



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Escola de Veterinária

Programa de Pós-graduação em Ciência Animal

Victória Pontes Rocha

**PATÓGENOS EMERGENTES PARA A PISCICULTURA: CARACTERIZAÇÃO  
GENÉTICA E SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS**

Belo Horizonte

2023

Victória Pontes Rocha

**PATÓGENOS EMERGENTES PARA A PISCICULTURA: CARACTERIZAÇÃO  
GENÉTICA E SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Campos Tavares

Belo Horizonte

2023

R672p

Rocha, Victória Pontes, 1997 -  
Patógenos emergentes para a piscicultura : Caracterização genética e  
sensibilidade a antimicrobianos / Victória Pontes Rocha.- 2023.  
131 f. il

Orientador: Guilherme Campos Tavares  
Dissertação (Mestrado) apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária  
da UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em  
Ciência Animal.  
Área de concentração Medicina Veterinária Preventiva  
Inclui bibliografia.

1. Tambaqui - Teses - 2. Aquicultura - Teses - 3. Veterinária - Teses -  
I. Tavares, Guilherme Campos - II. Universidade Federal de Minas Gerais,  
Escola de Veterinária IV. Título.

CDD - 639.31

Bibliotecário responsável Marcio Alves dos Santos CRB 3589  
Escola de Veterinária, UFMG.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO - VICTÓRIA PONTES ROCHA

Às 09:00 horas do dia 16 de junho de 2023, reuniu-se, na Escola de Veterinária da UFMG a Comissão Examinadora de Dissertação, para julgar, em exame final, a defesa da dissertação intitulada:

**“PATÓGENOS EMERGENTES PARA A PISCICULTURA: CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS”**

Como requisito final para a obtenção do Grau de **Mestre em Ciência Animal**, área de concentração em **Medicina Veterinária Preventiva**. Abrindo a sessão, o(a) Presidente da Comissão, **Guilherme Campos Tavares**, após informar o teor das Normas Regulamentares da Defesa de Dissertação, passou a palavra ao candidato (a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do(a) candidato(a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do(a) candidato(a) e do público, para julgamento da dissertação, tendo sido atribuídas as seguintes indicações:

Examinador / Prof. (a) / Dr. (a)	Aprovado(a)	Reprovado(a)
Guilherme Campos Tavares	X	
Gustavo Moraes Ramos Valladão	X	
Henrique César Pereira Figueiredo	X	
Carlos Augusto Gomes Leal	X	

Face os resultados, o (a) aluno (a) foi considerado(a):

Aprovado(a)	X	Reprovado(a)	
-------------	---	--------------	--

Para concluir o Mestrado, o(a) candidato(a) deverá entregar a versão final da dissertação, acatando, se houver, as modificações sugeridas pela banca, e a comprovação de submissão de pelo menos um artigo científico em periódico recomendado pelo Colegiado dos Cursos. Para tanto, terá o prazo máximo de 60 dias a contar da data da defesa.

O resultado final, foi comunicado publicamente ao(a) candidato(a) pelo(a) Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o(a) Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 16 de junho de 2023.

Assinatura dos membros da banca:



Documento assinado eletronicamente por **Guilherme Campos Tavares, Professor do Magistério Superior**, em 18/06/2023, às 21:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Henrique Cesar Pereira Figueiredo, Professor do Magistério Superior**, em 21/06/2023, às 15:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gustavo Moraes Ramos Valladão, Usuário Externo**, em 21/06/2023, às 15:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Augusto Gomes Leal, Membro**, em 21/06/2023, às 16:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2366924** e o código CRC **7DBBE8E4**.

Dedico esta dissertação à minha família, ao meu companheiro e a todos que, de certa forma, contribuíram para a consolidação desta pesquisa.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por guiar-me e ser meu refúgio nos momentos mais difíceis.

À família incrível que eu tenho, Jorge e Luciany, meus pais, Vitor e Airton, meus irmãos. Obrigada por serem minha fortaleza. Nada disso seria possível sem o apoio e o amor incondicional de vocês.

Ao meu companheiro, Yan, pelo amor, pela cumplicidade, compreensão, pelos carinhos. Agradeço também a todos os ensinamentos e conhecimentos compartilhados. Você foi essencial durante esse período. Sem você, eu não teria chegado até aqui. Te amo!

Aos meus amigos de longas datas, Adalberto, Amanda, Jéssica Uchoa e Mariana Araújo, por me escutarem quando eu precisava e pelas boas risadas. Um agradecimento especial à Mariana, por ter sido um dos meus grandes pontos de apoio nos momentos em que mais precisei.

Às novas amigas que fiz, Agna, Aila, Henrique, Maria, Peter e Veronica. Obrigada pelas palavras de incentivo, pelos conselhos, pelo companheirismo e pelos nossos momentos de descontração e diversão. Com vocês, o caminho foi menos turbulento.

À minha terapeuta, Ana Luiza, por todo o trabalho realizado durante esse período do mestrado. Com certeza, amadureci e evoluí bastante graças ao seu trabalho. As nossas sessões foram importantíssimas para eu ter conseguido finalizar mais essa etapa da minha vida.

Aos membros e ex-membros do Laboratório de Doenças de Animais Aquáticos (AQUAVET), Júlio, Yan, Henrique, Fagner, Guilherme Queiroz, Maria, Sarah, Peter, Tarcísio, Renata e Márcia. Agradeço a todos pela paciência que tiveram comigo, pelo conhecimento repassado, pela prestatividade e, claro, por todos os momentos de tranquilidade e alegria.

Às alunas de iniciação científica, principalmente Júlia, Helena e Danise, por terem me ajudado tanto durante a condução deste trabalho.

Às técnicas, Dra. Júnia Pacheco e Dra. Anna Gabriela, por todo o empenho que tiveram em me ensinar e serem tão solícitas, sempre.

À Médica Veterinária Sonia Suzuki pelo envio dos peixes marinhos para exame bacteriológico.

À equipe do Laboratório de Microbiologia Aplicada (LAMAQ), principalmente à Prof<sup>a</sup> Silvia Gallani, pela disponibilização dos isolados que foram utilizados nesta pesquisa.

Ao Prof. Felipe Pierezan e a toda a sua equipe pelas análises histológicas realizadas nos peixes marinhos, e por todo o conhecimento compartilhado e prestatividade nos momentos em que precisamos de suas ajudas.

À equipe do Laboratório de Anaeróbios pelo empréstimo de recursos, quando necessário, e pelos conhecimentos repassados.

Ao Prof. Carlos Leal por ter concedido material e equipamento, quando foi preciso, para realização deste estudo.

Ao Prof. Henrique Figueiredo pelos conselhos e por sempre disponibilizar espaço e material, quando necessário, para execução dessa pesquisa.

Ao meu orientador, Prof. Guilherme Campos Tavares, por todos os ensinamentos, incentivos, investimentos, confiança, apoio e paciência. Obrigada por ter contribuído tanto para meu crescimento pessoal e profissional. Sem dúvidas, vou levar por toda a minha caminhada os seus ensinamentos. O meu muito obrigada por tudo!

À UFMG, em especial ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária, por ter possibilitado uma seleção de mestrado à distância. Além disso, por ter em seu quadro de docentes tantos profissionais capacitados e renomados que me assistiram em diversos momentos. Ademais, agradeço a todos que trabalham no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução desse e de tantos outros trabalhos que tive a oportunidade de participar.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo número 131830/2021-0, pela concessão de bolsa durante o período do mestrado.

Ao Programa Nacional de Cooperação Acadêmica na Amazônia (PROCAD/Amazônia), processo número 88881.200614/2018-01, financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo fomento a essa pesquisa.

“Ninguém nasce feito, é experimentando-nos  
no mundo que nós nos fazemos” (Paulo Freire).

## RESUMO

A produção e o consumo de peixes estão aumentando no mundo de forma considerável. No Brasil, apesar de seu vasto território, a piscicultura marinha ainda se encontra aquém da produção de peixes em águas interiores. Em ambos os tipos de cultivo, os problemas sanitários ocasionam perdas econômicas. *Edwardsiella tarda* e *Francisella salinarum* (syn. *F. marina*) são bactérias Gram negativas capazes de provocarem prejuízos em peixes de água doce e marinhos, respectivamente. Conhecer os aspectos epidemiológicos a respeito destes patógenos favorece a construção de medidas de prevenção e controle de doenças. Sendo assim, objetivou-se descrever surtos em garoupas e beijupirás, realizar o isolamento e a identificação dos isolados bacterianos obtidos. Além disso, analisar as diversidades genética e peptídica de cepas de *E. tarda* e *F. salinarum*, e avaliar o perfil de resistência dos isolados aos antimicrobianos. Foram enviados dez garoupas e dez beijupirás para exame bacteriológico. Órgãos de garoupas e beijupirás foram submetidos ao exame histopatológico. Os isolados obtidos foram identificados por MALDI-ToF e métodos moleculares. A diversidade genética de isolados de *E. tarda*, oriundos de tambaquis, e de *F. salinarum* foi analisada por meio da técnica de REP-PCR e a tipagem peptídica através de um dendograma de *Main Spectra Profile* (MSP). A susceptibilidade aos antimicrobianos foi avaliada pelo antibiograma e, além disso, em isolados de *E. tarda* verificou-se a presença de genes de resistência. Os peixes recebidos apresentaram sinais clínicos inespecíficos de enfermidades infecciosas. Na histopatologia, foram visualizadas, em baço, fígado e coração de alguns beijupirás, lesões granulomatosas. Das garoupas e beijupirás, foram isolados, predominantemente, *F. salinarum*. As análises de diversidades genética e peptídica tipificou as cepas de *E. tarda* em grupos diferentes. Com relação a *F. salinarum*, todos os isolados foram clonalmente relacionados. Pontos de corte epidemiológicos provisórios foram calculados para os isolados de *E. tarda* com relação aos antimicrobianos. Um total de 26,76%, 26,76%, 7,04%, 18,30%, 11,26% e 8,45% destes isolados, foram classificados como NWT para oxitetraciclina, norfloxacin, lincomicina-espectinomicina, amoxicilina, florfenicol e sulfametaxazol-trimetoprim, respectivamente. Destes, 15,49% foram considerados multirresistentes. Os genes *bla<sub>TEM</sub>*, *tetA*, *sulI* e *floR* foram encontrados em 39,43%, 47,88%, 11,26% e 19,71% dos isolados, respectivamente. Todos os isolados de *F. salinarum* foram resistentes à amoxicilina e ao sulfametoxazol-trimetoprim. Sendo assim, pode-se concluir que as cepas de *E. tarda* analisadas, possuem variações intraespecíficas, não sendo clonalmente relacionadas. Os isolados de *E. tarda* avaliados foram resistentes aos antimicrobianos licenciados para uso no Brasil, evidenciando um desafio

sanitário considerando a disseminação de cepas resistentes aos antimicrobianos utilizados na aquicultura nacional. Além disso, foi relatada a primeira ocorrência no mundo de *F. salinarina* associada a enfermidades em garoupas e beijupirás. Os isolados obtidos foram clonais entre si e sensíveis aos antimicrobianos autorizados para uso em pisciculturas no Brasil, sendo alternativas para o tratamento destes animais.

**Palavras-chave:** *Edwardsiella tarda*, tambaqui, *Francisella salinarina*, garoupa, beijupirá.

## ABSTRACT

Fish production and consumption are increasing in a specific way around the world. In Brazil, despite its vast territory, marine fish farming is still found here in the production of fish in inland waters. In both types of cultivation, health problems cause economic losses. *Edwardsiella tarda* and *Francisella salinarum* (syn. *F. marina*) are Gram-negative bacteria capable of causing harm to freshwater and marine fish, respectively. Know the epidemiological aspects regarding these pathogens, favoring the construction of disease prevention and control measures. Therefore, the objective was to describe outbreaks on clothing and cobia, performing the isolation and identification of the bacterial isolates found. Furthermore, analyze the genetic and peptide diversities of *E. tarda* and *F. salinarum* strains, and evaluate the resistance profile of the isolates to antimicrobials. Ten groupers and ten cobias were sent for bacteriological examination. Grouper and cobia organs were subjected to histopathological examination. The isolates found were identified by MALDI-ToF and molecular methods. The genetic diversity of *E. tarda* isolates, from tambaquis, and *F. salinarum* was confirmed using the REP-PCR technique and peptide typing using a Main Spectra Profile (MSP) dendrogram. Susceptibility to antimicrobials was assessed by antibiogram and, in addition, the presence of resistance genes was extracted from *E. tarda* isolates. The fish received showed non-specific clinical signs of infectious diseases. In histopathology, granulomatous lesions were seen in the spleen, liver and heart of some cobias. *F. salinarum* was predominantly isolated from groupers and cobia. The analyzes of genetic and peptide diversities typified *E. tarda* strains into different groups. Regarding *F. salinarum*, all isolates were clonally related. Provisional epidemiological breakpoints were calculated for *E. tarda* isolates with respect to antimicrobials. A total of 26.76%, 26.76%, 7.04%, 18.30%, 11.26% and 8.45% of these isolates were classified as NWT for oxytetracycline, norfloxacin, lincomycin-spectinomycin, amoxicillin, florfenicol and trimethoprim-sulfamethoxazole, respectively. Of these, 15.49% were considered multidrug resistant. The blaTEM, tetA, sul1 and floR genes were found in 39.43%, 47.88%, 11.26% and 19.71% of the isolates, respectively. All *F. salinarum* isolates were resistant to amoxicillin and trimethoprim-sulfamethoxazole. Therefore, it can be concluded that the *E. tarda* evidence strains have intraspecific options and are not clonally related. The *E. tarda* isolates evaluated were resistant to antimicrobials licensed for use in Brazil, highlighting a health challenge considering the spread of strains resistant to antimicrobials used in national aquaculture. Furthermore, the world's first occurrence of *F. salinarum* associated with diseases on clothing and cobia was reported. The isolates obtained were clonal to each other and sensitive to

antimicrobials authorized for use in fish farms in Brazil, representing alternatives for the treatment of these animals.

**Keywords:** *Edwardsiella tarda*, tambaqui, *Francisella salinarina*, grouper, cobia.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Lista dos picos dos *Main Spectra Profiles* das 14 cepas de *E. tarda* oriundas de *C. macropomum*. Os picos em comum a todos os MSPs foram representados pelos círculos azuis. Os picos comuns a dois ou mais MSPs são representados por círculos brancos. Picos comuns a isolados do grupo G1 estão marcados por círculos cinzas e os únicos picos pertencentes ao grupo G2 estão representados por círculos vermelhos. Os picos exclusivos de cada MSP foram representados em amarelo.....54
- Figura 2 – Dendograma de Dice construído a partir dos *Main Spectra Profiles* das 14 cepas de *E. tarda*, oriundas de *C. macropomum*. A linha vermelha representa o ponto de corte estabelecido.....55
- Figura 3 - Resultado da REP-PCR para as 14 cepas de *E. tarda* provenientes de *C. macropomum*. O dendrograma foi construído usando o coeficiente de Dice e o método UPGMA. ....55
- Figura 4 – Imagem do gel da corrida de eletroforese capilar realizada com os *amplicons* obtidos da PCR multiplex, para confirmação da identificação dos isolados de *E. tarda*. Nas posições B10 e B11 estão os controles positivos e negativo, respectivamente. Na posição A01 se encontra o marcador de tamanho de fragmento.....74
- Figura 5 – Disposição das zonas de inibição e dos pontos de corte epidemiológico dos antimicrobianos: neomicina, oxitetraciclina, lincomicina-espectinomicina, amoxicilina, para os 71 isolados de *E. tarda*.....79
- Figura 6 - Disposição das zonas de inibição e dos pontos de corte epidemiológico dos antimicrobianos: norfloxacina, eritromicina, nitrofurantoína, florfenicol e sulfametoxazol-trimetoprim, para os 71 isolados de *E. tarda*.....79
- Figura 7 - Análise de correspondência múltipla (ACM) de variáveis categóricas de isolados de *E. tarda* oriundos de tambaquis (verde), tilápias (azul) e outras espécies de peixes (vermelho). As variáveis (resistência/suscetibilidade a neomicina - Neo, oxitetraciclina – OTC, lincomicina-espectinomicina – LXS, amoxicilina – AMO, norfloxacina – NOR, eritromicina – Eri, nitrofurantoína – NIT, florfenicol – FFC, sulfametoxazol-trimetoprim – SXT e hospedeiros – tambaqui, tilápia e outras espécies) foram considerados associados quando agrupados em conjunto.....80
- Figura 8 - Imagem do gel da corrida de eletroforese capilar realizada com os *amplicons* obtidos da PCR para detecção do gene de resistência *bla<sub>TEM</sub>*. Nas posições A01 e F05 estão os controles

negativo e positivo, respectivamente. Na posição G03 se encontra o marcador de tamanho de fragmento.....	83
Figura 9 - Imagem do gel da corrida de eletroforese capilar realizada com os <i>amplicons</i> obtidos da PCR para detecção do gene de resistência <i>tetA</i> . Nas posições A01 e F05 estão os controles negativo e positivo, respectivamente. Na posição F06 se encontra o marcador de tamanho de fragmento.....	83
Figura 10 - Imagem do gel da corrida de eletroforese capilar realizada com os <i>amplicons</i> obtidos da PCR para detecção do gene de resistência <i>sulI</i> . Nas posições A11 e A12 estão os controles negativo e positivo, respectivamente. Na posição B12 se encontra o marcador de tamanho de fragmento.....	84
Figura 11 - Imagem do gel da corrida de eletroforese capilar realizada com os <i>amplicons</i> obtidos da PCR para detecção do gene de resistência <i>floR</i> . Nas posições C08 e C09 estão os controles negativo e positivo, respectivamente. Na posição F06 se encontra o marcador de tamanho de fragmento.....	84
Figura 12 – Alterações visualizadas no exame físico de garoupas e beijupirás. Garoupas apresentando ulcerações tegumentares (A), beijupirás com alterações oculares (B) e áreas hemorrágicas no fígado (C).....	104
Figura 13 – Imagens histológicas de baços dos beijupirás. Área de agregado de macrófagos e acúmulo de material eosinofílico amorfo (necrose) (seta vermelha) e um pequeno granuloma maduro (seta preta) (A). Grande granuloma maduro, com centro contendo restos celulares e parede fina constituída por macrófagos achatados (B) (seta preta). Aumento de 40x.....	106
Figura 14 – Imagens histológicas de músculo (A), pele (B) e baço (C) de garoupas. Áreas com lesões de miosite necrosante (A) e dermatite (B), além de acúmulos de fibrina (C). Aumentos de 10x (B) e 20x (A e C) .....	107
Figura 15 - Árvore filogenética utilizando o método <i>Neighbor-Joining</i> baseada nas sequências do gene 16S rRNA (~1500 pb) dos isolados obtidos neste trabalho em comparação a outras cepas da espécie <i>F. salinarina</i> e de espécies distintas do gênero <i>Francisella</i> (teste de <i>bootstrap</i> , 1000 réplicas). <i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>novicida</i> TCH2015 representa o <i>outgroup</i> .....	111
Figura 16 - <i>Main Spectra Profile</i> (MSP) da cepa de <i>F. salinarina</i> (FSM02). O eixo x representa a relação m/z e o eixo y a intensidade relativa da m/z.....	111
Figura 17 – Dendograma de MSPs demonstrando o resultado da tipagem peptídica para os nove isolados de <i>F. salinarina</i> .....	112

Figura 18 - Dendograma representando o resultado da REP-PCR para os nove isolados de *F. salinarina* oriundos de garoupas e beijupirás.....112

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Metadados relacionados a cepas de <i>E. tarda</i> oriundas de <i>C. macropomum</i> .....	47
Tabela 2. Valores de escores obtidos pelo MALDI-ToF para os isolados de <i>E. tarda</i> selecionados para tipagem proteica e resultado do sequenciamento do gene <i>dnaJ</i> .....	52
Tabela 3. Metadados dos isolados de <i>E. tarda</i> utilizados no estudo.....	66
Tabela 4. Dados dos <i>primers</i> (DA COSTA <i>et al.</i> , 2022) utilizados na reação de PCR multiplex para confirmação da identificação de <i>E. tarda</i> .....	69
Tabela 5. <i>Primers</i> utilizados nas reações de detecção de genes de resistência.....	72
Tabela 6. Identificação molecular dos isolados de <i>Edwardsiella tarda</i> .....	74
Tabela 7. Intervalos dos diâmetros da zona de inibição para as ATCCs 25922 e 33658 para os antimicrobianos, de acordo com o CLSI.....	76
Tabela 8. Valores mínimo e máximo, média e desvio padrão dos diâmetros das zonas de inibição dos isolados de <i>E. tarda</i> para os antimicrobianos.....	76
Tabela 9. Valores de ponto de corte epidemiológico provisório (COwt), e das zonas de inibição (mm) de cada isolado para os antimicrobianos.....	77
Tabela 10. Presença ou ausência dos genes <i>blatem</i> , <i>tetA</i> , <i>sulI</i> e <i>floR</i> e do fenótipo de resistência aos antimicrobianos: amoxicilina, oxitetraciclina, sulfametoxazol-trimetoprim e florfenicol, em relação aos isolados de <i>E. tarda</i> .....	81
Tabela 11. Resultados da associação entre as variáveis genótipo e fenótipo de resistência aos antimicrobianos dos isolados de <i>E. tarda</i> , pelo teste exato de Fisher e pelo coeficiente de Cramer .....	85
Tabela 12. Resultado da identificação bacteriana dos isolados oriundos de garoupas e beijupirás.....	108
Tabela 13. Resultado da caracterização bioquímica dos isolados FSM02 e FSM08, além dos dados das cepas previamente caracterizadas bioquimicamente em estudos anteriores, E95-16 (SOTO <i>et al.</i> , 2018) e SYSU SWM-1 (LI <i>et al.</i> , 2020) .....	109
Tabela 14. Identificação das cepas de <i>F. salinarina</i> pelo sequenciamento do gene 16S rRNA e MALDI-ToF (valores de escores antes e após a inclusão do MSP) .....	110

Tabela 15. Valores mínimo e máximo, média e desvio padrão dos diâmetros de halos de inibição dos antimicrobianos utilizados para os isolados de <i>F. salinarina</i> .....	113
Tabela 16. Ponto de corte epidemiológico provisório locais dos antimicrobianos para <i>F. salinarina</i> e resultado do antibiograma realizado nos nove isolados.....	114

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAI	Identidade média de aminoácidos
ACM	Análise de correspondência múltipla
AL	Alagoas
AM	Amazonas
AML/AMO	Amoxicilina
ANI	Identidade média de nucleotídeos
AQUAVET	Laboratório de Doenças de Animais Aquáticos
ASA	Ágar tripton de soja acrescido de 5% de sangue de carneiro
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BA	Bahia
BHI	Ágar infusão cérebro-coração
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
BTS	<i>Bacterial Test Standard</i>
CHAH	Ágar cisteína coração suplementado com 1% de hemoglobina bovina
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standard Institute</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
COwt	Valores de ponto de corte epidemiológico
DD	Dendograma de Dice
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DP	Desvio padrão
ERIC-PCR	<i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Polymerase Chain Reaction</i>
ERI	Eritromicina
EUA	Estados Unidos da América
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FFC	Florfenicol
GO	Goiás
HCCA	Ácido $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico
H <sub>2</sub> S	Sulfeto de hidrogênio
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
kb	Quilobases
kDa	Quilodaltons

LAEV	Laboratório de Anaeróbios
LAMAO	Laboratório de Microbiologia Aplicada de Organismos Aquáticos
LS/LXS	Lincomicina-espectinomicina
MALDI-ToF	<i>Matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MG	Minas Gerais
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
MMH	Caldo Muller-Hinton cátion ajustado glicerinado suplementado com 2% de suplemento VX e 0.1% de glicose
MLSA	<i>Multilocus Sequence Analysis</i>
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MRS	Ágar Man Rogosa & Sharpe
MSP	<i>Main spectra profile</i>
MT	Mato Grosso
m/z	Massa/carga
NEO	Neomicina
NIT	Nitrofurantoína
NOR	Norfloxacina
NRI	Interpretação da resistência normalizada
NWT	<i>Non-wild type</i>
mPCR	Reação em cadeia da polimerase multiplex
NaCl	Cloreto de sódio
NBF	Formalina a 10% neutra tamponada
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OT/OTC	Oxitetraciclina
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PeixeBR	Associação Brasileira da Piscicultura
PFGE	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Piauí
RAPD	<i>Random Amplification of Polymorphic DNA</i>
REP-PCR	<i>Repetitive Extragenic Palindromic Polymerase Chain Reaction</i>

RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico
RO	Rondônia
rpm	Rotações por minuto
SDI	Índice de diversidade de Simpson
SP	São Paulo
subsp.	Subespécie
SXT	Sulfametoxazol-trimetoprim
syn	Sinonímia
TCBS	Ágar tiosulfato, citrato, bile e sacarose
TSA	Ágar triptona de soja
TSB	Caldo triptona de soja
T3SS	Sistema de secreção do tipo III
T6SS	Sistema de secreção do tipo VI
UFC	Unidades formadoras de colônias
UPGMA	Média aritmética entre grupos de pares não ponderados
WC	Coefficiente de Wallace
WHO	<i>World Health Organization</i>
WT	<i>Wild type</i>

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>18</b>
<b>1.1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>1.2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>20</b>
1.2.1. PANORAMA DA AQUICULTURA MUNDIAL E NACIONAL.....	20
1.2.2. PRODUÇÃO DE PEIXES NATIVOS E MARINHOS .....	21
<b>1.2.2.1. Tambaqui</b> .....	<b>22</b>
<b>1.2.2.1.1. Desafios sanitários na produção de tambaquis</b> .....	<b>23</b>
<b>1.2.2.1.2. <i>Edwardsiella tarda</i></b> .....	<b>24</b>
<b>1.2.2.2. Beijupirá e garoupa</b> .....	<b>29</b>
<b>1.2.2.2.1. Desafios sanitários na produção de beijupirás e garoupas</b> .....	<b>31</b>
<b>1.3. OBJETIVOS</b> .....	<b>32</b>
1.3.1. OBJETIVO GERAL .....	32
1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	32
<b>1.4. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>33</b>
<b>CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA E PEPTÍDICA DE ISOLADOS DE <i>Edwardsiella tarda</i> ORIUNDOS DE TAMBAQUI</b> .....	<b>44</b>
<b>2.1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>44</b>
<b>2.2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>46</b>
2.2.1. SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS .....	46
2.2.2. IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA POR MALDI-ToF.....	47
2.2.3. ANÁLISE DE <i>MAIN SPECTRA PROFILE</i> (MSP) .....	48
2.2.4. CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA.....	49
<b>2.2.4.1. Extração do DNA</b> .....	<b>49</b>
<b>2.2.4.2. Sequenciamento do gene <i>dnaJ</i></b> .....	<b>49</b>
<b>2.2.4.3 <i>Repetitive extragenic palindromic</i> - PCR (REP-PCR)</b> .....	<b>50</b>
<b>2.3. RESULTADOS</b> .....	<b>51</b>
2.3.1. CONFIRMAÇÃO DA ESPÉCIE BACTERIANA .....	51
2.3.2. TIPAGEM DE CEPAS DE <i>E. tarda</i> .....	52
<b>2.4. DISCUSSÃO</b> .....	<b>56</b>
<b>2.5. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>58</b>
<b>CAPÍTULO 3 - IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA E GENÓTIPICA DE ISOLADOS BRASILEIROS DE <i>E. tarda</i> RESISTENTES AOS ANTIMICROBIANOS</b> .....	<b>64</b>
<b>3.1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>64</b>
<b>3.2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>66</b>

3.2.1. SELEÇÃO DE ISOLADOS DE <i>E. tarda</i> .....	66
3.2.2. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS.....	68
<b>3.2.2.1. Extração do material genético.....</b>	<b>68</b>
<b>3.2.2.2. PCR multiplex.....</b>	<b>68</b>
<b>3.2.2.3. Sequenciamento do gene dnaJ.....</b>	<b>69</b>
3.2.3. TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS .....	70
3.2.4. DETECÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA.....	71
3.2.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	73
<b>3.3. RESULTADOS .....</b>	<b>73</b>
3.3.1. IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA POR MÉTODOS MOLECULARES .....	73
3.3.2. TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS .....	76
3.3.3. AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DOS GENES DE RESISTÊNCIA.....	80
<b>3.4. DISCUSSÃO.....</b>	<b>85</b>
<b>3.5. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>90</b>
<b>CAPÍTULO 4 – ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO, DIVERSIDADE GENÉTICA E AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS DE <i>Francisella salinarina</i> ORIUNDOS DE PEIXES MARINHOS NO BRASIL .....</b>	<b>94</b>
<b>4.1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>95</b>
<b>4.2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>96</b>
4.2.1. RELATO DE CASO .....	96
4.2.2. AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA E EXAME BACTERIOLÓGICO .....	97
4.2.3. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA .....	97
4.2.4. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS POR MALDI-ToF EM TEMPO REAL E CONSTRUÇÃO DE <i>MAIN SPECTRA PROFILE</i> (MSP).....	98
4.2.5. ANÁLISES DA DIVERSIDADE DE PEPTÍDEOS DOS ISOLADOS DE <i>F. salinarina</i> POR MSP .....	99
4.2.6. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA .....	100
4.2.7. CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DOS ISOLADOS .....	100
<b>4.2.7.1. Extração do DNA.....</b>	<b>100</b>
<b>4.2.7.2. Sequenciamento do gene 16S rRNA.....</b>	<b>101</b>
<b>4.2.7.3. Análise filogenética.....</b>	<b>101</b>
<b>4.2.7.4. REP-PCR.....</b>	<b>102</b>
4.2.8. TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS .....	103
<b>4.3. Resultados.....</b>	<b>104</b>
4.3.1. EXAME FÍSICO .....	104

4.3.2. EXAME HISTOPATOLÓGICO.....	104
<b>4.3.2.1. Beijupirás.....</b>	<b>104</b>
<b>4.3.2.2. Garoupas.....</b>	<b>106</b>
4.3.3. IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA PELO MALDI-ToF .....	107
4.3.4. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA .....	108
4.3.5. CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA.....	110
<b>4.3.5.1. Sequenciamento do gene 16S rRNA.....</b>	<b>110</b>
<b>4.3.5.2. Árvore filogenética.....</b>	<b>110</b>
4.3.6. CONSTRUÇÃO DE MSP PARA <i>F. salinarina</i> .....	111
4.3.7. DIVERSIDADES GENÉTICA E PEPTÍDICA .....	112
<b>4.3.7.1. Tipagem por MSP.....</b>	<b>112</b>
<b>4.3.7.2. REP-PCR.....</b>	<b>112</b>
4.3.8. ANTIBIOGRAMA .....	113
<b>4.4. DISCUSSÃO.....</b>	<b>114</b>
<b>4.5. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>118</b>
<b>CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>122</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>123</b>

## CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1. INTRODUÇÃO

Os dados de produção e consumo de pescado aumentam gradativamente. Em 2020, a produção global foi de 178 milhões de toneladas de organismos aquáticos. Destas, 57,5 milhões de toneladas foram relacionadas a produção de peixes. Desse total, 49,1 milhões eram provenientes da produção em água doce e, cerca de, 8,3 milhões de toneladas eram relacionadas a produção marinha e costeira (FAO, 2022). A produção de peixes no Brasil, no ano de 2022, foi de 860 mil toneladas de peixes, sendo a tilápia do Nilo a espécie de peixe mais produzida, com, cerca de 550 mil toneladas (PEIXEBR, 2023). A espécie nativa mais produzida no país é o tambaqui. Em 2021, sua produção ultrapassou 94 mil toneladas (IBGE, 2022). Embora, os dados de produção de peixes marinhos sejam desconhecidos, através de relatórios estatísticos oficiais, a garoupa e o beijupirá despertam interesse nos produtores (NASCIMENTO et al., 2022).

Tambaqui, *Colossoma macropomum*, é um peixe nativo da bacia Amazônica que se destaca culturalmente e comercialmente em vários países da América do Sul (VALLADÃO et al., 2018), além de alguns países da América Central e da Ásia (WOYNÁROVICH & VAN ANROOY, 2019). Essa espécie possui elevado potencial para produção em cativeiro, em decorrência de suas características zootécnicas (BARÇANTE & SOUSA, 2015; VAL & DE OLIVEIRA, 2021; WOOD et al., 2017).

