

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 29/01/2022.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

***Flavobacterium columnare*: CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR, PATOGENICIDADE E PERFIL DE
SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS**

Daniel de Abreu Reis Ferreira
Biólogo

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

***Flavobacterium columnare*: CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR, PATOGENICIDADE E PERFIL DE
SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS**

Discente: Daniel de Abreu Reis Ferreira

Orientadora: Dr(a). Fabiana Pilarski

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp,
Campus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de
Mestre em Microbiologia Agropecuária

F383f	Ferreira, Daniel de Abreu Reis Flavobacterium columnare : caracterização molecular, patogenicidade e perfil de susceptibilidade a antimicrobianos / Daniel de Abreu Reis Ferreira. -- Jaboticabal, 2021 41 f. : il., tabs., fotos Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientadora: Fabiana Pilarski 1. Genética microbiana. 2. Microbiologia. 3. Reação em cadeia da polimerase. 4. Filogenia. 5. Peixes de água doce. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: *Flavobacterium columnare*: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, PATOGENICIDADE E PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

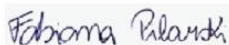
AUTOR: DANIEL DE ABREU REIS FERREIRA

ORIENTADORA: FABIANA PILARSKI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. FABIANA PILARSKI (Participação Virtual)
Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos / Centro de Aquicultura da UNESP, CAUNESP



Prof. Dr. DIOGO TERUO HASHIMOTO (Participação Virtual)
Laboratório de Genética / Centro de Aquicultura da UNESP, CAUNESP



Prof. Dr. MATEUS MALDONADO CARRIERO (Participação Virtual)
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - FZEA/USP / Pirassununga/SP

Jaboticabal, 29 de julho de 2021

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Daniel de Abreu Reis Ferreira nasceu na cidade do Rio de Janeiro-RJ no dia 06 de setembro de 1992, iniciou sua vida acadêmica ingressando no curso de Bacharelado em Ciências Biológicas no ano de 2014 pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp - Câmpus Jaboticabal, onde realizou estágio obrigatório no Departamento de Patologia Veterinária, onde realizou a maior parte das análises laboratoriais, desenvolvendo trabalho de conclusão de curso intitulado “Ocorrência de hemogregarinas em anuros no noroeste do estado de São Paulo”, o qual foi publicado na revista *Parasitology Research*, em 2019 iniciou o Mestrado Acadêmico em Microbiologia Agropecuária pela mesma instituição, desenvolvendo o presente estudo.

EPÍGRAFE

“O conhecimento é a algo que quanto mais se divide mais se multiplica, no dia em que entendermos isso, saberemos que podemos aprender com leigos e sábios, jovens e velhos, todos sempre têm algo a nos ensinar”

(José Vitor O. Amorim)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu avô
Manuel Reis Ferreira

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos que permitiu que eu realizasse esse projeto (131070/2019-3).

Ao Centro de Aquicultura da Unesp (CAUNESP) e a todos os funcionários e prestadores de serviço do setor, por fornecer subsídios para a realização do trabalho.

Ao programa de Pós Graduação em Microbiologia Agropecuária, a Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal e todos os professores e servidores pelo excelente serviço prestado, dando força a ciência e inovação no Brasil.

Ao (LaGeAq) Laboratório de Genética, Aquicultura e Conservação, especialmente ao prof. Diogo pelo conhecimento passado e fornecimento de equipamentos para realização das análises moleculares.

A minha esposa Marília que além de todo suporte emocional, por toda a parceria, amizade e pelo carinho que encontro no seu abraço nos momentos mais complicados, carinho este que se materializou na nossa linda filha Anna Lua, fonte de inspiração para enfrentar as adversidades e nos fazer pessoas melhores dia pós dia.

À minha família toda, aos meus pais Elaine e Lincoln por ser meu Norte, sendo uma referência em valores para a formação do meu caráter, aos meus irmãos Gabriel e Diogo pela parceria ao longo da vida.

A todos os meus companheiros do Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos do Caunesp, pelo profissionalismo e por aprender coisas novas com cada um de vocês sem exceção, agradeço a minha orientadora Fabiana Pilarski, por toda compreensão, paciência e espaço que ela fornece aos seus orientados, fico muito grato por ter desenvolvido esta dissertação em um meio tão rico como este.

Aos meus amigos Jaboticabalenses e São Carlenses, citar nomes seria algo injusto, dado o número de pessoas que encontrei na minha vida. Agradeço imensamente pelas nossas conversas ao longo da vida, tenho muito a agradecer, especialmente aos meus amigos de longa data Rafael, Fabi, Paulinho e Duda, por mesmo a distância não permitirem que estes laços tão importantes para minha vida se dissolvessem.

