

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

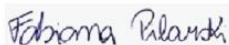
AUTOR: DANIEL DE ABREU REIS FERREIRA

ORIENTADORA: FABIANA PILARSKI

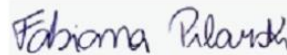
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:



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 enrofloxacina (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 genômico 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 enrofloxacina ($\Sigma\text{FIC} = 0,5$), atividade aditiva com a combinação de florfenicol com tianfenicol ($\Sigma\text{FIC} = 0,75$) e antagonismo na combinação de oxitetraciclina com enrofloxacina. 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 dolares (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 enrofloxacin, 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.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Filo Bacteroidetes

O filo Bacteroidetes compreende bactérias dos mais diversos habitats, como ambiente terrestre, aquático e do trato gastrointestinal de diferentes organismos, sendo o filo predominante encontrado na microbiota dos seres vivos (Mark & Zhu, 2013). A nomenclatura do filo foi modificada diversas vezes nos últimos anos. Primeiramente, foi denominado de *Cythofaga-Flexibacter-Bacteroides* (CFB), que mostra a grande diversidade de grupos bacterianos

que o compunham (Thomas et al., 2011). Hoje o filo é denominado de Bacteroidetes, apresenta espécies comuns à microbiota de diversas espécies de vertebrados tanto aquáticos como terrestres, em condições de estresse ou danos à integridade da mucosa intestinal, sendo considerados patógenos oportunistas (Smith et al., 2006) que provocam doenças em humanos (Kim et al., 2005), animais (Hugo et al., 1999) e plantas (Liao & Wells, 1986).

Os integrantes deste filo são bactérias Gram negativas com formato de bacilo, que geralmente apresentam motilidade por deslizamento, não necessitando de organelas como flagelos e pili para locomoção (Mark & Zhu, 2013). A patogenicidade de algumas bactérias está ligada a esta característica de locomoção, pela secreção de proteínas (Sato et al., 2010) e produção de uma grande variedade de enzimas degradadoras de polímeros que afetam os componentes celulares do hospedeiro, como por exemplo, hialuronidase, condroitina sulfatase, heparinases, glucosidases, dentre outras (Duerden, 1994).

Alguns membros deste filo são patógenos de importância para a aquicultura mundial, acometendo peixes produzidos e selvagens (Austin & Austin, 2007). As espécies de maior impacto na produção de peixes são a *Flavobacterium psychrophilum*, *F. columnare*, *F. branchiophilum*, *Tenacibaculum maritimum* e *Chryseobacterium scophthalmum* (Bernardet & Bowman, 2006).

2.2 Gênero *Flavobacterium*

Dentre as classes do filo Bacteroidetes, a *Flavobacteria* é a mais diversa, com 3.583 espécies de acordo com levantamento realizado por Thomas et al., (2011) utilizando a base de dados da NCBI (*National Center for Biotechnologic Information*).

Muitas espécies da família Flavobacteriaceae degradam derivados solúveis da celulose (Bernardet & Bowman, 2006) e a atividade celulolítica encontrada em algumas espécies difere os gêneros *Cytophaga* e *Flavobacterium*, sendo o gênero *Cytophaga* restrito a bactérias celulolíticas

(Nakagawa & Yamasato, 1996). A maioria das espécies do gênero *Flavobacterium* são capazes de hidrolisar polissacarídeos, sendo possível a observação da liquefação do meio em volta das colônias, característica evidenciada no cultivo em meio sólido de *F. flevense* (Bernardet & Bowman, 2006).

Em contraste, as espécies patogênicas do gênero para peixes, como a *F. columnare* e *F. psychrophilum* são incapazes de hidrolisar estes polissacarídeos (Bernardet & Grimont, 1989). A virulência destas espécies está ligada à degradação de complexos ácidos e polissacarídeos, abundantes no tecido conjuntivo. Estas proteases são responsáveis por desencadear úlceras e necroses cutâneas nos peixes infectados, pois são capazes de degradar componentes da matriz tecidual como a elastina, colágeno, fibrinogênio, gelatina, fibronectina, actina, miosina, dentre outros (Ostland et al., 2000; Stringer-Roth et al., 2002). A presença da condroitina AC liase é utilizada para identificar a espécie *F. columnare* diferenciando-a de outros patógenos do gênero (Griffin, 1991).

2.3 Fatores de virulência da *F. columnare*

Até o momento, sabe-se que as espécies patogênicas do gênero para animais aquáticos, são capazes de degradar alguns complexos ácidos e polissacarídeos do tecido conjuntivo, como o sulfato de condroitina e ácido hialurônico (Bernardet & Bowman, 2006; Griffin, 1991; Stringer-Roth et al., 2002).

A colonização do tecido hospedeiro pela bactéria ocorre em três etapas, pela atração (quimiotaxia), adesão (interações físico-químicas não específicas entre a bactéria e tecidos do hospedeiro) e agregação (interação entre adesinas da superfície bacteriana e receptores presentes nas superfícies de outros microrganismos) (Declercq et al., 2013).

Característica importante apresentada pela espécie compartilhada com outras do gênero é a capacidade de formar biofilme, produzindo e secretando substâncias poliméricas extraceulares ou polímeros de carboidratos. Em

estudo realizado por Sebastião et al., (2013) foram analisados os componentes da matriz de biofilme de 39 isolados de *F. columnare*, e foi identificada a presença de heteropolissacarídeos, compostos por ácido urônicos e açúcares, predominantemente a glicose. Estes polímeros desempenham várias funções que conferem à bactéria a capacidade de permanecer próxima ao hospedeiro em ambientes ricos em matéria orgânica, aumentando o risco de surtos recorrentes, como descrito por Basson et al., (2008).

Bactérias do gênero (*F. psycotrophilum*) formadoras de biofilme e que viviam em água com resíduos de oxitetraciclina e florfenicol, adquiriram maior resistência a esses fármacos, como demonstrado em estudo de concentração inibitória mínima (CIM) (Sundell & Wiklund, 2011).

Sabe-se que o fenômeno de variação de fase é um mecanismo que ocorre naturalmente em várias espécies bacterianas devido à alterações genômicas de ativação e desativação de genes. Quando ocorre aleatoriamente, forma fenotípicos variantes (Henderson et al., 1977). Observa-se alteração nas estruturas da membrana externa de *F. columnare* após a exposição à terapia de fagos, fenômeno que tem sido relatado recentemente em cepas da espécie (Kunttu et al., 2011; Heidi et al., 2009; Laanto et al., 2012).

Subculturas realizadas com diferentes variantes de *F. columnare* evidenciaram que o fenômeno de variação de fase ocorreu entre quatro fenótipos variantes da bactéria de forma hereditária (Kunttu et al., 2009) e este fenômeno é irreversível, como demonstrado pelo *Vibrio vulnificus* (Hilton et al., 2006), pois não se sabe ao certo quais mudanças no ambiente estimulam a ocorrência desse fenômeno.

Estudo recente que utilizou análise transcriptômica, identificou que genes ligados ao cálcio aumentavam também os fenótipos formadores de biofilme em isolados de *F. columnare* (Cai et al., 2019). Estes estudos são importantes, pois fornecem informações sobre um fenômeno pouco estudado e que pode ser um diferencial na epidemiologia da espécie.