Beijupirá, *R. canadum*, é um peixe que apresenta ampla distribuição geográfica, podendo ser encontrado em águas tropicais e subtropicais dos oceanos (HAMILTON et al., 2022). Os maiores produtores dessa espécie são a China e o Taiwan (FAO, 2023). A garoupa-verdadeira, *E. marginatus*, é uma espécie que também possui ampla distribuição geográfica, estando presente no nordeste e sudoeste do Oceano Atlântico, no Mar Mediterrâneo, no litoral do continente Africano e no sudoeste do Oceano Índico e no Atlântico (NASCIMENTO et al., 2022). Os principais produtores de garoupas são a China, Taiwan e Indonésia (RIMMER & GLAMUZINA, 2019). Carnes de excelente qualidade, ótimas taxas de conversão alimentar favorecem o interesse no cultivo de garoupas e beijupirás no Brasil (HAMILTON et al., 2022). Contudo, os problemas sanitários são alguns obstáculos enfrentados na produção de peixes de água doce e marinhos.

Enfermidades infecciosas provocam grandes perdas econômicas para o piscicultor (TAVARES-DIAS & MARTINS, 2017). Os parasitos e as bactérias são os principais

agentes causadores de surtos em *C. macropomum*. Acantocéfalos, crustáceos, monogenéticos, mixosporídeos, protozoários e tricodinídeos, são exemplos de parasitos que podem acometer tambaquis (GONÇALVES *et al.*, 2018; VALLADÃO *et al.*, 2018). Já com relação as bactérias, *Aeromonas hydrophila* (GALLANI *et al.*, 2020), *A. jandaei* e *Flavobacterium columnare* (MIELKE *et al.*, 2022) foram as espécies comprovadas cientificamente como patógenos para tambaquis. No entanto, recentemente, REIS *et al.* (2023) observou que *Edwardsiella tarda* foi capaz de causar lesões condizentes com infecção granulomatosa multifocal em rim e baço de tambaquis infectados experimentalmente. Recentemente, tem sido observado um aumento da ocorrência de surtos de doenças bacterianas em tambaquis, associados com o isolamento de *E. tarda* (REIS *et al.*, 2023).

*E. tarda* é uma bactéria Gram-negativa, considerada como patógeno oportunista, que possui um amplo espectro de hospedeiros, além de ter potencial zoonótico (COLES *et al.*, 1978; LEE *et al.*, 2018; MOHANTY & SAHOO, 2007; XU & ZHANG, 2014). Em peixes, já foi isolada de várias espécies, sendo sua ocorrência associada a surtos com mortalidades registrada no Brasil (DAVIES *et al.*, 2018; LIMA *et al.*, 2008; PROIETTI-JÚNIOR *et al.*, 2017; WINCKLER *et al.*, 2015). Para a aquicultura, essa bactéria possui grande importância. Além dos sinais clínicos inespecíficos e mortalidades ocasionadas, há dados que demonstram a resistência de isolados dessa espécie bacteriana a várias classes de antimicrobianos (ALGAMMAL *et al.*, 2022; EZZAT *et al.*, 2021; NIU *et al.*, 2019; REICHLEY *et al.*, 2017), sendo uma barreira no estabelecimento de medidas de controle de enfermidades causadas por essa bactéria.

No Brasil, apesar de escassos os relatos acerca de doenças infecciosas acometendo peixes marinhos, a maioria se restringe a descrição de infecções parasitárias, provocadas por monogenéticos (KERBER *et al.*, 2011; MOREIRA *et al.*, 2013) e dinoflagelados (MOREIRA *et al.*, 2013) em beijupirás; monogenéticos, digenéticos e nematódeos em garoupas (ROUMBEDAKIS *et al.*, 2013). Já no que diz respeito às bacterioses, *Photobacterium damsala* subsp. *piscicida* é o microrganismo mais relacionado a episódios de doença granulomatosa, septicemia e mortalidades em beijupirás (GONÇALVES *et al.*, 2016; SHIMADA *et al.*, 2020). Recentemente, um novo agente causador de mortalidades em peixes marinhos foi descrito na América Central (SOTO *et al.*, 2018). Esse patógeno emergente foi classificado como *Francisella salimarina* (LI *et al.*, 2020).

Nesse sentido, com poucos estudos relacionados a infecções bacterianas em tambaquis e em peixes marinhos no território brasileiro, torna-se necessária a investigação de surtos nesses animais. Sendo assim, os dados gerados podem servir de base para a elaboração de medidas epidemiológicas de prevenção e controle de doenças nos sistemas de cultivo, diminuindo os possíveis impactos econômicos provocados.

## **1.2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **1.2.1. PANORAMA DA AQUICULTURA MUNDIAL E NACIONAL**

A aquicultura e a pesca são atividades de suma importância para segurança alimentar e nutrição em todo o mundo (FAO, 2022). Foi estimado um crescimento no consumo de pescado de 3% ao ano, no período entre 1961 e 2019, correspondendo a quase o dobro da taxa de crescimento populacional, analisada nesse mesmo período, que foi de apenas 1,6% (FAO, 2022).

De acordo com o relatório publicado pela *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) (2022), 178 milhões de toneladas (t) de organismos aquáticos foram produzidos no ano de 2020, sendo 89% da produção destinada ao consumo humano. Do total produzido, 49%, o equivalente à cerca de 87,5 milhões de toneladas, foram relacionados à produção aquícola, sendo esse setor responsável por 56% do total de alimentos de origem aquática destinada ao consumo humano. A produção global foi estimada em 265 bilhões de dólares para a aquicultura. Diante disso, percebe-se a importância desse setor para a economia mundial. Ainda segundo esse relatório (FAO, 2022), na década de 90, a aquicultura era responsável pela produção de 21,8 milhões de toneladas, enquanto no ano de 2020 ultrapassou os 87 milhões. Esses dados evidenciam a expansão do setor aquícola, que tem alavancado a produção em águas interiores. Por exemplo, dos 178 milhões produzidos, 112 milhões são oriundos de água do mar, sendo apenas 33,6 milhões relativos à aquicultura. Os outros 66 milhões são provenientes de águas interiores, e desse total, mais de 54 milhões estão relacionados à aquicultura.

Com relação à produção de peixes, em 2020, a piscicultura foi responsável por gerar em torno de 57,5 milhões de toneladas. Desse valor, cerca de 49,1 milhões estavam relacionados à produção em águas interiores e, aproximadamente, 8,3 milhões de toneladas eram provenientes da produção marinha e costeira. Existe uma ampla variedade de espécies de peixes que são cultivadas, mas as que mais se destacam na produção em água doce, são a carpa-capim (*Ctenopharyngodon idellus*), a carpa-prateada (*Hypophthalmichthys molitrix*) e a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com,

aproximadamente, 5,8, 4,9 e 4,4 milhões de produzidas, respectivamente. Já a produção em águas marinha e costeira, as espécies que mais se destacam são o salmão do atlântico (*Salmo salar*) e o peixe-leite (*Chanos chanos*) com, cerca de 2,7 e 1,1 milhões de toneladas produzidas, respectivamente (FAO, 2022).

Os maiores produtores de peixes estão localizados no continente asiático, com destaque para China, com 25,8 milhões de toneladas de peso vivo produzidos em águas interiores em 2020. Em segundo e terceiro lugares estão Indonésia e Bangladesh com 3,39 e 2,29 milhões de toneladas produzidas, respectivamente (FAO, 2022). No que diz respeito à produção de peixes no Brasil, de acordo com o anuário publicado pela Associação Brasileira de Piscicultura (PeixeBR) em 2023, no ano de 2022, o país foi responsável pela produção de mais de 860 mil toneladas de peixes, sendo a tilápia do Nilo a espécie de peixe mais produzida, com cerca de 550 mil toneladas.

#### 1.2.2. PRODUÇÃO DE PEIXES NATIVOS E MARINHOS

No Brasil, a produção de peixes nativos de água doce apresentou uma taxa de crescimento de 1,8% entre os anos de 2021 e 2022, com um total de 267.060 toneladas de peixes produzidos. Os maiores produtores de peixes nativos são Rondônia (57.200 t), Maranhão (39.100 t), Mato Grosso (38.000 t), Pará (24.200 t) e Amazonas (21.300 t). Dentre as espécies de peixes nativos produzidas, o tambaqui, é a espécie que mais se destaca. A produção do tambaqui ultrapassou 94 mil toneladas em 2021, sendo a espécie nativa mais produzida no país (IBGE, 2022). No ano de 2022, essa espécie de peixe foi a segunda mais exportada pelo país, gerando uma receita de 268 mil dólares (PEIXEBR, 2023).

Quanto à produção de peixes nativos marinhos, ainda não há informações oficiais desse tipo de cultivo no Brasil (NASCIMENTO *et al.*, 2022). Embora, os peixes marinhos tenham sido os primeiros animais aquáticos cultivados no país, até o momento a piscicultura marinha não progrediu para uma atividade de relevância comercial (VALENTI *et al.*, 2021), estando restrita a pequenos sistemas de cultivo e a alguns institutos de pesquisa (NASCIMENTO *et al.*, 2022). Esses sistemas de cultivos se encontram mais concentrados nos estados do Rio de Janeiro, Espírito Santo e São Paulo (VALENTI *et al.*, 2021). Beijupirá e garoupa são as duas espécies nativas que despertam maior interesse dos produtores, pelas suas características zootécnicas, assim como pelo desenvolvimento de tecnologias relacionadas ao cultivo dessas espécies (NASCIMENTO *et al.*, 2022).

### 1.2.2.1. Tambaqui

*C. macropomum* é um peixe teleósteo, neotropical, redondo, originário dos caracídeos, da família *Serrasalminidae*, nativo dos rios Orinoco e Amazonas, na bacia Amazônica (BUCKUP *et al.*, 2007; VALLADÃO *et al.*, 2018). Esse peixe se destaca culturalmente e comercialmente, em virtude de haver uma considerável apreciação pela sua carne, principalmente nos países da América do Sul, como Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Peru e Venezuela (VALLADÃO *et al.*, 2018). Além disso, a produção do tambaqui se dispersou para países da América Central, como alguns países do Caribe, além de diversos países da Ásia, como China, Indonésia, Malásia, Myanmar e Vietnã (WOYNÁROVICH & VAN ANROOY, 2019). Dessa forma, *C. macropomum* é importante não apenas para o mercado local, mas para o comércio mundial.

A aquicultura do tambaqui, atualmente, supera a pesca extrativa (WOYNÁROVICH & VAN ANROOY, 2019). Isso é consequência do elevado potencial que essa espécie de peixe possui para produção em cativeiro, em decorrência de suas características. Bom desempenho zootécnico, representado pelas ótimas taxas de crescimento e conversão alimentar, além de prolificidade, e sobrevivência em condições adversas, como situações de hipóxia e baixos níveis de pH. Ademais, é um animal facilmente domesticável, possuindo hábitos alimentares onívoros e boa adaptabilidade (BARÇANTE & SOUSA, 2015; VAL & DE OLIVEIRA, 2021; WOOD *et al.*, 2017).

Contudo, existem alguns problemas relacionados à comercialização do tambaqui. O preço dos insumos, além de falhas no comércio dessa espécie de peixe por pequenos produtores, muitas vezes atreladas a logística, são alguns dos entraves observados (PEIXEBR, 2023). Em adição, a presença de espinhas em Y nessa espécie de peixe refuta uma grande parte dos consumidores, em virtude da preocupação em relação ao consumo, principalmente, por crianças (POVH *et al.*, 2022). Além disso, outros obstáculos relacionados a comercialização de *C. macropomum* são os problemas sanitários. Assim como em outras espécies de peixes, a aquicultura intensiva do tambaqui pode implicar na exposição dos animais a mudanças ambientais, como temperatura, qualidade da água, introdução de novos animais no plantel, além de manejo excessivo. Essas mudanças frequentes podem resultar em estresse nos peixes, o que pode afetar sua saúde e aumentar a susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças, em decorrência das alterações fisiológicas, endócrinas e imunológicas ocorridas (KRKOŠEK, 2010; NARDOCCI *et al.*, 2014).

#### 1.2.2.1.1. Desafios sanitários na produção de tambaquis

As infecções parasitárias e bacterianas que ocorrem em sistemas de cultivo de peixes, no Brasil, culminam em grandes perdas econômicas para o produtor. Estima-se que as enfermidades infecciosas provoquem a perda de 15% da produção, o equivalente a 84 milhões de dólares (TAVARES-DIAS & MARTINS, 2017). Dessa forma, considerando os prejuízos causados pelas doenças infecciosas, é necessário a compreensão acerca de potenciais patógenos (GALLANI, 2019), principalmente no que diz respeito às suas características epidemiológicas, para que seja possível o estabelecimento de medidas de controle e prevenção de surtos de doenças.

Os principais agentes etiológicos envolvidos nas enfermidades ocasionadas em *C. macropomum* são parasitos e bactérias. Acantocéfalos (*Neoechinorhynchus buttnerae*), crustáceos (*Perulernaea gamitanae*), monogenéticos (*Anacanthorus spathulatus*), mixosporídeos, protozoários (*Ichthyophthirius multifiliis*, *Piscinoodinium pillulare*) e tricodinídeos, são alguns dos exemplos de parasitos que acometem tambaquis (GONÇALVES *et al.*, 2018; VALLADÃO *et al.*, 2018). Dentre esses parasitos, infecções causadas pelo *Neoechinorhynchus buttnerae* têm sido motivos de preocupação, em virtude do aumento do número de casos de *C. macropomum* acometidos por esse acantocéfalo, apresentando prejuízos em seu desempenho zootécnico (CHAGAS *et al.*, 2019; JERÔNIMO *et al.*, 2017; MACIEL-HONDA *et al.*, 2023; PEREIRA & MOREY, 2018; VALLADÃO *et al.*, 2020).

No que diz respeito as bactérias, *Aeromonas* spp., *Edwardsiella* spp., *Flavobacterium columnare*, *Francisella orientalis*, *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp., são patógenos bacterianos que causam algumas das doenças relacionadas a taxas de mortalidades significativas em sistemas de produção de peixes, sobretudo em tilapiculturas (ABOYADAK *et al.*, 2015; DAVIES *et al.*, 2018; EGGER *et al.*, 2023; EVANS *et al.*, 2009; FIGUEIREDO *et al.*, 2005, 2006; LEAL *et al.*, 2014; SOTO *et al.*, 2012). Entretanto, com relação ao desenvolvimento de enfermidades infecciosas de origem bacteriana em tambaquis, pouco se conhece.

Há relatos na literatura do isolamento, em tambaquis, de algumas dessas espécies bacterianas associadas a mortalidades em tilápias, como *Aeromonas* spp., *Edwardsiella tarda*, *Flavobacterium columnare* e *Lactococcus garvieae* (CARVALHO, 2012; GALLANI *et al.*, 2020; MIELKE *et al.*, 2022; PILARSKI *et al.*, 2008). No entanto, as bactérias que, cientificamente, foram consideradas patógenos para tambaquis são *Aeromonas hydrophila* (GALLANI *et al.*, 2020), *A. jandaei* e *Flavobacterium columnare*

(MIELKE *et al.*, 2022). Recentemente, em um estudo conduzido por REIS *et al.* (2023), embora não tenham sido constatados mortalidades e nem sinais clínicos, observou-se que *E. tarda* foi capaz de produzir alterações histopatológicas no baço e no rim de tambaquis infectados experimentalmente, condizentes com infecção granulomatosa multifocal. Além disso, nos últimos anos, tem sido observado um aumento no número de surtos associados a presença dessa bactéria em *C. macropomum* (dados não publicados).

Nesse sentido, acerca dos possíveis impactos econômicos que esse microrganismo possa ocasionar na cadeia produtiva de tambaquis, a detecção de isolados de *E. tarda* nesses animais e o entendimento a respeito de suas características epidemiológicas, como a sua diversidade genética e comportamento frente aos antimicrobianos, se faz extremamente necessário. Esses conhecimentos possibilitam elaborar estratégias a fim de se evitar a disseminação de doenças não apenas relacionadas aos sistemas de produção de tambaquis, mas também à piscicultura brasileira como um todo.

#### **1.2.2.1.2. *Edwardsiella tarda***

*Edwardsiella tarda* é uma bactéria Gram-negativa, pequena, móvel, em forma de bastonete (1 µm de diâmetro e, cerca de 2-3 µm de comprimento), anaeróbia facultativa, mesófila, oxidase negativa, produtora de H<sub>2</sub>S, redutora de nitrato e tolerante a níveis de 1,5% e 3% de NaCl (MOHANTY & SAHOO, 2007). Essa bactéria pertence à família *Hafniaceae* e, juntamente com *E. ictaluri*, *E. hoshinae*, *E. piscicida* e *E. anguillarum* representam o gênero *Edwardsiella* (ABAYANEH *et al.*, 2013; PARK *et al.*, 2012; SHAO *et al.*, 2015). Dessas cinco espécies bacterianas, apenas *E. hoshinae* não é capaz de provocar enfermidades em peixes.

Originariamente, pelo que se têm de relatos na literatura em animais aquáticos, *E. tarda* foi isolada de infecção em enguia japonesa (*Anguilla japonica*) no Japão, pela primeira vez na década de 60, sendo classificada como *Paracolobactrum anguillimortiferum* (HOSHINA, 1962). Nessa mesma época, isolados provenientes de fezes humanas, por possuírem características bioquímicas distintas de outras enterobactérias, como, por exemplo, a capacidade de produzir H<sub>2</sub>S, foram classificados em um novo gênero, *Edwardsiella*, e o nome *E. tarda* foi proposto para esses isolados bacterianos (EWING *et al.*, 1965). Posteriormente, foram relatados casos de diarreias em crianças associadas a presença desse microrganismo (BHAT *et al.*, 1967). Desde então essa bactéria tem sido isolada de diversas espécies de peixes, em diferentes anos, e em localizações geográficas distintas (MOHANTY & SAHOO, 2007). Além de peixes e

humanos, esse microrganismo já foi isolado de aves, anfíbios, répteis e mamíferos marinhos (COLES *et al.*, 1978; LEE *et al.*, 2018; XU & ZHANG, 2014). Esses dados evidenciam que essa espécie de bactéria pode representar um problema para a saúde única, pelo seu potencial zoonótico.

*E. tarda* parece comum de ser encontrada em ambientes aquáticos, tendo sua ocorrência registrada em água, lama e sedimentos em lagoas (MAITI *et al.*, 2009; WYATT *et al.*, 1979).

No Brasil, *E. tarda* já foi isolada em diferentes espécies de hospedeiros, como ser humano (*Homo sapiens*) (NUCCI *et al.*, 2002), truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (ALEXANDRINO *et al.*, 1999), pacus (*Myleus micans*) (LIMA *et al.*, 2008), matrinxãs (*Brycon amazonicus*) (CARVALHO, 2012), tambaquis (CARVALHO, 2012), tambacus (*Colossoma macropomum* x *Piaractus mesopotamicus*) (WINCKLER *et al.*, 2015), tilápias (*Oreochromis* spp.) (SEBASTIÃO *et al.*, 2015; DAVIES *et al.*, 2018), pirarucus (*Arapaima gigas*) (PROIETTI-JÚNIOR *et al.*, 2017), pinguim-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) (CAMPOS *et al.*, 2013), patos (*Anas platyrhynchos domesticus*) e garça (*Egretta thula*) (DAVIES *et al.*, 2018).

Essa capacidade de adaptação a diferentes hospedeiros e condições ecológicas sugere que *E. tarda* possua uma ampla variabilidade genética. Isso é evidenciado no estudo realizado por ABAYNEH *et al.* (2012), em que isolados de *E. tarda*, provenientes de hospedeiros e regiões geográficas diferentes, além de isolados oriundos de hospedeiros distintos, no entanto habitando o mesmo local, eram geneticamente diferentes. Verificar a existência da diversidade genética de bactérias pode fornecer subsídios para o entendimento a respeito da patogenicidade, virulência, hospedeiros, rastreabilidade da fonte de infecção, e resistência aos antimicrobianos daquele microrganismo (LI *et al.*, 2009).

Há vários estudos que abordam diferentes técnicas utilizadas para analisar a diversidade genética entre isolados de *E. tarda*, como *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA) (ABAYNEH *et al.*, 2012), *Multilocus Sequence Typing* (MLST), *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) (YANG *et al.*, 2013), *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR* (ERIC-PCR), *Random Amplification of Polymorphic DNA* (RAPD), BOX-PCR (CASTRO *et al.*, 2011), e *Repetitive Extragenic Palindromic PCR* (REP-PCR) (CASTRO *et al.*, 2011; REICHLEY *et al.*, 2017). Dessas, a REP-PCR é uma metodologia mais rápida, fácil e menos onerosa de ser realizada. No Brasil, até o momento, não há nenhum estudo que relate a diversidade genética de isolados de *E. tarda*

em peixes. A utilização da técnica de REP-PCR seria interessante para averiguar o padrão de variabilidade genética entre as cepas.

No que diz respeito a patogenia dessa bactéria, *E. tarda* é um patógeno intracelular com capacidade de infectar vários tipos de células (WANG *et al.*, 2013). A patogênese dessa bactéria envolve muitos fatores, como, adesão e invasão das células epiteliais, bem como sobrevivência e colonização no interior das células dos macrófagos. Esses mecanismos se dão, principalmente, pelo sistema de secreção do tipo III (T3SS) e tipo VI (T6SS) (LEUNG *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2016) e adicionalmente a produção de toxinas, como dermatotoxinas (ULLAH & ARAI, 1983) e hemolisinas (HIRONO *et al.*, 1997) que favorecem a disseminação sistêmica e proliferação da bactéria em diversos órgãos, principalmente por ser capaz de escapar das células de defesa (BLAZER, 1991; DALMO *et al.*, 1997; ISHIBE *et al.*, 2008; XIE *et al.*, 2015). Acredita-se que a hemolisina e outras adesinas sejam importantes para o estágio primário da infecção, enquanto T3SS e T6SS são essenciais para os estágios posteriores da infecção (TAN *et al.*, 2005; ZHENG *et al.*, 2005; ZHENG & LEUNG, 2007).

Com relação aos sinais clínicos produzidos pela infecção dessa espécie bacteriana em peixes, não há nenhuma característica patognomônica observada. Embora haja descrição na literatura de que os peixes acometidos podem apresentar pequenas lesões cutâneas que evoluem para abscessos no interior da musculatura e órgãos como fígado, baço e rim, e que podem produzir odor fétido quando aberto (MOHANTY & SAHOO, 2007). No entanto, o mais comumente observado são os sinais clínicos associados a quadros de septicemia, como exoftalmia, opacidade de córnea, emaciação, ascite, áreas hemorrágicas na nadadeira e no orifício urogenital, podendo ocorrer mortalidades nesses animais (MOHANTY & SAHOO, 2007; PARK *et al.*, 2012, XU & ZHANG, 2014).

Para a identificação dessa bactéria a nível de espécie, o mais recomendado é o sequenciamento de genes *housekeeping*, em virtude de haver muitas semelhanças a níveis morfológicos e bioquímicos entre espécies de *Edwardsiella* (ABAYNEH *et al.*, 2013; SHAO *et al.*, 2015). Além disso, métodos baseados em sequências de RNA ribossômico são amplamente aceitos como técnicas para determinar a posição taxonômica de bactérias desconhecidas, porém essa técnica apresenta limitações no que se refere a espécies com alta porcentagem de similaridade dentro do gênero ao qual pertencem (AMANO *et al.*, 2005; JANDA & ABBOTT, 2010), como é o caso de *Edwardsiella* spp.. Pelo fato dos genes *housekeeping* serem altamente conservados, estes são marcadores filogenéticos de

alta resolução para a classificação de bactérias intimamente relacionadas, evoluindo mais rapidamente que os genes de rRNA (YAMAMOTO & HARAYAMA, 1996).

Os genes *housekeeping* utilizados na discriminação das espécies de *Edwardsiella* são *gyrB*, *sodB* e *dnaJ*, que codificam a subunidade B da DNA girase, o superóxido dismutase B e a proteína de choque térmico 40, respectivamente (BÚJAN *et al.*, 2018; REICHLEY *et al.*, 2017). Dentre esses três genes, o sequenciamento do gene *dnaJ* mostrou-se com altamente resolutivo para identificação de *Edwardsiella* spp. a nível de espécie (BÚJAN *et al.*, 2018).

Além disso, recentemente, foi desenvolvida uma outra ferramenta molecular, PCR *multiplex* (mPCR), que se mostrou bastante eficaz na diferenciação de espécies de *Edwardsiella* que provocam doenças em peixes. Esse método não possui a necessidade de sequenciamento, tornando-se uma metodologia mais simples, menos laboriosa e de baixo custo quando comparada ao sequenciamento de algum gene *housekeeping* (DA COSTA *et al.*, 2022).

A utilização de antimicrobianos de forma profilática e terapêutica é feita de forma frequente em sistemas de cultivos de animais aquáticos. O uso abusivo de antibacterianos na piscicultura comercial promove a proliferação de bactérias resistentes e a transferência de genes de resistência entre esses microrganismos, que pode culminar na transferência desses genes para outras bactérias, incluindo patógenos humanos, por meio de elementos genéticos móveis, os quais podem ser transposons, integrons, sequências de inserção, bacteriófagos, plasmídeos, ilhas de patogenicidade, ou ainda, a associação de um ou mais desses elementos (HEUER *et al.*, 2009; LEUNG *et al.*, 2019). Isso é alarmante, em virtude da possibilidade da disseminação de bactérias resistentes a vários antibacterianos culminando em resistomas (LEUNG *et al.*, 2019).

Em alguns países, existem alguns fármacos utilizados em sistemas de produção de peixes (CHEN *et al.*, 2020) que são amplamente utilizados na medicina humana, como eritromicina, sulfametoxazol, trimetoprim e espectinomicina (WHO, 2018). Se os microrganismos que causam infecções em humanos apresentarem resistência a estes antimicrobianos, o tratamento realizado poderá ser dificultado.

Uma das alternativas para averiguar a resistência dos microrganismos aos antimicrobianos é por meio do monitoramento. Dados de monitoramento fundamentam a avaliação e gestão de riscos, por meio de intervenções e avaliação do impacto destas, além da observação quanto à conformidade com os regulamentos/diretrizes estabelecidos sobre o uso adequado de antimicrobianos (HEUER *et al.*, 2009).

Em 2021, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento do Brasil (MAPA) implementou o “Programa de Vigilância e Monitoramento da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Agropecuária” (BRASIL, 2021). Esse programa seria executado em duas etapas, entre os anos de 2019 e 2022, com o objetivo de monitorar riscos, tendências e padrões da resistência aos antimicrobianos através de alimentos de origem animal produzidos no país. No entanto, esse programa não contemplou o monitoramento dessa resistência em animais aquáticos. Isso é preocupante e deve ser revisto, em virtude de, como já comentado anteriormente, a aquicultura ser uma atividade relevante para a cadeia produtiva brasileira e, com a utilização indevida de antibacterianos, pode ser uma fonte de bactérias resistentes a diversos antimicrobianos.

Espécies do gênero *Edwardsiella* parecem desempenhar um papel importante na disseminação de resistência aos antimicrobianos, favorecendo o aumento de patógenos resistentes no ambiente (LEUNG *et al.*, 2019). Dados demonstraram resistência de cepas de *E. tarda* a uma ampla gama de antimicrobianos, como: ácido nalidíxico, amoxicilina, ampicilina, lincomicina, norfloxacin, sulfametoxazol-trimetoprim, tetraciclina, estreptomicina, cefotaxima, gentamicina, ciprofloxacina, enrofloxacin e ceftazidima (ALGAMMAL *et al.*, 2022; EZZAT *et al.*, 2021; NIU *et al.*, 2019; REICHLEY *et al.*, 2017). Além disso, a presença de genes de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos e as tetraciclina são encontrados frequentemente em isolados de *E. tarda* oriundos de peixes (ALGAMMAL *et al.*, 2022; EZZAT *et al.*, 2021; NIU *et al.*, 2019).

Existem alguns métodos utilizados para avaliação da atividade antimicrobiana. Métodos de difusão, como teste de disco-difusão, fitas de gradiente antimicrobiano – ETEST e métodos de diluição, como método de diluição em caldo e o método de diluição em ágar, são alguns exemplos (BALOUIRI *et al.*, 2016). Para avaliar a susceptibilidade antimicrobiana de isolados de *E. tarda* em peixes, os mais utilizados são os testes de concentração inibitória mínima, que pode ser feito por meio do método de diluição em caldo, e de disco-difusão em ágar (ALGAMMAL *et al.*, 2022; EZZAT *et al.*, 2021; NIU *et al.*, 2019; REICHLEY *et al.*, 2017).

Para bactérias isoladas de animais aquáticos, o *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI, 2020) possui os únicos protocolos reconhecidos que contém critérios estabelecidos que deverão ser seguidos para a realização de testes de susceptibilidade aos antimicrobianos (VET03 – “*Methods for Antimicrobial Broth Dilution and Disk Diffusion Susceptibility Testing of Bacteria Isolated From Aquatic Animals*”), além de valores de referência para os testes de susceptibilidade de algumas espécies bacterianas isoladas de

animais aquáticos frente a antimicrobianos (VET04 – “*Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacteria Isolated From Aquatic Animals*”), como *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophila*, *Flavobacterium columnare* e *Flavobacterium psychrophilum*. Para espécies de bactérias que não possuem os valores de referência dispostos neste protocolo, recomenda-se a elaboração de um ponto de corte epidemiológico a fim de possibilitar a classificação dos isolados em *wild type* (WT) e *non-wild type* (NWT). Este deve ser realizado seguindo alguns critérios e, dentre eles, utilizar um número mínimo de isolados (SMITH, 2020).

No Brasil, há alguns estudos que abordam o perfil de susceptibilidade de isolados de patógenos bacterianos considerados importantes para pisciculturas, como *Streptococcus agalactiae* (OLIVEIRA *et al.*, 2018), *Aeromonas jandaei* (ASSANE *et al.*, 2021), *Flavobacterium columnare* (FERREIRA *et al.*, 2022), *Francisella orientalis* (OLIVEIRA *et al.*, 2022) e *Lactococcus petauri* (EGGER *et al.*, 2023). Para isolados de *E. tarda*, apenas um estudo (DAVIES *et al.*, 2018), segundo o nosso conhecimento, foi realizado. No entanto, este não forneceu dados relacionados ao ponto de corte epidemiológico de *E. tarda* para os antimicrobianos analisados. Além disso, o estudo também não avalia a presença, nos isolados, de genes de resistência aos antimicrobianos.

Com a relevância desta bactéria para os sistemas de cultivo de peixes, torna-se necessário a realização de estudos que avaliem a susceptibilidade de um número considerável de isolados brasileiros a diferentes antimicrobianos, para que seja possível estabelecer um ponto de corte epidemiológico provisório (SMITH, 2020) de *E. tarda* para os antibacterianos. Adicionalmente, a verificação da presença de genes de resistência também se faz importante não apenas para a saúde animal, mas para a saúde única. Esse estudo poderia ser utilizado para o monitoramento da resistência aos antimicrobianos na piscicultura do país e, assim, serviria de base para a elaboração de estratégias a fim de prevenir e controlar essa bactéria nos sistemas de cultivo.

#### **1.2.2.2. Beijupirá e garoupa**

O beijupirá, *R. canadum*, também conhecido popularmente como beijupirá, pirambiju, parambijú, ceixupirá e cação-de-escamas, é um peixe carnívoro, teleósteo, da ordem dos perciformes, pertencente à família *Rachycentridae*. É um peixe circuntropical, que apresenta ampla distribuição geográfica, podendo ser encontrado em águas tropicais e subtropicais dos oceanos, com exceção da porção leste do Oceano Pacífico. Essa distribuição é influenciada pela temperatura da água, ocorrendo, principalmente, nas áreas frias dos oceanos, mas restrita aos meses mais quentes do ano, sendo encontrado

em todo o litoral brasileiro. A faixa de temperatura entre 27-29°C é considerada ideal para o crescimento dessa espécie. *R. canadum* é uma espécie migratória e pelágica, podendo habitar até 150 m de profundidade dos oceanos (HAMILTON *et al.*, 2022; NASCIMENTO *et al.*, 2022).

O cultivo dessa espécie pode produzir peixes de até 6 kg de peso em um ano de produção. No ambiente natural os animais podem atingir até 60 kg de peso. Apesar de sua carne ser de excelente qualidade e de alto valor agregado (NASCIMENTO *et al.*, 2022), a pesca dessa espécie não é tão realizada, por conta de algumas dificuldades, como em virtude do seu hábito migratório e pela formação de pequenos cardumes (HAMILTON *et al.*, 2022). Quanto a aquicultura do beijupirá, a China e o Taiwan se destacam como os maiores produtores, mas há também relatos da produção em Bahamas, Belize, República Dominicana, México, Filipinas, Porto Rico, Estados Unidos e Vietnã (FAO, 2023). Como já comentado anteriormente, não há dados oficiais a respeito de sistemas de produção de peixes marinhos no Brasil (NASCIMENTO *et al.*, 2022). No entanto, estima-se que entre os anos de 2015 e 2019, a produção de beijupirá aumentou de 25 para 100 toneladas ao ano (VALENTI *et al.*, 2021).