Ao meu cachorro Charlie por estar sempre ao meu lado e proteger nossa família.

SUMÁRIO

Página

RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Filo Bacteroidetes	3
2.2 Gênero <i>Flavobacterium</i>	4
2.3 Fatores de virulência da <i>F. columnare</i>	5
2.4 Epidemiologia e diversidade genética em <i>F. columnare</i>	7
2.5 Pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>) Holmberg 1887	8
3. OBJETIVOS GERAIS.....	10
3.1 Objetivos específicos.....	10
4. MÉTODOS.....	10
4.1. Cepa bacteriana e condições de crescimento.....	10
4.2. Infecção experimental e CL-50 em <i>Piaractus mesopotamicus</i>	11
4.3. Identificação molecular	12
4.3.1. Extração de DNA.....	12
4.3.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR)	12
4.3.3. Genotipagem pela técnica PCR-RFLP.....	13
4.4. Análise filogenética do gene 16S rRNA de <i>F. columnare</i>	13
4.5. Teste de sensibilidade antimicrobiana.....	14
4.5.1. Preparo do inóculo.....	15
4.5.2. Soluções estoque dos antimicrobianos	15
4.5.3. Concentrações mínima inibitória e bactericida.....	16
4.5.4. Teste da combinação dos antimicrobianos (sinergismo: checkerboard).....	17
5. RESULTADOS.....	18
5.1. Infecção experimental e CL-50 em <i>Piaractus mesopotamicus</i>	18

5.2. Genotipagem pela técnica PCR-RFLP	19
5.3. Análise filogenética do gene 16S rRNA de <i>F. columnare</i>	21
5.4.1 Teste de sensibilidade antimicrobiana	23
5.4.2 Teste da combinação dos antimicrobianos (sinergismo: checkerboard)	24
6. DISCUSSÃO.....	25
7. REFERÊNCIAS.....	30

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado “**Flavobacterium columnare: caracterização molecular, patogenicidade e perfil de susceptibilidade a antimicrobianos**”, protocolo nº 350/21, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Fabiana Pilarski, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 11 de fevereiro de 2021.

Vigência do Projeto	05/03/2021 a 30/04/2021
Espécie / Linhagem	<i>Piractusmesopotamicus</i>
Nº de animais	64
Peso / Idade	150g
Sexo	Não se aplica
Origem	Criadouro

Jaboticabal, 16 de fevereiro de 2021.


Profa. Dra. Paola Castro Moraes
Vice-Coordenadora – CEUA

***Flavobacterium columnare*: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR,
PATOGENICIDADE E PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE À
ANTIMICROBIANOS**

RESUMO - *Flavobacterium columnare* é uma bactéria oportunista que causa grande impacto na aquicultura mundial. Neste estudo, investigamos as características moleculares, a patogenicidade da bactéria ao pacu, *Piaractus mesopotamicus* e susceptibilidade antimicrobiana de *F. columnare* isolada de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*. A patogenicidade ao pacu foi avaliada através da infecção experimental por imersão. As características moleculares da bactéria foram determinadas através da técnica PCR-RFLP e sequenciamento de nucleotídeos com análise filogenética do gene 16S rRNA. A susceptibilidade à enrofloxacin (ENRO), florfenicol (FFC), oxitetraciclina (OTC), tianfenicol (TAP) e suas combinações foram avaliadas pelos métodos da microdiluição em caldo e teste de sinergismo, respectivamente. Como resultado, após a infecção experimental, colônias rizóides foram isoladas do rim cranial do pacu, após a realização da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para o gene 16S rDNA, confirmando tratar-se de *F. columnare*. Após análise por PCR-RFLP com a endonuclease *Hae III*, confirmou-se que a cepa pertence ao genótipo II. A análise filogenética do gene 16S rRNA demonstrou que a cepa de *F. columnare* está intimamente relacionada ao grupo genético tailandês (GG4), sendo esta a primeira ocorrência desta linhagem no Brasil. Para o teste de susceptibilidade aos antimicrobianos, a cepa foi classificada como tipo selvagem para todos os antimicrobianos testados. Em relação ao sinergismo entre os antimicrobianos, encontramos sinergismo entre tianfenicol e a enrofloxacin ($\Sigma FIC = 0,5$), atividade aditiva com a combinação de florfenicol com tianfenicol ($\Sigma FIC = 0,75$) e antagonismo na combinação de oxitetraciclina com enrofloxacin. Os resultados deste estudo são importantes para o controle da columnariose na piscicultura brasileira, pois demonstram que apesar da cepa ser altamente virulenta, os antimicrobianos mais utilizados na piscicultura brasileira são eficientes contra ela.