Em ensaio de quimiotaxia por capilar em Bagres-do-canal (*Ictalurus punctatus*), foi observado que o processo de atração (quimiotaxia) da bactéria ocorre através do muco secretado pela pele e brânquias do hospedeiro, o qual estimulou maior expressão do gene *gldH* na bactéria e está relacionado à

motilidade por deslizamento. Foram observadas diferenças na proporção desta atração, sugerindo que este seja um importante fator de virulência (Klesius et al., 2008) e que este processo de quimiotaxia é específico para cada espécie de peixe (Lafrentz & Klesius, 2009). Outro estudo demonstrou que proteínas sinalizadoras, presentes no muco dos peixes também influenciam a quimiotaxia, aumentando a expressão de genes envolvidos no sequestro do ferro e estimulando a formação de biofilme em cepas de *F. columnare* dos genomovars I e II de (Lange et al., 2020).

Com relação à adesão, esta é considerada um importante fator de virulência de *F. columnare*, uma vez que estirpes mais virulentas tem maior capacidade de adesão nos tecidos do hospedeiro (Decostere et al., 1999).

A morfologia da colônia também tem relação com a capacidade de adesão da *F. columnare*. Colônias com aspecto rizoide e rugoso tem maior capacidade de adesão aos tecidos do hospedeiro (Kuntu et al., 2009).

2.4 Epidemiologia e diversidade genética de *F. columnare*

O impacto da *F. columnare* na piscicultura está relacionado com sua diversidade genética. Inicialmente, a bactéria foi classificada em três grupos genômicos, denominados genomovars (Triyanto & Wakabayashi, 1999). A classificação foi proposta por Ursing & Lalucat (1995) para agrupar espécies fenotipicamente idênticas, mas que compartilhavam baixo grau de hibridização (DNA-DNA). Para identificar a qual genomovar a cepa pertence, utiliza-se a técnica de PCR-RFLP com a enzima *HaeIII*.

Em estudos realizados com o intuito de analisar a virulência dos três genomovars na infecção experimental em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e bagre-do-canal americano (*Ictalurus punctatus*), foi observado maior virulência nas cepas pertencentes ao genomovar II (Shoemaker et al., 2008; Lafrentz et al., 2012). Em estudo desenvolvido por Klesius et al., (2008) para investigar a quimiotaxia entre estirpes de *F. columnare* classificadas como genomovars I e II ao muco de bagres-do-canal (*Ictalurus punctatus*) pode-se

constatar que a quimiotaxia depende dos componentes do muco e difere entre os genomovars.

Diversas endonucleases tem sido utilizadas para investigar a diversidade genética de cepas de *F. columnare*. Em estudo utilizando a técnica de PCR-RFLP e SSCP (*single strand conformation polymorphism*) pode-se constatar a existência de dois subgrupos genômicos dentro do genomovar I e II, o I-b e II-b (Olivares-Fuster et al., 2007).

A elevada disseminação do patógeno em escala global na aquicultura eleva a taxa de diversidade genética, mesmo entre indivíduos classificados como pertencentes ao mesmo genomovar. Ao analisar 12 estirpes da bactéria isoladas de trutas-arco-íris de diferentes pisciculturas nos Estados Unidos, constatou-se que todas as cepas pertenciam ao genomovar I e que estas tinham variações em graus de similaridade, constatado por análise filogenética (Evenhuis et al., 2016). Estudos como estes demonstram a importância da utilização de técnicas moleculares de baixo custo para o monitoramento da diversidade genética de *F. columnare*.

Mais recentemente foi identificado em estudo conduzido por Lafrentz et al., (2014), que utilizaram técnicas de clonagem gênica e gel de alta resolução, o qual pode levantar a hipótese de que alguns isolados apresentam alta heterogeneidade genômica, constatando a existência do genomovar I/II, com alto grau de heterogeneidade para o gene. Estes resultados permitiram estudos sobre a investigação e análise de múltiplos genes para genotipagem de cepas de *F. columnare*.

Em abordagem epidemiológica realizada por LaFrentz et al., (2018) foi observada íntima relação entre o hospedeiro e grupos genéticos de cepas de *F. columnare*. Ao realizar análise filogenética multilocus com os *housekeeping genes* 16S rRNA, *trpB*, *gyrB*, *dnaK*, *tuf*, *atpA* e *rpoD* foi identificado a formação de quatro grupos genéticos cuja incidência varia em diferentes espécies de peixes, sendo o gene *dnaK* o que apresentou maior suporte e agrupou de maneira mais robusta os grupos genéticos.

Em estudo realizado por Ashrafi et al., (2015), foi identificada diversidade genômica entre isolados da Finlândia pertencentes ao genótipo I, como diferenças no genoma e na patogenicidade dos isolados. Recentemente, LaFrentz et al., (2019) padronizaram uma reação para a PCR multiplex que rapidamente pode distinguir os fragmentos de bandas gerados entre os grupos genéticos e uma rápida genotipagem de baixo custo para monitorar a diversidade genética de *F. columnare*.

2.5 Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) Holmberg 1887

O pacu é um peixe nativo do Brasil, com distribuição por toda a Bacia do Prata e Bacia dos rios Paraná-Paraguai. Possui hábito alimentar onívoro, com a alimentação diversa, desde crustáceos e matéria vegetal como folhas, frutos e sementes (Rodrigues et al., 2016). Com a pesca extrativista, os estoques populacionais naturais têm sido reduzidos drasticamente, fato que impulsiona a criação desta espécie em todos os estados brasileiros.

É a segunda espécie nativa mais produzida no Brasil, pois apresenta características produtivas desejáveis, como carne saborosa e de alto valor comercial. Em sistema produtivo aceita bem dietas artificiais, possui rápido crescimento e rendimento no processamento, com 46,73% de filé sem pele; 16,57% de cabeça e 88,98% de rendimento de carcaça, por isso, a espécie é amplamente produzida em todas as regiões do Brasil (Vaz et al., 2000; Silva et al., 2012; Valladão et al., 2018).

A produção brasileira de pacu em 2019 foi de 14.562 toneladas (PEIXEBR, 2019). Todavia, mesmo com o constante crescimento da produção de pacu no Brasil, a atividade apresenta entraves por problemas relacionados às doenças, as quais provocam danos, muitas vezes irreversíveis, aos tecidos dos peixes e uma elevada taxa de mortalidade, com consequentes prejuízos econômicos (Sebastião et al., 2015). Dentre as bactérias que acometem a espécie, destaca-se a *F. columnare*, que provoca danos à superfície corporal e brânquias do peixe, muitas vezes irreversíveis e que provocam o desestímulo da atividade.

3. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi realizar a genotipagem de *F. columnare* por PCR-RFLP utilizando polimorfismo do gene 16S e investigar a atividade antimicrobiana desta cepa frente aos antimicrobianos oxitetraciclina, florfenicol, tianfenicol, enrofloxacin e da combinação deles, bem como verificar a virulência da cepa através da infecção experimental em juvenis de pacu.