Além da alta taxa de crescimento que o beijupirá possui quando produzido em cativeiro e da valorização da carne dessa espécie de peixe, existem outros fatores favoráveis à sua produção no Brasil, como o domínio de tecnologias de reprodução e larvicultura, devido ao cultivo em outros países, como EUA, Taiwan e China (BENETTI *et al.*, 2010; HAMILTON *et al.*, 2022).

A garoupa-verdadeira, *E. marginatus*, é uma espécie de peixe carnívora, hermafrodita protogínica, territorialista, pertencente à família *Serranidae*. Possui extensa distribuição geográfica, ocorrendo no nordeste e sudoeste do Oceano Atlântico, no Mar Mediterrâneo, no litoral do continente Africano e no sudoeste do Oceano Índico e no Atlântico. Na América do Sul, pode ser encontrado desde a Bahia até a Patagônia Argentina (NASCIMENTO *et al.*, 2022).

Sua carne é bastante valorizada, o que teve como consequência, a pesca indiscriminada dessa espécie (NASCIMENTO *et al.*, 2022), sendo incluída na lista de espécies ameaçadas, classificada como vulnerável pelo Ministério do Meio Ambiente do Brasil (BRASIL, 2022). Existem algumas empresas responsáveis pela produção e repovoamento da garoupa-verdadeira. Uma delas fica localizada em Ilabela-SP (MELLO, 2021; NASCIMENTO *et al.*, 2022).

Quanto à aquicultura dessa espécie, é importante destacar que no relatório gerado pela FAO (2022), os dados da produção são apontados para *Epinephelus* spp., ou seja, para as várias espécies do gênero. Percebe-se um aumento considerável no cultivo de espécies desse gênero. Por exemplo, nos anos 2000 a produção era de apenas 7,6 mil toneladas. Em 2020, a produção dessas espécies superou a marca de 226 mil toneladas produzidas. Os principais produtores de garoupas são a China, Taiwan e Indonésia (RIMMER & GLAMUZINA, 2019). Os dados de produção em relação a garoupa são escassos no Brasil, mas há indícios de que o cultivo dessa espécie vem despertando interesse em produtores de várias localidades (MELLO, 2021; MOREIRA, 2022; VALENTI *et al.*, 2021). Contudo, as dificuldades na obtenção de licenciamento ambiental para o cultivo, a necessidade de altos investimentos para implementação da produção, além de alguns problemas no manejo das espécies, são entraves que ainda atrapalham a consolidação da produção de peixes marinhos no Brasil (CORIOLANO & COELHO, 2012; NASCIMENTO *et al.*, 2022). Além disso, como já mencionado anteriormente, as doenças infecciosas são responsáveis por provocar grandes perdas econômicas para o produtor (TAVARES-DIAS & MARTINS, 2017).

Há a carência de estudos voltados ao diagnóstico de enfermidades infecciosas em peixes marinhos no Brasil, tornando o cultivo desses animais ainda mais dificultoso em virtude da falta de informações. Sendo assim, a parceria entre empresas produtoras dessas espécies e institutos de pesquisa é crucial para que sejam realizados exames nos animais acometidos por doenças e, dessa forma, serem produzidos estudos sobre a sanidade de peixes marinhos, que auxiliariam a conduta dos profissionais da área, evitando, assim, as possíveis perdas ocasionadas pelos problemas sanitários.

#### **1.2.2.2.1 Desafios sanitários na produção de beijupirás e garoupas**

No Brasil, existem poucos relatos acerca de doenças infecciosas acometendo peixes marinhos. A maioria desses relatos estão relacionados a infecções parasitárias e bacterianas. Os parasitos mais encontrados foram monogenéticos (KERBER *et al.*, 2011; MOREIRA *et al.*, 2013) e dinoflagelados (MOREIRA *et al.*, 2013) em beijupirás; monogenéticos, digenéticos e nematódeos em garoupas (ROUMBEDAKIS *et al.*, 2013). Com relação as bacterioses, *Photobacterium damsalae* subsp. *piscicida* é o microrganismo mais relacionado a quadros de doença granulomatosa, septicemia e mortalidades em peixes marinhos no Brasil, principalmente nos beijupirás (GONÇALVES *et al.*, 2016; SHIMADA *et al.*, 2020).

No Brasil, em julho de 2021, ocorreram episódios de surtos envolvendo sinais clínicos característicos de enfermidades infecciosas, acometendo garoupas e beijupirás em um sistema de recirculação de água no estado de São Paulo. Mortalidades de até 100% dos beijupirás foram registradas. Diante disso, a investigação desses episódios tornou-se imprescindível e será discutida mais adiante, no capítulo 4 deste trabalho.

### 1.3. OBJETIVOS

#### 1.3.1. OBJETIVO GERAL

Diagnosticar o agente associado a surtos em peixes marinhos, além de analisar as diversidades genética, peptídica, e a sensibilidade a antimicrobianos em isolados de *E. tarda*, oriundos de tambaquis, e *F. salinarina*, provenientes de garoupas e beijupirás.

#### 1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar as diversidades genética e peptídica de cepas de *E. tarda* isoladas de tambaquis;
- Confirmar a nível de espécie a identificação dos isolados de *E. tarda* utilizados no presente trabalho;
- Calcular pontos de corte epidemiológicos provisórios para *E. tarda* em relação a antimicrobianos;
- Avaliar a susceptibilidade qualitativa (WT e NWT) de isolados de *E. tarda* a diferentes fármacos através da técnica de difusão em disco;
- Analisar a presença de genes de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, florfenicol, tetraciclinas, sulfonamidas em isolados de *E. tarda*;
- Diagnosticar agentes causadores de enfermidades em garoupas e beijupirás;
- Observar as lesões histopatológicas encontradas nos órgãos de garoupas e beijupirás doentes;
- Analisar as diversidades genética e peptídica de cepas de *F. salinarina* isoladas de garoupas e bijupirás;
- Avaliar a susceptibilidade qualitativa (WT e NWT) de isolados de *F. salinarina* a diferentes fármacos através da técnica de difusão em disco.

#### 1.4. REFERÊNCIAS

ABAYNEH, T.; COLQUHOUN, D. J.; SØRUM, H. *Edwardsiella piscicida* sp.nov., a novel species pathogenic to fish. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, n. 3, p. 644–654, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.12080>

ABAYNEH, T.; COLQUHOUN, D. J.; SØRUM, H. Multi-locus Sequence Analysis (MLSA) of *Edwardsiella tarda* isolates from fish. **Veterinary Microbiology**, v. 158, n. 3–4, p. 367–375, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.03.006>

ABOYADAK, I. M.; ALI, N. G. M.; GODA, A. M. A. S.; ABOELGALAGEL, W. H.; SALAM, A. M. E. Molecular Detection of *Aeromonas Hydrophila* as the Main Cause of Outbreak in Tilapia Farms in Egypt. **Journal of Aquaculture & Marine Biology**, v. 2, n. 5, 2015.

ALEXANDRINO, A.; OKUMURA, M.; BALDASSI, L. Ocorrência de infecção por *Edwardsiella tarda* em truta arco-iris *Oncorhynchus mykiss* em cultivo intensivo. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 25, p. 121–123, 1999.

ALGAMMAL, A. M.; MABROK, M.; EZZAT, M.; ALFIFI, K. J.; ESAWY, A. M.; ELMASRY, N.; EL-TARABILI, R. M. Prevalence, antimicrobial resistance (AMR) pattern, virulence determinant and AMR genes of emerging multi-drug resistant *Edwardsiella tarda* in Nile tilapia and African catfish. **Aquaculture**, v. 548, n. P1, 737643, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737643>

AMANO, M.; OHKUSU, K.; KUSABA, K.; IKEDA, H.; NAGASAWA, Z.; AOKI, Y.; KAWAMURA, Y.; KOBATAKE, S.; TANAKA, T.; MATSUURA, S.; EZAKI, T. Quantitative Microarray-Based DNA-DNA Hybridization Assay for Measuring Genetic Distances among Bacterial Species and Its Application to the Identification of Family *Enterobacteriaceae*. **Microbiology and Immunology**, v. 49, n. 3, p. 255–263, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2005.tb03727.x>

ASSANE, I. M.; DE SOUSA, E. L.; VALLADÃO, G. M. R.; TAMASHIRO, G. D.; CRISCOULO-URBINATI, E.; HASHIMOTO, D. T.; PILARSKI, F. Phenotypic and genotypic characterization of *Aeromonas jandaei* involved in mass mortalities of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) in Brazil. **Aquaculture**, v. 541, 736848, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736848>

BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, V. 6, n. 2, p. 71–79, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>

BARÇANTE, B.; SOUSA, A. Características Zootécnicas e Potenciais Do Tambaqui (*Colossoma Macropomum*) Para a Piscicultura Brasileira. **PubVet**, v. 9, n. 7, p. 287–290, 2015.

BENETTI, D.; SARDENBERG, B.; HOENIG, R.; WELCH, A.; STIEGLITZ, J.; MIRALAO, S.; FARKAS, D.; BROWN, P.; JORY, D. Cobia (*Rachycentron canadum*) hatchery-to-market aquaculture technology: recent advances at the University of Miami Experimental Hatchery (UMEH). **R. Bras. Zootec.** 39 (suppl spe), 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-35982010001300008>

BHAT. P.; MYERS, R. M.; CARPENTER, K. P. *Edwardsiella tarda* in a study of juvenile diarrhoea. **Journal of Hygiene**, v. 65, n. 3, p. 293–298, 1967. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0022172400045812>

BLAZER, V. S. Piscine Macrophage Function and Nutritional Influences: A Review. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 3, n. 2, p. 77–86, 1991. DOI: [https://doi.org/10.1577/1548-8667\(1991\)003<0077:PMFANI>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8667(1991)003<0077:PMFANI>2.3.CO;2)

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa de Vigilância e Monitoramento da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Agropecuária**. 2021.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Gabinete do Ministro. **Portaria MMA nº148, de 7 de junho de 2022**. 2022.

BUCKUP, P. A.; MENEZES, N. A.; GHAZZI, M. S. A. **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil**, v. 1, 2007. Rio de Janeiro: Museu Nacional.

BUJÁN, N.; MOHAMMED, H.; BALBOA, S.; ROMALDE, J. L.; TORANZO, A. E.; ARIAS, C. R.; MAGARIÑOS, B. Genetic studies to re-affiliate *Edwardsiella tarda* fish isolates to *Edwardsiella piscicida* and *Edwardsiella anguillarum* species. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 30–37, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2017.09.0047>

CARVALHO, E. C. **Identificação fenotípica e molecular de bactérias patogênicas associadas à criação de peixes amazônicos**. 2012. Dissertação (Mestrado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, INPA. Manaus, 120 f. 2012.

CASTRO, N.; TORANZO, A. E.; BASTARDO, A.; BARJA, J. L.; MAGARIÑOS, B. Intraspecific genetic variability of *Edwardsiella tarda* strains from cultured turbot. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 95, p. 253–258, 2011. DOI: 10.3354/dao02363

CAMPOS, S. D. E.; PEREIRA, A. M.; MAIA, A. L. P. S.; COSTA, C. H. C.; MAGALHÃES, H.; ALMOSNY, N. R. P. Identificação de *Edwardsiella tarda* in em processo septicêmico em *Spheniscus magellanicus* (Sphenisciformes: Spheniscidae) – Relato de Caso. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 35, n. 3, p. 224–228, 2013.

CHAGAS, E. C.; AQUINO-PEREIRA, S. L.; BENAVIDES, M. V.; BRANDÃO, F. R.; MONTEIRO, P. C.; MACIEL, P. O. *Neoechinorhynchus buttnerae* parasitic infection in tambaqui (*Colossoma macropomum*) on fish farms in the state of Amazonas. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 45, n. 2, e499, 2019. DOI: 10.20950/1678-2305.2019.45.2.499

CHEN, J.; SUN, R.; PAN, C.; SUN, Y., MAI, B.; LI, Q. X. Antibiotics and Food Safety in Aquaculture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 43, p. 11908–11919, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c03996>

CLSI. **Methods for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing of Bacteria Isolated From Aquatic Animals**. 2nd ed. CLSI guideline VET03. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacteria Isolated From Aquatic Animals**. 3rd ed. CLSI supplement VET04. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020.

COLES, B. M.; STROUD, R. K.; SHEGGEY, S. Isolation of *Edwardsiella tarda* from three Oregon sea mammals. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 14, n. 3, p. 339–341, 1978. DOI: <https://doi.org/10.7589/0090-3558-14.3.339>

CORIOLOANO, M. C. & COELHO, C. B. B. Cobia (*Rachycentron canadum*): A marine fish native to Brazil with biological characteristics to captive environment. In: DANIELS, J. A. **Advances in Environmental Research**. Nova Science Publishers, v. 26, p. 119-132, 2012. Disponível em: [https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/34509850/Mabrouk\\_El-Sharkawy\\_978-1-62081-469-](https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/34509850/Mabrouk_El-Sharkawy_978-1-62081-469-7__Climate_Change__Chapter_3__NovaScience_2012.pdf?1408720612=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DBook.pdf&Expires=1683933637&Signature=fGF90iPYLYVXIQMer8xDs0mVBEretkq9FylaDyC3OyF-N6WrtKBjNvfePtzXNf-6DIHIZlirS4TuQVoDVAqIUJqUMnTG8ct8Ct-EuGZW325-W78rmsM9HoaP2UR2lqBNQ2mluoVhJg6wzj6VYt4bTa9e4RCXFWXrvlgD42fRV2J-cHxoQsN0DKOOV7OQ4goY0FyPsrkKIFcP~Jn4b1KTLS4zB-xqZ0m5GIZJjEou2K1hPpLvweY4pz5Hu0j8dY~BvND7azPWS0Qr791VYPdybMCZncA7C7SsQ0PK9p~k5LD75L9KKoTXBMAAjel63jYEY3hgkbtbrfn0tjLhLrlFg__&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA#page=133)

7\_\_Climate\_Change\_\_Chapter\_3\_\_NovaScience\_2012.pdf?1408720612=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DBook.pdf&Expires=1683933637&Signature=fGF90iPYLYVXIQMer8xDs0mVBEretkq9FylaDyC3OyF-N6WrtKBjNvfePtzXNf-6DIHIZlirS4TuQVoDVAqIUJqUMnTG8ct8Ct-EuGZW325-W78rmsM9HoaP2UR2lqBNQ2mluoVhJg6wzj6VYt4bTa9e4RCXFWXrvlgD42fRV2J-cHxoQsN0DKOOV7OQ4goY0FyPsrkKIFcP~Jn4b1KTLS4zB-xqZ0m5GIZJjEou2K1hPpLvweY4pz5Hu0j8dY~BvND7azPWS0Qr791VYPdybMCZncA7C7SsQ0PK9p~k5LD75L9KKoTXBMAAjel63jYEY3hgkbtbrfn0tjLhLrlFg\_\_&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA#page=133. Acesso em 08 mai 2023.

DA COSTA, A. R.; CHIDEROLI, R. T.; LANES, G. C.; FERRARI, N. A.; CHICOSKI, L. M.; BATISTA, C. E.; PANDOLFI, V. C. F.; WARE, C.; GRIFFIN, M. J.; DOS SANTOS, A. R.; AZEVEDO, V. A. C.; DA COSTA, M. M.; PEREIRA, U. P. Multiplex PCR assay for correct identification of the fish pathogenic species of *Edwardsiella* genus reveals the presence of *E. anguillarum* in South America in strains previously characterized as *E. tarda*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 132, n. 6, p. 4225-4235, 2022. DOI: doi: 10.1111/jam.15538

DALMO, R. A.; INGEBRIGTSEN, K.; BOGWALD, J. Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). **Journal of Fish Diseases**, v. 20, n. 4, p. 241-273, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1997.00302.x>

DAVIES, Y. M.; DE OLIVEIRA, M. G. X.; CUNHA, M. P. V.; FRANCO, L. S.; SANTOS, S. L. P.; MORENO, L. Z.; GOMES, V. T. M.; SATO, M. I. Z.; NARDI, M. S.; MORENO, A. M.; SAIDENBERG, A. B.; DE SÁ, L. R. M.; KNOBL, T. *Edwardsiella tarda* outbreak affecting fishes and aquatic birds in Brazil. **Veterinary Quarterly**, v. 38, n. 1, p. 99-105, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1080/01652176.2018.1540070>

EGGER, R. C.; ROSA, J. C. C.; RESENDE, L. F. L.; DE PÁDUA, S. B.; BARBOSA, F. O.; ZERBINI, M. T.; TAVARES, G. C.; FIGUEIREDO, H. C. P. Emerging fish pathogens *Lactococcus petauri* and *L. garvieae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) farmed in Brazil. **Aquaculture**, v. 565, 739093, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.739093>.

EVANS, J. J.; KLESIOUS, P. H.; SHOEMAKER, C. A. First Isolation and Characterization of *Lactococcus Garvieae* from Brazilian Nile Tilapia, *Oreochromis Niloticus* (L.), and Pintado, *Pseudoplathystoma Corruscans* (Spix & Agassiz). **Journal of Fish Diseases**, v. 32, n. 11, p. 943-951, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2009.01075.x>

EWING, W. H.; MCWHORTER, A. C.; ESCOBAR, M. R.; LUBIN, A. H. *Edwardsiella*, a new genus of *Enterobacteriaceae* based on a new species, *E. tarda*. **International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy**, v. 15, n. 1, p. 33-38, 1965. DOI: <https://doi.org/10.1099/00207713-15-1-33>

EZZAT, M.; EL-TARABILI, R. M.; ESAWY, A. M.; NEHAL, E. Antibiotic Resistance and Antibiotic Resistance Genes Among *Edwardsiella Tarda* Isolated from Fish. **Suez Canal Veterinary Medical Journal**, v. 26, n. 1, p. 171-188, 2021. DOI: 10.21608/scvmj.2021.184978

FAO. 2022. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2022: Towards Blue Transformation**. Rome: [s. n.], 2022. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>

FAO, 2023. *Rachycentron canadum*. **Cultured Aquatic Species Information Programme**. Text by J.B. Kaiser, J.G. Holt.. Fisheries and Aquaculture Division [online]. Rome. Updated 2007-05-25. Disponível em: [https://www.fao.org/fishERI/en/culturedspecies/rachycentron\\_canadum/en](https://www.fao.org/fishERI/en/culturedspecies/rachycentron_canadum/en). Acesso em 09 mai. 2023.

FERREIRA, D. A. R.; ASSANE, I. M.; VANECCI-SILVA, D.; OLIVEIRA, A. V.; TAMASHIRO, G. D.; HASHIMOTO, D. T.; PILARSKI, F. Morpho-molecular identification, pathogenicity for *Piaractus mesopotamicus*, and antimicrobial susceptibility of a virulent *Flavobacterium columnare* isolated from Nile tilapia cultured in Brazil. **Aquaculture**, v. 560, 738486, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738486>

FIGUEIREDO, H. C. P.; KLESIUS, P. H.; ARIAS, C. R.; EVANS, J.; SHOEMAKER, C. A.; PEREIRA JÚNIOR, D. J.; PEIXOTO, M. T. D. Isolation and Characterization of Strains of *Flavobacterium Columnare* from Brazil. **Journal of Fish Diseases**, v. 28, p. 199–204, 2005. DOI: 10.1111/j.1365-2761.2005.00616.x.

FIGUEIREDO, H. C. P.; CARNEIRO, D. O.; FARIA, F. C.; COSTA, G. M. *Streptococcus Agalactiae* associado à meningoencefalite e infecção sistêmica em tilápia-do-nilo (*Oreochromis Niloticus*) no Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 4, p. 678–680, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-09352006000400036>

GALLANI, S. U. **Infecção experimental de tambaqui (*Colossoma macropomum*) por *Aeromonas hydrophila*: avaliação de antimicrobianos e da resposta imune do hospedeiro**. 2019. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Universidade Estadual Paulista, UNESP. Jaboticabal, 141 f. 2019.

GALLANI, S. U.; VALLADÃO, G. M. R.; ASSANE, I. M.; ALVES, L. O.; KOTZENT, S.; HASHIMOTO, D. T.; PILARSKI, F. Motile *Aeromonas* septicemia in tambaqui *Colossoma macropomum*: Pathogenicity, lethality and new insights for control and disinfection in aquaculture. **Microbial Pathogenesis**, v. 149, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104512>

GONÇALVES, B. B.; OLIVEIRA, M. S. B.; BORGES, W. F.; SANTOS, G. G.; TAVARES-DIAS, M. Diversity of metazoan parasites in *Colossoma macropomum* (Serrasalmidae) from the lower Jari River, a tributary of the Amazonas River in Brazil. **Acta Amazonica**, v. 48, n. 3, p. 211-216, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/1809-4392201704371>

GONÇALVES, E. L. T.; SANCHES, E. G.; MARTINS, M. L.; TSUZUKI, M. Y. Detecção, controle e prevenção de fotobacteriose em cultivo de bijupirá. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 5, p. 465-472, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2016000500006>

HAMILTON, S.; SEVERI, W.; CAVALLI, R. O. Biologia e pesca do beijupirá. In: CAVALLI, R. O. **Aquicultura do Beijupirá (*Rachycentron canadum*) no Brasil**. Rio Grande, RS: Editora da FURG, p. 10-20, 2022.

HEUER, O. E.; KRUSE, H.; GRAVE, K.; COLLIGNON, P.; KARUNASAGAR, I.; ANGULO, F. J. Human Health Consequences of Use of Antimicrobial Agents in Aquaculture. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 8, p. 1248-1253, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1086/605667>

HIRONO, I.; TANGE, N.; AOKI, T. Iron-regulated haemolysin gene from *Edwardsiella tarda*. **Molecular Microbiology**, v. 24, n. 4, p. 851–856, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.3971760.x>

HOSHINA, T. On a new bacterium *Paracolobactrum anguillimortiferum* n. sp. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, v. 28, n. 2, 1962. DOI: <https://doi.org/10.2331/suisan.28.162>

IBGE, 2022. **Produção da Pecuária Municipal 2021**. Rio de Janeiro.

ISHIBE, K.; OSATOMI, K.; HARA, K.; KANAI, K.; YAMAGUCHI, K.; ODA, T. Comparison of the responses of peritoneal macrophages from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) against high virulent and low virulent strains of *Edwardsiella tarda*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 24, n. 2, p. 243–251, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.11.001>

JANDA, J. M. & ABBOTT, S. L. The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 1, p. 35–73, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1128/CMR.00039-09>

JERÔNIMO, G. T.; DE PÁDUA, S. B.; BELO, M. A. A.; CHAGAS, E. C.; TABOGA, S. R.; MACIEL, P. O.; MARTINS, M. L. *Neoechinorhynchus buttnerae* (Acanthocephala) infection in farmed *Colossoma macropomum*: A pathological approach. **Aquaculture**, v. 469, p. 124-127, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.11.027>

KERBER, C. E.; SANCHES, E. G.; SANTIAGO, M.; LUQUE, J. L. First record of *Neobenedenia melleni* (Monogenea: Capsalidae) in sea-farmed cobia (*Rachycentron canadum*) in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 20, n. 4, p. 331-333, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1984-29612011000400013>

KRKOŠEK, M. Host Density Thresholds and Disease Control for Fisheries and Aquaculture. **Aquaculture Environment Interactions**, v. 1, n. 1, p. 21–32, 2010. DOI: [10.3354/aei0004](https://doi.org/10.3354/aei0004)

LEAL, C. A. G.; TAVARES, G. C.; FIGUEIREDO, H. C. P. Outbreaks and genetic diversity of *Francisella noatunensis* subsp *orientalis* isolated from farm-raised Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 3, p. 5704–5712, 2014.

LEE, K.; KIM, H. K.; PARK, S. K.; SOHN, H.; CHO, Y.; CHOI, Y. M.; JEONG, D. G.; KIM, J. H. First report of the occurrence and whole-genome characterization of *Edwardsiella tarda* in the false killer whale (*Pseudorca crassidens*). **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 80, n. 6, p. 1041–1046, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1292/jvms.17-0590>

LEUNG, K. Y.; SIAME, B. A.; TENKINK, B. J.; NOORT, R. J.; MOK, Y.-F. *Edwardsiella tarda* - Virulence mechanisms of an emerging gastroenteritis pathogen. **Microbes and Infection**, v. 14, n. 1, p. 26-34, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.08.005>

LEUNG, K. Y.; WANG, Q.; YANG, Z.; SIAME, B. A. *Edwardsiella piscicida*: A versatile emerging pathogen of fish. **Virulence**, v. 10, n. 1, p. 555–567, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1080/21505594.2019.1621648>

LI, L. -H.; LUO, H. -M.; FENG, J. -H.; MING, Y. -Z.; ZHENG, M. -L.; DENG, G. -Y.; CHEN, C.; LI, W. -J.; XIAO, M.; QU, P. -H. *Francisella salimarina* sp. nov., isolated from coastal seawater. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, p. 3264-3272, 2020. DOI: 10.1099/ijsem.0.004164

LI, W.; RAOULT, D.; FOURNIER, P. E. Bacterial strain typing in the genomic era. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews**, v. 33, p. 892-916, 2009. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2009.00182.x

LIMA, L. C.; FERNANDES, A. A.; COSTA, A. A. P.; VELASCO, F. O.; LEITE, R. C.; HACKETT, J. L. Isolation and characterization of *Edwardsiella tarda* from pacu *Myleus micans*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 1, p. 275–277, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-09352008000100040>

MACIEL-HONDA, P. O.; NETO, E. M. S.; COSTA-FERNANDES, T. O.; DE JESUS, F. H. R.; CHAGAS, E. C.; TAVARES-DIAS, M. First record of *Neoechinorhynchus buttnerae* and *Piscinoodinium pillulare* infection in *Colossoma macropomum* in the state of Tocantins, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 32, n. 1, e013622, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1984-29612023001>

MAITI, N. K.; MANDAL, A.; MOHANTY, S.; MANDAL, R. N. Phenotypic and genetic characterization of *Edwardsiella tarda* isolated from pond sediments. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 32, n. 1, p. 1-8, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2007.11.001>

MELLO, G. L. Produção de garoupas no Brasil: realidade e perspectivas. **Aquaculture Brasil**, 2021. Disponível em: <https://www.aquaculturebrasil.com/coluna/204/producao-de-garoupas-no-brasil:-realidade-e-perspectivas>. Acesso em 08 mai. 2023.

MIELKE, T. D.; FRANCISCO, C. J.; DORELLA, F. A.; FIGUEIREDO, H. C. P.; TAVARES, G. C.; GALLANI, S. U. The strategic use of water additives for tambaqui *Colossoma macropomum* transport: New insights of bacteriosis and productivity approach. **Aquaculture**, v. 558, 738406, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738406>

MOHANTY, B. R. & SAHOO, P. K. Edwardsiellosis in Fish: A Brief Review. **Journal of Biosciences**, v. 32, n. 3, p. 1331–1344, 2007.

MOREIRA, C. B.; HASHIMOTO, G. S. O.; ROMBENSO, A. N.; CANDIOTTO, F. B.; MARTINS, M. L.; TSUZUKI, M. Y. Outbreak of mortality among cage-reared cobia (*Rachycentron canadum*) associated with parasitism. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 4, p. 588-591, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1984-29612013000400021>

MOREIRA, D. Criação de garoupa no Ceará desperta atenção de produtores e pesquisadores. Governo do Estado do Ceará, 2022. Disponível:

<https://www.ceara.gov.br/2022/02/24/criacao-de-garoupa-no-ceara-desperta-atencao-de-produtores-e-pesquisadores/>. Acesso em 08 mai. 2023.

NARDOCCI, G.; NAVARRO, C.; CORTÉS, P. P.; IMARAI, M.; MONTOYA, M.; VALENZUELA, B.; JARA, P.; ACUÑA-CASTILLO, C.; FERNÁNDEZ, R. Neuroendocrine Mechanisms for Immune System Regulation during Stress in Fish. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 40, n. 2, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.08.001>

NASCIMENTO, M. S.; CARVALHO, C. V. A.; PASSINI, G.; SOARES, M.; EVANGELISTA, D. K. R.; SOUSA, D. N. **Panorama da piscicultura marinha no Brasil: desafios e perspectivas**. 1. ed. Palmas, TO: Embrapa Pesca e Aquicultura, 2022. 40 p. ISSN 2318-1400. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/234347/1/doc-51-2022.pdf>. Acesso em: 08 mai. 2023.

NIU, G.; WONGSATHEIN, D.; BOONYAYATRA, S.; KHATTIYA, R. Occurrence of multiple antibiotic resistance and genotypic characterization in *Edwardsiella tarda* isolated from cage-cultured hybrid red tilapia (*Oreochromis* sp.) in the Ping River, Northern Thailand. **Aquaculture Research**, v. 50, n. 12, p. 3643–3652, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/are.14322>

NUCCI, C.; DA SILVEIRA, W. D.; CORRÊA, S. S.; NAKAZATO, G.; BANDO, S. Y.; RIBEIRO, M. A.; PESTANA DE CASTRO, A. F. Microbiological comparative study of isolates of *Edwardsiella tarda* isolated in different countries from fish and humans. **Veterinary Microbiology**, v. 89, n. 1, p. 29-39, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00151-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00151-7)

OLIVEIRA, T. F.; LEIBOWITZ, M. P.; LEAL, C. A. G. Local epidemiological cutoff values and antimicrobial susceptibility profile for Brazilian *Francisella orientalis* isolates. **Aquaculture**, v. 553, 738054, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738054>

OLIVEIRA, T. F.; QUEIROZ, G. A.; TEIXEIRA, J. P.; FIGUEIREDO, H. C. P.; LEAL, C. A. G. Recurrent Streptococcus agalactiae infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) treated with florfenicol. **Aquaculture**, v. 493, p. 51-60, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.04.037>

PARK, S. B.; AOKI, T.; JUNG, T. S. Pathogenesis of and Strategies for Preventing *Edwardsiella Tarda* Infection in Fish. **Veterinary Research**, v. 43, n. 67, 2012.

PEIXE BR. **Anuário Peixe BR da piscicultura 2022**. São Paulo: [s.n.], 2023.

PEREIRA, J. N. & MOREY, G. A. M. First record of *Neoechinorhynchus buttnerae* (Eoacantocephala, Neochinorhynchidae) on *Colossoma macropomum* (Characidae) in a fish farm in Roraima, Brazil. **Acta Amazonica**, v. 48, n. 1, p. 42-45, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/1809-4392201702411>

PILARSKI, F.; ROSSINI, A. J.; CECCARELLI, P. S. Isolation and characterization of *Flavobacterium columnare* (Bernardet et al. 2002) from four tropical fish species in Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 2, p. 409–414, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1519-69842008000200025>

POVH, J. A.; OLIVEIRA, C. A. L.; RIBEIRO, R. P.; SHIOTSUKI, L.; TEIXEIRA, S. A.; FORNARI, D. C.; FILHO, R. A. C. C. Perspectivas para o melhoramento genético de peixes nativos. In: **Congresso Brasileiro de Zootecnia**. Manaus, AM, 2022.