Palavras-chave: *Flavobacterium columnare*, *Piaractus mesopotamicus*, PCR-RFLP, filogenia, patogenicidade, atividade antimicrobiana.

***Flavobacterium columnare*: MOLECULAR CHARACTERIZATION,
PATHOGENICITY AND SUSCEPTIBILITY PROFILE TO ANTIMICROBIALS**

ABSTRACT - *Flavobacterium columnare* is an important pathogen of freshwater fish that has severe impacts on the commercial aquaculture sector. In this study, we investigated the molecular characteristics, pathogenicity against pacu, *Piaractus mesopotamicus*, and antimicrobial susceptibility of a virulent *F. columnare* isolated from Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, cultured in Brazil. The pathogenicity against pacu was analyzed by experimental columnaris infection by immersion challenge. Bacteria molecular characteristics were determined through PCR-RFLP, multiplex PCR, nucleotide sequencing and phylogenetic analysis of 16S rRNA gene. Susceptibility to enrofloxacin (ENRO), florfenicol (FFC), oxytetracycline (OTC), thiamphenicol (TAP), and their combinations were assessed by broth microdilution and checkerboard methods, respectively. As a result, after experimental infection, rhizoid-type colonies were isolated from the cranial kidney of pacu, which after performing PCR for 16S rDNA gene, were identified as *F. columnare*, and then submitted to PCR-RFLP using restriction enzyme *Hae III* demonstrated to belong to genomovar II, phylogenetic analyses reveals the strain is closely related to Thai isolates (GG4), this lineage was also identified in an outbreak in Brazilian fish farming for the first time. For the AST test the strain was classified as wild-type for all tested antimicrobials. Regarding the synergism between antimicrobials, we found synergism between thiamphenicol and enrofloxacin ($\Sigma\text{FIC} = 0.5$), additive activity with the combination of florfenicol with thiamphenicol ($\Sigma\text{FIC} = 0.75$), and antagonism in the combination of oxytetracycline with enrofloxacin. These results are very important because making it possible to assess the susceptibility of *F. columnare* to the main antimicrobials used in Brazilian fish farming, as well as to obtain a synergistic effect between thiamphenicol and enrofloxacin.

Keywords: *Flavobacterium columnare*, *Piaractus mesopotamicus*, PCR-RFLP, phylogeny, pathogenicity, antimicrobial activity.

1. INTRODUÇÃO

A aquicultura no Brasil apresentou grande expansão nos últimos anos, com aumento representativo desde 2010, praticamente dobrando a produção até 2018, demonstrando participação expressiva na produção de peixes no continente sul-americano, ocupando a segunda posição, atrás apenas do Chile em volume produzido e exportado. A atividade demonstra elevado potencial de crescimento, principalmente nos países em desenvolvimento, auxiliando no desenvolvimento social direto, através do abastecimento alimentar de milhões de famílias brasileiras, como fonte importante de proteínas e subsistência (IBGE, 2019).

A Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) reconhece o potencial da aquicultura brasileira como importante fornecedora de proteína para a segurança alimentar, e que poderá contribuir significativamente para o acesso completo a alimentos com qualidade adequada para a população global (Food and Agriculture Organization, 2018). Todavia, apesar do potencial brasileiro para produção de organismos aquáticos e as expectativas de expansão do setor, a realidade é diferente, uma vez que com a intensificação da atividade, o número de perdas por doenças bacterianas é muito grande, aliado ao número elevado de cepas altamente resistentes aos antimicrobianos disponíveis no mercado, o que pode acarretar em um crescimento menor do que o esperado para a atividade.

Dentre as espécies de peixes mais produzidas no Brasil, destaca-se o Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (Holmberg 1887, Characidae, Serrasalminae), espécie nativa da América do Sul, que tem excelentes características produtivas (Bernardino & Colares de Melo, 1989), com produção estimada em 11,5 mil toneladas (IBGE 2019), sendo uma das principais espécies produzidas na América Latina (Valladão et al., 2018), com expansão para países asiáticos e se tornando uma importante espécie de produção para a aquicultura global (FAO, 2010; Lin et al., 2015).

A *Flavobacterium columnare*, agente etiológico da columnariose é uma das bactérias que causam maior impacto nos diferentes sistemas de produção em todo o mundo. A bactéria apresenta a morfologia de bacilo longo, Gram

negativo, pertencente ao filo Bacteroidetes, considerada uma bactéria oportunista, presente tanto na microbiota da água como nos tecidos e ovos de peixes e de outros animais aquáticos (Barker et al., 1990). Esta bactéria é responsável por inúmeras perdas econômicas no setor aquícola, acometendo tanto peixes de produção como selvagens, principalmente nas formas jovens, (Figueiredo et al., 2005). Surto da bactéria costumam ocorrer após estresse, como elevada densidade populacional, qualidade da água inadequada, excesso de matéria orgânica ou lesões causadas na superfície corporal dos peixes (Decostere et al., 2000), todos muito comuns em uma piscicultura. Esta bactéria alimenta-se de células epiteliais, causando manchas acinzentadas e necrose na pele dos animais acometidos e nas brânquias provoca hiperplasia, congestão e necrose, causando asfixia (Declercq et al., 2013; Pilarski et al., 2008; Sebastião et al., 2015).

O Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos, do Centro de Aquicultura da Unesp – CAUNESP, Jaboticabal, SP, através do atendimento à piscicultores brasileiros demonstrou que a columnariose é a doença bacteriana que mais acomete peixes produzidos no Brasil (52,4%), fato observado também na cadeia produtiva do Bagre-do-canal americano (*Ictalurus punctatus*) nos Estados Unidos, na qual a bactéria é a segunda mais incidente, responsável por elevadas taxas de mortalidade (Wagner et al., 2002) e perdas econômicas anuais avaliadas em aproximadamente 30 milhões de dólares (Shoemaker et al., 2011).

A ampla distribuição apresentada pelo patógeno promove a diversificação genética da espécie. Estudos sobre a diversidade genética da *F. columnare* foram primeiramente realizados através da técnica da PCR-RFLP (*Amplificated Restriction Fragment Length Polimorfism*) utilizando polimorfismos existentes no gene 16S rRNA, sustentados por hibridização DNA-DNA e sequenciamento do gene 16S rRNA, no qual 23 estirpes da bactéria, de diferentes localidades e hospedeiros foram utilizadas e as mesmas classificadas em três grupos genéticos, com perfis de restrição distintos após digestão com a endonuclease *HaeIII* (genomovars I, II e III) (Triyanto & Wakabayashi, 1999). Depois disso, muitos estudos envolvendo a diversidade genômica de *F. columnare* foram realizados e subgrupos em genomovares

foram estabelecidos (Evenhuis et al., 2016; B. R. LaFrentz et al., 2014) sendo esta classificação utilizada como base para estudos envolvendo caracterização genética em *F. columnare*. Atualmente, a bactéria é dividida em quatro grupos genéticos (GGs), que apresentam especificidade no tipo de hospedeiro onde a cepa é identificada. Em estudo realizado por LaFrentz et al., (2018), com filogenias de genes estruturais, juntamente com o gene 16S rRNA, verificaram as mesmas topologias que distinguiram claramente os GGs em quatro grandes clados.

Mesmo com estes avanços na genética de *F. columnare*, poucos são os estudos que comparam a patogenicidade e resistência aos antimicrobianos em cepas obtidas de diferentes localidades do Brasil. Desta forma, o objetivo deste estudo foi classificar o GG de uma cepa altamente virulenta de *F. columnare*, isolada de um surto em uma tilapicultura localizada na região sudeste do país, através de análises filogenéticas e sequenciamento do gene 16S rRNA, bem como avaliar a susceptibilidade desta cepa frente a oxitetraciclina, florfenicol, tianfenicol e enrofloxacina, assim como a combinação destes antimicrobianos em pares através do teste de sinergismo e comprovar a patogenicidade da bactéria, através da infecção experimental por imersão com em pacu. Este estudo é inédito no Brasil e promoverá maior conhecimento sobre a cepa circulante, bem como das moléculas antimicrobianas para potencializar o seu controle e estabelecer medidas para sua prevenção na piscicultura.