3.1. Objetivos Específicos

- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) dos quatro antimicrobianos mais utilizados na piscicultura brasileira para o tratamento de bacterioses.
- Avaliar a atividade antimicrobiana da combinação do florfenicol com a oxitetraciclina, tianfenicol e enrofloxacin, bem como do tianfenicol com a oxitetraciclina e enrofloxacin e da oxitetraciclina com a enrofloxacin.
- Realizar a genotipagem de uma cepa de *F. columnare* pela técnica de PCR-RFLP para identificar o genótipo da bactéria.
- Elaborar a árvore filogenética a partir de amplificado do gene 16S rDNA.
- Verificar a virulência da cepa de *F. columnare* através da infecção experimental por imersão em pacu.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Cepa bacteriana e condições de crescimento

A cepa de *Flavobacterium columnare* (DV001) foi obtida de úlceras cutâneas de tilápia-do-Nilo com sinais clínicos característicos de columnariose. A bactéria foi identificada pelo Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos do Caunesp como agente causador de surto em uma piscicultura localizada no estado de São Paulo no ano de 2018. A bactéria foi cultivada em placas contendo meio Shieh (Shieh, 1980) suplementado com trombamicina (Annemie Decostere et al., 1997) por 24 horas a 25°C. Após o período de crescimento foi realizada a caracterização morfológica das colônias,

através da técnica da coloração de Gram. A bactéria foi identificada como bacilo Gram negativo longo e fino, sugerindo tratar-se de *F. columnare*. A identificação da espécie foi realizada através do sequenciamento do gene 16S-23S pelo Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO) da Unesp, Jaboticabal, SP. A sequência parcial da região 16S-23S foi depositada no Genbank sob o número de acesso MW186708. A cepa bacteriana foi armazenada em solução de glicerol (concentração final de 20% (v/v)) a -80°C, em criotubos estéreis, identificada e estocada no banco de cepas do Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos do Caunesp.

4.2 Infecção experimental e dose letal (DL-50%) de *F. columnare* para *Piaractus mesopotamicus*

O estudo da patogenicidade em pacus foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Escola de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Jaboticabal, São Paulo, Brasil, sob o protocolo número 350 / 21. Esta aprovação foi condizente com os princípios éticos propostos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Para o ensaio da DL-50%, a fim de estabelecer a dose bacteriana que mata 50% da população, foram utilizados 40 pacus saudáveis oriundos de piscicultura comercial, com peso médio de $264,8 \pm 74,6$ g e comprimento total de $23,5 \pm 1,9$ cm, os quais foram divididos em oito tanques (120 L), com aeração e renovação de água constante. Foram utilizados dois tanques para cada concentração (10^2 , 10^4 e 10^6 UFC/ml), com oito peixes em cada. Os peixes foram aclimatados durante 15 dias às condições laboratoriais antes do experimento. Durante este período, foram alimentados diariamente com ração comercial para peixes onívoros (Laguna, Socil-ADM) na quantidade de 3% do peso vivo. Para o preparo das doses infectantes, a cepa foi cultivada em caldo Shieh por 24 horas com agitação constante de 150 rpm em agitador orbital. Após o período de incubação, o caldo foi centrifugado (4°C, 1400 xg), o pellet formado foi lavado três vezes com PBS, diluído em PBS e a concentração

bacteriana foi ajustada em espectrofotômetro (Unico®) pela análise de absorbância do inóculo a 540 nm. Para confirmar a concentração bacteriana testada, diluições fator 10 de cada dose foram semeadas em meio de Shieh em duplicata. Deste modo, 150 ml das suspensões bacterianas a serem testadas foram adicionadas em 5 L de água, os peixes foram colocados neste recipiente contendo a bactéria por 40 minutos. Os peixes do grupo controle foram expostos ao PBS pelo mesmo período. Durante o período de exposição à bactéria, os peixes receberam aeração constante e foram brevemente imersos em água limpa (sem bactéria) antes de retornarem aos tanques. O monitoramento foi realizado por 15 dias, com a retirada dos peixes mortos ou até que as mortalidades apresentassem um “platô” e a mortalidade cumulativa para cada dose pudesse ser calculada, sendo selecionado um indivíduo “moribundo” para reisolamento do agente microbiano.

4.3. Identificação molecular

4.3.1. Extração de DNA

A cepa de *F. columnare* foi semeada em placas contendo meio Shieh e incubadas a 28°C por 48h e o DNA extraído através do kit de extração de DNA da Quiagen (DNeasy *Blood and Tissue Kit*), conforme as instruções do fabricante (Qiagen, 2020).

4.3.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

O DNA extraído foi avaliado em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Fisher®) para observação da concentração e mensuração da absorbância a 230, 280 e 260 nm para estabelecimentos das relações 230/260 e 280/260 indicando contaminantes por solventes orgânicos e proteínas respectivamente. A técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada utilizando o primer *forward* universal UN-20 (5'-GCCCTAGTTACCAGTTTTAC-3') (Triyanto & Wakabayashi, 1999) e o primer reverso redesenhado por Darwish & Ismaiel (2005) R1438 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), para obtenção de amplicons de aproximadamente 1.450 pb do gene 16S rRNA. Os ciclos e

temperatura de anelamento foram adotados de acordo com recomendações para o uso do kit da enzima “*Platinum II*” *Taq Hot-Start DNA Polymerase* (Invitrogen) sendo desnaturação inicial à 94°C por dois minutos, 30 ciclos de 94°C, 60°C e 68°C por 15 segundos cada, após os 30 ciclos a reação é resfriada se mantendo por 4°C.

4.3.3. Genotipagem pela técnica PCR-RFLP

Para identificação de marcadores moleculares, foi utilizado o método do Polimorfismo de Comprimento de Fragmento (RFLP) descrito em estudos anteriores (Darwish & Ismaiel, 2005; Evenhuis et al., 2016; Olivares-Fuster et al., 2007). Para tal, o produto da PCR do gene 16S rRNA foi utilizado em reação com endonuclease *Hae III* (New England, Biolabs), de acordo com recomendações do fabricante foram utilizadas uma unidade da enzima em reação à 37°C por uma hora. O uso desta técnica demonstra perfis de bandas claramente distintos entre os genótipos de *F. columnare* (Tryianto & Wakabayashi, 1999). Após a reação de digestão com a endonuclease, fragmentos de DNA foram corados com 1 µL de fluorescência para DNA de fita dupla (dsDNA) em gel de eletroforese de agarose (Nancy-520, Sigma-Aldrich) e submetidos a eletroforese em gel (1,5% agarose). A eletroforese foi realizada a 100V por 1 hora. O gel resultante foi fotografado sob a luz UV utilizando scanner de gel (Loccus Biotecnologia).