PROIETTI JÚNIOR, A. A.; RODRIGUES, D. P.; ROGES, E. M.; LIMA, L. S.; CARDOSO, F. M. N.; YOSHIOKA, T. O.; TAVARES-DIAS, M. First isolation and characterization of clinical signs of polymicrobial infection by *Aeromonas jandiae*, *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella tarda* in disease outbreak of fingerlings *Arapaima gigas* (Pirarucu). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 29 ENCONTRO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA AMBIENTAL, 15, 2017, Foz do Iguaçu. **Resumos** [...] São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2017. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1079928>. Acesso em: 06 mai. 2023

REICHLEY, S. R.; WARE, C.; STEADMAN, J.; GAUNT, P. S.; GARCIA, J. C.; LAFRENTZ, B. R.; TCHACIL, A.; WALDBIESER, G. C.; STINE, C. B.; BUJÁN, N.; ARIAS, C. R.; LOCH, T.; WELCH, T. J.; CIPRIANO, R. C.; GREENWAY, T. E.; KHOO, L. H.; WISE, D. J.; LAWRENCE, L.; GRIFFIN, M. J. Comparative Phenotypic and Genotypic Analysis of *Edwardsiella* Isolates from Different Hosts and Geographic Origins with Emphasis on Isolates Formerly Classified as *E. tarda*, and Evaluation of Diagnostic Methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 12, p. 3466–3491, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.00970-17>

REIS, F. Y. T.; ROCHA, V. P.; JANAMPA-SARMIENTO, P.; COSTA, H. L.; EGGER, R. C.; PASSOS, N. C.; DE ASSIS, C. H. S.; CARNEIRO, S. P.; SANTOS, A. F.; SILVA, B. A.; DORELLA, F. A.; LEIBOWITZ, M. P.; LUZ, R. K.; PIEREZAN, F.; GALLANI, S. U.; TAVARES, G. C.; FIGUEIREDO, H. C. P. *Edwardsiella tarda* in Tambaqui (*Colossoma macropomum*): A Pathogenicity, Antimicrobial Susceptibility, and Genetic Analysis of Brazilian Isolates. **Animals**, 13, 2910, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/ani13182910>

ROUMBEDAKIS, K.; MARCHIORI, N. C.; PASETO, Á.; GONÇALVES, E. L. T.; LUQUE, J. L.; CEPEDA, P. B.; SANCHES, E. G.; MARTIS, M. L. Parasite fauna of wild and cultured dusky-grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) from Ubatuba, Southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 73, n. 4, p. 871-878, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1519-69842013000400025>

RIMMER, M. A. & GLAMUZINA, B. A review of grouper (Family Serranidae: Subfamily Epinephelinae) aquaculture from a sustainability science perspective. **Reviews in Aquaculture**, v. 11, n. 1, p. 58-87, 2019. DOI: 10.1111/raq.12226

SEBASTIÃO, F. A.; FURLAN, L. R.; HASHIMOTO, D. T.; PILARSKI, F. Identification of Bacterial Fish Pathogens in Brazil by Direct Colony PCR and 16S rRNA Gene Sequencing. **Advances in Microbiology**, v. 5, n. 6, p. 409–424, 2015. DOI: 10.4236/aim.2015.56042

SHAO, S.; LAI, Q.; LIU, Q.; WU, H.; XIAO, J.; SHAO, Z.; WANG, Q.; ZHANG, Y. 2015. Phylogenomics characterization of a highly virulent *Edwardsiella* strain ET080813 T encoding two distinct T3SS and three T6SS gene clusters: Propose a novel species as *Edwardsiella anguillarum* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 36–47, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2014.10.008>

SHIMADA, M. R.; YUNIS-AGUINAGA, J.; CUEVA-QUIROZ, V. A.; FILHO, J. R. E.; MOURIÑO, J. L. P.; CLAUDIANO, G. S.; MORAES, F. R.; MORAES, J. R. E. Isolation

and characterization of pathology in case of massive mortality by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in *Rachycentron canadum*. **Bioscience Journal**, v. 36, n. 5, p. 1732-1741, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.14393/BJ-v36n5a2020-41745>

SMITH, P. Eight rules for improving the quality of papers on the antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from aquatic animals. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 139, p. 87–92, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3354/DAO03476>

SOTO, E.; GRIFFIN, M.; ARAUZ, M.; RIOFRIO, A.; MARTINEZ, A.; CABREJOS, M. E. *Edwardsiella Ictaluri* as the causative agent of mortality in cultured Nile tilapia. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 24, n. 2, p. 81–90, 2012. DOI: [10.1080/08997659.2012.675931](https://doi.org/10.1080/08997659.2012.675931)

SOTO, E.; GRIFFIN, M. J.; MORALES, J. A.; CALVO, E. B.; SEBASTIÃO, F. A.; PORRAS, A. L.; VÍQUEZ-RODRÍGUEZ, X.; REICHLEY, S. R.; ROSSER, T. G.; WARE, C.; BYRNE, B. A.; GARCÍA, J. C.; LAFRENTZ, B. R.; CAMUS, A. C. *Francisella marina* sp. nov., Etiologic Agent of Systemic Disease in Cultured Spotted Rose Snapper (*Lutjanus guttatus*) in Central America. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 16, e00144-18, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.00144-18>

TAVARES-DIAS, M. & MARTINS, M. L. An overall estimation of losses caused by diseases in the Brazilian fish farms. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 41, n. 4, p. 913-918, 2017. DOI: [10.1007/s12639-017-0938-y](https://doi.org/10.1007/s12639-017-0938-y)

TAN, Y. P.; ZHENG, J.; TUNG, S. L.; ROSENSHINE, I.; LEUNG, K.Y. Role of type III secretion in *Edwardsiella tarda* virulence. **Microbiology**, v. 151, p. 2301–2313, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1099/mic.0.28005-0>

ULLAH, A. & ARAI, T. Pathological Activities of the Naturally Occurring Strains of *Edwardseilla tarda*. **Fish Pathology**, v. 18, n. 2, p. 65–70, 1983, DOI: <https://doi.org/10.3147/jsfp.18.65>

VAL, A. L. & DE OLIVEIRA, A. M. *Colossoma Macropomum*—A Tropical Fish Model for Biology and Aquaculture. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology**, v. 335, n. 9–10, p. 761–770, 2021.

VALENTI, W. C.; BARROS, H. P.; MORAES-VALENTI, P.; BUENO, G. W.; CAVALLI, R. O. Aquaculture in Brazil: past, presente and future. **Aquaculture Reports**, 19, 100611, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100611>

VALLADÃO, G. M. R.; GALLANI, S. U.; PILARSKI, F. South American Fish for Continental Aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, v.10, n. 2, p. 351–369, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/raq.12164>

VALLADÃO, G. M. R.; GALLANI, S. U.; JERÔNIMO, G. T.; DE SEIXAS, A. T. Challenges in the control of acanthocephalosis in aquaculture: special emphasis on *Neoechinorhynchus buttnerae*. **Reviews in Aquaculture**, v. 12, n. 3, p. 1360-1372, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1111/raq.12386>

WANG, B.; YU, T.; DONG, X.; ZHANG, Z.; SONG, L.; XU, Y.; ZHANG, X.-H. *Edwardsiella tarda* invasion of fish cell lines and the activation of divergent cell death pathways. **Veterinary Microbiology**, v. 163, n. 3-4, p. 282–289, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.12.027>

WHO. 2018. **Critically Important Antimicrobials for Human Medicine: Ranking of medically important antimicrobials for risk management of antimicrobial resistance due to non-human use**. Switzerland: 6<sup>th</sup> revision, 2018. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/312266/9789241515528-eng.pdf>> Acesso em 05 mai. 2023.

WINCKLER, L. Z.; SANTOS, R. M.; FERREIRA, M. W.; SANTOS, F. M.; LEITE, T. C.; DE ANDRADE, G. B. Mortalidade de tambacús (*Colossoma macropomum* x *Piaractus mesopotamicus*) infectados por *Edwardsiella tarda*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 52, n. 1, p. 63–67, 2015. DOI: 10.11606/issn.1678-4456.v52i1p63-67

WOOD, C. M.; DE SOUZA NETTO, J. G.; WILSON, J. M.; DUARTE, R. M.; VAL, A. L. Nitrogen metabolism in Tambaqui (*Colossoma macropomum*), a neotropical model teleost: hypoxia, temperature, exercise, feeding, fasting, and high environmental ammonia. **Journal of Comparative Physiology B**, 187:135–151, 2017. DOI: 10.1007/s00360-016-1027-8

WOYNÁROVICH, A. & VAN ANROOY, R. **Field guide to the culture of tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1816)**. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper No. 624, Rome, FAO, 132p. 2019.

WYATT, L. E.; NICKELSON, R.; VANDERZANT, C. *Edwardsiella tarda* in freshwater catfish and their environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 710–714, 1979. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.38.4.710-714.1979>

XIE, H. -X.; LU, J. -F.; ZHOU, Y.; YI, J.; YU, X. -J.; LEUNG, K. Y.; NIE, P. Identification and functional characterization of the novel *Edwardsiella tarda* effector EseJ. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 4, p. 1650–1660, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1128/IAI.02566-14>

XU, T. & ZHANG, X. *Edwardsiella Tarda*: An Intriguing Problem in Aquaculture. **Aquaculture**, v. 431, p. 129–135, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.12.001>

YAMAMOTO, S. & HARAYAMA, S. Phylogenetic Analysis of *Acinetobacter* Strains Based on the Nucleotide Sequences of *gyrB* Genes and on the Amino Acid Sequences of Their Products. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, n. 2, p. 506–511, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1099/00207713-46-2-506>

YANG, M.; SHAO, S.; XIAO, J.; WANG, Q.; ZHANG, Y. Phylogenetic investigation of *Edwardsiella tarda* with multilocus sequence typing (MLST) and pulsed field gel electrophoresis (PFGE) typing methods. **Aquaculture**, v. 410-411, p. 79-85, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.05.024>

ZHANG, L.; NI, C.; XU, W.; DAI, T.; YANG, D.; WANG, Q.; ZHANG, Y.; LIU, Q. Intramacrophage Infection Reinforces the Virulence of *Edwardsiella tarda*. **Journal of Bacteriology**, v. 198, n. 10, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1128/JB.00978-15>

ZHENG, J. & LEUNG, K.Y. Dissection of a type VI secretion system in *Edwardsiella tarda*. **Molecular Microbiology**, v. 66, n. 5, p. 1192–1206, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05993.x>

ZHENG, J.; TUNG, S. L.; LEUNG, K.Y. Regulation of a Type III and a Putative Secretion System in *Edwardsiella tarda* by EsrC Is under the Control of a Two-

Component System, EsrA-EsrB. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 4127–4137, 2005.  
DOI: <https://doi.org/10.1128/IAI.73.7.4127-4137.2005>

## CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA E PEPTÍDICA DE ISOLADOS DE *Edwardsiella tarda* ORIUNDOS DE TAMBAQUI

### RESUMO

*Edwardsiella tarda* é um patógeno bacteriano de grande importância para a aquicultura mundial. Recentemente, esta bactéria produziu alterações histopatológicas em alguns órgãos de tambaqui, *Colossoma macropomum*, um peixe amazônico comercialmente importante para diversos países. Verificar a diversidade genética e peptídica entre isolados de uma mesma espécie bacteriana, permite que haja a compreensão de um microrganismo de forma mais acurada, como relacionada a sua dispersão e adaptação entre hospedeiros. Sendo assim, o presente estudo objetivou analisar as diversidades genética e peptídica de outras cepas de *E. tarda* oriundas de *C. macropomum* no Brasil. Catorze isolados foram selecionados e identificados por espectrometria de massas (MALDI-ToF) e, em seguida, tiveram seu material genético extraído e quantificado. Foi, então, realizado o sequenciamento do gene *dnaJ*, para assegurar a identificação dos isolados a nível de espécie. Em seguida, realizou-se a análise da diversidade genética pela técnica de REP-PCR e os grupos obtidos foram dispostos em um dendrograma, utilizando coeficiente de Dice e abordagem UPGMA. Além disso, as 14 cepas foram submetidas à tipagem por MALDI-ToF, com seus picos de massas avaliados, agrupados em um dendrograma utilizando o software MSP-Share e analisados pelo coeficiente de Dice. O poder discriminatório destas duas técnicas foi avaliado pelo Índice de Diversidade de Simpson (SDI). As 14 cepas tiveram sua identificação confirmada pelo sequenciamento do gene *dnaJ*. A análise de diversidade genética tipificou as cepas em três grupos, enquanto a avaliação da diversidade peptídica agrupou as cepas em dois grupos (picos de massa específica: G1= 3565,68 e G2= 6981,56). A técnica de REP-PCR obteve maior poder discriminatório. Em virtude do agrupamento dos isolados em diferentes *clusters*, pode-se concluir que as cepas oriundas de tambaquis não são clonalmente relacionadas, não havendo um único clone adaptado a esse hospedeiro.

**Palavras-chave:** Edwardsielose, *C. macropomum*, tipagem, REP-PCR, MALDI-ToF.

### 2.1. INTRODUÇÃO

Tambaqui, *Colossoma macropomum*, é um peixe amazônico de água doce cultivado para consumo humano em vários países da América do Sul, como Colômbia,

Peru, Venezuela, Bolívia, Equador e, mais significativamente, no Brasil (VALLADÃO *et al.*, 2018), além de ser produzida em alguns países da América Central e da Ásia (WOYNÁROVICH & VAN ANROOY, 2019). Diante disso, é evidente a importância econômica dessa espécie de peixe. Apenas no Brasil, a produção do tambaqui ultrapassou 94 mil toneladas em 2021, sendo a espécie nativa mais produzida no país (IBGE, 2022). Outro dado que merece ser mencionado é relacionado à exportação do *C. macropomum* pelo território brasileiro. Segundo a Associação Brasileira de Piscicultura (PEIXEBR, 2023), no ano de 2022, o tambaqui foi a segunda espécie mais exportada, totalizando 268 mil dólares.

Apesar da piscicultura do tambaqui expressar-se de forma significativa para o país, existem alguns entraves no cultivo, como relacionados aos problemas sanitários. Infecções por parasitos, principalmente pelo acantocéfalo *Neoechinorhynchus buttnerae*, têm sido as mais relatadas ultimamente (CHAGAS *et al.*, 2019; JERÔNIMO *et al.*, 2017; MACIEL-HONDA *et al.*, 2023 PEREIRA & MOREY, 2018; VALLADÃO *et al.*, 2020). Todavia, também há perdas causadas pelas infecções bacterianas, mas em menor frequência. *Aeromonas hydrophyla*, *Aeromonas jandaei*, *Flavobacterium columnare* são as bactérias cientificamente comprovadas como patógenos para *C. macropomum* (GALLANI *et al.*, 2020; MIELKE *et al.*, 2022). Recentemente, em um ensaio de infecção experimental em tambaquês, *Edwardsiella tarda* foi capaz de provocar formação de lesões granulomatosas em baço e rim desses animais (REIS, 2021).

*E. tarda* é uma bactéria Gram-negativa, anaeróbia facultativa, em forma de bastonete, pertencente à família *Hafniaceae*. Além de *E. tarda*, existem mais quatro espécies pertencentes ao gênero *Edwardsiella*, as quais são: *E. hoshinae*, *E. ictaluri*, *E. piscicida* e *E. anguillarum*. Durante muitos anos, *E. piscicida* e *E. anguillarum* foram erroneamente classificadas como *E. tarda*, uma vez que diferenças fenotípicas não puderam ser observadas entre essas espécies (ABAYNEH *et al.*, 2013; SHAO *et al.*, 2015). Alguns métodos podem ser usados para distinguir essas espécies, como dessorção/ionização a laser assistida por matriz - tempo de voo (MALDI-ToF), sequenciamento de genes *gyrB*, *sodB*, *dnaJ* e, mais recentemente, por meio de PCR multiplex (BÚJAN *et al.*, 2018; DA COSTA *et al.*, 2022; REICHLEY *et al.*, 2017). O sequenciamento do gene *dnaJ* mostrou-se uma ferramenta bastante eficiente para a discriminação de espécies de *Edwardsiella* (BÚJAN *et al.*, 2018).

*E. tarda* é conhecida por afetar principalmente peixes, levando a perdas econômicas (MOHANTY & SAHOO, 2007; PARK *et al.*, 2012), mas também já foi

isolado de aves, anfíbios, répteis, mamíferos marinhos e até humanos (COLES *et al.*, 1978; EWING *et al.*, 1965; LEE *et al.*, 2018; XU & ZHANG, 2014). No Brasil, *E. tarda*, além de ter sido isolada de tabaquis (CARVALHO, 2012), já foi associada a mortalidades em espécies de peixes intimamente relacionados com *C. macropomum*, como pacus (*Myleus micans*) (LIMA *et al.*, 2008) e tambacus (*Colossoma macropomum* x *Piaractus mesopotamicus*) (WINCKLER *et al.*, 2015).

Analisar a variabilidade genética de isolados bacterianos, por meio de ferramentas de tipagem molecular, é importante para entendimento da epidemiologia de patógenos importantes acerca da disseminação destes nos contextos temporal, geográfico e entre hospedeiros (LI *et al.*, 2009; BARONY *et al.*, 2017). Adicionalmente, a tipagem peptídica de microrganismos patogênicos para peixes, por meio do MALDI-ToF, mostrou-se uma ferramenta interessante para a detecção de biomarcadores proteicos, que possuem finalidades epidemiológicas, como por exemplo a identificação de sorotipos de espécies bacterianas (TORRES-CORRAL *et al.*, 2019). Dessa forma, em virtude da possibilidade deste patógeno ocasionar perdas na cadeia produtiva dessa espécie de peixe, a realização de análises de diversidades genética e peptídica de isolados de *E. tarda*, oriundos de tabaquis, é necessária para o aperfeiçoamento do manejo na prevenção de surtos ocasionados por esse microrganismo.

Portanto, este trabalho tem como objetivo analisar as diversidades peptídica e genética de 14 cepas de *E. tarda* isoladas de *C. macropomum* no Brasil.

## **2.2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.2.1. SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS**

Foram selecionados 14 isolados de *E. tarda*, oriundos de cérebro, rim, baço, fígado e intestino de tabaquis, provenientes de quatro estados brasileiros (AM, MG, RO), entre os anos de 2014 e 2020. Esses isolados foram obtidos das bacteriotecas do Laboratório de Doenças dos Animais Aquáticos (AQUAVET) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e do Laboratório de Microbiologia Aplicada (LMAO) da Universidade Nilton Lins (UNL). Os metadados das cepas estão dispostos na Tabela 1.

Tabela 1. Metadados relacionados a cepas de *E. tarda* oriundas de *C. macropomum*.

Cepas	Coleção de Culturas	Estado	Ano do isolamento	Órgão
AM-ED01	LAMAO	AM	2018	Cérebro
AM-ED03	LAMAO	AM	2018	Cérebro
AM-ED05	LAMAO	AM	2019	Rim
AM-ED06	LAMAO	AM	2019	Cérebro
AM-ED15	LAMAO	AM	2019	Cérebro
AM-ED36	LAMAO	AM	2019	Baço
AM-ED38	LAMAO	AM	2019	Rim
AM-ED43	LAMAO	AM	2019	Fígado
AM-ED45	LAMAO	AM	2019	Intestino
AM-ED46	LAMAO	AM	2020	Rim
ED20-14	AQUAVET	MG	2014	Rim
ED37-17	AQUAVET	RO	2017	Rim
ED38-17	AQUAVET	RO	2017	Rim
ED48-20	AQUAVET	AM	2020	Intestino

### 2.2.2. IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA POR MALDI-ToF

Os isolados foram descongelados, semeados em ágar triptona de soja (TSA) (HiMedia, Índia) e incubados a 28°C por 24 horas. As colônias foram identificadas usando espectrometria de massas por MALDI-ToF, conforme descrito por ASSIS *et al.* (2017). Para isso, entre uma e duas unidades formadoras de colônias (UFC) frescas foram coletadas e aplicadas na placa de aço inoxidável polido (Bruker Daltonics, EUA), com auxílio de um palito de madeira estéril. Subsequentemente, adicionou-se 1 µL de ácido fórmico a 70% (Sigma-Aldrich), sendo aguardada a sua secagem completa, à temperatura ambiente, e, em seguida, foi adicionado 1 µL da matriz de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA) (Bruker Daltonics), que secou naturalmente. A calibração do equipamento foi realizada com o *Bacterial Test Standard* (BTS) (*E. coli* DH5 alpha; Bruker Daltonics), antes dos procedimentos. Os espectros foram obtidos seguindo as recomendações do fabricante, no software FlexControl e MicroFlex LT *mass spectrometer* (Bruker Daltonics). A placa de aço polido com os isolados preparados foi, então, inserida no equipamento Microflex LT (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) para identificação das bactérias, através das proteínas ionizadas liberadas após exposição aos tiros de laser.

De acordo com o proposto pelo fabricante, são considerados valores de escores como critério de pontuação para confirmação da identificação de microrganismos. Sendo assim, escores com valores  $\geq 2.000$  indicam uma identificação a nível de espécie. Escores com pontuação entre 1.700 e 1.999 apontam uma identificação a nível de gênero. Já os

escores com valores abaixo de 1.700 são considerados imprecisos quanto à identificação do microrganismo.

Além disso, de acordo com o preconizado por REICHLEY *et al.* (2017), foi investigada, por meio do software FlexAnalysis versão 3.4 (Bruker Daltonics), a presença de picos espécie-específico para *E. tarda* ( $m/z = 4.252$ ), *E. piscicida* ( $m/z = 8.793$ ) e *E. anguillarum* ( $m/z = 7.628$ ).

### 2.2.3. ANÁLISE DE MAIN SPECTRA PROFILE (MSP)

A fim de se verificar a existência da relação proteica entre os isolados de *E. tarda* selecionados, foi realizada, inicialmente, a construção de MSPs no sistema MALDI Biotyper (Bruker Daltonics). Para isso, as 14 cepas (tabela 1) foram descongeladas, estriadas em TSA e incubados a 28°C por 24 horas. Após o período de incubação, foi realizada a extração em tubo de colônias bacterianas de cada isolado, conforme preconizado por ASSIS *et al.* (2017). Dessa forma, foi coletada a quantidade equivalente a 1 µL de colônias bacterianas, com o auxílio de uma alça bacteriológica, sendo suspensas em 300 µL de água destilada. Posteriormente, foi adicionado um volume de 900 µL de etanol e a solução foi homogeneizada, com o auxílio de um agitador vórtex (KASVI). A suspensão bacteriana foi, então, centrifugada duas vezes por dois minutos a 15.000 rpm, e o sobrenadante removido. Foi aguardada a secagem completa, à temperatura ambiente, do *pellet* obtido que, por sua vez, foi ressuspensionado em 50 µL de ácido fórmico a 70% e em 50 µL de acetonitrila. Novamente, a solução foi homogeneizada e centrifugada por dois minutos a 15.000 rpm.

Em seguida, 1 µL do sobrenadante foi adicionado em oito pontos diferentes da placa de aço polido. Aguardou-se a secagem completa da placa e, após isso, adicionou-se 1 µL da matriz HCCA, que secou naturalmente. A calibração do equipamento foi realizada com o BTS, antes do início do procedimento, conforme explicado no tópico anterior (item 2.2.2.). Em cada um dos oito pontos, os dados de massa/carga ( $m/z$ ) foram coletados em triplicatas, gerando um total de 24 espectros. A qualidade destes foi analisada pelo software FlexAnalysis (Bruker Daltonics), no qual os três espectros de pior qualidade foram descartados. Os espectros que restaram foram adicionados ao MALDI-ToF Biotyper versão 3 (Bruker Daltonics) em que se obteve os MSPs para cada isolado bacteriano. A aprovação do MSP se deu pela obtenção de um escore mínimo de 2.700 e frequência de picos de 75%.

Todos os espectros adicionados ao software foram exportados. Os MSPs gerados para cada isolado tiveram sua massa de pico extraída e comparada por um software *in house*, MSP-Share, em que um módulo, Dendrograma de Dice (DD), foi gerado para a comparar a similaridade proteica entre os isolados. Este módulo é responsável por: (1) constatar os picos  $m/z$  nos MSPs; (2) calcular o coeficiente de Sørensen-Dice entre cada par de MSPs; (3) construir uma matriz de distância (por exemplo, 1-Dice); (4) organizar os MSPs hierarquicamente com a média aritmética entre grupos de pares não ponderados (UPGMA) e (5) dispor um dendrograma com a biblioteca *ggdendro* do software R (R CORE TEAM, 2021). O ponto de corte para tipagem foi baseado na similaridade de Dice, usando a média de todos os sítios menos 1.645 vezes o desvio padrão (isto significa que, admitindo a curva normal, 95% dos valores de similaridade ficaram acima do ponto de corte estabelecido). O poder discriminatório da técnica foi calculado pelo Índice de Diversidade de Simpson (SDI). Um SDI = 1 significa que o método é capaz de distinguir todos os isolados e, quando mais próximo a 0, indica homogeneidade da tipagem de cepas (HUNTER & GASTON, 1988).

#### 2.2.4. CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA

##### 2.2.4.1. Extração do DNA

Para caracterização genética, foram realizadas metodologias moleculares, que serão descritas nos tópicos subsequentes, nos 14 isolados que foram utilizados para a realização da análise de diversidade peptídica descrita no tópico anterior (item 2.2.3.). Sendo assim, estes foram descongelados, estriados em ágar MacConkey (TmMedia, Índia), incubados a 28°C por 24h. Em seguida, o material genético foi extraído por meio do kit de purificação Maxwell 16 Tissue DNA (Promega, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Após isso, o DNA extraído foi quantificado pelo espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, EUA). A pureza do ácido nucleico foi mensurada através da razão de absorbância em comprimento de onda a 260 nm/280 nm, seguindo as recomendações do fabricante. O material genético extraído e quantificado de cada isolado foi armazenado a -20°C até o uso.

##### 2.2.4.2. Sequenciamento do gene *dnaJ*

Para a confirmação da identificação a nível de espécie, realizada pelo MALDI-ToF, dos 14 isolados de *E. tarda*, o sequenciamento do gene *dnaJ* foi realizado.



foi composta por tampão 1X de PCR, 0,2  $\mu$ M de dNTPs, 1,5 mM de  $MgCl_2$ , 0,5  $\mu$ M do *primer*, 2 U de Taq DNA polimerase e 35 ng de DNA de cada isolado. As etapas da PCR consistiram em uma desnaturação inicial de 95 °C por 15 min, seguido por 30 ciclos de 95 °C por 30 s, 45 °C por 1 min, 72 °C por 4 min e uma extensão final a 72 °C por 16 min. A reação de amplificação foi realizada no termociclador Veriti.

Os produtos correspondentes à PCR foram separados por eletroferese em gel de agarose (1,5%) e corados com brometo de etídio (0,5  $\mu$ g/mL por 20 min). Um marcador de 1 kb (Promega) foi utilizado como padrão de tamanho molecular. O gel com os produtos da PCR, foram visualizados por transiluminação UV e as imagens foram capturadas usando o sistema digital de imagem L-Pix EX (Loccus Biotecnologia). As imagens capturadas foram avaliadas usando o software BioNumerics versão 6.6 (Applied Maths). O coeficiente de Dice foi utilizado para determinar as semelhanças entre os padrões de bandas (DICE, 1945) e um dendrograma foi gerado usando o método de média aritmética entre grupos de pares não ponderados (UPGMA). Para considerar as cepas como clonalmente relacionadas, um ponto de corte foi calculado como descrito previamente. O poder discriminatório da REP-PCR também foi calculado usando o índice de diversidade de Simpson (HUNTER & GASTON, 1988).

## 2.3. RESULTADOS

### 2.3.1. CONFIRMAÇÃO DA ESPÉCIE BACTERIANA

As cepas foram identificadas pelo MALDI-ToF, e foram obtidos valores de escores variando de 2.153 a 2.600 (Tabela 2). Em adição, picos específicos de *E. tarda* foram observados nos 14 isolados (entre 4.249,280 e 4.254,087 m/z), sugerindo *Edwardsiella tarda* como provável espécie.

A confirmação a nível de espécie também foi realizada através do sequenciamento. Aproximadamente, um produto de 700 pares de bases (pb) foi gerado como resultado da amplificação do gene *dnaJ*. As sequências oriundas dos 14 isolados tiveram uma cobertura de 100%, e uma variação na identidade entre 97.81% e 100%, quando comparadas com outras sequências depositadas no banco de dados NCBI, pela análise do BLAST. Todas as sequências obtidas apresentaram uma grande similaridade com as cepas: *Edwardsiella tarda strain KC-Pc-HB1 chromosome, complete genome* (Número de acesso: CP023706.1), *Edwardsiella tarda dnaJ gene for DnaJ, partial cds, strain: SU138* (AB454434.1) e *Edwardsiella tarda dnaJ gene for DnaJ, partial cds,*

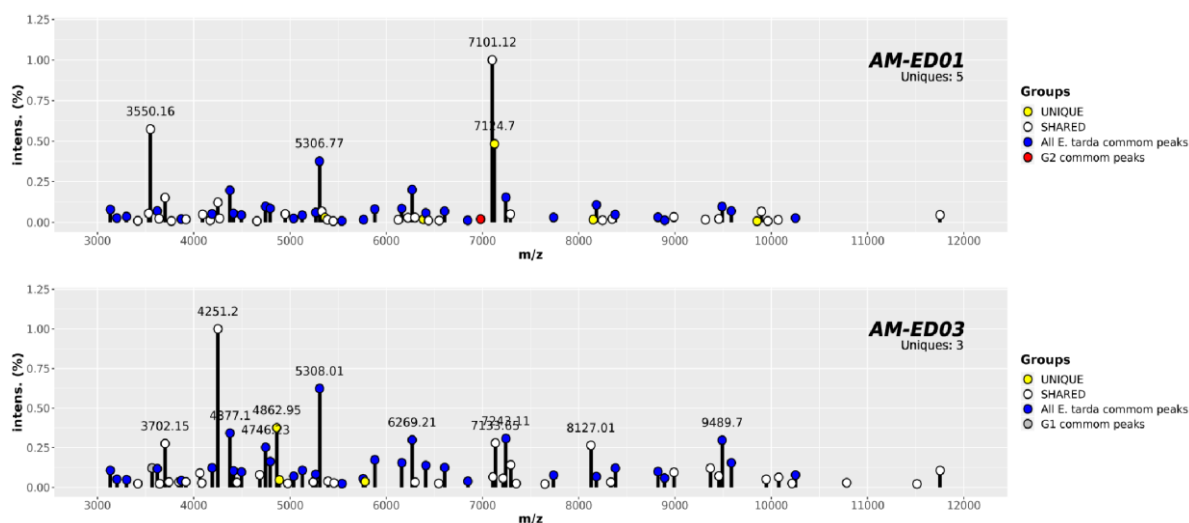
*strain*: GTC 112 (AB272633.1). Sendo assim, os isolados foram confirmados como *E. tarda*.

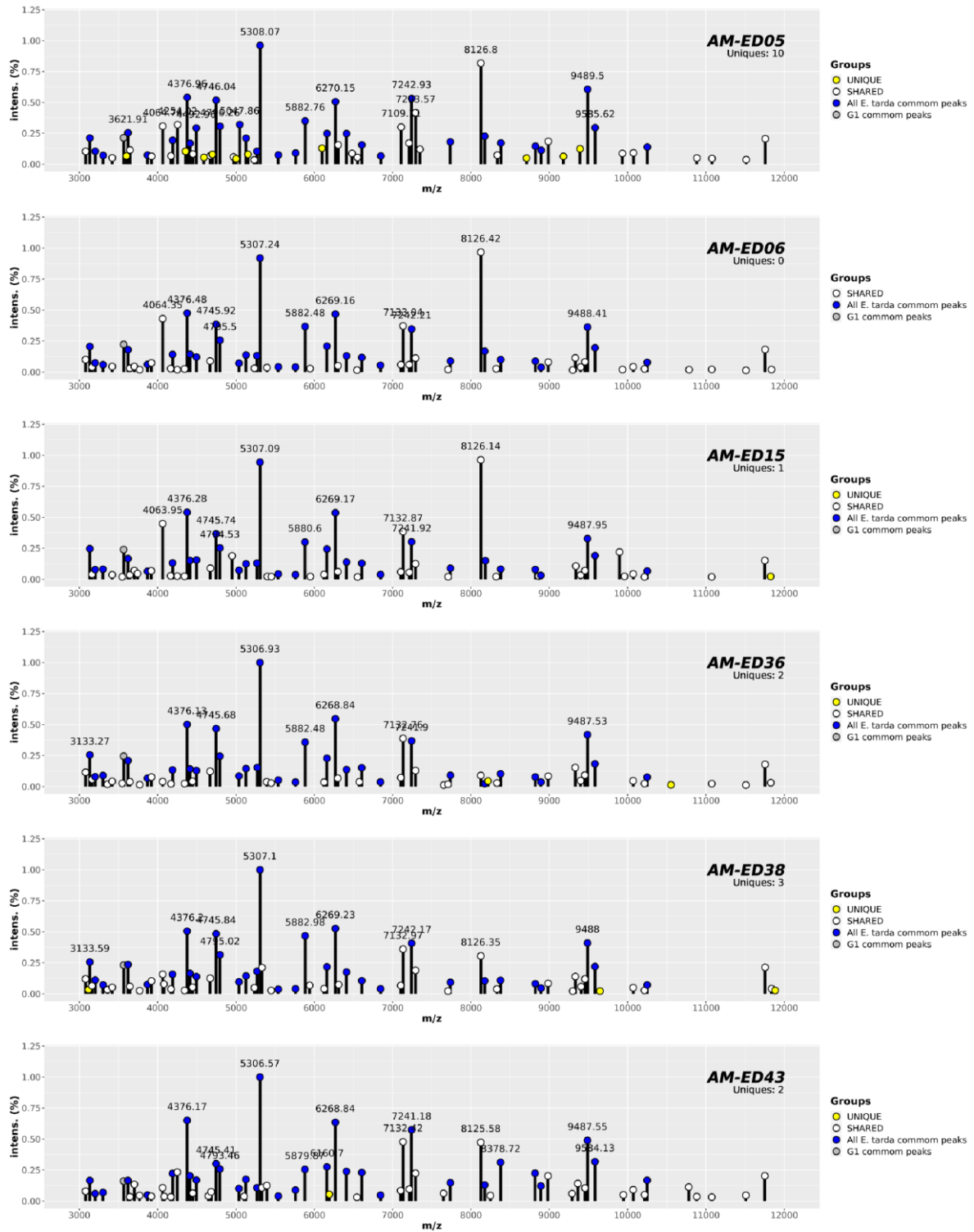
Tabela 2. Valores de escores obtidos pelo MALDI-ToF para os isolados de *E. tarda* selecionados para tipagem proteica e resultado do sequenciamento do gene *dnaJ*.