REFERÊNCIAS

- Ashrafi, R., Pulkkinen, K., Sundberg, L., Pekkala, N., & Ketola, T. (2015). A multilocus sequence analysis scheme for characterization of *Flavobacterium columnare* isolates. **BMC Microbiology**, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0576-4>
- Assane, I. M., Gozi, K. S., Valladão, G. M. R., & Pilarski, F. (2019). Combination of antimicrobials as an approach to reduce their application in aquaculture: Emphasis on the use of thiamphenicol/florfenicol against *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture**, 507(May):, 238–245. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.04.021>
- Austin, B., & Austin, D. (2007). Bacterial Fish Pathogens Diseases of Farmed and Wild Fish. In *Springer-praxis books in aquatic and marine sciences*.
- Bader, J. A., Nusbaum, K. E., & Shoemaker, C. A. (2003). *Comparative challenge model of Flavobacterium columnare using abraded and unabraded channel catfish, Ictalurus punctatus (Rafinesque)*. 461–467.
- Barker, G. A., Smith, S. N., & Bromage, N. R. (1990). Effect of oxolinic acid on bacterial flora and hatching success rate of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, eggs. **Aquaculture**, 91(3–4):, 205–222. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(90\)90189-T](https://doi.org/10.1016/0044-8486(90)90189-T)
- Barony, G. M., Tavares, G. C., Assis, G. B. N., Luz, R. K., Figueiredo, H. C. P., & Leal, C. A. G. (2015). New hosts and genetic diversity of *Flavobacterium columnare* isolated from Brazilian native species and Nile tilapia. **Diseases of Aquatic Organisms**, 117(Shibata 2003):, 1–11. <https://doi.org/10.3354/dao02931>
- Basson, A., Flemming, L. A., & Chenia, H. Y. (2008). Microbial Ecology. **Microbial Ecology**, 55:, 1–14. <https://doi.org/10.1007/s00248-007-9245-y>
- Bernardet, J., & Bowman, J. P. (2006). The Genus *Flavobacterium*. In *The Prokaryotes* (Vol. 7). <https://doi.org/10.1007/0-387-30747-8>
- Bernardet, J. F., & Grimont, P. A. D. (1989). Deoxyribonucleic acid relatedness

- and phenotypic characterization of *Flexibacter columnaris* sp. nov., nom. rev., *Flexibacter psychrophilus* sp. nov., nom. rev., and *Flexibacter maritimus* Wakabayashi, Hikida, and Masumura 1986. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 39(3):, 346–354. <https://doi.org/10.1099/00207713-39-3-346>
- Bernardino, G., & Colares de Melo, J. S. (1989). *estimativa_tamanho_1989_01.pdf* (pp. 75–89).
- Blondeau, J. M., Borsos, S., Blondeau, L. D., Blondeau, B. J. J., & Hesje, C. E. (2012). Comparative minimum inhibitory and mutant prevention drug concentrations of enrofloxacin , ceftiofur , florfenicol , tilmicosin and tulathromycin against bovine clinical isolates of *Mannheimia haemolytica*. **Veterinary Microbiology**, 160(1–2):, 85–90. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.05.006>
- Cai, W., De La Fuente, L., & Arias, C. R. (2019). Transcriptome analysis of the fish pathogen *Flavobacterium columnare* in biofilm suggests calcium role in pathogenesis. **BMC Microbiology**, 19(1):, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1533-4>
- CLSI. (2015). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement Clinical and Laboratory Standards Institute. In *CLSI document M100-S16CLSI*, Wayne, PA (Vol. 32, Issue 1).
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). JModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, 9(8):, 772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- Darwish, A. M., Farmer, B. D., & Hawke, J. P. (2008). Improved method for determining antibiotic susceptibility of *flavobacterium columnare* isolates by broth microdilution. **Journal of Aquatic Animal Health**, 20(4):, 185–191. <https://doi.org/10.1577/H07-047.1>
- Darwish, A. M., & Ismaiel, A. A. (2005). Genetic diversity of *Flavobacterium columnare* examined by restriction fragment length polymorphism and

- sequencing of the 16S ribosomal RNA gene and the 16S-23S rDNA spacer. **Molecular and Cellular Probes**, 19(4):, 267–274. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2005.04.003>
- Declercq, A. M., Haesebrouck, F., Broeck, W. Van Den, Bossier, P., & Decostere, A. (2013). *Columnaris disease in fish : a review with emphasis on bacterium-host interactions*. 1–17.
- Decostere, A, Lammens, M., & Haesebrouck, F. (2000). *Difficulties in experimental infection studies with *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using immersion , oral and anal challenges*. 165–169. <https://doi.org/10.1053/rvsc.2000.0408>
- Decostere, Annemie, Haesebrouck, F., & Devriese, L. U. C. A. (1997). *Shieh Medium Supplemented with Tobramycin for Selective Isolation of *Flavobacterium columnare* (*Flexibacter columnaris*) from Diseased Fish*. 35(1):, 322–324.
- Dong, H. T., Lafrentz, B., Pirarat, N., & Rodkhum, C. (2015). Phenotypic characterization and genetic diversity of *Flavobacterium columnare* isolated from red tilapia , *Oreochromis sp .*, in Thailand. **Journal of Fish Diseases**, 901–913. <https://doi.org/10.1111/jfd.12304>
- Dong, Y., Zhao, X., & Domagala, J. (1999). *Effect of Fluoroquinolone Concentration on Selection of Resistant Mutants of *Mycobacterium bovis* BCG and *Staphylococcus aureus* †*. 43(7):, 1756–1758.
- Duerden, B. I. (1994). Virulence Factors in Anaerobes. **Clinical Infectious Diseases**, 18:.
- EUCAST. (2000). Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. **Clinical Microbiology and Infection**, 6(9):, 503–508. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2000.00149.x>
- Evenhuis, J. P., Mohammed, H., LaPatra, S. E., Welch, T. J., & Arias, C. R. (2016). Virulence and molecular variation of *Flavobacterium columnare* affecting rainbow trout in Idaho, USA. **Aquaculture**, 464:, 106–110.