4.4 Análise filogenética do gene 16S rRNA de *F. columnare*

Para a análise filogenética, Os eletroferogramas obtidos pelo sequenciamento dos amplicons (senso e antisenso) dos genes 16S rRNA de *F. columnare*. Os amplicons foram utilizados para montar uma sequência consenso utilizando o *software* BioEdit (Hall, 1999), após verificação da qualidade das bases sequenciadas pelo *software* FinchTV. A correção das sequências foi realizada manualmente, após análise de confiabilidade ($Q \geq 10$). A sequência foi alinhada com sequências de *F. columnare* representando os quatro grupos genéticos para a matriz de dados com a sequência do gene 16S

rRNA. O estudo buscou incluir apenas sequências de isolados no qual o genômico foi aferido pela técnica PCR-RFLP assim como estirpes caracterizadas em quatro grupos genéticos do estudo de LaFrentz, et al. (2018). Sequências de *Flavobacterium aquatile* (NR_112978) e *Flavobacterium psychrophilum* (MN653384) foram utilizadas como grupo externo. O alinhamento foi realizado pelo software online Mapfft online (mafft.cbrc.jp). A matriz contendo sequências de *F. columnare* obtidas a partir da base de dados GenBank foi “trimada” e utilizada para análise bayesiana, com o software MrBayes 3.2.7 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001) após verificação do modelo evolutivo que o grupo de sequências apresentava para o gene, utilizando a informação Akaike geradas pelo software JModelTest2 (Darriba et al., 2012). Os arquivos gerados pela análise bayesiana foram editados e enraizados no software FigTree 3.2.

4.5. Teste de susceptibilidade antimicrobiana

A cepa de *F. columnare* foi semeada em placas contendo meio Shieh com o objetivo de determinar a atividade antimicrobiana *in vitro* (Concentração inibitória mínima – CIM e concentração bactericida mínima – CBM) da oxitetraciclina, florfenicol, tianfenicol e enrofloxacin. O Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) recomenda o uso de caldo Mueller-Hinton com cátions ajustados (CAMHB) para testes de susceptibilidade antimicrobiana para padronizar os resultados obtidos por diferentes laboratórios, entretanto, este não fornece condições para o crescimento de *F. columnare*, fato que foi confirmado por testes preliminares, sendo utilizado o meio diluído 1:5 (DCAMHB) seguindo recomendações de Gieseke et al., (2016).

Primeiramente, foi determinada a CIM dos antimicrobianos contra uma cepa padrão de Referência ATCC (*American Type Culture Collection*) *E. coli* (ATCC25922), utilizada como controle de qualidade (Darwish et al., 2008; Gieseke et al., 2016; Assane et al., 2019.)

Todas as CIMs foram determinadas em placas de micro titulação de 96 poços, estéreis e com tampa e fundo em forma de U; com base na metodologia

de microdiluição em caldo, como recomendado pelo CLSI (CLSI, 2014), com três réplicas.

4.5.1. *Preparo do inóculo*

Para o preparo do inóculo, seguimos a metodologia de Darwish (2008), com pequenas modificações, como o uso de placas contendo o meio de Shieh e o tempo de crescimento em estufa bacteriológica de 44-48 horas a 28° C. Para o preparo do inóculo, colônias de *F. columnare* foram transferidas para um recipiente contendo solução salina de 0,85% (NaCl). O conteúdo foi vortecado e 2 ml da porção homogênea da solução foram coletados (após os aglomerados celulares típicos desta espécie de bactéria serem depositados naturalmente no fundo) e o plaqueamento realizado em placas de Ágar Shieh.

Estudos preliminares foram realizados para testar o tempo de cultivo das colônias para facilitar a decantação dos aglomerados bacterianos (clumps). O ajuste da concentração bacteriana do inóculo inicial de 10^8 UFC ml⁻¹ foi realizada em espectrofotômetro (Unico®), utilizando leitura da absorbância no comprimento de onda de 540nm e se necessário à adição de solução salina estéril para ajuste. Para verificar a concentração do inóculo, foram realizadas diluições seriadas fator 10 em salina, o conteúdo vortecado e plaqueado, dispensando-se 100 ul das diluições em Agar Shieh com a contabilização das colônias após 48 horas.

4.5.3. *Soluções estoque dos antimicrobianos*

Foram preparadas soluções estoque dos antimicrobianos tianfenicol (TAP, lote: BCBP3008V, ≥99.0% pureza, Sigma-Aldrich), oxitetraciclina (OTC, lote: BCBG9599V, ≥95.0% pureza, Sigma-Aldrich), florfenicol (FFC, lote: MKBV1157V, ≥99.0% pureza, Sigma-Aldrich), e enrofloxacin (ENRO, lote: BCBM5502V, ≥98.0% pureza, Sigma-Aldrich) seguindo as recomendações dos fabricantes. Os antimicrobianos foram dissolvidos em água (ENRO), etanol (FFC e TAP) ou metanol (OTC) e diluídos em água para se obter as

concentrações de: 5.120 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (OTC e TAP), 1.280 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (FFC) e 1.000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (ENRO). As soluções foram armazenadas em ultrafreezer -80° C.

4.5.6. Concentrações mínima inibitória e bactericida

Para testar a susceptibilidade da bactéria aos antimicrobianos selecionados, foi realizado o teste de microdiluição em caldo (Muller, 2006). Todas as CIMs foram determinadas em placas de micro titulação de 96 poços, estéreis com tampa e fundo em forma de U, com base na metodologia de microdiluição em caldo (CLSI, 2014), com duas réplicas. Para isto, as soluções estoque dos antimicrobianos foram diluídas em DCAMHB para obter-se a concentração final de 32 $\mu\text{g ml}^{-1}$ para TAP e OTC, 64 $\mu\text{g ml}^{-1}$ para FFC e 4 $\mu\text{g ml}^{-1}$ para ENRO. Estas concentrações foram calculadas para serem duas diluições maior que a maior concentração testada no experimento, após diluição seriada fator 2 dos fármacos até o décimo poço da placa e inoculação da microplaca com 100 μl por poço do inóculo bacteriano na concentração de 10^6 UFC ml^{-1} totalizando 200 μl por poço. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica por 48 horas a 28°C. Os valores de CIM foram determinados pela inspeção visual de cada poço da placa, sendo considerada como a CIM a menor concentração do antimicrobiano que sem crescimento bacteriano visível.

Para determinar as concentrações bactericidas, os três poços com a menor concentração do fármaco, sem crescimento bacteriano visível, foram plaqueados em duplicata, com auxílio de alça de Henle. Depois de 48 horas de incubação a 28°C em placas agar Shieh, foi avaliado o crescimento bacteriano. Foi considerada CBM a menor concentração de antimicrobiano sem crescimento após a incubação.

Os valores de corte epidemiológicos de CIM (ECVs) para *F. columnare*, estabelecidos pela CLSI (2020b) foram usados para categorizar a cepa como tipo não selvagem (NWT) ou tipo selvagem (WT) com base nos valores de CIM de cada antimicrobiano. Devido à falta de critérios padronizados para interpretar a AST de TAP contra *F. columnare*, critérios alternativos, baseados

em pontos de corte derivados de dados microbiológicos, farmacocinéticos (usando doses clínicas aceitas) e farmacodinâmicas foram usados para categorizar o isolado como suscetível ($CIM \leq 8 \mu\text{g ml}^{-1}$) ou resistente ($CIM > 8 \mu\text{g ml}^{-1}$) a TAP (Assane et al., 2019).