Cepas	Valor de escores do MALDI-ToF	Pico específico (m/z)	Sequenciamento do gene <i>dnaJ</i>		
			Espécie	Identidade	Cobertura
AM-ED01	2.210	4.252,724	<i>E. tarda</i>	98.08%	100%
AM-ED03	2.459	4.252,634	<i>E. tarda</i>	100%	100%
AM-ED05	2.153	4.253,466	<i>E. tarda</i>	99.45%	100%
AM-ED06	2.598	4.251,951	<i>E. tarda</i>	99.73%	100%
AM-ED15	2.521	4.252,657	<i>E. tarda</i>	100%	100%
AM-ED36	2.539	4.252,619	<i>E. tarda</i>	97.81%	100%
AM-ED38	2.600	4.249,280	<i>E. tarda</i>	98.35%	100%
AM-ED43	2.286	4.250,134	<i>E. tarda</i>	100%	100%
AM-ED45	2.292	4.252,499	<i>E. tarda</i>	100%	100%
AM-ED46	2.347	4.253,458	<i>E. tarda</i>	99.73%	100%
ED20-14	2.494	4.252,789	<i>E. tarda</i>	97.81%	100%
ED37-17	2.358	4.249,682	<i>E. tarda</i>	98.08%	100%
ED38-17	2.534	4.254,087	<i>E. tarda</i>	100%	100%
ED48-20	2.316	4.252,560	<i>E. tarda</i>	98.35%	100%

### 2.3.2. TIPAGEM DE CEPAS DE *E. tarda*

A análise das 14 cepas de *E. tarda*, através dos MSPs, evidenciou que os picos de massa com maior reprodutibilidade foram os que estiveram na faixa de 3110.59 a 12384.10 kDa. Cada um dos MSPs gerados possuíam 70 picos, sendo os mais reprodutíveis para cada isolado, individualmente. Um total de 31 desses picos (44.29%) estavam presentes em todos os isolados de *E. tarda* analisados (Figura 1).





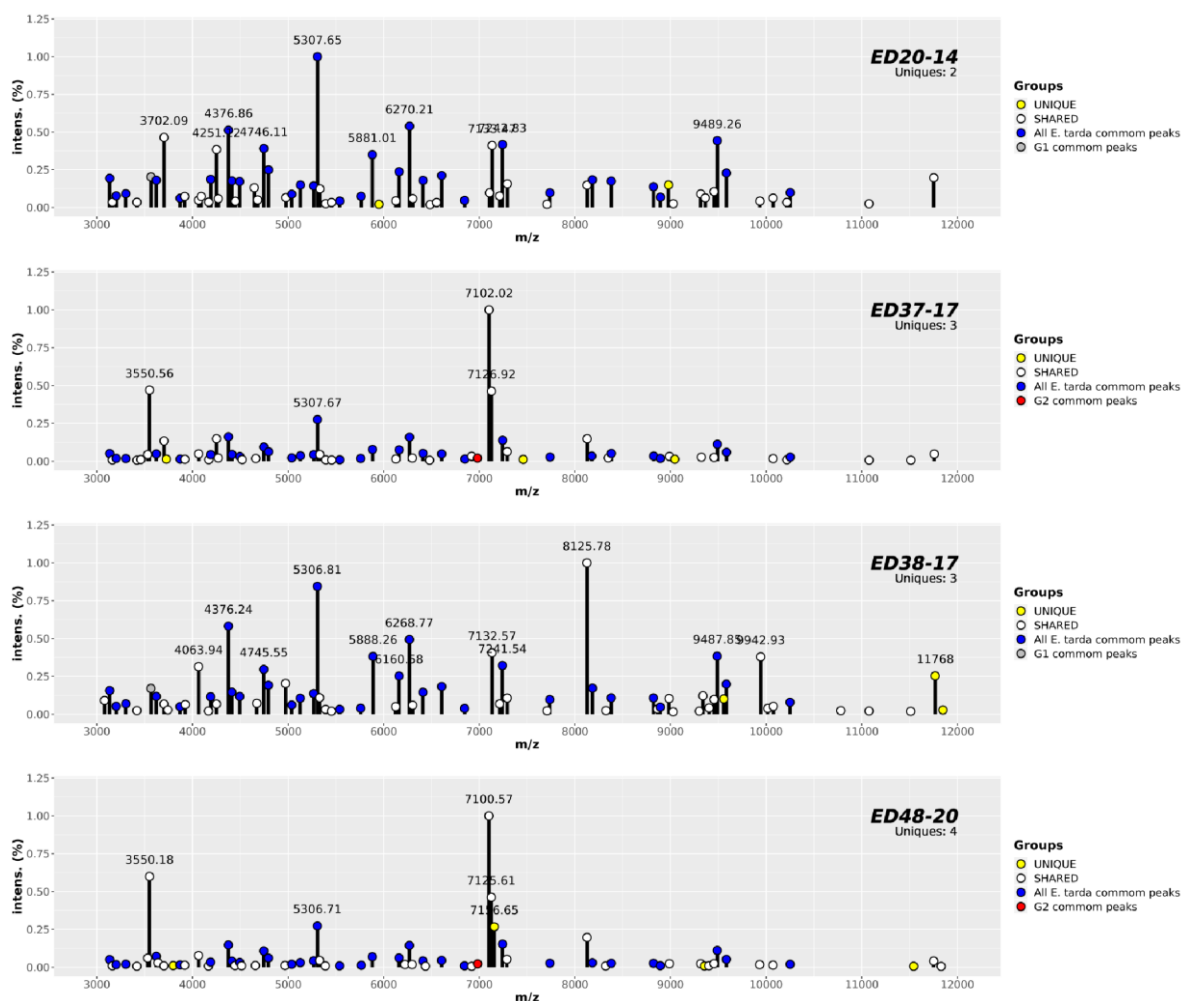


Figura 1 - Lista dos picos dos *Main Spectra Profiles* das 14 cepas de *E. tarda* oriundas de *C. macropomum*. Os picos em comum a todos os MSPs foram representados pelos círculos azuis. Os picos comuns a dois ou mais MSPs são representados por círculos brancos. Picos comuns a isolados do grupo G1 estão marcados por círculos cinzas e os únicos picos pertencentes ao grupo G2 estão representados por círculos vermelhos. Os picos exclusivos de cada MSP foram representados em amarelo.

Um dendrograma de Dice foi construído para os 14 MSPs de *E. tarda*, onde foi calculado o valor do ponto de corte de 69,73%, sendo as cepas agrupadas em dois grupos, G1 e G2 (Figura 2). Para cada grupo definido, o software MSP-Share mostrou picos específicos, os quais não são compartilhados com o outro grupo. Para G1, o pico de massa específico encontrado foi de 3565.68, enquanto para o G2, o pico de massa específico foi 6981.56 (Figura 1). O poder discriminatório da técnica de tipagem pelo MALDI-ToF foi de 0.440.

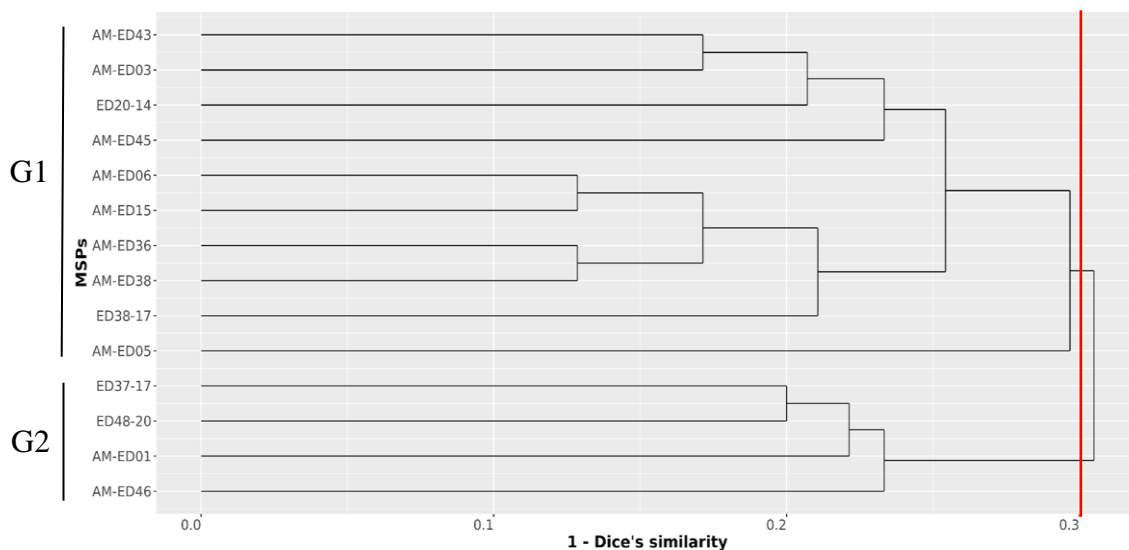


Figura 2 – Dendrograma de Dice construído a partir dos *Main Spectra Profiles* das 14 cepas de *E. tarda*, oriundas de *C. macropomum*. A linha vermelha representa o ponto de corte estabelecido.

A REP-PCR dos 14 isolados de *E. tarda* resultou na amplificação de 8 a 15 bandas, com faixa de tamanho entre 400 e 4000 pb. Três diferentes padrões GTG<sub>5</sub> foram obtidos baseados em um ponto de corte de similaridade calculado de 77.08% (Figura 3). Nenhuma associação foi observada entre os padrões GTG<sub>5</sub> e surtos assistidos. O poder discriminatório da técnica de REP-PCR foi de 0.692.

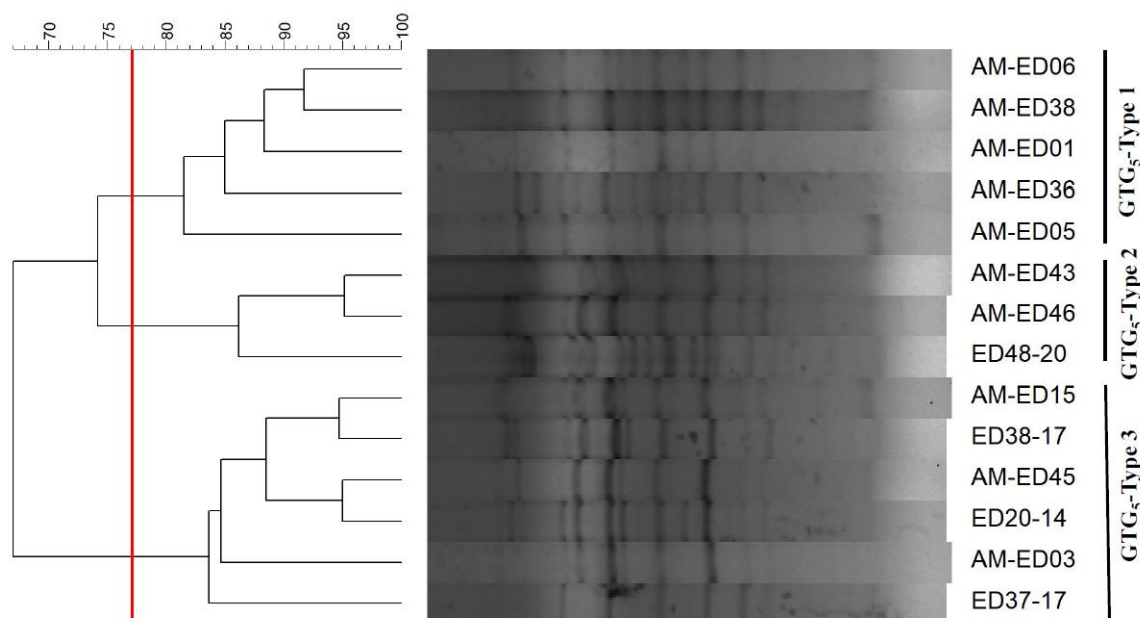


Figura 3. Resultado da REP-PCR para as 14 cepas de *E. tarda* provenientes de *C. macropomum*. O dendrograma foi construído usando o coeficiente de Dice e o método UPGMA.

## 2.4. DISCUSSÃO

*E. tarda* é um patógeno bacteriano capaz de afetar uma ampla gama de hospedeiros, inclusive podendo acometer uma extensa variedade de espécies de peixes (ALEXANDRINO *et al.*, 1999; CARVALHO, 2012; LIMA *et al.*, 2008; PROIETTI-JÚNIOR *et al.*, 2017; WINCKLER *et al.*, 2015; XU & ZHANG 2014). O isolamento a partir de *C. macropomum* já havia sido descrito anteriormente (CARVALHO, 2012), e a susceptibilidade desta espécie de peixe para a edwardsielose foi comprovada (REIS *et al.*, 2023). Em 2014, houve o primeiro isolamento de *E. tarda* de tambaqui, referente à bacterioteca do AQUAVET. Com o decorrer dos anos uma elevação na ocorrência desta bactéria neste hospedeiro foi observada. Dessa forma, o conhecimento deste patógeno é importante, para que seja possível a construção de medidas epidemiológicas a fim de prevenir e controlar surtos futuros, evitando assim possíveis perdas que possam ser geradas. Sendo assim, pela primeira vez, o presente trabalho avaliou as tipagens genéticas e peptídicas de isolados de *E. tarda* provenientes de tambaqui.

Isolados de *E. tarda* foram identificados através do MALDI-ToF, o qual é um método rápido e confiável de identificação de microrganismos (ASSIS *et al.*, 2017; REICHLEY *et al.*, 2017). Contudo, caso o banco de dados do MALDI-ToF não esteja atualizado, a identificação de isolados de *Edwardsiella* pode ser realizada de forma incorreta (REICHLEY *et al.*, 2017). Como já mencionado, isolados de *E. anguillarum* e *E. piscicida* já foram classificados como *E. tarda* (ABAYNEH *et al.*, 2013; SHAO *et al.*, 2015). REICHLEY *et al.* (2017), durante a identificação de isolados de *Edwardsiella*, observaram picos de peptídeos específicos para espécies de *E. anguillarum* (7628 m/z), *E. piscicida* (8793 m/z) e *E. tarda* (4252 m/z). Picos de peptídeo específicos de *E. tarda* foram identificados nos isolados de tambaquis (variando de 4.249,280 a 4.254,087 m/z), sugerindo a identificação destes como *E. tarda*. Esses resultados foram então confirmados por meio do sequenciamento do gene *dnaJ*, que se mostrou altamente eficaz para a identificação a nível de espécie de isolados de *Edwardsiella* (BUJÁN *et al.*, 2018).

A adaptação de *E. tarda* a diferentes classes de animais evidencia a possibilidade dessa bactéria possuir ampla diversidade genética intraespecífica. Ao longo dos anos, várias técnicas de tipagem molecular foram utilizadas para cepas de *E. tarda*, como *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA) (ABAYNEH *et al.*, 2012), *Multilocus Sequence Typing* (MLST), *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) (YANG *et al.*, 2013), *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR* (ERIC-PCR), *Random Amplification of Polymorphic DNA* (RAPD), BOX-PCR e *Repetitive Extragenic*

*Palindromic* PCR (REP-PCR) (CASTRO *et al.*, 2011). Dentre as técnicas menos onerosas e mais fáceis de serem executadas, a técnica de REP-PCR foi a que apresentou um maior poder discriminatório (CASTRO *et al.*, 2011). Dessa forma, essa ferramenta foi utilizada para analisar a diversidade genética dos isolados do presente trabalho.

A análise por REP-PCR foi realizada neste estudo e as cepas de *E. tarda*, derivadas de *C. macropomum*, oriundas de três estados diferentes, em anos distintos, foram agrupadas em três grupos genéticos, não sendo clonalmente relacionadas. Achados semelhantes foram encontrados na literatura, para isolados dessa espécie bacteriana com a utilização dessa metodologia de tipagem molecular. CASTRO *et al.* (2011) observaram variabilidade genética entre isolados de *E. tarda* provenientes de uma única espécie de peixe, linguados (*Psetta maxima*) obtidos em diferentes localidades e períodos na Europa. GRIFFIN *et al.* (2013) perceberam a diversidade genética entre cepas de *E. tarda* oriundas de diferentes hospedeiros (humano, algumas espécies de bagres e tilápias) em localizações distintas dos EUA. Ambos os estudos dividiram os isolados de *E. tarda* em dois grupos genéticos.

Assim como a tipagem molecular, a tipagem peptídica pode ser vista como uma ferramenta que fornece uma impressão digital de um microrganismo (MALAININE *et al.*, 2013). A tipagem por MALDI ToF é considerada mais rápida, prática e econômica quando comparada a tipagem por métodos moleculares, possuindo resultados satisfatórios na análise de variações intraespecíficas (TORRES-CORRAL *et al.*, 2019). Por esse motivo, essa técnica foi escolhida no presente estudo para verificar a diversidade proteica entre os isolados.

Neste estudo, foram observados padrões espectrais únicos de cada isolado, compartilhados entre as cepas e comuns a todos os isolados de *E. tarda*. O dendrograma de MSP construído discriminou os isolados em dois grupos, cada um com um pico de massa específico (G1 = 3565,68; G2 = 6981,56). Até onde sabemos, esse é o primeiro estudo que relata a existência de picos de massa intraespecíficos para *E. tarda*. Esses dados podem servir de base para a identificação de proteínas responsáveis pela patogenicidade e determinados mecanismos de virulência no hospedeiro (BHOWMICK *et al.*, 2008).

As técnicas de tipagem utilizadas neste estudo possuem alvos diferentes. A tipagem por MALDI-ToF tem como finalidade analisar a diversidade de proteínas ribossomais e algumas proteínas *housekeeping* (SINGHAL *et al.*, 2015), enquanto a tipagem por REP-PCR está voltada a observação da relação genética entre as cepas, tendo

como alvo as sequências palindrômicas repetitivas do genoma bacteriano (VERSALOVIC *et al.*, 1998).

A tipagem por REP-PCR apresentou um maior poder discriminatório quando comparada a tipagem por MALDI-ToF. Uma hipótese para esclarecer esse evento, é que existem espécies bacterianas em que as variações intraespecíficas são mais difíceis de serem observadas a nível de proteoma (SANDRIN *et al.*, 2012), uma vez que a análise do conjunto de proteínas de um microrganismo reflete o estado fisiológico daquele momento (BURTSCHER *et al.*, 2020). Já ao se analisar partes de um genoma, a molécula biológica é mais estável ao longo da sobrevivência do microrganismo (SANDRIN *et al.*, 2012). Em *Edwardsiella* spp., a observação de diferenças fenotípicas é dificultada entre as espécies, e a identificação fidedigna não se baseia em métodos convencionais (BÚJAN *et al.*, 2018), como por exemplo o sequenciamento do gene 16S rRNA, o qual é realizado na identificação em várias espécies de procariotos. Além disso, a identificação de *Edwardsiella* spp. por meio do MALDI-ToF pode ser realizada de forma errônea (REICHHLEY *et al.*, 2017), como já mencionado anteriormente, em virtude das semelhanças entre as espécies desse gênero. Sendo assim, a análise de variações intraespecíficas por meio do MALDI-ToF, pode também ser dificultada por conta desses fatores.

Diante do exposto, pode-se concluir que os isolados de *E. tarda* provenientes de tambaquis estão divididos em três grupos genéticos distintos, não sendo clonalmente relacionados. A técnica de tipagem molecular REP-PCR mostrou maior poder discriminatório em relação a metodologia de tipagem peptídica, por MALDI-ToF. No entanto, os resultados dos padrões espectrais aqui obtidos podem servir de base para estudos futuros.

## 2.5. REFERÊNCIAS

ABAYNEH, T.; COLQUHOUN, D. J.; SØRUM, H. *Edwardsiella piscicida* sp.nov., a novel species pathogenic to fish. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, n. 3, p. 644–654, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.12080>

ABAYNEH, T.; COLQUHOUN, D. J.; SØRUM, H. Multi-locus Sequence Analysis (MLSA) of *Edwardsiella tarda* isolates from fish. **Veterinary Microbiology**, v. 158, n. 3–4, p. 367–375, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.03.006>

ALEXANDRINO, A.; OKUMURA, M.; BALDASSI, L. Ocorrência de infecção por *Edwardsiella tarda* em truta arco-iris *Oncorhynchus mykiss* em cultivo intensivo. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 25, p. 121–123, 1999.

ASSIS, G. B. N.; PEREIRA, F. L.; ZEGARRA, A. U.; TAVARES, G. C.; LEAL, C. A.; FIGUEIREDO, H. C. P. Use of MALDI-TOF Mass Spectrometry for the Fast Identification of Gram-Positive Fish Pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01492

BARONY, G. M.; TAVARES, G. C.; PEREIRA, F. L.; CARVALHO, A. F.; DORELLA, F. A.; LEAL C. A. G.; FIGUEIREDO, H. C. P. Large-scale genomic analyses reveal the population structure and evolutionary trends of *Streptococcus agalactiae* strains in Brazilian fish farms. **Scientific Reports**, v. 7, n. 13538, 2017. DOI:10.1038/s41598-017-13228-z 1

BHOWMICK, P. P.; KHUSHIRAMANI, R.; RAGHUNATH, P.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. Molecular typing of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from seafood harvested along the south-west coast of India. **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 198-204, 2008. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2007.02304.x

BUJÁN, N.; MOHAMMED, H.; BALBOA, S.; ROMALDE, J. L.; TORANZO, A. E.; ARIAS, C. R.; MAGARIÑOS, B. Genetic studies to re-affiliate *Edwardsiella tarda* fish isolates to *Edwardsiella piscicida* and *Edwardsiella anguillarum* species. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 30–37, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2017.09.0047>

BURTSCHER, J.; KULLER, F.; DREIER, M.; ARIAS-ROTH, E.; DRISSNER, D.; DOMIG, K. J. Characterization of *Clostridium tyrobutyricum* Strains Using Three Different Typing Techniques. **Microorganisms**, v. 8, n. 7, 1057, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8071057>

CARVALHO, E. C. **Identificação fenotípica e molecular de bactérias patogênicas associadas à criação de peixes amazônicos**. 2012. Dissertação (Mestrado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, INPA. Manaus, 120 f. 2012.

CASTRO, N.; TORANZO, A. E.; BASTARDO, A.; BARJA, J. L.; MAGARIÑOS, B. Intraspecific genetic variability of *Edwardsiella tarda* strains from cultured turbot. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 95, p. 253-258, 2011. DOI: 10.3354/dao02363

CHAGAS, E. C.; AQUINO-PEREIRA, S. L.; BENAVIDES, M. V.; BRANDÃO, F. R.; MONTEIRO, P. C.; MACIEL, P. O. *Neoechinorhynchus buttnerae* parasitic infection in tambaqui (*Colossoma macropomum*) on fish farms in the state of Amazonas. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 45, n. 2, e499, 2019. DOI: 10.20950/1678-2305.2019.45.2.499

COLES, B. M.; STROUD, R. K.; SHEGGEY, S. Isolation of *Edwardsiella tarda* from three Oregon sea mammals. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 14, n. 3, p. 339-341, 1978. DOI: <https://doi.org/10.7589/0090-3558-14.3.339>

COSTA, F. A. A.; LEAL, C. A. G.; LEITE, R. C.; FIGUEIREDO, H. C. P. Genotyping of *Streptococcus Dysgalactiae* Strains Isolated from Nile Tilapia, *Oreochromis Niloticus* (L.). **Journal of Fish Diseases**, v. 37, n. 5, p. 1–7, 2013. DOI: 10.1111/jfd.12125

DA COSTA, A. R.; CHIDEROLI, R. T.; LANES, G. C.; FERRARI, N. A.; CHICOSKI, L. M.; BATISTA, C. E.; PANDOLFI, V. C. F.; WARE, C.; GRIFFIN, M. J.; DOS SANTOS, A. R.; AZEVEDO, V. A. C.; DA COSTA, M. M.; PEREIRA, U. P. Multiplex PCR assay for correct identification of the fish pathogenic species of *Edwardsiella* genus reveals the presence of *E. anguillarum* in South America in strains previously

characterized as *E. tarda*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 132, n. 6, p. 4225-4235, 2022. DOI: doi: 10.1111/jam.15538

DICE, L. R. Measures of the amount of ecologic association between species. **Ecology**, v. 26, n. 3, p. 297–302, 1945. DOI: <https://doi.org/10.2307/1932409>

EWING, W. H.; MCWHORTER, A. C.; ESCOBAR, M. R.; LUBIN, A. H. *Edwardsiella*, a new genus of *Enterobacteriaceae* based on a new species, *E. tarda*. **International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy**, v. 15, n. 1, p. 33–38, 1965. DOI: <https://doi.org/10.1099/00207713-15-1-33>

GALLANI, S. U.; VALLADÃO, G. M. R.; ASSANE, I. M.; ALVES, L. O.; KOTZENT, S.; HASHIMOTO, D. T.; PILARSKI, F. Motile Aeromonas septicemia in tambaqui *Colossoma macropomum*: Pathogenicity, lethality and new insights for control and disinfection in aquaculture. **Microbial Pathogenesis**, v. 149, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104512>

GRIFFIN, M. J.; QUINIOU, S. M.; CODY, T.; TABUCHI, M.; WARE, C.; CIPRIANO, R. C.; MAUEL, M. J.; SOTO, E. Comparative analysis of *Edwardsiella* isolates from fish in the eastern United States identifies two distinct genetic taxa amongst organisms phenotypically classified as *E. tarda*. **Veterinary Microbiology**, v. 165, n. 3-4, p. 358–372, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2013.03.027>

HONG NHUNG, P.; OHKUSU, K.; MISHIMA, N.; NODA, M.; MONIR SHAH, M.; SUN, X.; HAYASHI, M.; EZAKI, T. Phylogeny and species identification of the family *Enterobacteriaceae* based on *dnaJ* sequences. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 58, n. 2, p. 153–161, 2007. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2006.12.019

HUNTER, P. R. & GASTON, M. A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n. 11, p. 2465-2466, 1988. DOI: 10.1128/jcm.26.11.2465-2466.1988

IBGE, 2022. **Produção da Pecuária Municipal 2021**. Rio de Janeiro.

JERÔNIMO, G. T.; DE PÁDUA, S. B.; BELO, M. A. A.; CHAGAS, E. C.; TABOGA, S. R.; MACIEL, P. O.; MARTINS, M. L. *Neoechinorhynchus buttnerae* (Acanthocephala) infection in farmed *Colossoma macropomum*: A pathological approach. **Aquaculture**, v. 469, p. 124-127, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.11.027>

LEE, K.; KIM, H. K.; PARK, S. K.; SOHN, H.; CHO, Y.; CHOI, Y. M.; JEONG, D. G.; KIM, J. H. First report of the occurrence and whole-genome characterization of *Edwardsiella tarda* in the false killer whale (*Pseudorca crassidens*). **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 80, n. 6, p. 1041–1046, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1292/jvms.17-0590>

LI, W.; RAOULT, D.; FOURNIER, P. E. Bacterial strain typing in the genomic era. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews**, v. 33, p. 892-916, 2009. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2009.00182.x

LIMA, L. C.; FERNANDES, A. A.; COSTA, A. A. P.; VELASCO, F. O.; LEITE, R. C.; HACKETT, J. L. Isolation and characterization of *Edwardsiella tarda* from pacu *Myleus*

*micans*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 1, p. 275–277, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-09352008000100040>

MACIEL-HONDA, P. O.; NETO, E. M. S.; COSTA-FERNANDES, T. O.; DE JESUS, F. H. R.; CHAGAS, E. C.; TAVARES-DIAS, M. First record of *Neoechinorhynchus buttnerae* and *Piscinoodinium pillulare* infection in *Colossoma macropomum* in the state of Tocantins, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 32, n. 1, e013622, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1984-29612023001>

MALAININE, S. M.; MOUSSAOUI, W.; PRÉVOST, G.; SCHEFTEL, J.-M.; MIMOUNI, R. Rapid identification of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from shellfish, sea water and sediments of the Khnifiss lagoon, Morocco, by MALDI-TOF mass spectrometry. **Letters in Applied Microbiology**, v. 56, n. 5, p. 379–386, 2013. DOI: 10.1111/lam.12060

MIELKE, T. D.; FRANCISCO, C. J.; DORELLA, F. A.; FIGUEIREDO, H. C. P.; TAVARES, G. C.; GALLANI, S. U. The strategic use of water additives for tambaqui *Colossoma macropomum* transport: New insights of bacteriosis and productivity approach. **Aquaculture**, v. 558, 738406, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738406>

MOHANTY, B. R. & SAHOO, P. K. Edwardsiellosis in Fish: A Brief Review. **Journal of Biosciences**, v. 32, n. 3, p. 1331–1344, 2007.

PARK, S. B.; AOKI, T.; JUNG, T. S. Pathogenesis of and Strategies for Preventing *Edwardsiella Tarda* Infection in Fish. **Veterinary Research**, v. 43, n. 67, 2012.

PEIXE BR. **Anuário Peixe BR da piscicultura 2022**. São Paulo: [s.n.], 2023.