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.06.017>

FAO. (2010). *THE STATE OF WORLD FISHERIES AND AQUACULTURE*.
FAO.

Figueiredo, H. C. P., Klesius, P. H., Arias, C. R., Evans, J., Shoemaker, C. A., Pereira, D. J., & Peixoto, M. T. D. (2005). Isolation and characterization of strains of *Flavobacterium columnare* from Brazil. **Journal of Fish Diseases**, 28(4):, 199–204. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2005.00616.x>

Foerster, S., Golparian, D., Jacobsson, S., Hathaway, L. J., Low, N., Shafer, W. M., Althaus, C. L., & Unemo, M. (2015). Genetic resistance determinants, in vitro time-kill curve analysis and pharmacodynamic functions for the novel topoisomerase II inhibitor ETX0914 (AZD0914) in *Neisseria gonorrhoeae*. **Frontiers in Microbiology**, 6(DEC):, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01377>

Food and Agriculture Organization. (2018). *World Fisheries and Aquaculture Sofia Report*. www.fao.org/publications

Gieseke, C. M., Crosby, T. C., Mayer, T. D., Bodeis, S. M., & Stine, C. B. (2016). Development of similar broth microdilution methods to determine the antimicrobial susceptibility of *Flavobacterium columnare* and *F. psychrophilum*. **Journal of Aquatic Animal Health**, 28(1):, 27–38. <https://doi.org/10.1080/08997659.2015.1105878>

Gieseke, C. M., Mayer, T. D., Crosby, T. C., Carson, J., Dalsgaard, I., Darwish, A. M., Gaunt, P. S., Gao, D. X., Hsu, H. M., Lin, T. L., Oaks, J. L., Pyecroft, M., Teitzel, C., Somsiri, T., & Wu, C. C. (2012). Quality control ranges for testing broth microdilution susceptibility of *Flavobacterium columnare* and *F. psychrophilum* to nine antimicrobials. **Diseases of Aquatic Organisms**, 101(3):, 207–215. <https://doi.org/10.3354/dao02527>

Griffin, B. R. (1991). Characteristics of a Chondroitin AC Lyase Produced by *Cytophaga columnaris*. **Transactions of the American Fisheries Society**, 120(3):, 391–395. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1991\)120](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1991)120)

- Hall, T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, 95–98.
- Henderson, I. R., Owen, P., & James, P. (1977). *MicroReview Molecular switches ± the ON and OFF of bacterial phase variation*. 33(1999):, 919–932.
- Hilton, T., Rosche, T., Froelich, B., Smith, B., & Oliver, J. (2006). Capsular Polysaccharide Phase Variation in *Vibrio vulnificus*. **Applied and Environmental Microbiology**, 72(11):, 6986–6993. <https://doi.org/10.1128/AEM.00544-06>
- Huelsenbeck, J. P., & Ronquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**, 17(8):, 754–755. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.8.754>
- Hugo, C. J., Jooste, P. J., Segers, P., Vancanneyt, M., & Kersters, K. (1999). A polyphasic taxonomic study of chryseobacterium strains isolated from dairy sources. **Systematic and Applied Microbiology**, 22(4):, 586–595. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(99\)80012-5](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(99)80012-5)
- Kayansamruaj, P., Dong, H. T., Hirono, I., Kondo, H., Senapin, S., & Rodkhum, C. (2017). Comparative genome analysis of fish pathogen *Flavobacterium columnare* reveals extensive sequence diversity within the species. **Infection, Genetics and Evolution**, 54:, 7–17. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.06.012>
- Kim, K. K., Kim, M. K., Lim, J. H., Park, H. Y., & Lee, S. T. (2005). Transfer of *Chryseobacterium meningosepticum* and *Chryseobacterium miricola* to *Elizabethkingia* gen. nov. as *Elizabethkingia meningoseptica* comb. nov. and *Elizabethkingia miricola* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 55(3):, 1287–1293. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63541-0>
- Klesius, P. H., Shoemaker, C. A., & Evans, J. J. (2008). *Flavobacterium columnare* chemotaxis to channel catfish mucus. **FEMS Microbiology**

Letters, 288(2):, 216–220. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01348.x>

Kristiansson, E., Fick, J., Janzon, A., Grabic, R., Rutgersson, C., & So, H. (2011). *Pyrosequencing of Antibiotic-Contaminated River Sediments Reveals High Levels of Resistance and Gene Transfer Elements*. 6(2):. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017038>