4.5.7. Teste da combinação dos antimicrobianos (*sinergismo: checkerboard*)

Os antimicrobianos foram avaliados quanto à relação sinérgica entre eles em pares, estes dados fornecem subsídios para a redução do volume de antimicrobianos aplicados na aquicultura. Para isto os valores de CIM determinados na etapa preliminar foram utilizados para realizar novas diluições das soluções estoque dos antimicrobianos testados, seguindo o método descrito por Leber (2016). Para isto, as soluções estoque dos fármacos foram diluídas em meio DCAMHB para obterem-se concentrações três vezes maiores que a maior concentração testada. O meio DCAMHB foi inoculado objetivando a concentração de 10^6 UFC ml^{-1} e utilizado para inocular microplacas de 96 poços estéreis, com tampa e fundo em “U” contendo as concentrações dos antimicrobianos em diluição fator 2 dispostos de maneira horizontal para o antimicrobiano A (todas as linhas com a mesma dosagem do antimicrobiano A) e o antimicrobiano B diluído em sentido vertical (todas as colunas com a mesma concentração de B), sendo distribuídos 50 μl de cada fármaco diluído no respectivo poço. Em cada placa a primeira linha e a primeira coluna continham os antimicrobianos A e B isolados. Para identificar a atividade sinérgica, os limites foram determinados pela inspeção visual dos poços de menor concentração e que não apresentaram crescimento microbiano após 24/48 horas. A concentração inibitória fracionada (FIC) foi calculada pela equação:

$$FIC_x = \frac{MIC \text{ do antimicrobiano } x \text{ na combinação}}{MIC \text{ do antimicrobiano } x \text{ isolado}}$$

O índice da FIC (FICI) dos antimicrobianos combinados foi determinado a partir da somatória da FIC dos antimicrobianos A e B (Leber, 2016). Os valores obtidos foram interpretados a partir do critério interpretativo proposto pela EUCAST (European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing)

(EUCAST, 2000), caracterizando as relações entre os fármacos como sinérgica, antagônica, indiferente e aditiva.

5. Resultados

5.1. Infecção experimental e dose letal (DL-50%) de *F. columnare* para *Piaractus mesopotamicus*

O valor da DL-50% foi calculado a partir da porcentagem cumulativa de mortalidade de cada grupo experimental infectado. A concentração do incóculo bacteriano que causou a mortalidade de metade dos indivíduos ($n = 4$) foi de 150 ml de inóculo com concentração aproximada de 1×10^2 UFC / ml⁻¹ em 5 L de água. Os peixes infectados com a bactéria apresentaram letargia 24 horas após imersão na água contendo a bactéria, com aparecimento de manchas acinzentadas na região dorsal e congestão (Figura 1).

A mortalidade teve início 48 horas após a imersão, atingindo o “platô” com a última mortalidade registrada após 96 horas. Para os peixes infectados com inóculos das concentrações de 10^4 e 10^6 foi observado mortalidade de seis e sete indivíduos respectivamente.

Para confirmar a mortalidade dos peixes pela bactéria, foi realizado o reisolamento bacteriano do rim craniano e úlceras localizadas na superfície corporal de um pacu moribundo e o material semeado em placas contendo meio Shieh. As placas foram colocadas para crescimento em incubadora bacteriológica a 28° C por 48 horas. Após a obtenção de colônias puras características da bactéria, o DNA genômico foi extraído e o gene 16S sequenciado confirmando a infecção pela bactéria. Nenhuma mortalidade foi observada nos peixes do grupo controle (PBS).

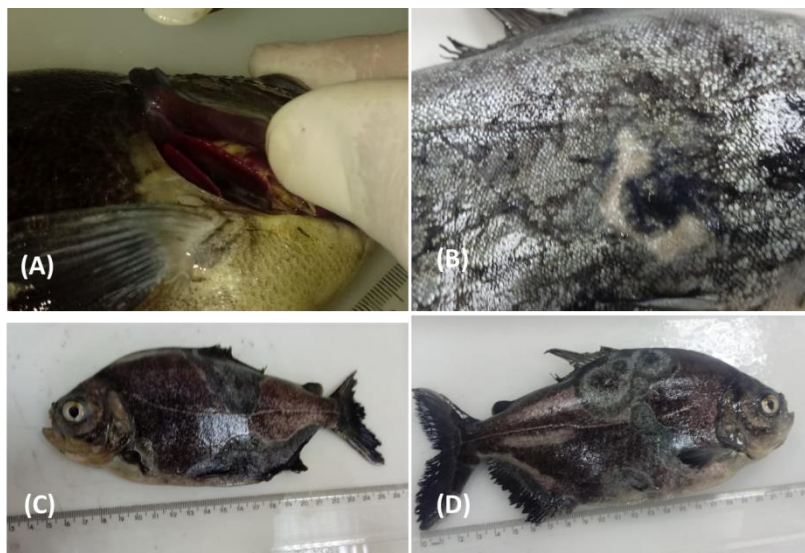


Figura 1. *Piaractus mesopotamicus* apresentando lesões características de columnariose. A - Colônização das brânquias, B, C e D manchas acinzentadas por toda a superfície corporal.

5.2. Genotipagem pela técnica PCR-RFLP.

Após a reação de amplificação para o gene 16S rRNA utilizando metodologia descrita por Darwish & Ismaiel (2005) e a visualização do produto amplificado com aproximadamente 1450 pb (Figura 2^a) por eletroforese gel agarose 1%, foi realizada a digestão com a endonuclease *HaeIII* (New England, Bio Labs), os fragmentos obtidos (Figura 2) foram visualizados por eletroforese gel agarose 1,5% demonstrando perfil correlato ao genomovar II. O perfil gerado pela reação de digestão foi comparado aos perfis dos três genomovars documentados por Darwish e colaboradores (2005), estudo que utilizou o mesmo primer reverso com a amplificação de um fragmento de aproximadamente 1450 pb.

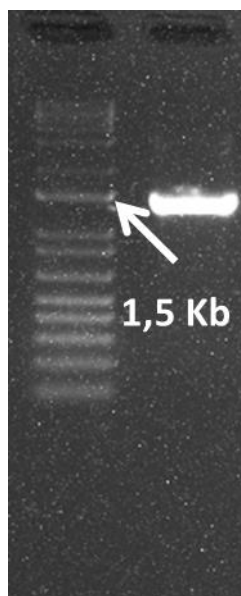


Figura 2a. Eletroforese em gel agarose 1% com visualização de produto amplificado do gene 16S rRNA, utilizando os primers UN-20 (Tryianto e Wakabayashi (1999) e R1438 (Darwish e Ismaiel, 2005), Linha 1: marcador de peso molecular 1Kb Plus (Invitrogen); Linha 2 produto amplificado da cepa amostrada (DV001) apresentando banda de aproximadamente 1450 pb .