PEREIRA, J. N. & MOREY, G. A. M. First record of *Neoechinorhynchus buttnerae* (Eoacantocephala, Neochinorhynchidae) on *Colossoma macropomum* (Characidae) in a fish farm in Roraima, Brazil. **Acta Amazonica**, v. 48, n. 1, p. 42-45, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/1809-4392201702411>

PROIETTI JÚNIOR, A. A.; RODRIGUES, D. P.; ROGES, E. M.; LIMA, L. S.; CARDOSO, F. M. N.; YOSHIOKA, T. O.; TAVARES-DIAS, M. First isolation and characterization of clinical signs of polymicrobial infection by *Aeromonas jandiae*, *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella tarda* in disease outbreak of fingerlings *Arapaima gigas* (Pirarucu). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 29 ENCONTRO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA AMBIENTAL, 15, 2017, Foz do Iguaçu. **Resumos** [...] São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2017. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1079928>. Acesso em: 06 mai. 2023

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2021

REICHLEY, S. R.; WARE, C.; STEADMAN, J.; GAUNT, P. S.; GARCIA, J. C.; LAFRENTZ, B. R.; TCHACIL, A.; WALDBIESER, G. C.; STINE, C. B.; BUJÁN, N.; ARIAS, C. R.; LOCH, T.; WELCH, T. J.; CIPRIANO, R. C.; GREENWAY, T. E.; KHOO, L. H.; WISE, D. J.; LAWRENCE, L.; GRIFFIN, M. J. Comparative Phenotypic and Genotypic Analysis of *Edwardsiella* Isolates from Different Hosts and Geographic Origins with Emphasis on Isolates Formerly Classified as *E. tarda*, and Evaluation of

Diagnostic Methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 12, p. 3466–3491, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.00970-17>

REIS, F. Y. T.; ROCHA, V. P.; JANAMPA-SARMIENTO, P.; COSTA, H. L.; EGGER, R. C.; PASSOS, N. C.; DE ASSIS, C. H. S.; CARNEIRO, S. P.; SANTOS, A. F.; SILVA, B. A.; DORELLA, F. A.; LEIBOWITZ, M. P.; LUZ, R. K.; PIEREZAN, F.; GALLANI, S. U.; TAVARES, G. C.; FIGUEIREDO, H. C. P. *Edwardsiella tarda* in Tambaqui (*Colossoma macropomum*): A Pathogenicity, Antimicrobial Susceptibility, and Genetic Analysis of Brazilian Isolates. **Animals**, 13, 2910, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/ani13182910>

SANDRIN, T. R.; GOLDSTEIN, J. E.; SCHUMAKER, S. Maldi Tof MS profiling of bacteria at the strain level: a review. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 32, n. 3, 188-217, 2012. DOI: [10.1002/mas.21359](https://doi.org/10.1002/mas.21359)

SHAO, S.; LAI, Q.; LIU, Q.; WU, H.; XIAO, J.; SHAO, Z.; WANG, Q.; ZHANG, Y. 2015. Phylogenomics characterization of a highly virulent *Edwardsiella* strain ET080813 T encoding two distinct T3SS and three T6SS gene clusters: Propose a novel species as *Edwardsiella anguillarum* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 36–47, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2014.10.008>

SINGHAL, N.; KUMAR, M.; KANAUIA, P. K.; VIRDI, J. S. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00791>

TORRES-CORRAL, Y.; FERNÁNDEZ-ÁLVARES, C.; SANTOS, Y. Proteomic and molecular fingerprinting for identification and tracking of fish pathogenic *Streptococcus*. **Aquaculture**, v. 498, 322-334, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.041>

VALLADÃO, G. M. R.; GALLANI, S. U.; PILARSKI, F. South American Fish for Continental Aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, v.10, n. 2, p. 351–369, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/raq.12164>

VALLADÃO, G. M. R.; GALLANI, S. U.; JERÔNIMO, G. T.; DE SEIXAS, A. T. Challenges in the control of acanthocephalosis in aquaculture: special emphasis on *Neoechinorhynchus buttnerae*. **Reviews in Aquaculture**, v. 12, n. 3, p. 1360-1372, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1111/raq.12386>

VERSALOVIC, J.; BRUIJN, F. J. De; LUPSKI, J. R. Repetitive Sequence-based PCR (rep-PCR) DNA Fingerprinting of Bacterial Genomes. In: de Bruijn, F.J., Lupski, J.R., Weinstock, G.M. (eds) **Bacterial Genomes**. Springer, Boston, MA, p. 437-454, 1998. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6369-3\\_34](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6369-3_34)

WINCKLER, L. Z.; SANTOS, R. M.; FERREIRA, M. W.; SANTOS, F. M.; LEITE, T. C.; DE ANDRADE, G. B. Mortalidade de tambacus (*Colossoma macropomum* x *Piaractus mesopotamicus*) infectados por *Edwardsiella tarda*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 52, n. 1, p. 63–67, 2015. DOI: [10.11606/issn.1678-4456.v52i1p63-67](https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.v52i1p63-67)

WOYNÁROVICH, A. & VAN ANROOY, R. **Field guide to the culture of tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1816)**. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper No. 624, Rome, FAO, 132p. 2019.

XU, T. & ZHANG, X. *Edwardsiella Tarda*: An Intriguing Problem in Aquaculture. **Aquaculture**, v. 431, p. 129–135, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.12.001>

YANG, M.; SHAO, S.; XIAO, J.; WANG, Q.; ZHANG, Y. Phylogenetic investigation of *Edwardsiella tarda* with multilocus sequence typing (MLST) and pulsed field gel electrophoresis (PFGE) typing methods. **Aquaculture**, v. 410-411, p. 79-85, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.05.024>

## CAPÍTULO 3 - IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA E GENÓTÍPICA DE ISOLADOS BRASILEIROS DE *E. tarda* RESISTENTES AOS ANTIMICROBIANOS

### RESUMO

*E. tarda* é um patógeno capaz de provocar mortalidades em peixes. A resistência de isolados dessa espécie a diferentes classes de antimicrobianos já tem sido relatada em amostras oriundas de peixes, incluindo fármacos liberados para uso na aquicultura. Dessa forma, monitorar o perfil de susceptibilidade de patógenos frente aos fármacos é cada vez mais necessário. Diante disso, objetivou-se realizar as caracterizações fenotípica e genotípica de isolados de *E. tarda*, oriundos de diferentes espécies de peixes no território brasileiro, frente aos antimicrobianos, além de estabelecer um ponto de corte epidemiológico provisório. Para tanto, 71 isolados confirmados como *E. tarda* foram selecionados e submetidos ao teste de disco difusão com diferentes antimicrobianos, seguido pelo cálculo do ponto de corte epidemiológico. Além disso, os isolados foram testados quanto a presença de genes de resistência (*bla<sub>TEM</sub>*, *tetA*, *sulI*, *floR*). Análises estatísticas, como teste exato de Fisher, coeficiente V de Cramer e análise de correspondência múltipla (ACM), foram realizadas. Um total de 26,76%, 26,76%, 7,04%, 18,30%, 11,26% e 8,45% dos isolados, foram classificados como NWT para oxitetraciclina, norfloxacin, lincomicina-espectinomicina, amoxicilina, florfenicol e sulfametaxazol-trimetoprim, respectivamente. Destes, 15,49% foram considerados multirresistentes. A ACM mostrou uma associação entre a susceptibilidade de isolados de tambaquis a oxitetraciclina e ao florfenicol e a resistência de cepas oriundas de tilápias a esses mesmos fármacos. Os genes *bla<sub>TEM</sub>*, *tetA*, *sulI* e *floR* foram encontrados em 39,43%, 47,88%, 11,26% e 19,71% dos isolados, respectivamente. Conclui-se que foi possível observar a existência de alguns isolados resistentes as drogas licenciadas para uso no Brasil, além da presença de genes de resistência. Nossos achados evidenciam um novo desafio sanitário ao se pensar na possível disseminação de cepas consideradas resistentes aos antimicrobianos usados na aquicultura nacional.

**Palavras-chave:** Edwardsiellose, PCR *multiplex*, antibiograma, genes de resistência.

### 3.1. INTRODUÇÃO

Edwardsiellose é uma enfermidade causada por *Edwardsiella* spp., uma bactéria Gram-negativa, anaeróbia facultativa, em forma de bastonete, que possui um amplo

espectro de hospedeiros, como peixes, répteis, aves e mamíferos, incluindo humanos (MOHANTY & SAHOO, 2007). Desde 1962, tem sido associada a elevadas perdas econômicas em sistemas de cultivo de peixes de diferentes espécies, oriundos de ambientes dulcícolas e marinhos (HOSHINA, 1962; MOHANTY & SAHOO, 2007).

Esse microrganismo, quando em condições favoráveis, desencadeia sinais clínicos e achados de necropsia semelhantes a outras doenças bacterianas, como por exemplo: ascite, exoftalmia, ulceração, palidez de brânquias, produção excessiva de muco, e pode culminar na morte de peixes (MOHANTY & SAHOO, 2007; XU & ZHANG, 2014; WINCKLER et al., 2015).

Uma das medidas de controle da infecção ocasionada por esse patógeno é a utilização de antimicrobianos. Todavia, o uso indiscriminado desses fármacos na piscicultura comercial, além de outros sistemas de produção animal, levou o aparecimento de bactérias resistentes a múltiplas drogas (GAO et al., 2012; LEUNG et al., 2019). Trabalhos na literatura relatam a resistência de isolados de *E. tarda* à vários antimicrobianos, como ácido nalidíxico, amoxicilina, ampicilina, lincomicina, norfloxacin, sulfametoxazol-trimetoprim, tetraciclina, estreptomicina, cefotaxima, gentamicina, ciprofloxacina, enrofloxacin, ceftazidima (ALGAMMAL et al., 2022; EZZAT et al., 2021; NIU et al., 2019; REICHLEY et al., 2017).

Para avaliar, fenotipicamente, o perfil de susceptibilidade de isolados de *E. tarda* aos antimicrobianos, podem ser utilizados os testes de disco difusão (ALGAMMAL et al., 2022; EZZAT et al., 2021; NIU et al., 2019), conhecido como antibiograma, além do ensaio de concentração mínima inibitória (CIM) (REICHLEY et al., 2017). Destes, o antibiograma tem como vantagens a simplicidade, a rapidez, o baixo custo, além da flexibilidade de se poder testar diversos antimicrobianos (BERKE & TIerno JR., 1996).

Bactérias do gênero *Edwardsiella* podem atuar de forma considerável na disseminação da resistência aos antimicrobianos (LEUNG et al., 2019), culminando na disseminação de patógenos resistentes entre diferentes classes de hospedeiros (SANTOS & RAMOS, 2018), sendo um problema para a saúde única. Existem estudos que relatam a existência de vários genes de resistência aos antimicrobianos em isolados de *E. tarda*. Dentre esses, os genes de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos e as tetraciclina são prevalentes (ALGAMMAL et al., 2022; NIU et al., 2019).

No Brasil, não há nenhum estudo que aborde a caracterização fenotípica e genotípica da sensibilidade aos antimicrobianos de isolados de *E. tarda*, provenientes de peixes. Além disso, no protocolo padrão utilizado para a realização dos testes de

susceptibilidade das bactérias aos antimicrobianos, oriundas de organismos aquáticos, ainda não há informações quanto aos valores de referência para *E. tarda* (CLSI, 2020).

Sendo assim, os objetivos do presente trabalho foram avaliar o perfil de sensibilidade de isolados de *E. tarda*, provenientes de diferentes espécies de peixes do Brasil, aos antimicrobianos, através do método de discos difusão e da detecção de genes de resistência, além de estabelecer um ponto de corte epidemiológico provisório para os diferentes antimicrobianos.

## 3.2. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1. SELEÇÃO DE ISOLADOS DE *E. tarda*

Foram selecionados, para o estudo, 71 isolados de *Edwardsiella tarda* que foram identificados previamente pelo MALDI-ToF (ASSIS *et al.*, 2017), provenientes das bacteriotecas do AQUAVET, LAMAO e do Laboratório de Anaeróbios da Escola de Veterinária da UFMG (LAEV). Estes isolados foram oriundos de diferentes órgãos de espécies de peixes nativos e exóticos, resultantes de surtos/monitoramento sanitário, provenientes de propriedades localizadas em nove estados (Alagoas, Amazonas, Bahia, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso, Rondônia, São Paulo e Piauí) entre os anos de 2014-2022 (Tabela 3).

Tabela 3. Metadados dos isolados de *E. tarda* utilizados no estudo.

<b>Isolado</b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>Órgão</b>	<b>Estado</b>	<b>Ano</b>
ED06-14	Tilápia	Baço	SP	2014
ED17-14	Pacamã	Rim	MG	2014
ED18-14	Curimba	Cérebro	MG	2014
ED20-14	Tambaqui	Rim	MG	2014
ED24-15	Tilápia	Baço	MG	2015
ED27-16	Tilápia	Baço	MG	2016
ED29-16	Tilápia	Rim	MG	2016
ED35-17	Tambatinga	Cérebro	MT	2017
ED37-17	Tambaqui	Rim	RO	2017
ED38-17	Tambaqui	Rim	RO	2017
ED39-18	Tilápia Vermelha	Rim	SP	2018
ED42-19	Tilápia	Baço	MG	2019
11/19-18	Tilápia	Cérebro	GO	2019
19/19-11	Tilápia	Cérebro	PI	2019
30/19-4	Tilápia	Rim	SP	2019
36/19-21	Tilápia	Cérebro	AL	2019
25/19-23	Tilápia	Rim	GO	2019
RP1	Pintado	NI	SP	2019

ED48-20	Tambaqui	Intestino	AM	2020
ED51-20	Tilápia	Rim	MG	2020
09/20-1	Tilápia	Baço	MG	2020
44/20-01	Tilápia	Cérebro	MG	2020
48/20-07	Tilápia	Rim	MT	2020
50/20-10	Tilápia	Rim	MT	2020
ED53-21	Tamoatá	Rim	MG	2021
ED59-21	Lambari Rosa	Rim	MG	2021
ED62-21	Lambari	Cérebro	MG	2021
14/21-04	Tilápia	Cérebro	PI	2021
28/21-17	Tilápia	Cérebro	BA	2021
34/21-03	Tilápia	Cérebro	MG	2021
67/21-13	Tilápia	Rim	BA	2021
44/22-08	Tilápia	Rim	GO	2022
55/22-06	Tilápia	Cérebro	MG	2022
ZOO-ED	Pacu	Pele	MG	2022
ED63-22	Pirarucu	Cérebro	SP	2022
ED64-22	Tilápia	Cérebro	MG	2022
ED65-22	Pacu	Rim	MG	2022
ED66-22	Pirapitinga	Baço	MG	2022
ED78-22	Tambaqui	Cérebro	AM	2022
ED84-22	Tambaqui	Cérebro	AM	2022
ED87-22	Tambaqui	Cérebro	AM	2022
ED88-22	Tambatinga	Rim	AM	2022
ED90-22	Tambaqui	Cérebro	AM	2022
ED92-22	Pirarucu	Bexiga natatória	BA	2022
ED95-22	Tilápia	Rim	MG	2022
AM-ED01	Tambaqui	Cérebro	AM	2018
AM-ED03	Tambaqui	Cérebro	AM	2018
AM-ED04	Acará-disco	Rim	AM	2019
AM-ED05	Tambaqui	Rim	AM	2019
AM-ED06	Tambaqui	Cérebro	AM	2019
AM-ED08	Tilápia	Cérebro	AM	2019
AM-ED10	Pirarucu	Cérebro	AM	2019
AM-ED15	Tambaqui	Cérebro	AM	2019
AM-ED24	Pirarucu	Rim	AM	2019
AM-ED34	Matrinxã	Rim	AM	2019
AM-ED35	Pirarucu	Cérebro	AM	2019
AM-ED36	Tambaqui	Baço	AM	2019
AM-ED38	Tambaqui	Rim	AM	2019
AM-ED43	Tambaqui	Fígado	AM	2019
AM-ED45	Tambaqui	Intestino	AM	2020
AM-ED46	Tambaqui	Rim	AM	2020
AM-ED47	Acará- bandeira	Intestino	AM	2020
AM-ED48	Tambaqui	NI	AM	2021
AM-ED50	Matrinxã	Intestino	AM	2021
AM-ED53	Tambaqui	Intestino	AM	2021

AM-ED55	Tabaqui	Cérebro	AM	2022
AM-ED56	Tabaqui	Intestino	AM	2022
AM-ED57	Tabaqui	Intestino	AM	2022
AM-ED58	Tabaqui	Rim	AM	2021
AM-ED59	Tabaqui	Intestino	AM	2022
AM-ED60	Tabaqui	Baço	AM	2022

NI: Não informado.

### 3.2.2. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS

#### 3.2.2.1. Extração do material genético

Todos os isolados listados na Tabela 3 tiveram seu material genético extraído e quantificado. Para tanto, estes foram descongelados, estriados em ágar MacConkey (TmMedia, Índia), incubados a 28°C por 24h. Em seguida, o material genético foi extraído por meio do kit de purificação Maxwell 16 Tissue DNA (Promega, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Após isso, o DNA extraído foi quantificado pelo espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, EUA). A pureza do ácido nucleico foi mensurada através da razão de absorbância em comprimento de onda a 260 nm/280 nm, seguindo as recomendações do fabricante. O material genético extraído e quantificado de cada isolado foi armazenado a -20°C até o uso.

#### 3.2.2.2. PCR *multiplex*

A PCR *multiplex* foi realizada com quatro pares de *primers* (Tabela 4), conforme proposto por DA COSTA *et al.* (2022) com algumas modificações. Os *primers* foram sintetizados e purificados pela Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, EUA).

A reação foi realizada usando o kit de DNA polimerase, GoTaq, em um volume final de 20 µL, contendo 1X de tampão de PCR, 0,2 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,25 µM de cada um dos quatro pares de *primer*, 0,025 U de Taq DNA polimerase e, em torno, de 200 ng de *template* de DNA. As condições da PCR consistiram em uma etapa inicial de 94°C por 5 min, seguida de 35 ciclos de 94°C por 30 s, 58°C por 30 s e a 72°C por 45 s. Por fim, a etapa final foi de 72°C por 5 min. A ciclagem térmica foi realizada no termociclador Veriti 96 poços (Life Technologies, EUA). Os produtos de PCR foram separados no QIAxcell Advanced usando o Kit QX DNA *Screening* (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. Os controles positivos utilizados para essa reação foram: 17/21-14 (*E. piscicida*), 13/20-13 (*E. anguillarum*), ED04 (*E. ictaluri*) e 09/20-1 (*E. tarda*).

Tabela 4. Dados dos *primers* (DA COSTA *et al.*, 2022) utilizados na reação de PCR multiplex para confirmação da identificação de *E. tarda*.

<b>Espécie</b>	<b>Primer</b>	<b>Sequência (5' → 3')</b>	<b>Tamanho do amplicon</b>
<i>E. anguillarum</i>	FAP2	TCCCAGTATTGCCGAAGTTG	621 pb
	RAP2	GCTGTAGAGAGTAAAGCCGC	
<i>E. ictaluri</i>	FIP29	TAACCGTACACTGGCACTTC	133 pb
	RIP29	AGAGGGTGATTCTTGTAGCC	
<i>E. piscicida</i>	FSP4	ACTTTATCTGCGATCCCACG	423 pb
	RSP4	CGGTGATATAGCCCTGAGAG	
<i>E. tarda</i>	FTP7	GGCGATTACCAGCTCTTTATC	282 pb
	RTP7	GCGAGAGGGAAGCGTATTC	

Pb: pares de bases

### 3.2.2.3. Sequenciamento do gene *dnaJ*

Para os isolados que tiveram resultados inconclusivos na PCR *multiplex*, foi realizado o sequenciamento do gene *dnaJ*. A PCR foi feita utilizando os *primers* DN1-1F (*forward*) (5'- GATYTRCGHTAYAACATGGA-3') e DN1-2R (*reverse*) (5'- TTCACRCCRTYDAAGAARC-3'), segundo o proposto por HONG NHUNG *et al.* (2007) com algumas modificações. Os primers foram sintetizados e purificados pela Integrated DNA Technologies (IDT, EUA). A reação foi realizada usando o kit de DNA polimerase, HotStarTaq, em um volume final de 25 µL, contendo 1X de tampão de PCR, 0,2 mM de dNTPs, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,25 mM de cada *primer*, 1,5U de Taq DNA polimerase e, aproximadamente, 200 ng de *template* de DNA. As condições da PCR consistiram em uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 15 min, seguida de 40 ciclos compostos por uma fase de desnaturação a 94°C por 45 s, seguida por uma etapa de anelamento dos primers a 51°C por 45 s e fase de extensão a 72°C por 1 min. Por fim, a etapa final de alongamento foi a 72°C por 5 min. A ciclagem térmica foi realizada no termociclador Veriti 96 poços (Life Technologies, EUA). Os produtos de PCR foram separados no QIAxcell Advanced usando o Kit QX DNA Screening (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante.

Em seguida, procedeu-se a purificação dos produtos da PCR utilizando o Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, EUA), seguindo as recomendações do

fabricante, para que fosse possível realizar o sequenciamento. As reações de sequenciamento foram realizadas com o Kit BigDye™ Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems, EUA), com os mesmos *primers*, descritos no parágrafo anterior, e avaliadas com o analisador genético ABI 3500 (Life Technologies, EUA). As sequências, forward e reverse, oriundas do sequenciamento foram usadas para gerar os contigs, usando o software BioEdit (Ibis Biosciences, EUA), sendo, então, comparados com sequências, depositadas no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) através do algoritmo *Basic local alignment search tool* (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

### 3.2.3. TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

O teste de disco difusão foi realizado conforme as diretrizes estabelecidas pelo protocolo VET03 do *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI, 2020). Discos contendo os antimicrobianos: amoxicilina (AML, 10 µg), eritromicina (ERI, 15 µg), florfenicol (FFC, 30 µg), norfloxacin (NOR, 10 µg), oxitetraciclina (OT, 30 µg), sulfametoxazol-trimetoprim (SXT, 25 µg), neomicina (NEO, 10 µg), nitrofurantoína (NIT, 300 µg) e lincomicina-espectinomicina (LS, 109 µg) foram obtidos comercialmente (Oxoid, UK).

Todos os 71 isolados, que tiveram a confirmação de *E. tarda* a nível de espécie, foram descongelados, semeados em ágar MacConkey e incubados a 28 °C por 24h. Após a incubação, foram coletadas colônias e suspensas em solução salina estéril para atingir um valor de absorvância, no comprimento de onda de 625 nm, entre 0,08 e 0,13, que foi avaliado usando um espectrofotômetro (Spectrum, China). Placas de ágar Muller-Hinton foram inoculadas com a suspensão bacteriana usando *swabs* estéreis. Em seguida, os discos antimicrobianos foram colocados no ágar e as placas foram incubadas a 28 °C por 24 horas. Além disso, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658 (cepas de controle de qualidade) foram cultivadas em ágar TSA a 28°C por 24 horas e submetidas às mesmas condições experimentais descritas acima. Todos os procedimentos descritos foram realizados em triplicatas.

O diâmetro das zonas de inibição foi mensurado com o auxílio de uma régua. Os isolados foram classificados como selvagens (WT) ou não selvagens (NWT), de acordo com valores de corte epidemiológicos ( $CO_{WT}$ ) calculados pela interpretação da resistência normalizada (NRI) (KRONVALL *et al.*, 2003; KRONVALL & SMITH, 2016; SMITH *et al.*, 2007). A análise de NRI foi realizada através da planilha automática MS Excel

disponibilizada de forma online por P. Smith, W. Finnegan e G. Kronvall ([www.bioscand.se/nri](http://www.bioscand.se/nri)), sendo utilizada com a permissão do detentor da patente Bioscand AB, T€ABY, Suécia (patente europeia nº 1383913 e patente dos EUA nº 7.465.559). Cepas não selvagens a pelo menos três antimicrobianos foram classificadas como bactérias multirresistentes (SCHWARZ *et al.*, 2010).

#### 3.2.4. DETECÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA

A fim de se verificar a presença de genes de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos (*bla<sub>TEM</sub>*), às tetraciclinas (*tetA*), ao florfenicol (*floR*) e às sulfonamidas (*sulI*), foram realizadas PCRs nos isolados de *E. tarda*. Para a detecção dos genes foram utilizados *primers* (Tabela 5) sintetizados e purificados pela Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, EUA).

As reações para detecção dos genes *bla<sub>TEM</sub>* e *tetA* foram realizadas de acordo com o proposto por NIU *et al.* (2019), com algumas modificações. Utilizou-se o kit de DNA polimerase, GoTaq, em um volume final de 25  $\mu$ L, contendo 1X de tampão de PCR, 0,2 mM de dNTPs, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,4  $\mu$ M de cada *primer*, 0,06 U de Taq DNA polimerase e, em torno, de 200 ng de template de DNA. As condições de amplificação para o gene *bla<sub>TEM</sub>* consistiram em uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 5 min, seguida de 35 ciclos compostos por uma fase de desnaturação a 95°C por 30 s, seguida por uma etapa de anelamento dos primers a 62°C por 1 min e fase de extensão a 72°C por 1 min. A etapa final de alongamento foi de 72°C por 7 min. Já para a amplificação do gene *tetA*, foram realizadas as seguintes etapas: uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 5 min, seguida de 30 ciclos de 94°C por 60 s, 58°C por 1 min e 72°C por 1 min. Por fim, a etapa final de alongamento foi a 72°C por 10 min.

Com relação a detecção de *floR*, as reações foram realizadas conforme o proposto por YING *et al.* (2019), com algumas modificações. Foi utilizado o kit de DNA polimerase, GoTaq, em um volume final de 25  $\mu$ L, contendo 1X de tampão de PCR, 0,2 mM de dNTPs, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,32  $\mu$ M de cada *primer*, 0,06 U de Taq DNA polimerase e, em torno, de 200 ng de template de DNA. As condições da PCR consistiram em uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 5 min, seguida de 35 ciclos de 95°C por 1 min, 58°C por 1 min e 72°C por 1 min. A etapa final de alongamento foi de 72°C por 10 min.

Já para a avaliação da presença de *sulI*, as reações foram realizadas, de acordo com o preconizado por RAHMANI *et al.* (2013), com algumas alterações. Utilizou-se o kit de DNA polimerase, GoTaq, em um volume final de 25  $\mu$ L, contendo 1X de tampão de PCR, 0,16 mM de dNTPs, 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,4  $\mu$ M de cada *primer*, 0,06 U de Taq

DNA polimerase e, em torno, de 200 ng de template de DNA. As condições da PCR consistiram em uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 5 min, seguida de 35 ciclos de 95°C por 30 s, 58°C por 15 s e 72°C por 30 s. A etapa final de alongamento foi de 72°C por 10 min.

Todas as ciclagens térmicas foram realizadas no termociclador Veriti 96 poços (Life Technologies, EUA). Os produtos de PCR foram separados no QIAxcell Advanced usando o Kit QX DNA *Screening* (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante.

Para a obtenção dos controles positivos para as reações de amplificação de cada gene, *blatem*, *tetA*, *sull* e *floR*, foram realizados testes com os isolados que apresentaram o fenótipo de resistência.

A fim de confirmar se os fragmentos amplificados eram realmente referentes aos genes de resistência, foram realizados a purificação e o sequenciamento dos *amplicons* referentes aos genes *blatem*, *tetA*, *floR* e *sull*. A purificação foi realizada através do Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. As reações de sequenciamento foram realizadas com o Kit BigDye™ Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems, EUA), com os mesmos *primers* utilizados para a PCR de detecção dos genes, e avaliadas com o analisador genético ABI 3500 (Life Technologies, EUA). As sequências, *forward* e *reverse*, oriundas do sequenciamento foram usadas para gerar *contigs*, usando o software BioEdit (Ibis Biosciences, EUA), sendo, então, comparados com sequências, depositadas no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) através do algoritmo *Basic local alignment search tool* (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Tabela 5. *Primers* utilizados nas reações de detecção de genes de resistência.

Gene	Primer	Sequência (5' → 3')	Tamanho do amplicon	Referência
<i>bla<sub>TEM</sub></i>	<i>bla<sub>TEM</sub></i> -F	CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC	800 pb	NIU <i>et al.</i> (2019)
	<i>bla<sub>TEM</sub></i> -R	CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC		
<i>tetA</i>	<i>tetA</i> -F	TTTCGGGTTCGGGATGGT	780 pb	
	<i>tetA</i> -R	CAGGCAGAGCAAGTAGAGGG		
<i>floR</i>	<i>floR</i> -F	ATGGTGATGCTCGGCGTGGGC CA	800 pb	YING <i>et al.</i> (2019)
	<i>floR</i> -R	GCGCCGTTGGCGGTAACAGAC ACCGTGA		
<i>sull</i>	<i>sull</i> -F	TGAGATCAGACGTATTGCGC	420 pb	RAHMANI <i>et al.</i> (2013)
	<i>sull</i> -R	TTGAAGGTTTCGACAGCACGT		

pb: pares de bases

### 3.2.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A análise de correspondência múltipla (ACM), uma metodologia que permite observar a associação entre duas ou mais variáveis categóricas (BEH, 2004), foi realizada através do software R (R CORE TEAM, 2021), para as seguintes variáveis: resistência/suscetibilidade aos nove antimicrobianos analisados e hospedeiros (tambaquis, tilápias e outras espécies). As variáveis foram consideradas associadas quando traçadas em conjunto.

A existência da associação entre os resultados do antibiograma e a detecção dos genes de resistência dos isolados de *E. tarda* foi investigada pelo teste exato de Fisher, onde os valores de  $p < 0,05$  seriam estatisticamente significativos. Além disso, a força dessa associação foi mensurada usando o coeficiente de Cramer. Esse método mede a força da associação entre duas variáveis. Os valores variam de 0 a 1, em que valores mais próximos de 1 indicam uma relação forte entre as variáveis, e os valores mais aproximados de 0 apontam uma relação fraca (CORMELATO *et al.*, 2020). Ambas as análises foram conduzidas no software estatístico Minitab (MINITAB, 2021).

## 3.3. RESULTADOS

### 3.3.1. IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA POR MÉTODOS MOLECULARES

Setenta e um isolados tiveram sua identificação confirmada como *Edwardsiella tarda* pela PCR *multiplex* (Figura 4) ou sequenciamento do gene *dnaJ*. Os dados relacionados à identificação dos isolados por esses métodos moleculares estão dispostos na Tabela 6. Um total de 9/71 isolados tiveram resultados inconclusivos na PCR *multiplex*, sendo submetidos ao sequenciamento do gene *dnaJ*. Todas as sequências obtidas apresentaram uma grande similaridade com as cepas: *Edwardsiella tarda* strain KC-Pc-HB1 chromosome, complete genome (Número de acesso: CP023706.1), *Edwardsiella tarda* strain LADL99-302 chromosome, complete genome (CP084419.1) e *Edwardsiella tarda* *dnaJ* gene for DnaJ, partial cds, strain: GTC 112 (AB272633.1).

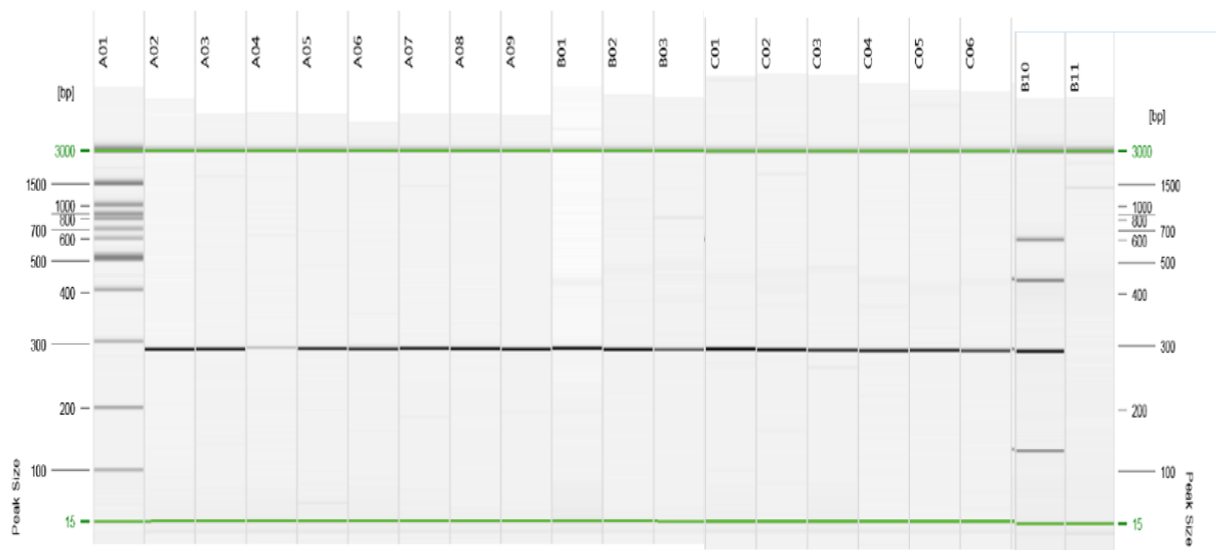


Figura 4 – Imagem do gel da corrida de eletroforese capilar realizada com os *amplicons* obtidos da PCR *multiplex*, para confirmação da identificação dos isolados de *E. tarda*. Nas posições B10 e B11 estão os controles positivos (621 pb – *E. anguillarum*; 423 pb – *E. piscicida*; 282 pb – *E. tarda*; 133 pb – *E. ictaluri*) e negativo, respectivamente. Na posição A01 se encontra o marcador de tamanho de fragmento. As demais posições estão alguns dos isolados testados.

Tabela 6. Identificação molecular dos isolados de *Edwardsiella tarda*.