Kunttu, H. M.T., Jokinen, E. I., Valtonen, E. T., & Sundberg, L. R. (2011). Virulent and nonvirulent *Flavobacterium columnare* colony morphologies: Characterization of chondroitin AC lyase activity and adhesion to polystyrene. **Journal of Applied Microbiology**, 111(6):, 1319–1326. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05149.x>

Kunttu, Heidi M.T., Suomalainen, L. R., Jokinen, E. I., & Valtonen, E. T. (2009). *Flavobacterium columnare* colony types: Connection to adhesion and virulence? **Microbial Pathogenesis**, 46(1):, 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2008.10.001>

Laanto, E., Bamford, J. K. H., Laakso, J., & Sundberg, L. R. (2012). Phage-Driven Loss of Virulence in a Fish Pathogenic Bacterium. **PLoS ONE**, 7(12):. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053157>

LaFrentz, B. R., Lapatra, S. E., Shoemaker, C. A., & Klesius, P. H. (2012). Reproducible challenge model to investigate the virulence of *Flavobacterium columnare* genomovars in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Diseases of Aquatic Organisms**, 101:, 115–122. <https://doi.org/10.3354/dao02522>

LaFrentz, B. R., Waldbieser, G. C., Welch, T. J., & Shoemaker, C. A. (2014). Intragenomic heterogeneity in the 16S rRNA genes of *Flavobacterium columnare* and standard protocol for genomovar assignment. **Journal of Fish Diseases**, 37(7):, 657–669. <https://doi.org/10.1111/jfd.12166>

LaFrentz, Benjamin R., García, J. C., Waldbieser, G. C., Evenhuis, J. P., Loch, T. P., Liles, M. R., Wong, F. S., & Chang, S. F. (2018). Identification of four distinct phylogenetic groups in *Flavobacterium columnare* with fish host

- associations. **Frontiers in Microbiology**, 9(MAR):, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00452>
- LaFrentz, Benjamin R., & Klesius, P. H. (2009). Development of a culture independent method to characterize the chemotactic response of *Flavobacterium columnare* to fish mucus. **Journal of Microbiological Methods**, 77(1):, 37–40. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.12.011>
- Leber, A. L. (2016). *Clinical Microbiology Procedures Handbook* (4th ed.). ASM Press.
- Liao, C. H., & Wells, J. M. (1986). Properties of *Cytophaga johnsonae* strains causing spoilage of fresh produce at food markets. **Applied and Environmental Microbiology**, 52(6):, 1261–1265. <https://doi.org/10.1128/aem.52.6.1261-1265.1986>
- Lin, Y., Gao, Z., & Zhan, A. (2015). Introduction and use of non-native species for aquaculture in China: status , risks and management solutions. **Reviews in Aquaculture**, 7:, 28–58. <https://doi.org/10.1111/raq.12052>
- Liu, J., Gefen, O., Ronin, I., Bar-Meir, M., & Balaban, N. Q. (2020). Effect of tolerance on the evolution of antibiotic resistance under drug combinations. **Science**, 367(6474):, 200–204. <https://doi.org/10.1126/science.aay3041>
- Mark, B. M., & Zhu, Y. (2013). Gliding motility and por secretion system genes are widespread among members of the phylum bacteroidetes. **Journal of Bacteriology**, 195(2):, 270–278. <https://doi.org/10.1128/JB.01962-12>
- Mata, W., Putita, C., Dong, H. T., Kayansamruaj, P., Senapin, S., & Rodkhum, C. (2018). Quinolone-resistant phenotype of *Flavobacterium columnare* isolates harbouring point mutations both in *gyrA* and *parC* but not in *gyrB* or *parE*. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, 15:, 55–60.
- Nakagawa, Y., & Yamasato, K. (1996). Emendation of the genus *Cytophaga* and transfer of *Cytophaga agarovorans* and *Cytophaga salmonicolor* to *Marinilabilia* gen. nov.: Phylogenetic analysis of the *Flavobacterium-Cytophaga* complex. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 46(2):, 599–603. <https://doi.org/10.1099/00207713-46-2-599>