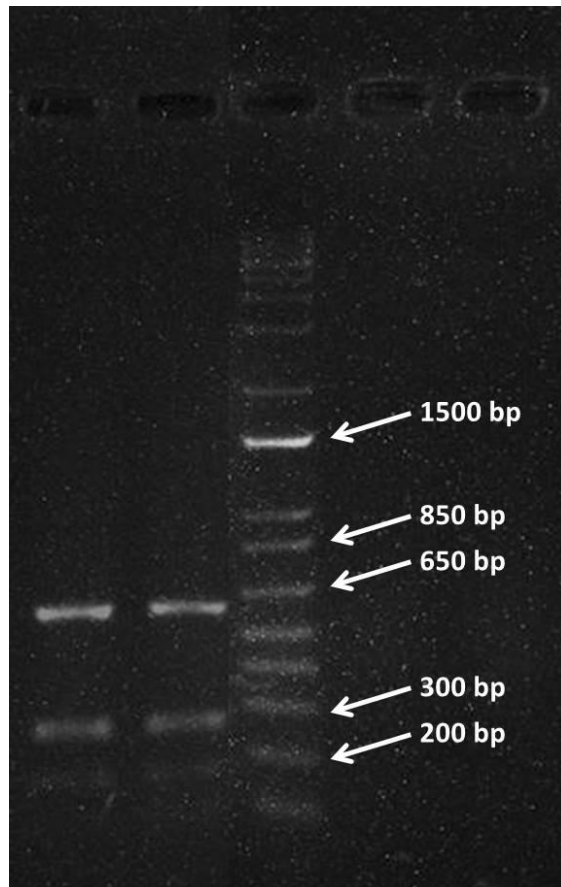


Figura 2b. Eletroforese em gel agarose 1,5% perfil de restrição gerado após digestão com enzima *HaeIII* (New England, BioLabs) utilizando amplificado do gene 16S, cepa demonstrou padrão de fragmentos correlato ao genótipo II. Linha 1 e 2: cepa DV001 (*Flavobacterium columnare*) Linha 3: marcador de peso molecular 1Kb Plus (Invitrogen).

5.3. 4.4 Análise filogenética do gene 16S rRNA de *F. columnare*

Sequência parcial do gene 16S rRNA de 1318 pb de *F. columnare*, obtido com os primers UN-20 e R1438 (Darwish & Ismaiel, 2005; Triyanto & Wakabayashi, 1999) foi gerada pela sequência consenso entre os amplicons senso e antisenso sequenciados, a sequência foi analisada e corrigida manualmente com auxílio do software FinchTV e depositada na base de dados do GenBank sob o número de acesso NW732243, para a construção da árvore filogenética (Figura 4), através de análise bayesiana, utilizando-se o “software” MrBayes (Huelsenbeck & Ronquist, 2001). Alterações nos parâmetros para inferência filogenética foram adotados de acordo com informação Akaike obtida através do “software” JModelTest2 (Darriba et al., 2012). Para a reconstrução filogenética foram selecionadas sequências do gene 16S rDNA de *F. columnare* depositadas no GenBank, abrangendo os quatro grupos genéticos diferentes localidades, os quais formaram quatro grandes clados com *bootstrap* >70, separando-os grupos genéticos, foi observado que a *F. columnare* deste estudo agrupou-se com o clado com cepas do GG4, formado prioritariamente por isolados tailandeses, encontrados em Tilápias caracterizados no estudo de Dong et al., (2015). O clado formado apresentou *bootstrap* (90%).

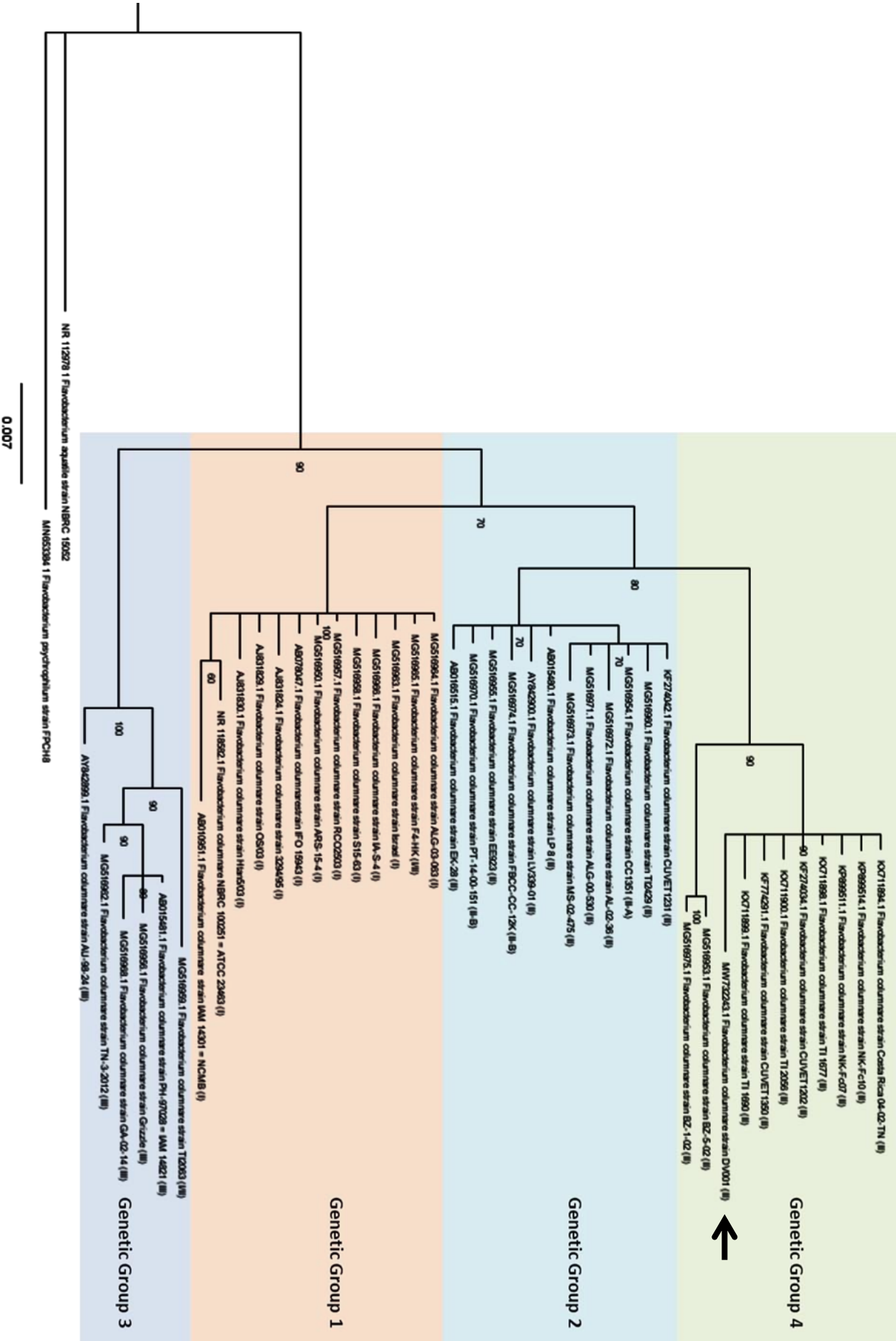


Figura 4. – Árvore filogenética construída com sequência do gene 16S de *F. columnare* utilizando os primers UN-20 e R1438 (Darwish & Ismaiel, 2005; Triyanto & Wakabayashi, 1999) e sequências de isolados de *F. columnare* depositadas no GenBank. Informações nos braços referem-se ao número de acesso do banco de dados do GenBank, ao nome da estirpe e (genomovar), números nos nós representam os valores de “bootstrap” para 10.000 gerações, modelo selecionado foi TPM3+I, *Flavobacterium aquatile* (NR_112978) e *Flavobacterium psychrophilum* (MN653384) foram utilizadas como grupo externo e enraizadas com o software FigTree v1.4.4, flecha indica a sequência da estirpe estudada (DV001).