Isolado	<i>m</i> PCR	<i>dnaJ</i>	Sequenciamento do gene <i>dnaJ</i>	
			Identidade	Cobertura
ED06-14	<i>E. tarda</i>	-	-	-
ED17-14	-	<i>E. tarda</i>	100%	100%
ED18-14	<i>E. tarda</i>	-	-	-
ED20-14	<i>E. tarda</i>	-	-	-
ED24-15	<i>E. tarda</i>	-	-	-
ED27-16	<i>E. tarda</i>	-	-	-
ED29-16	<i>E. tarda</i>	-	-	-
ED35-17	<i>E. tarda</i>	-	-	-
ED37-17	<i>E. tarda</i>	-	-	-
ED38-17	<i>E. tarda</i>	-	-	-
ED39-18	<i>E. tarda</i>	-	-	-
ED42-19	<i>E. tarda</i>	-	-	-
11/19-18	<i>E. tarda</i>	-	-	-
19/19-11	<i>E. tarda</i>	-	-	-
30/19-4	<i>E. tarda</i>	-	-	-
36/19-21	<i>E. tarda</i>	-	-	-
25/19-23	<i>E. tarda</i>	-	-	-
RP1	<i>E. tarda</i>	-	-	-
ED48-20	<i>E. tarda</i>	-	-	-
ED51-20	<i>E. tarda</i>	-	-	-
09/20-1	<i>E. tarda</i>	-	-	-
44/20-01	<i>E. tarda</i>	-	-	-

48/20-07	<i>E. tarda</i>	-	-	-
50/20-10	<i>E. tarda</i>	-	-	-
ED53-21	<i>E. tarda</i>	-	-	-
ED59-21	-	<i>E. tarda</i>	98,17%	100%
ED62-21	<i>E. tarda</i>	-	-	-
14/21-04	<i>E. tarda</i>	-	-	-
28/21-17	<i>E. tarda</i>	-	-	-
34/21-03	<i>E. tarda</i>	-	-	-
67/21-13	<i>E. tarda</i>	-	-	-
44/22-08	<i>E. tarda</i>	-	-	-
55/22-06	<i>E. tarda</i>	-	-	-
ZOO-ED	<i>E. tarda</i>	-	-	-
ED63-22	<i>E. tarda</i>	-	-	-
ED64-22	<i>E. tarda</i>	-	-	-
ED65-22	<i>E. tarda</i>	-	-	-
ED66-22	-	<i>E. tarda</i>	100%	100%
ED78-22	<i>E. tarda</i>	-	-	-
ED84-22	<i>E. tarda</i>	-	-	-
ED87-22	<i>E. tarda</i>	-	-	-
ED88-22	<i>E. tarda</i>	-	-	-
ED90-22	-	<i>E. tarda</i>	100%	100%
ED92-22	<i>E. tarda</i>	-	-	-
ED95-22	<i>E. tarda</i>	-	-	-
AM-ED01	-	<i>E. tarda</i>	98.08%	100%
AM-ED03	<i>E. tarda</i>	-	-	-
AM-ED04	<i>E. tarda</i>	-	-	-
AM-ED05	<i>E. tarda</i>	-	-	-
AM-ED06	<i>E. tarda</i>	-	-	-
AM-ED08	<i>E. tarda</i>	-	-	-
AM-ED10	-	<i>E. tarda</i>	98,43%	100%
AM-ED15	<i>E. tarda</i>	-	-	-
AM-ED24	<i>E. tarda</i>	-	-	-
AM-ED34	-	<i>E. tarda</i>	97,74%	100%
AM-ED35	<i>E. tarda</i>	-	-	-
AM-ED36	<i>E. tarda</i>	-	-	-
AM-ED38	<i>E. tarda</i>	-	-	-
AM-ED43	<i>E. tarda</i>	-	-	-
AM-ED45	<i>E. tarda</i>	-	-	-
AM-ED46	<i>E. tarda</i>	-	-	-
AM-ED47	<i>E. tarda</i>	-	-	-
AM-ED48	<i>E. tarda</i>	-	-	-
AM-ED50	<i>E. tarda</i>	-	-	-
AM-ED53	-	<i>E. tarda</i>	97,88%	100%
AM-ED55	<i>E. tarda</i>	-	-	-
AM-ED56	<i>E. tarda</i>	-	-	-
AM-ED57	<i>E. tarda</i>	-	-	-
AM-ED58	<i>E. tarda</i>	-	-	-
AM-ED59	-	<i>E. tarda</i>	97,9%	100%
AM-ED60	<i>E. tarda</i>	-	-	-

### 3.3.2. TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

As cepas de controle de qualidade, *Escherichia coli*, ATCC 25922, e *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, ATCC 33658 apresentaram os diâmetros dos halos de inibição dentro dos limites aceitáveis estabelecidos pelo CLSI (CLSI, 2020) (Tabela 7). Os valores de média e desvio padrão dos diâmetros das zonas de inibição dos antimicrobianos utilizados para os isolados de *E. tarda*, considerando as triplicatas realizadas, estão apresentados na Tabela 8. Os valores do ponto de corte epidemiológico provisório calculados pelo NRI e os referentes aos diâmetros das zonas de inibição dos antimicrobianos para cada isolado estão representados na Tabela 9 e dispostos a distribuição das frequências nas Figuras 5 e 6. De acordo com os valores do ponto de corte calculados, 100% dos isolados foram classificados como WT para neomicina, eritromicina e nitrofurantoína. Além disso, 26,76%, 26,76%, 7,04%, 18,30%, 11,26% e 8,45% dos isolados, foram classificados como NWT para oxitetraciclina, norfloxacina, lincomicina-espectinomomicina, amoxicilina, florfenicol e sulfametaxazol-trimetoprim, respectivamente. Ademais, 15,49% dos isolados foram considerados como multirresistentes.

Tabela 7. Intervalos dos diâmetros da zona de inibição para as ATCCs 25922 e 33658 para os antimicrobianos, de acordo com o CLSI.

<b>Intervalos de diâmetro da zona de inibição para as cepas de controle de qualidade</b>			
<b>Antimicrobianos</b>	<b><i>Escherichia coli</i> ATCC 25922</b>	<b><i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> ATCC33658</b>	
Eritromicina	10-15	21-29	
Florfenicol	20-30	33-41	
Oxitetraciclina	23-29	28-34	
Sulfametoxazol-trimetoprima	25-32	24-39	

Tabela 8. Valores mínimo e máximo, média e desvio padrão dos diâmetros das zonas de inibição dos isolados de *E. tarda* para os antimicrobianos.

<b>Antimicrobianos</b>	<b>Valor mínimo</b>	<b>Valor máximo</b>	<b>Média ± DP</b>
Neomicina	8	15	12,99 ± 2,09
Oxitetraciclina	6	34	22,85 ± 10,11
Lincomicina-espectinomomicina	13	27	23,45 ± 2,82
Amoxicilina	6	30	23,28 ± 8,24
Norfloxacina	11	39	31,95 ± 5,52
Eritromicina	10	22	12,83 ± 1,83
Nitrofurantoína	24	29	26,65 ± 1,65
Florfenicol	6	37	30,87 ± 8,12
Sulfametoxazol-trimetoprim	6	37	28,94 ± 7,63

A análise de correspondência múltipla apresentou 50% dos dados representados nas duas dimensões, e evidenciou que os isolados de *E. tarda* obtidos de tambaqui estão mais relacionados à susceptibilidade à oxitetraciclina e ao florfenicol. Por outro lado, as cepas oriundas de tilápias estão mais relacionadas a resistência para esses mesmos fármacos (Figura 7).

Tabela 9. Valores de ponto de corte epidemiológico provisório (COwt), e das zonas de inibição (mm) de cada isolado para os antimicrobianos.

	Antimicrobianos								
	NEO	OT	LS	AML	NOR	ERI	NIT	FFC	SXT
COwt	8	22	21	24	30	9	24	29	23
ED06-14*	11	9	24	6	33	13	26	12	14
ED17-14	11	28	23	27	34	12	27	33	27
ED18-14	11	26	24	27	33	13	26	31	32
ED20-14	11	29	23	28	36	12	26	33	26
ED24-15*	12	6	23	27	28	16	27	6	28
ED27-16*	11	8	18	11	29	14	28	33	22
ED29-16	13	29	23	28	32	13	27	35	29
ED35-17	12	29	25	27	38	13	26	34	35
ED37-17	13	32	24	30	35	15	29	37	31
ED38-17	12	27	23	27	29	12	26	32	25
ED39-18*	15	12	14	6	31	16	28	35	6
ED42-19	15	30	26	28	36	22	29	37	36
11/19-18	14	31	25	27	37	14	27	37	35
19/19-11	15	30	24	27	36	13	27	36	35
30/19-4	14	6	25	26	15	13	24	35	34
36/19-21*	15	6	25	6	33	13	28	11	37
25/19-23	15	6	26	27	39	10	27	11	36
RP1*	14	6	25	27	29	13	27	9	36
ED48-20	12	28	23	27	36	14	25	32	26
ED51-20	15	6	25	27	24	12	28	35	34
09/20-1	14	6	24	26	27	12	26	31	32
44/20-01*	14	6	24	26	27	13	26	6	32
48/20-07	14	7	25	29	34	13	27	35	31
50/20-10	14	28	25	27	37	13	27	34	35
ED53-21	14	29	26	29	34	12	26	34	35
ED59-21*	14	6	27	6	30	12	28	12	36
ED62-21	8	7	25	26	11	12	24	34	32
14/21-04	14	28	26	27	37	13	27	35	35
28/21-17	14	27	25	26	31	14	28	35	25
34/21-03	13	7	24	28	26	14	27	35	32
67/21-13	14	27	25	28	37	13	26	34	35
44/22-08	14	7	25	27	36	13	27	35	33
55/22-06	14	29	24	26	31	12	26	32	33
ZOO-ED	15	30	24	28	31	13	26	35	32
ED63-22	15	6	24	27	31	13	27	9	37

ED64-22	14	28	24	26	29	11	27	33	32
ED65-22*	14	6	23	26	23	12	25	32	6
ED66-22*	13	28	15	26	28	14	27	31	6
ED78-22	14	25	23	6	35	13	27	35	34
ED84-22	15	25	24	6	34	13	25	30	34
ED87-22	15	26	24	6	32	12	25	32	32
ED88-22	15	27	24	25	33	11	26	33	33
ED90-22	15	28	25	6	34	13	27	33	31
ED92-22	15	27	23	25	35	11	27	32	31
ED95-22	15	8	25	27	26	16	27	35	30
AM-ED01	11	28	22	27	26	12	25	31	23
AM-ED03	12	32	22	28	37	11	28	33	31
AM-ED04	11	30	22	29	36	13	26	33	26
AM-ED05	12	29	21	6	34	13	27	32	25
AM-ED06	11	27	22	28	35	14	26	33	24
AM-ED08	11	28	22	29	38	12	28	35	24
AM-ED10	11	28	22	27	32	11	26	32	27
AM-ED15	11	27	22	27	36	13	26	33	26
AM-ED24	11	29	23	26	36	12	28	35	27
AM-ED34	12	31	23	27	36	11	28	35	27
AM-ED35	13	32	24	29	29	10	29	36	32
AM-ED36*	12	28	13	6	27	12	27	32	6
AM-ED38	12	28	23	27	33	13	26	34	26
AM-ED43	11	29	24	6	30	13	25	32	27
AM-ED45	12	34	24	26	36	13	28	36	32
AM-ED46	12	29	23	26	34	12	27	33	28
AM-ED47	11	30	20	28	34	11	27	33	30
AM-ED48	13	30	25	28	31	13	26	33	31
AM-ED50	14	29	25	26	34	13	27	32	30
AM-ED53	12	28	24	27	25	14	26	32	26
AM-ED55	14	28	24	29	37	14	26	36	30
AM-ED56	12	29	25	27	31	12	26	32	31
AM-ED57	13	34	26	28	37	13	27	33	31
AM-ED58	13	29	24	6	34	13	27	34	31
AM-ED59	12	26	24	27	28	13	26	33	27
AM-ED60	13	29	25	26	30	14	27	35	30
ATCC25922	15	25	25	16	33	13	23	23	26
ATCC33658	16	29	26	33	34	23	25	33	26

Abreviações: COWt: ponto de corte epidemiológico provisório, NEO: neomicina, OT: oxitetraciclina, LS: lincomicina-espectinomomicina, AML: amoxicillina, NOR: norfloxacina, ERI: eritromicina, NIT: nitrofurantoína, FFC: florfenicol, SXT: sulfametoxazol-trimetoprim.

Células em vermelho demonstram isolados classificados como NWT, de acordo com o COWt estabelecido para os antimicrobianos.

\*: isolados classificados como multirresistentes, de acordo com o PCE calculado.

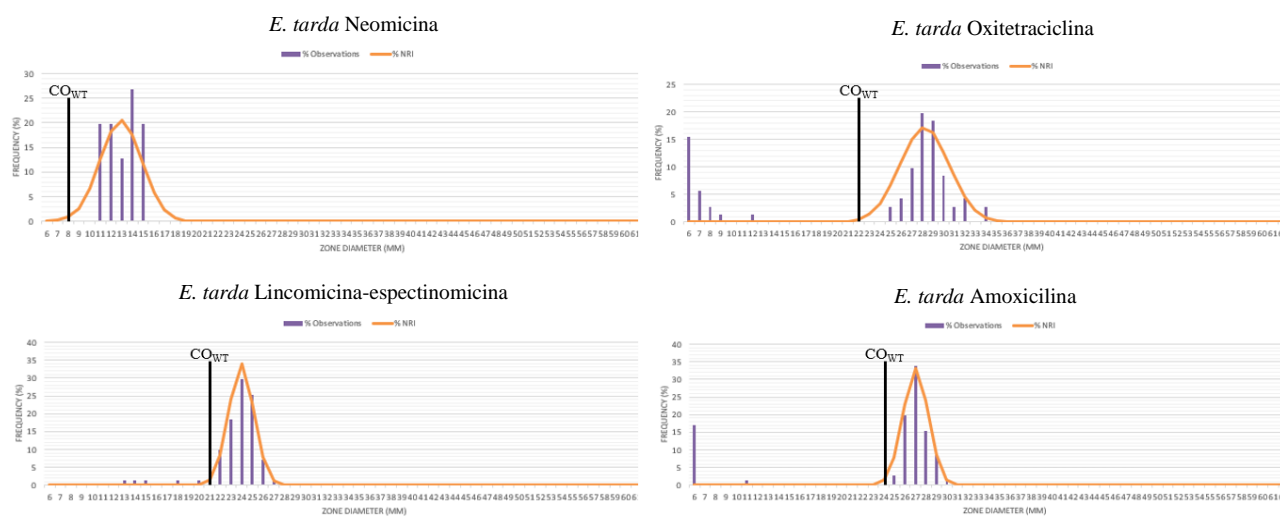


Figura 5 – Disposição das zonas de inibição e dos pontos de corte epidemiológico dos antimicrobianos: neomicina, oxitetraciclina, lincomicina-espectinomicina, amoxicilina, para os 71 isolados de *E. tarda*.

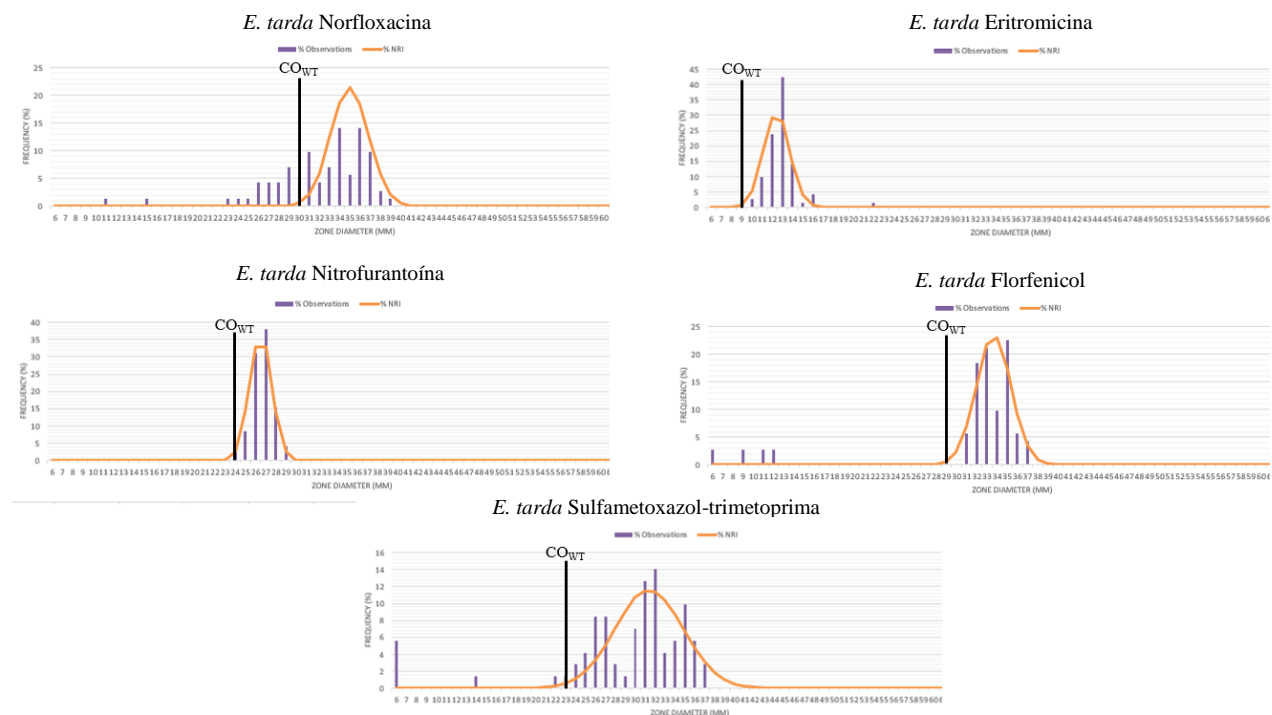


Figura 6 - Disposição das zonas de inibição e dos pontos de corte epidemiológico dos antimicrobianos: norfloxacina, eritromicina, nitrofurantóina, florfenicol e sulfametoxazol-trimetoprim, para os 71 isolados de *E. tarda*.

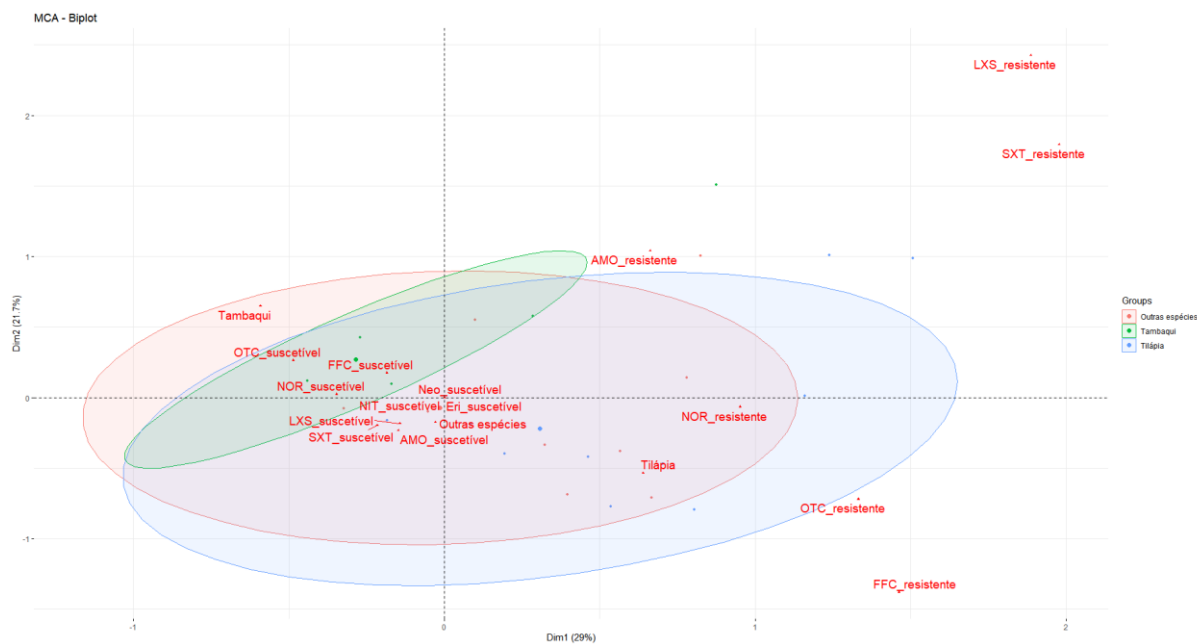


Figura 7 - Análise de correspondência múltipla (ACM) de variáveis categóricas de isolados de *E. tarda* oriundos de tambaquis (verde), tilápias (azul) e outras espécies de peixes (vermelho). As variáveis (resistência/susceptibilidade a neomicina - Neo, oxitetraciclina – OTC, lincomicina-espectinomicina – LXS, amoxicilina – AMO, norfloxacina – NOR, eritromicina – Eri, nitrofurantoína – NIT, florfenicol – FFC, sulfametoxazol-trimetoprim – SXT; e hospedeiros – tambaqui, tilápia e outras espécies) foram considerados associados quando agrupados em conjunto.

### 3.3.3. AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DOS GENES DE RESISTÊNCIA

AM-ED43, ED24-15, ED39-18 e ED06-14 foram utilizados como controles positivos para os genes *bla<sub>TEM</sub>*, *tetA*, *sulI* e *floR*, respectivamente. A Tabela 10 representa a presença ou ausência dos genes para cada isolado. Os genes *bla<sub>TEM</sub>*, *tetA*, *sulI* e *floR* foram encontrados em 28/71 (39,43%) (Figura 8), 34/71 (47,88%) (Figura 9), 8/71 (11,26%) (Figura 10) e 14/71 (19,71%) (Figura 11) dos isolados, respectivamente. Um total de 9/71 (12,67%) isolados apresentaram 3 genes de resistência. Apenas 1/71 (1,40%) apresentou todos os 4 genes. Onze de 28 (39,28%) isolados apresentaram o genótipo e o fenótipo de resistência para  $\beta$ -lactâmicos, 17/34 (50%) para tetraciclina, 2/8 (25%) para sulfonamidas e 7/14 (50%) para florfenicol (Tabela 9). Para amoxicilina, oxitetraciclina e florfenicol, embora a associação entre os resultados do antibiograma e a detecção dos genes de resistência tenha sido observada ( $p < 0.05$ ), a força de relação entre as duas variáveis é fraca (Tabela 11).

As sequências dos *amplicons*, oriundos das PCRs para os genes de resistência, apresentaram 100% de cobertura e identidade com sequências de outros genes depositados no NCBI. Para *bla<sub>TEM</sub>* os nossos resultados foram idênticos à *Escherichia*



ZOO-ED	-	-	-	-	-	-	-	-
ED63-22	-	+	-	+	-	+	-	+
ED64-22	-	-	-	-	-	-	-	-
ED65-22	-	+	+	-	-	+	+	-
ED66-22	-	-	-	-	-	-	+	-
ED78-22	+	+	-	+	+	-	-	-
ED84-22	+	+	-	+	+	-	-	-
ED87-22	+	+	-	+	+	-	-	-
ED88-22	+	-	-	+	-	-	-	-
ED90-22	+	-	-	+	+	-	-	-
ED92-22	+	-	-	+	-	-	-	-
ED95-22	+	-	-	-	-	+	-	-
AM-ED01	-	-	-	-	-	-	-	-
AM-ED03	-	-	-	-	-	-	-	-
AM-ED04	-	-	+	-	-	-	-	-
AM-ED05	+	+	+	-	+	-	-	-
AM-ED06	+	-	-	-	-	-	-	-
AM-ED08	-	-	-	-	-	-	-	-
AM-ED10	-	-	-	-	-	-	-	-
AM-ED15	-	-	+	-	-	-	-	-
AM-ED24	-	-	-	-	-	-	-	-
AM-ED34	-	-	-	-	-	-	-	-
AM-ED35	-	-	-	-	-	-	-	-
AM-ED36	+	+	-	-	+	-	+	-
AM-ED38	+	-	-	-	-	-	-	-
AM-ED43	+	+	-	-	+	-	-	-
AM-ED45	+	+	-	-	-	-	-	-
AM-ED46	+	-	-	-	-	-	-	-
AM-ED47	-	-	-	-	-	-	-	-
AM-ED48	-	-	-	-	-	-	-	-
AM-ED50	-	-	-	-	-	-	-	-
AM-ED53	+	-	-	-	-	-	-	-
AM-ED55	+	+	-	-	-	-	-	-
AM-ED56	-	-	-	-	-	-	-	-
AM-ED57	+	-	-	-	-	-	-	-
AM-ED58	+	+	-	-	+	-	-	-
AM-ED59	-	-	-	-	-	-	-	-
AM-ED60	+	-	-	-	-	-	-	-

Abreviações: AML: amoxicillina, OT: oxitetraciclina, SXT: sulfametoxazol-trimetoprim e FFC: florfenicol.

+: presença; -: ausência.

Células em rosa demonstram isolados positivos para os genes de resistência.

Células em cinza demonstram isolados positivos para os fenótipos de resistência aos antimicrobianos.

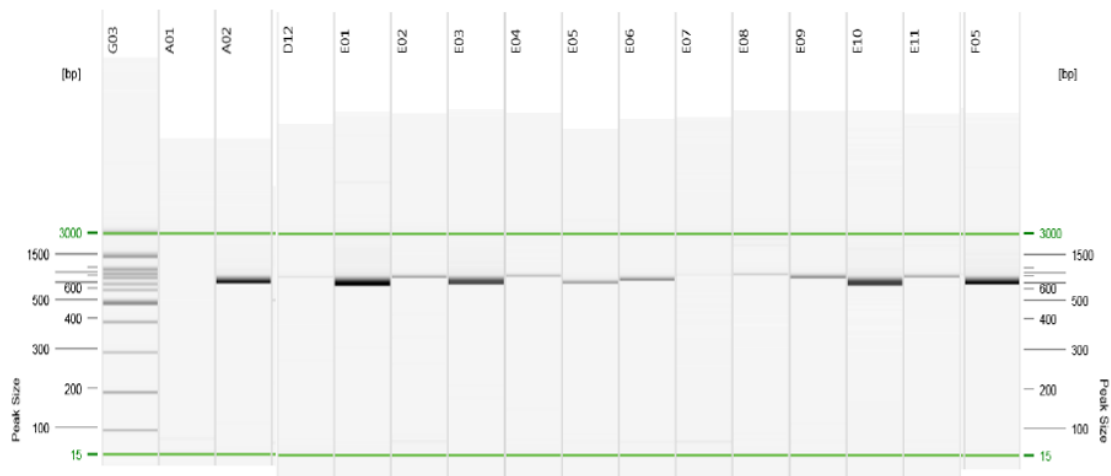


Figura 8 - Imagem do gel da corrida de eletroforese capilar realizada com os *amplicons* obtidos da PCR para detecção do gene de resistência *bla<sub>TEM</sub>*. Nas posições A01 e F05 (800 pb) estão os controles negativo e positivo, respectivamente. Na posição G03 se encontra o marcador de tamanho de fragmento.

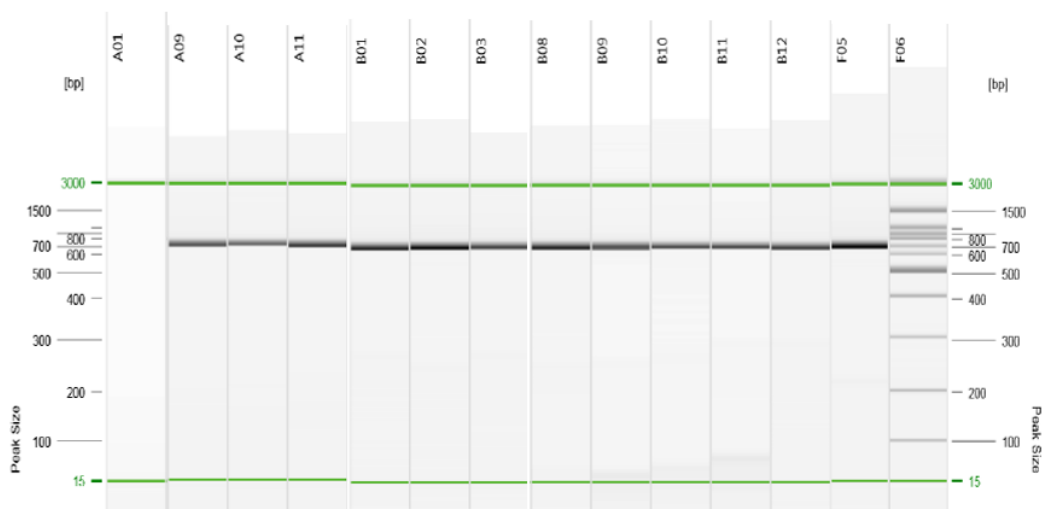


Figura 9 - Imagem do gel da corrida de eletroforese capilar realizada com os *amplicons* obtidos da PCR para detecção do gene de resistência *tetA*. Nas posições A01 e F05 (780 pb) estão os controles negativo e positivo, respectivamente. Na posição F06 se encontra o marcador de tamanho de fragmento.

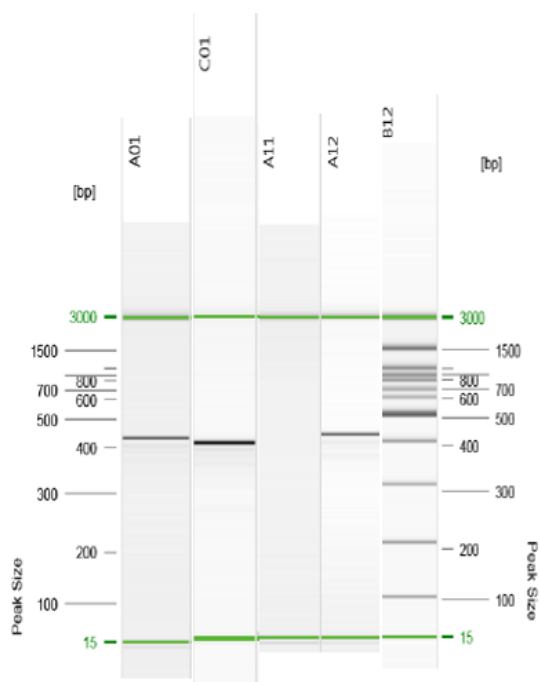


Figura 10 - Imagem do gel da corrida de eletroforese capilar realizada com os *amplicons* obtidos da PCR para detecção do gene de resistência *sulI*. Nas posições A11 e A12 (420 pb) estão os controles negativo e positivo, respectivamente. Na posição B12 se encontra o marcador de tamanho de fragmento.

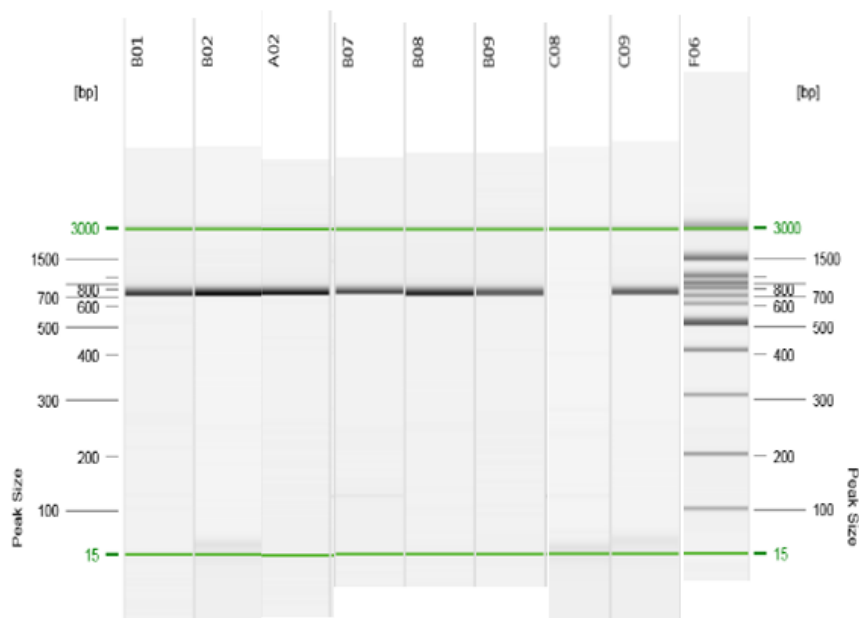


Figura 11 - Imagem do gel da corrida de eletroforese capilar realizada com os *amplicons* obtidos da PCR para detecção do gene de resistência *floR*. Nas posições C08 e C09 (800pb) estão os controles negativo e positivo, respectivamente. Na posição F06 se encontra o marcador de tamanho de fragmento.

Tabela 11. Resultados da associação entre as variáveis genótipo e fenótipo de resistência aos antimicrobianos dos isolados de *E. tarda*, pelo teste exato de Fisher e pelo coeficiente de Cramer.

Antimicrobianos	Teste exato de Fisher (valor de <i>p</i> )	Coefficiente de Cramer
Amoxicilina	0,000356	0,19154
Oxitetraciclina	0,000026	0,25321
Florfenicol	0,000018	0,36854
Sulfametoxazol-trimetoprim	0,175244	0,032755

### 3.4. DISCUSSÃO

A fim de verificar o perfil de susceptibilidade dos isolados de *E. tarda* oriundos de peixes nativos e exóticos de diferentes localidades no Brasil, foram realizados os ensaios de antibiograma e a detecção de genes de resistência aos antimicrobianos. Este é um trabalho inédito que visa monitorar a resistência de isolados dessa espécie bacteriana no país, além de estabelecer um ponto de corte epidemiológico provisório, que contribui para o monitoramento de novos isolados em análises futuras.