- Odds, F. C. (2003). Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 52(1):, 1. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg301>
- Olivares-Fuster, O., Shoemaker, C. A., Klesius, P. H., & Arias, C. R. (2007). Molecular typing of isolates of the fish pathogen, *Flavobacterium columnare*, by single-strand conformation polymorphism analysis. **FEMS Microbiology Letters**, 269(1):, 63–69. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00605.x>
- Ostland, V. E., Byrne, P. J., Hoover, G., & Ferguson, H. W. (2000). Necrotic myositis of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum): Proteolytic characteristics of a crude extracellular preparation from *Flavobacterium psychrophilum*. **Journal of Fish Diseases**, 23(5):, 329–336. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2000.00251.x>
- Pilarski, F., Rossini, A., & 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(2):, 409–414.
- Qiagen. (2020). *DNeasy® Blood & Tissue Handbook* (Issue 01).
- Rodrigues, J. A., Rangel, F. D., Trugilho, W. S., Christo, B. F., & Silva, E. C. G. da. (2016). Considerações do panorama produtivo da aquicultura no brasil. **Revista Univap**, 2237.
- Sato, K., Naito, M., Yukitake, H., Hirakawa, H., Shoji, M., McBride, M. J., Rhodes, R. G., & Nakayama, K. (2010). A protein secretion system linked to bacteroidete gliding motility and pathogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 107(1):, 276–281. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912010107>
- Sebastião, F. A., Furlan, L. R., Hashimoto, D. T., & Pilarski, F. (2015). Identification of Bacterial Fish Pathogens in Brazil by Direct Colony PCR and 16S rRNA Gene Sequencing. **Advances in Microbiology**, 05(06):, 409–424. <https://doi.org/10.4236/aim.2015.56042>
- Sebastião, F. D. A., Pilarski, F., Victor, M., Lemos, F., Pós-graduação, P. De, &

- Aplicada, M. (2013). *Composition of Extracellular Polymeric Substances (EPS) produced by Flavobacterium columnare isolated from tropical fish in Brazil*. 864:, 861–864.
- Shieh, H. S. (1980). “*Studies on nutrition of a fish pathogen, Flexibacter columnaris.*”
- Shoemaker, C. A., Olivares-Fuster, O., Arias, C. R., & Klesius, P. H. (2008). Flavobacterium columnare genomovar influences mortality in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Veterinary Microbiology**, 127(3–4):, 353–359. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.09.003>
- Shoemaker, C A, Olivares-fuster, O., Arias, C. R., & Klesius, P. H. (2008). *Flavobacterium columnare genomovar influences mortality in channel catfish (Ictalurus punctatus)*. 127:, 353–359. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.09.003>
- Shoemaker, Craig A., Klesius, P. H., Drennan, J. D., & Evans, J. J. (2011). Efficacy of a modified live Flavobacterium columnare vaccine in fish. **Fish and Shellfish Immunology**, 30(1):, 304–308. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.11.001>
- Smith, C. J., Rocha, E. R., & Paster, B. (2006). The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria - Symbiotic Associations, Biotechnology, Applied Microbiology. In *Applied Microbiology*. https://doi.org/10.1007/0-387-30746-x_22
- Stringer-Roth, K. M., Yunghans, W., & Caslake, L. F. (2002). Differences in chondroitin AC lyase activity of Flavobacterium columnare isolates. **Journal of Fish Diseases**, 25(11):, 687–691. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2002.00421.x>
- Sundell, K., & Wiklund, T. (2011). Effect of biofilm formation on antimicrobial tolerance of Flavobacterium psychrophilum. **Journal of Fish Diseases**, 34(5):, 373–383. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2011.01250.x>
- Thomas, F., Hehemann, J.-H., Rebuffet, E., Czejek, M., & Michel, G. (2011). Environmental and gut Bacteroidetes: the food connection. **Frontiers in**

Microbiology, 2(May):, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00093>

Triyanto, A., & Wakabayashi, H. (1999). *Flavobacterium columnare* , the causative agent of " columnaris disease " , is one of the most important bacterial pathogens in freshwater fishes (Wakabayashi , 1993). It was first isolated by Davis in 1922 , and named *Bacillus columnaris* . The organism. **Fish Pathology**, 34:, 65–71.

Ursing, J. B., & Lalucat, J. (1995). *Taxonomic Note : a Pragmatic Approach to the Nomenclature of Phenotypically Similar Genomic Groups*. July, 1995.

Valladão, G. M. R., Gallani, S. U., & Pilarski, F. (2018). South American fish for continental aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, 10:, 351–369. <https://doi.org/10.1111/raq.12164>

Wagner, B. A., Wise, D. J., Khoo, L. H., & Terhune, J. S. (2002). The epidemiology of bacterial diseases in food-size channel catfish. **Journal of Aquatic Animal Health**, 14(4):, 263–272. [https://doi.org/10.1577/1548-8667\(2002\)014<0263:TEOBDI>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8667(2002)014<0263:TEOBDI>2.0.CO;2)

Wintersdorff, C. J. H. Von, Penders, J., & Niekerk, J. M. Van. (2016). *Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer*. 7(February):, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00173>