5.1. Teste de sensibilidade antimicrobiana

A concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) dos três antimicrobianos para a cepa controle de qualidade, *Escherichia coli* (ATCC® 25922TM) em DCAMHB foi de 0,031 µg ml⁻¹, 0,5 µg ml⁻¹, 4 µg ml⁻¹ e >8 µg ml⁻¹ para ENRO, OTC, FFC e TAP respectivamente. Os valores identificados encontraram-se dentro dos publicados para o organismo controle de qualidade para o meio integral (CLSI, 2015; Assane et al., 2019) e o meio diluído DCAHB (Gieseke et al., 2012, 2016).

A cepa apresentou susceptibilidade a TAP (Assane et al. 2019) e foi caracterizada como selvagem em relação aos demais antimicrobianos (FFN, ENRO e OTC) (CLSI 2020b). O cálculo da concentração bacteriana no inóculo do teste foi de aproximadamente $2,7 \times 10^6$ seguindo recomendações da CLSI, os valores da CIM foram os mesmos para 24 ou 48 horas de incubação e todos os controles apresentaram crescimento visual a partir de 24 horas a 28°C. Os valores de CIM e CBM para a cepa de *F. columnare* em DCAMHB foram 0,062 µg ml⁻¹ tanto CIM quanto CBM frente a ENRO, CIM 0,062 µg ml⁻¹ e CBM 0,125 µg ml⁻¹ para OTC. Os valores da CIM para TAP e FFC foram de 2 µg ml⁻¹ e 0,5 µg ml⁻¹ respectivamente, apresentando atividade bacteriostática, não foi possível identificar a concentração bactericida para os dois antimicrobianos pois a mesma foi maior que a maior concentração testada (8 µg ml⁻¹ e 2 µg ml⁻¹).

5.1.1 Teste da combinação dos antimicrobianos (sinergismo: checkerboard)

Para o teste de sinergismo, os quatro antimicrobianos foram testados contra *F. columnare*, seguindo o método descrito por Leber (2016). Os valores mostraram efeito sinérgico ($\Sigma\text{FIC} = 0,5$) entre o TAP e a ENRO, reduzindo o valor da CIM em duas vezes tanto para a ENRO quanto para o TAP. Efeito aditivo ($\Sigma\text{FIC} = 0,75$) foi identificado na combinação de FFC e TAP e efeito antagônico para OTC e ENRO (Tabela 1).

Tabela 1. - Atividade antimicrobiana *in vitro* de diferentes combinações e concentrações de florfenicol (FFC), tianfenicol (TAP), oxitetraciclina (OTC) e enrofloxacin (ENRO) contra *F. columnare*.

Cepa	CIM antimicrobiano isolado ($\mu\text{g ml}^{-1}$)		do CIM ($\mu\text{g ml}^{-1}$) em combinação		Concentração inibitória fracionada (FIC)		Atividade
	FFC	OTC	FFC + OTC	FFC	OTC	ΣFIC	
Flavobacterium columnare (MW186708)	0,031	0,496	0,031 + 0,0155	1	0,0312	1,0312	IND
			0,031 + 0,124	1	0,25	1,25	IND
	FFC	TAP	FFC + TAP	FFC	TAP		
	0,062	2	0,031 + 0,5	0,5	0,25	0,75	ADTV
			0,031 + 1	0,5	0,5	1	IND
			0,0155 + 2	0,25	1	1,25	IND
	FFC	ENRO	FFC + ENRO	FFC	ENRO		
	0,062	0,122	0,062 + 0,0155	1	0,127	1,127	IND
			0,062 + 0,122	1	1	2	IND
	TAP	ENRO	TAP + ENRO	TAP	ENRO		

2	0,124	0.5 + 0,031	0,25	0,25	0,5	SYN
		1 + 0,031	0,5	0,25	0,75	ADTV
		2 + 0,00775	1	0,06	1,06	IND
TAP	OTC	TAP + OTC	TAP	OTC		
2	0,062	1 + 0,031	0,5	0,5	1	IND
		2 + 0,00775	1	0,125	1,125	IND
OTC	ENRO	OTC + ENRO	OTC	ENRO		
0,062	0,155	0,062 + 0,031	1	2	3	ANT

TAP: Thiamphenicol, OTC: Oxitetraciclina, ENRO: Enrofloxacin, FFN: Florfenicol, IND: Indiferente, ADTV: Aditiva, SYN: Sinérgica, ANT: Antagônica, critérios interpretativos dos valores de Σ FIC para caracterização da atividade de interação entre os fármacos foram adotados de acordo com EUCAST (*European Committee for Antimicrobial Susseptibility Testing*) (EUCAST, 2000).

6. DISCUSSÃO

Nosso estudo foi pioneiro em comprovar a patogenicidade de *F. columnare* no pacu por imersão. Os resultados demonstraram que a DL50% foi alcançada com dose bacteriana muito pequena (2 UFC/ml^{-1}), e sem o uso de métodos abrasivos antes da imersão em solução bacteriana, o que facilita a reprodução do método e garante resultados mais estáveis. Em estudo desenvolvido por Bader et al., (2003) comparou-se os métodos de abrasão e não abrasão em bagre americano (*Ictalurus punctatus*), antecedendo o desafio por imersão com *F. columnare*. Os autores observaram que o grupo que não sofreu abrasão apresentou mortalidade significativamente menor (no estudo foi testada a dose de $1 \times 10^8 \text{ UFC / ml}^{-1}$) com sobrevivência de 60% dos indivíduos. Pode-se comparar a diferença entre a dose utilizada no estudo acima citada e na utilizada em nosso estudo, ressaltando a virulência elevada da cepa circulante em uma das espécies de peixe mais produzidas no Brasil. Corroborando relatos sobre o elevado potencial de virulência de cepas pertencentes ao genômico II em países de clima tropical (Klesius et al., 2008; Shoemaker et al., 2008).

Em estudo realizado por LaFrentz et al., (2018) foi identificado associações entre os GGs e tipo de hospedeiro ao realizar inferências filogenéticas baseadas no gene 16S-rRNA e outros *housekeeping genes*. O estudo demonstrou a possibilidade de identificação da linhagem através de inferências filogenéticas.

