
- Pinto, E., Garcia, A.M., Figueiredo, H.C.P., Rodrigues, M.P., Martins, M.L. 2009. Primeiro relato de *Tripartiella* sp. (Ciliophora: Peritrichia) em *Pseudoplatystoma*

- corruscans* (Osteichthyes: Pimelodidae) cultivado no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil, com descrição de nova espécie. *Boletim do Instituto de Pesca* 35, 91-97.
- Pomba, C., Couto, N., Moodley, A. 2010. Treatment of a lower urinary tract infection in a cat caused by a multi-drug methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* and *Enterococcus faecalis*. *Journal of Feline Medicine & Surgery* 12, 802-806.
- Shewmaker, P.L., Camus, A.C., Bailiff, T., Steigerwalt, A.G., Morey, R.E., Carvalho, M.G.S. 2007. *Streptococcus ictaluri* sp. nov., isolated from Channel Catfish *Ictalurus punctatus* broodstock. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 1603-1606.
- Silva, B.C., Mouriño, J.L.P., Vieira, F.N., Jatobá, A., Seiffert, W.Q., Martins, M.L. 2012. Haemorrhagic septicaemia in the hybrid surubim (*Pseudoplatystoma corruscans* x *Pseudoplatystoma fasciatum*) caused by *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Research* 43, 908-916.
- Tavares-Dias, M., Ishikawa, M.M., Martins, M.L., Satake, F., Hisano, H., Pádua, S.B., Jerônimo, G.T., Sant Ana, A.R. 2009. Hematologia: ferramenta para o monitoramento do estado de saúde de peixes em cultivo. In: Saran-Neto, A; Mariano, W.S.; Pozzobon-Soria, S.F.. (Org.). Tópicos especiais em saúde e criação animal. 1ª ed. São Carlos: Pedro & João Editores, v. 1, p. 43-80.
- Toranzo, A.E., Cutrín, J.M., Roberson, B.S., Núñez, S., Abell, J.M., Hetrick, F.M., Baya, A.M. 1994. Comparison of the taxonomy, serology, drug resistance transfer, and virulence of *Citrobacter freundii* strains from mammals and poikilothermic hosts. *Applied and environmental microbiology* 60, 1789-1797.
- Wang, P.C., Lin, Y.D., Liaw, L.L., Chern, R.S., Chen, S.C. 2008. *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* also causes white muscle disease in farmed giant freshwater prawns *Macrobrachium rosenbergii*. *Diseases of aquatic organisms* 79, 9-17.

- Wang, Q.Q., Zhang, C.F., Chu, C.H., Zhu, X.F. 2012. Prevalence of *Enterococcus faecalis* in saliva and filled root canals of teeth associated with apical periodontitis. *International Journal of Oral Science* 4, 19-23.
- Wichtel, M.E.G., Fenwick, S.G., Hunter, J., Stephenson, A., Martin, D., Wichtel, J. J. 2003. Septicaemia and septic arthritis in a neonatal calf caused by *Lactococcus lactis*. *Veterinary record* 153, 22-23.
- Zechini, B., Cipriani, P., Papadopoulou, S., Di Nucci, G., Petrucca, A., Teggi, A. 2006. Endocarditis caused by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* in a patient with atrial myxoma: a case report. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 56, 325-328.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo foi mais uma etapa de trabalhos pioneiros iniciados por pesquisadores e alunos estagiários do Laboratório de Piscicultura da *Embrapa Agropecuária Oeste*. Entre as primeiras abordagens diagnósticas utilizadas foram pesquisas sobre a fauna parasitária de bagres nativos criados no Brasil central, que por sua vez resultaram publicações como as de Ishikawa et al. (2011, 2012) e Pádua et al. (2012, 2013). Com essa nova etapa de estudos envolvendo a microbiologia clínica, caracterizamos novos patógenos que foram responsáveis por causarem importantes perdas em fazendas-berçários.

As informações epidemiológicas e caracterização de patógenos são os alicerces para estruturarem as medidas profiláticas para efetivar um programa sanitário de controle e erradicação de patógenos nas pisciculturas. Portanto, essas informações devem ser agrupadas em benefício de melhorias na sanidade de surubins em criação. Novos avanços são necessários, especialmente no desenvolvimento de vacinas contra essas bacterioses.

Em adição, o processo de desenvolvimento e validação de vacinas demanda algum tempo. Portanto, os piscicultores precisam implantar medidas de profiláticas que impeçam a circulação desses patógenos dentro da fazenda-berçário, visto que todos nossos isolados são coliformes fecais facilmente encontrados na microbiota de animais homeotermos. Dessa forma, o processo de adubação dos viveiros para obtenção de plâncton para alimentação das larvas deve ser realizado com adubo químico, que é livre dessas bactérias, ou até mesmo adubo orgânico devidamente processado em sistemas de compostagem. Dessa forma, pode-se alcançar a inocuidade do produto para sua utilização sem representar sérios riscos sanitários aos peixes em criação.

## REFERÊNCIAS

- Ishikawa, M.M., Pádua, S.D., Ventura, A.S., Capecchi, R.S., Vendruscolo, A.B., Carrijo-Mauad, J. R. 2011. Infestação por ictio em surubim híbrido durante a fase inicial de criação. Embrapa Agropecuária Oeste. Comunicado técnico, 165.
- Ishikawa, M.M., Pádua, S.B., Ventura, A.S., Jerônimo, G.T., Russo, M.R., Carrijo-Mauad, J.R., Martins, M.L. 2012. Biologia e estratégias na sanidade de alevinos de bagres carnívoros. Documentos (Embrapa Agropecuária Oeste. Impresso), v. 115, p. 1-35, 2012.
- Pádua, S.B., Ishikawa, M.M., Kasai, R.Y.D., Jerônimo, G.T., Carrijo-Mauad, J.R. 2012. Parasitic infestations in hybrid surubim catfish fry (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *P. corruscans*). *Revista Brasileira de Medicina Veterinária* 34, 235-240.
- Pádua, S.B., Ishikawa, M.M., Ventura, A.S., Jerônimo, G.T., Martins, M.L., Tavares, L.E.R. 2013. Brazilian catfish parasitized by *Epistylis* sp. (Ciliophora, Epistylididae), with description of parasite intensity score. *Parasitology Research* 112, 443-446.