A árvore filogenética do gene 16S rRNA gerada por análise bayesiana revelou agrupamento da cepa estudada com estirpes do GG4 caracterizadas na Taiândia por Dong et al., (2015), apresentando *bootstrap* de 90%. Notou-se a diversificação da cepa estudada ao observar homologia com as estirpes (CUVET) e o restante dos isolados do GG4. Esta linhagem foi documentada pela primeira vez neste estudo, em um surto em tilápia-do-Nilo no Brasil, reforçando a especificidade de isolados do GG4 em tilápias (LaFrentz et al., 2018). Estes resultados são de extrema importância, pois de acordo com a classificação proposta recentemente, sugere-se que os diferentes GGs possam

a vir separar-se em espécies, segundo resultados levantados por Kayansamruaj et al., (2017), sobre análises de diversidade genômica e patogenicidade entre isolados de diferentes GGs. Também foram identificadas diferenças no tamanho do genoma, que diferiram muito quando comparando as estirpes Tailândesas NK01, 1215, 1214.

Aparentemente, o GG4 tem distribuição documentada em países asiáticos e latino americanos, tendo como principal hospedeiro a tilapia-do-Nilo, (LaFrentz et al., 2018). Através de inferência filogenética do gene 16S rRNA observou-se uma distância filogenética entre a cepa brasileira e de outras cepas do grupo genético 4, levantando a hipótese sobre o grau elevado de diversidade genética entre os isolados brasileiros, contudo dados sobre a sequências de cepas brasileiras brasileiras de *F. columnare* são escassos, uma vez que apenas sequências da cepa BZ estão depositadas na base de dados da NCBI.

Nossos resultados diferem de Barony et al., (2015), que caracterizaram geneticamente cepas que acometiam diferentes pisciculturas no Brasil, e foram identificadas com similaridade filogenética (caracterizadas como genomovar II) com isolados dos Estados unidos (GG2), e a nossa, com cepa da Tailândia e Costa Rica (GG4). Ressalta-se a importância do uso de ferramentas moleculares e sequenciamento de importantes genes, aliados a testes de susceptibilidade antimicrobiana e virulência de isolados de *F. columnare* de diferentes pisciculturas brasileiras, para o monitoramento epidemiológico sobre a columnariose no Brasil, buscando estratégias que mitiguem o impacto causado por ela nos diferentes sistemas produtivos brasileiros.

A padronização dos testes de susceptibilidade antimicrobiana é necessária para a comparação entre os resultados obtidos em diferentes locais, com melhor entendimento da concentração de um determinado medicamento para o controle de diversas bactérias patogênicas na produção animal, assim como a identificação de cepas circulantes resistentes. O teste realizado neste estudo utilizou como controle de qualidade *E. coli* (ATCC® 25922™) e apresentou resultados dentro dos valores estabelecidos para a CIM

dos quatro antimicrobianos testados (CLSI, 2015; Gieseke et al., 2016; Assane et al., 2019) assegurando a confiabilidade do teste. Nossos resultados de CIM para *F. columnare* caracterizaram a cepa como tipo-selvagem (CLSI 2020b) aos três antimicrobianos testados (OTC, FFN e TAP), sendo susceptível a ENRO e com atividade bacteriostática para o tianfenicol e florfenicol com valores de CBM acima do estabelecido neste estudo.

Foi realizado o teste de atividade sinérgica *in vitro* contra a cepa estudada e como resultado, observou-se uma redução para $\frac{1}{4}$ do valor de CIM identificada para a ENRO e TAP com a concentração de 0,031 e 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente. Atividade aditiva da combinação de FFC e TAP ($\Sigma\text{FIC} = 0,75$) e atividade antagônica de OTC e ENRO foram identificadas neste estudo. Essas informações fornecem dados para planos alternativos para o controle de doenças bacterianas na aquicultura com a redução na concentração dos antimicrobianos utilizados e manutenção da eficácia dos mesmos (Assane et al., 2019).

O estudo apresenta resultados inovadores sobre a atividade sinérgica *in vitro* de antimicrobianos com extenso uso na aquicultura mundial, entretanto novos estudos são necessários para verificar os riscos da propagação de bactérias resistentes, pelo risco da transferência horizontal de genes de resistência aos antimicrobianos à bactérias presentes no meio aquático (Kristiansson et al., 2011; Wintersdorff et al., 2016). Estudo realizado por Dong et al., (1999) avaliou o crescimento de inóculos bacterianos com alta concentração (10^{10} UFC mL^{-1}) em placas contendo concentrações progressivas de fluoroquinolonas, simulando uma infecção aguda. Foi observado que em determinadas doses consideradas inibitórias as bactérias apresentavam um platô de crescimento e, em seguida outro pico de crescimento. Este platô refere-se ao estabelecimento de mutantes de primeiro passo como denomina o autor, sendo a concentração mínima de prevenção destes mutantes (MPC) a menor concentração do fármaco que impossibilita o surgimento desta primeira população identificada no platô, e que a proporção do número destes mutantes de primeiro passo é distinta para cada espécie bacteriana.

Em outro estudo, realizado para mensurar valores de MPC de cinco antimicrobianos frente à bactéria causadora da doença respiratória em bovinos *Mannheimia haemolytica*, foi elaborado um ranking de potência de antimicrobianos testados, sendo identificado uma ótima relação MPC/CIM para a enrofloxacin, posicionando a molécula como a segunda mais potente dentre os cinco agentes antimicrobianos testados em relação à prevenção de mutantes de primeiro-passo (Blondeau et al., 2012).

Em estirpes tailandesas de *Flavobacterium columnare* resistentes a quinolonas (QR), foi identificado que estas apresentavam mutações nos genes da *gyrA* e *parC* que codificam subunidades da girase e topoisomerase IV estruturas alvo das quinolonas e fluoroquinolonas. Esta aquisição de resistência em diferentes estirpes de *F. columnare* em países asiáticos pode estar relacionada ao uso frequente de enrofloxacin e OXO nas pisciculturas (Mata et al., 2018).

Outra ferramenta importante para avaliar a eficácia de um fármaco em relação à resistência aos antimicrobianos é a curva do tempo de morte que fornece dados complementares para analisar a dinâmica de fármacos na inibição do crescimento bacteriano (Foerster et al., 2015), sendo este um fator importante para a aquisição de resistência em populações microbianas (Liu et al., 2020).

Portanto, fazem-se necessários estudos futuros para avaliar a eficácia de antimicrobianos em sinergia com outros visando analisar o surgimento ou não de mutantes resistentes, além de estudos *in vivo*, fornecendo informações que auxiliem em estratégias para atenuar os riscos de uso destas moléculas antimicrobianas na aquicultura.

Assim, este estudo foi pioneiro em caracterizar a genética da *F. columnare* circulante no Brasil, a qual foi caracterizada como pertencente ao grupo genético IV, bem como classificar a cepa como altamente virulenta, após a realização do desafio por imersão no pacu. Após a realização do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos, a cepa foi classificada como tipo selvagem a todos os antimicrobianos testados, com sinergismo entre tianfenicol e a enrofloxacin, atividade aditiva com a combinação do florfenicol com

tianfenicol e antagonismo com a combinação da oxitetraciclina com a enrofloxacin.

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>