Em virtude da dificuldade da identificação a nível de espécie de isolados de *E. tarda* por métodos fenotípicos, bioquímicos e por espectrometria de massas (REICHLEY *et al.*, 2017), foram realizadas PCRs *multiplex* para discriminar as quatro espécies de *Edwardsiella* que sabidamente provocam infecções em peixes (DA COSTA *et al.*, 2022). Além disso, a PCR *multiplex* apresenta vantagens de ser mais simples e mais econômica, quando comparada ao sequenciamento de genes *housekeeping* (DA COSTA *et al.*, 2022). No entanto, os isolados que não apresentaram amplificação nessa reação, foram submetidos ao sequenciamento do gene *dnaJ*, sendo considerado o mais resolutivo no que diz respeito a identificação a nível de espécie para isolados de *Edwardsiella* (BUJÁN *et al.*, 2018). Dessa forma, asseguramos que todos os isolados utilizados neste estudo eram *Edwardsiella tarda*.

Neomicina, norfloxacin, amoxicilina, florfenicol, oxitetraciclina, eritromicina, sulfametoxazol-trimetoprim, lincosamidas (bases farmacológicas utilizadas neste estudo), são alguns antimicrobianos liberados para utilização na aquicultura de alguns países (CHEN *et al.*, 2020). Entretanto, no Brasil, apenas duas bases farmacológicas são licenciadas para utilização em algumas espécies de peixes, pelo Ministério da Agricultura

Pecuária e Abastecimento (MAPA), oxitetraciclina e florfenicol. Ambas agem através de ligações em subunidades ribossômicas, interferindo na síntese proteica. Sendo assim, são considerados como agentes bacteriostáticos (PAPICH & RIVIERE, 2018; PAPICH, 2018), inibindo a multiplicação de bactérias.

Com relação aos antibiogramas, neste estudo, foram realizadas triplicatas para cada um dos isolados e para as cepas utilizadas para o controle de qualidade do teste, como forma de evitar qualquer equívoco relacionado à metodologia do teste de disco difusão e à interpretação dos resultados (SMITH, 2020). Os valores das zonas de inibição das cepas de controle de qualidade para eritromicina, florfenicol, oxitetraciclina e sulfametoxazol-trimetoprim, estavam dentro dos limites estabelecidos pelo CLSI (2020). Esses dados garantem a confiabilidade dos resultados do teste. Para os outros antimicrobianos, não há valores de referência estabelecidos no CLSI.

Para *E. tarda*, não há ponto de corte epidemiológico estabelecido pelo CLSI, sendo assim, foi estabelecido um ponto de corte epidemiológico provisório neste estudo para ser possível classificar os isolados em WT e NWT. LIM *et al.* (2016) também calcularam os valores de corte epidemiológicos provisórios para alguns antimicrobianos em relação a isolados de *E. tarda*. Estes valores calculados pelos autores foram maiores ou iguais a 16, 7, 31, 27, 12, para amoxicilina, eritromicina, florfenicol, oxitetraciclina, sulfametoxazol-trimetoprim, respectivamente. Com relação aos calculados no presente estudo, foram obtidos como pontos de corte provisórios para essas mesmas bases farmacológicas, 24, 9, 29, 22, 23, respectivamente. Com exceção da amoxicilina, em que a concentração do disco utilizada foi diferente em ambos os estudos, sendo 25 µg no trabalho do LIM *et al.* (2016) e 10 µg utilizados no presente estudo, os discos dos outros antimicrobianos que foram utilizados possuíam a mesma concentração.

Para florfenicol e oxitetraciclina os valores de corte epidemiológicos diminuíram, o que significa dizer que para um isolado ser considerado como NWT, o halo de mensuração da zona de inibição precisa ser menor. Já para os outros antimicrobianos analisados os pontos de corte epidemiológicos provisórios aumentaram. Uma explicação para essa diferença, pode ser devido ao fato de que no estudo de LIM *et al.* (2016) foram utilizados 52 isolados e no presente trabalho utilizamos 19 a mais, totalizando 71 isolados, com os dados mais dispersos. Além disso, foi confirmada a identificação dos isolados por dois métodos moleculares, assegurando que realmente as espécies de *Edwardsiella* spp. utilizadas neste trabalho são *E. tarda*. Anteriormente, a identificação de espécies de *Edwardsiella* spp. era realizada de forma errônea em muitos trabalhos, em virtude de as

espécies deste gênero serem muito similares entre si (BÚJAN *et al.*, 2018). Outro ponto importante a ser considerado, é que os isolados que foram utilizados no estudo de LIM *et al.* (2016) foram obtidos entre os anos de 2004 e 2011, na Coreia do Sul. Já, no presente trabalho, foram utilizados isolados oriundos de diferentes regiões geográficas do Brasil, entre os anos 2014 e 2022. Com o passar dos anos, a utilização de antimicrobianos aumentou de forma considerável e aquisição de resistência por parte de isolados também ocorreu expressivamente (CAPUTO *et al.*, 2022).

Todos os isolados deste estudo apresentaram fenótipo WT para neomicina, eritromicina e nitrofurantoína. Com relação a neomicina, os isolados deste estudo apresentaram fenótipo WT, porém, pelo observado na distribuição das frequências dos resultados das mensurações dos halos de inibição na Figura 5, o perfil não parece ser de WT, em virtude de os dados estarem mais concentrados à esquerda, sendo menos restritivo. Além disso, é possível observar uma distribuição unimodal, com halos muito pequenos. Para contornar esse problema, mais isolados seriam necessários para o cálculo do ponto de corte ser realizado de forma mais assertiva, além de ser interessante utilizar discos desse antimicrobiano com outras concentrações, a fim de verificar se essa distribuição de frequências permaneceria dessa forma.

Apesar de os isolados deste estudo terem apresentado perfil WT para nitrofurantoína, é importante mencionar que os nitrofuranos possuem potencial de causar mutagênese e carcinogênese em células de mamíferos e, dessa forma, seu uso foi proibido em sistemas de produção de alimentos, incluindo pisciculturas. No entanto, há relato da utilização desse antimicrobiano em produção de peixes ornamentais (YANONG, 2003). Sendo assim, buscamos verificar se os isolados de *E. tarda* oriundos de peixes seriam resistentes a esse fármaco que é de utilização proibida.

No presente trabalho, 26,76% dos isolados, grande parte oriundos de tilápias do Nilo, apresentaram fenótipo NWT para oxitetraciclina. Esses dados são inferiores quando comparados aos encontrados por NIU *et al.* (2019) e ALGAMMAL *et al.* (2022), em que em torno de 90% dos isolados de *E. tarda* testados foram resistentes a tetraciclina. No entanto, em ambos os estudos foram avaliados uma quantidade menor de isolados,  $n = 30$  (NIU *et al.*, 2019) e  $n = 44$  (ALGAMMAL *et al.*, 2022), provenientes de apenas uma região geográfica, na Tailândia e no Egito, respectivamente, no período de um ano. No presente estudo, além de terem sido analisados um número maior de isolados, provenientes de nove localizações geográficas distintas, as cepas utilizadas foram obtidas no período de oito anos.

Com relação ao florfenicol, apenas 11,26% dos isolados, sendo a maioria oriundos de tilápias do Nilo, foram considerados NWT, neste estudo. EZZAT *et al.* (2021) observaram que apenas 22,2% dos isolados de *E. tarda*, provenientes de tilápia zillii no Egito, também foram resistentes ao florfenicol. Ensaio experimentais realizados com tilápias do Nilo, também no Egito, demonstraram a eficácia de florfenicol no tratamento contra edwardsielse (NOOR EL DEEN *et al.*, 2017).

No que concerne aos resultados do ensaio de disco difusão para os outros antimicrobianos, foram observados fenótipos NWT para norfloxacin (26,76%), lincomicina-espectinomicina (7,04%), amoxicilina (18,3%) e sulfametaxazol-trimetoprim (8,45%). É importante ressaltar que a distribuição das frequências dos resultados das mensurações dos halos de inibição para norfloxacin foi bastante afetada pelo número de amostras e dispersão delas, onde é possível observar o ponto de corte calculado mais à direita na Figura 6, sendo mais restritivo.

Os percentuais relacionados a resistência desses antimicrobianos encontrados neste trabalho foram inferiores aos encontrados por outros pesquisadores. Por exemplo, EZZAT *et al.* (2021) observaram resistência em 88,8%, 66,6% e 55,6% dos isolados para amoxicilina, lincomicina e norfloxacin, respectivamente. Já ALGAMMAL *et al.* (2022) encontraram 93,2% e 90,9% de isolados com fenótipos de resistência para amoxicilina e sulfametoxazol-trimetoprim. NIU *et al.* (2019) verificaram a presença de fenótipo de resistência a sulfametoxazol-trimetoprim em 83,3% dos isolados do estudo. Nossos resultados, apesar de apresentar percentual de resistência inferiores aos encontrados na literatura, são preocupantes, em virtude de nenhum desses fármacos serem legalmente liberados para utilização nos sistemas de produção de peixes em território brasileiro, o que pode sugerir o uso indevido de agentes antimicrobianos não liberados para utilização nos sistemas de cultivo.

Uma hipótese que pode justificar o aparecimento de resistência nos isolados de *E. tarda* é a presença de genes de resistência. As bactérias podem transferir entre si genes de resistência (DA COSTA *et al.*, 2021), por plasmídeos ou transposons (PAPICH & RIVIERE, 2018) contribuindo para expressão de fenótipos resistentes aos antimicrobianos. Neste trabalho foram analisadas a presença de quatro genes, *bla<sub>TEM</sub>*, *tetA*, *sulI* e *floR*. Nossos resultados demonstram a presença do gene *tetA* em quase metade dos isolados ( $n=34$ ), do gene *bla<sub>TEM</sub>* em 28 isolados, do gene *floR* em 14 e do gene *sulI* em 8. NIU *et al.* (2019) encontraram o gene *bla<sub>TEM</sub>* em 100% dos isolados avaliados e o gene *tetA* em 90%. ALGAMMAL *et al.* (2022) também verificaram a presença de 100%

do gene *bla<sub>TEM</sub>* em seus isolados, e 90.1% para os genes *tetA* e *sulI*. Esses resultados divergem dos encontrados aqui, em que a maior prevalência foi do gene *tetA*. Um estudo conduzido em Taiwan encontrou esse mesmo gene em 100% dos isolados testados. Os autores sugerem a disseminação de um plasmídeo associado à resistência à oxitetraciclina em isolados de *E. tarda* de diferentes regiões geográficas (LO *et al.*, 2014), o que pode ter acontecido no presente trabalho.

Tanto nos ensaios *in vitro* realizado com os isolados, quanto a avaliação genotípica da resistência, foram encontrados isolados resistentes a múltiplas drogas. Esses resultados podem indicar um grande problema na resolução de enfermidades ocasionadas não só por esse microrganismo, mas por outras espécies bacterianas. Os resultados obtidos aqui são importantes para o monitoramento de resistência aos antimicrobianos na piscicultura. No entanto, o teste de concentração inibitória mínima seria de suma importância na complementariedade deste trabalho, a fim de fornecer as concentrações mínimas necessárias dos antimicrobianos, especialmente oxitetraciclina e florfenicol, para inibir o crescimento dessa espécie de bactéria.

O tratamento de edwardsiellose com florfenicol e oxitetraciclina em tilápias, pelos resultados obtidos aqui, pode não ser eficaz, pela associação dos isolados oriundos dessa espécie de peixe serem resistentes a esses antimicrobianos. Com isso, em virtude de serem os únicos fármacos liberados para uso, novas medidas de controle dessa enfermidade em tilápias precisam ser estudadas e postas em prática, uma vez que caso esses animais venham a ser acometidos por *E. tarda*, o tratamento pode não ser efetivo, levando os produtores a prejuízos socioeconômicos. Para tambaquis, pelo fato de os isolados terem apresentado a probabilidade de serem susceptíveis a esses antimicrobianos, o tratamento com esses fármacos poderia ser uma alternativa ao controle da infecção, mas testes *in vivo* com essas drogas nessa espécie de peixe são necessários.

Como conclusão, é garantido que as cepas utilizadas neste trabalho são *E. tarda*. Todos os isolados utilizados foram WT para neomicina, eritromicina e nitrofurantoína. Algumas cepas apresentaram fenótipo NWT para norfloxacin, lincomicina-espectinomicina, amoxicilina, sulfametaxazol-trimetoprim, florfenicol e oxitetraciclina. Além disso, foi possível encontrar genes de resistência nestes isolados, sendo o *tetA* o mais prevalente. Os cálculos dos pontos de corte epidemiológicos provisórios realizados neste trabalho podem servir de referência para estudos futuros, para ser possível realizar comparações e, também, quando for estabelecido um ponto de corte epidemiológico pelo CLSI ou pelo Comitê Europeu de Testes de Susceptibilidade Antimicrobiana (EUCAST),

para *E. tarda* em relação aos antimicrobianos. Por fim, este trabalho fornece subsídios para o monitoramento da resistência de isolados de *E. tarda* aos antimicrobianos, por meio de ensaios *in vitro* e por biologia molecular.

### 3.5. REFERÊNCIAS

ALGAMMAL, A. M.; MABROK, M.; EZZAT, M.; ALFIFI, K. J.; ESAWY, A. M.; ELMASRY, N.; EL-TARABILI, R. M. Prevalence, antimicrobial resistance (AMR) pattern, virulence determinant and AMR genes of emerging multi-drug resistant *Edwardsiella tarda* in Nile tilapia and African catfish. **Aquaculture**, v. 548, n. P1, 737643, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737643>

ASSIS, G. B. N.; PEREIRA, F. L.; ZEGARRA, A. U.; TAVARES, G. C.; LEAL, C. A.; FIGUEIREDO, H. C. P. Use of MALDI-TOF Mass Spectrometry for the Fast Identification of Gram-Positive Fish Pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01492

BEH, E. J. Simple Correspondence Analysis: A Bibliographic Review. **International Statistical Review**, v. 72, n. 2, p. 257-284, 2004.

BERKE, I. & TIerno JR., P. M. Comparison of Efficacy and Cost-Effectiveness of BIOMIC VIDEO and Vitek Antimicrobial Susceptibility Test Systems for Use in the Clinical Microbiology Laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 8, p. 1980-1984, 1996. DOI: 10.1128/jcm.34.8.1980-1984.1996

BUJÁN, N.; MOHAMMED, H.; BALBOA, S.; ROMALDE, J. L.; TORANZO, A. E.; ARIAS, C. R.; MAGARIÑOS, B. Genetic studies to re-affiliate *Edwardsiella tarda* fish isolates to *Edwardsiella piscicida* and *Edwardsiella anguillarum* species. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 30–37, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2017.09.0047>

CAPUTO, A.; BONDAD-REANTASO, M.; KARUNASAGAR, I.; HAO, B.; GAUNT, P.; VERNER-JEFFREYS, D.; FRIDMAN, S.; DORADO-GARCÍA, A. Antimicrobial resistance in aquaculture: A global analysis of literature and national action plans. **Reviews in Aquaculture**, v. 15, p. 568-578, 2023. DOI: 10.1111/raq.12741

CHEN, J.; SUN, R.; PAN, C.; SUN, Y., MAI, B.; LI, Q. X. Antibiotics and Food Safety in Aquaculture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 43, p. 11908-11919, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c03996>

CLSI. **Methods for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing of Bacteria Isolated From Aquatic Animals**. 2nd ed. CLSI guideline VET03. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacteria Isolated From Aquatic Animals**. 3rd ed. CLSI supplement VET04. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020.

COMERLATO, P. H.; SANTOS, S.; ZIEGLER, N.; CAPP, E.; NIENOV, O. H. Métodos estatísticos para desfechos qualitativos. In: DARSKI, C.; FERREIRA, C. F.; KUHL, C. P.; MACHADO, F. D.; FERREIRA, F. V.; WERKA, H. M. G.; DIAZ, J. O.; RODRIGUES, M. P.; MOREIRA, M. S.; ZIEGLER, N. S.; TERRACIANO, P. B.;

COMERLATO, P. H.; SANTOS, S. **Bioestatística Quantitativa Aplicada**, Porto Alegre: Edison Capp, p. 101-124, 2020.

DA COSTA, A.; CHIDEROLI, R. T.; CHICOSKI, L. M.; DE ABREU, D. C.; FAVERO, L. M.; FERRARI, N. A.; MAINARDI, R. M.; DA SILVA, V. G.; PEREIRA, U. P. Frequency of pathogens in routine bacteriological diagnosis in fish and their antimicrobial resistance. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 42, n. 6, p. 3259-3272, 2021. DOI: 10.5433/1679-0359.2021v42n6p3259

DA COSTA, A. R.; CHIDEROLI, R. T.; LANES, G. C.; FERRARI, N. A.; CHICOSKI, L. M.; BATISTA, C. E.; PANDOLFI, V. C. F.; WARE, C.; GRIFFIN, M. J.; DOS SANTOS, A. R.; AZEVEDO, V. A. C.; DA COSTA, M. M.; PEREIRA, U. P. Multiplex PCR assay for correct identification of the fish pathogenic species of *Edwardsiella* genus reveals the presence of *E. anguillarum* in South America in strains previously characterized as *E. tarda*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 132, n. 6, p. 4225-4235, 2022. DOI: doi: 10.1111/jam.15538

EZZAT, M.; EL-TARABILI, R. M.; ESAWY, A. M.; NEHAL, E. Antibiotic Resistance and Antibiotic Resistance Genes Among *Edwardsiella Tarda* Isolated from Fish. **Suez Canal Veterinary Medical Journal**, v. 26, n. 1, p. 171-188, 2021. DOI: 10.21608/scvmj.2021.184978

GAO, P.; MAO, D.; LUO, Y.; WANG, L.; XU, B.; XU, L. Occurrence of sulfonamide and tetracycline-resistant bacteria and resistance genes in aquaculture environment. **Water Research**, v. 46, n. 7, p. 2355-2364, 2012. DOI: 10.1016/j.watres.2012.02.004

HONG NHUNG, P.; OHKUSU, K.; MISHIMA, N.; NODA, M.; MONIR SHAH, M.; SUN, X.; HAYASHI, M.; EZAKI, T. Phylogeny and species identification of the family *Enterobacteriaceae* based on *dnaJ* sequences. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 58, n. 2, p. 153–161, 2007. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2006.12.019

HOSHINA, T. On a new bacterium *Paracolobactrum anguillimortiferum* n. sp. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, v. 28, n. 2, 1962. DOI: <https://doi.org/10.2331/suisan.28.162>

KRONVALL, G. Determination of the real standard distribution of susceptible strains in zone histograms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 22, n. 1, p. 7–13, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(03\)00107-9](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(03)00107-9).

KRONVALL, G. & SMITH, P. Normalized resistance interpretation, the NRI method: review of NRI disc test applications and guide to calculations. **Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 124, p. 1023-1030, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/apm.12624>.

LEUNG, K. Y.; WANG, Q.; YANG, Z.; SIAME, B. A. *Edwardsiella piscicida*: A versatile emerging pathogen of fish. **Virulence**, v. 10, n. 1, p. 555–567, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1080/21505594.2019.1621648>

LIM, Y. -J.; KIM, D. -H.; ROH, H. J.; PARK, M. -A.; PARK, C.-I.; SMITH, P. Epidemiological cut-off values for disc diffusion data generated by standard test protocols from *Edwardsiella tarda* and *Vibrio harveyi*. **Aquaculture International**, v. 24, p. 1153-1161, 2016. DOI: 10.1007/s10499-016-9977-0

LO, D. Y.; LEE, Y. J.; WANG, J. H.; KUO, H. C. Antimicrobial susceptibility and genetic characterisation of oxytetracycline-resistant *Edwardsiella tarda* isolated from diseased eels. **Veterinary Record**, v. 175, n. 8, 2014. DOI: 10.1136/vr.101580

MINITAB. Minitab, LLC, 2021. Disponível em: <https://www.minitab.com>

MOHANTY, B. R. & SAHOO, P. K. Edwardsiellosis in Fish: A Brief Review. **Journal of Biosciences**, v. 32, n. 3, p. 1331–1344, 2007.

NIU, G.; WONGSATHEIN, D.; BOONYAYATRA, S.; KHATTIYA, R. Occurrence of multiple antibiotic resistance and genotypic characterization in *Edwardsiella tarda* isolated from cage-cultured hybrid red tilapia (*Oreochromis* sp.) in the Ping River, Northern Thailand. **Aquaculture Research**, v. 50, n. 12, p. 3643–3652, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/are.14322>

NOOR EL DEEN, A. I. E.; EL-GOHARY, M. S.; ABDU, M. S.; ADEL, M. E. -G. Molecular characterization of *Edwardsiella tarda* bacteria causing severe mortalities in cultured *Oreochromis niloticus* fish with treatment trials. **International Journal of Current Research**, v. 9, n. 5, p. 50962-50969, 2017.

PAPICH, M. G. Chloramphenicol and Derivates, Macrolides, Lincosamides and Miscellaneous Antimicrobials. In: RIVIERE, J. E; PAPICH, M. G. **Veterinary Pharmacology & Therapeutics**. New York: Wiley Blackwell, p. 903-952, 2018.

PAPICH, M. G. & RIVIERE, J. E. Tetracycline Antibiotics. In: RIVIERE, J. E; PAPICH, M. G. **Veterinary Pharmacology & Therapeutics**. New York: Wiley Blackwell, p.858-876, 2018.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2021.

REICHLEY, S. R.; WARE, C.; STEADMAN, J.; GAUNT, P. S.; GARCIA, J. C.; LAFRENTZ, B. R.; TCHACIL, A.; WALDBIESER, G. C.; STINE, C. B.; BUJÁN, N.; ARIAS, C. R.; LOCH, T.; WELCH, T. J.; CIPRIANO, R. C.; GREENWAY, T. E.; KHOO, L. H.; WISE, D. J.; LAWRENCE, L.; GRIFFIN, M. J. Comparative Phenotypic and Genotypic Analysis of *Edwardsiella* Isolates from Different Hosts and Geographic Origins with Emphasis on Isolates Formerly Classified as *E. tarda*, and Evaluation of Diagnostic Methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 12, p. 3466–3491, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.00970-17>

RAHMANI, M.; PEIGHAMBARI, S. M.; SVENDSEN, C. A.; CAVACO, L. M.; AGERSØ, Y.; HENDRIKSEN, R. S. Molecular clonality and antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Infantis from broilers in three Northern regions of Iran. **BMC Veterinary Research**, v. 9, 2013. DOI: 10.1186/1746-6148-9-66

SANTOS, L. & RAMOS, F. Antimicrobial resistance in aquaculture: Current knowledge and alternatives to tackle the problem. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 52, n. 2, p. 135-143, 2018. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2018.03.010

SCHWARZ, S.; SILLEY, P.; SIMJEE, S.; WOODFORD, N.; VAN DUIJKEREN, E.; JOHNSON, A. P.; GAASTRA, W. Assessing the Antimicrobial Susceptibility of Bacteria Obtained from Animals. **Veterinary Microbiology**, v. 141, n. 1–2, p. 1–4, 2010. DOI: 10.1016/j.vetmic.2009.12.013

SMITH, P. Eight rules for improving the quality of papers on the antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from aquatic animals. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 139, p. 87–92, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3354/DAO03476>

SMITH, P.; RUANE, N. M.; DOUGLAS, I.; CARROLL, C.; KRONVALL, G.; FLEMING, G. T. A. Impact of inter-lab variation on the estimation of epidemiological cut-off values for disc diffusion susceptibility test data for *Aeromonas salmonicida*. **Aquaculture**, v. 272, n. 1-4, p. 168-179, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.07.216>

WINCKLER, L. Z.; SANTOS, R. M.; FERREIRA, M. W.; SANTOS, F. M.; LEITE, T. C.; DE ANDRADE, G. B. Mortalidade de tambacus (*Colossoma macropomum* x *Piaractus mesopotamicus*) infectados por *Edwardsiella tarda*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 52, n. 1, p. 63–67, 2015. DOI: DOI: 10.11606/issn.1678-4456.v52i1p63-67

XU, T. & ZHANG, X. *Edwardsiella Tarda*: An Intriguing Problem in Aquaculture. **Aquaculture**, v. 431, p. 129–135, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.12.001>

YANONG, R. P. E. Use of Antibiotics in Ornamental Fish Aquaculture. Institute of Food and Agricultural Sciences Extension, University of Florida, Circular 84, 2003. Disponível em: [https://shellfish.ifas.ufl.edu/wp-content/uploads/Handout-1\\_EDIS-Circ.-84\\_Use-of-antibiotics-in-ornamental-fish-aquaculture.pdf](https://shellfish.ifas.ufl.edu/wp-content/uploads/Handout-1_EDIS-Circ.-84_Use-of-antibiotics-in-ornamental-fish-aquaculture.pdf). Acesso em 03 mai 2023.

YING, Y.; WU, F.; WU, C.; JIANG, Y.; YIN, M.; ZHOU, W.; ZHU, X.; CHENG, C.; ZHU, L.; LI, K.; LI, K.; LU, J.; XU, T.; BAO, Q. Florfenicol Resistance in Enterobacteriaceae and Whole-Genome Sequence Analysis of Florfenicol-Resistant *Leclercia adecarboxylata* Strain R25. **International Journal of Genomics**, v. 2019, 2019.

**CAPÍTULO 4 – ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO, DIVERSIDADE GENÉTICA E AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS DE *Francisella salinarina* ORIUNDOS DE PEIXES MARINHOS NO BRASIL**

**RESUMO**

*Francisella salinarina* (syn. *F. marina*), um patógeno emergente, foi responsável por ocasionar surtos com mortalidade em *Lutjanus guttatus* (pargos) na América Central. O conhecimento acerca da epidemiologia de potenciais patógenos é crucial para elaborar medidas de controle e evitar os prejuízos. Sendo assim, objetivou-se identificar e caracterizar o patógeno associado a surto em uma piscicultura de peixes marinhos no Brasil, analisar as variabilidades genética e peptídica, além da sensibilidade aos antimicrobianos. Em 2021, foram recebidos juvenis de *Epinephelus marginatus* (n=10) e *Rachycentron canadum* (n=10) para exames bacteriológico e histopatológico. Os isolados obtidos foram submetidos às caracterizações morfológica e bioquímica, identificados por MALDI-ToF e sequenciamento do gene 16S rRNA. A diversidade genética desses isolados foi analisada por meio da técnica de REP-PCR. A tipagem peptídica foi observada por meio de um dendograma de MSP. A susceptibilidade aos antimicrobianos foi avaliada pela técnica de disco difusão. Macroscopicamente, os animais apresentavam ulcerações tegumentares, alterações oculares, hepatomegalia e esplenomegalia. Foram isoladas de 2 garoupas e 7 beijupirás, uma bactéria pleomórfica, Gram-negativa, catalase e oxidase positivos. O MALDI-ToF conseguiu identificar, em nível de gênero, os isolados. As sequências do gene 16S rRNA apresentaram cobertura e identidade superiores a 99% com outras sequências depositadas de *F. salinarina*. Os resultados das análises bioquímicas foram correspondentes a essa espécie bacteriana. Na histopatologia, foram visualizadas, em baço, fígado e coração de alguns animais, lesões granulomatosas. Os isolados apresentaram o mesmo padrão de bandas quando realizado o REP-PCR, além de estarem agrupados no mesmo clado, no dendograma de MSP, o que indica que são clonalmente relacionados. Por fim, o antibiograma mostrou que 11,1% isolados foram classificados como NWT para oxitetraciclina. Todos os isolados foram resistentes à amoxicilina e a sulfametoxazol-trimetoprim. Conclui-se que este é o primeiro relato no mundo de *F. salinarina* associada a enfermidades em garoupas e beijupirás. Os isolados obtidos foram clonais entre si e sensíveis aos antimicrobianos autorizados para uso em pisciculturas no Brasil, sendo alternativas para o tratamento destes animais.

**Palavras-chave:** surto, patógeno emergente, garoupas, beijupirás, tipagem, antibiograma

#### 4.1. INTRODUÇÃO

De acordo com o relatório publicado pela (FAO) em 2022, a aquicultura mundial ultrapassou a produção de 87 milhões de toneladas de peso vivo de animais aquáticos em 2020, sendo 57,5 milhões de toneladas relacionados à produção de peixes. Desse valor, 8,3 milhões estão relacionados com a piscicultura marinha. Desse total, em torno de 2,7 milhões de toneladas são decorrentes da produção de *Salmo salar* e, cerca de 1,1 milhões toneladas, estão relacionadas à produção do *Chanos chanos*.

Apesar de o Brasil possuir um elevado potencial para a piscicultura marinha, a produção se restringe, principalmente, a pequenas fazendas localizadas nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Espírito Santo. Uma das espécies marinhas mais cultivadas no país, que sofreu um aumento em sua produção, entre os anos de 2015 a 2019, foi o *Rachycentron canudum*, o beijupirá (VALENTI *et al.*, 2021). Já outra espécie que tem havido interesse crescente em seu cultivo é a *Epinephelus marginatus*, a garoupa (MELLO, 2021; MOREIRA, 2022; VALENTI *et al.*, 2021). Carne com alto valor agregado, boas taxas de conversão alimentar, são alguns dos atrativos para a produção de beijupirás e garoupas no país (NASCIMENTO *et al.*, 2022).

Contudo, há alguns entraves na produção de peixes marinhos. O acometimento dos animais por doenças infecciosas é um dos exemplos. Além do prejuízo econômico gerado na piscicultura (TAVARES-DIAS & MARTINS, 2017), os dados relacionados a doenças infecciosas em peixes marinhos são escassos, dificultando a produção. A intensificação da produção aquícola promove exposições dos animais às mudanças no meio, envolvendo fatores abióticos (como temperatura e qualidade da água) e bióticos (introdução de novos animais no plantel). Essas constantes alterações estressam os animais, aumentando a predisposição destes ao desenvolvimento de doenças (KRKOŠEK, 2010; NARDOCCI *et al.*, 2014), que podem levar os animais a óbito. No Brasil, destaca-se a bactéria *Photobacterium damsalae* subsp. *piscicida* associada à septicemia e mortalidades em beijupirás (GONÇALVES *et al.*, 2016; SHIMADA *et al.*, 2020).

Em 2018 foi relatada a emergência de uma nova espécie de *Francisella* provocando surtos de uma doença granulomatosa, com mortalidade, em alevinos de pargos, na América Central. De acordo com as análises morfológicas, fenotípicas e genotípicas realizadas, foi proposto o nome *Francisella marina* para este patógeno

(SOTO *et al.*, 2018). No entanto, posteriormente, este nome foi considerado inválido, e uma nova classificação foi proposta, *Francisella salimarina* (LI *et al.*, 2020). Pelos resultados das análises genéticas realizadas, como a formação de clados monofiléticos entre os isolados e clados distintos com outras espécies do gênero *Francisella*, além de valores superiores a 97,3% para identidade média de aminoácidos (AAI) e identidade média de nucleotídeos (ANI), os isolados descritos nos dois trabalhos, E95-16 (SOTO *et al.*, 2018) e SYSU SYW-1 (LI *et al.*, 2020), pertencem a mesma espécie bacteriana (LI *et al.*, 2020).

Recentemente, este patógeno foi isolado de um paciente humano com infecção cutânea em dedos da mão. As lesões eram eritematosas e crostosas. O estudo publicado em que há esse relato, destaca a possibilidade da infecção oportunista dessa bactéria por meio de atividades, como a pesca (HENNEBIQUE *et al.*, 2022). Esse fato destaca a importância dessa bactéria não apenas para a saúde animal, mas para a saúde única, já que esse microrganismo parece ter potencial zoonótico.

Assim, os objetivos deste trabalho foram identificar e caracterizar o patógeno associado a um surto com mortalidade em uma piscicultura de peixes marinhos no estado de São Paulo. Além disso, obter conhecimentos a respeito de suas características epidemiológicas, por meio das análises das diversidades genética e peptídica, e sensibilidade desse microrganismo aos antimicrobianos, são essenciais para que sirvam de base para elaboração de medidas de contenção e de prevenção dos surtos ocasionados por *F. salimarina*.

## **4.2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.2.1. RELATO DE CASO**

Em julho de 2021, foi verificada a ocorrência de um surto de doença infecciosa com mortalidade em juvenis de garoupas (*Epinephelus marginatus*) e beijupirás (*Rachycentron canadum*), cultivados em uma piscicultura com sistema de recirculação de água, localizada no estado de São Paulo. No mês subsequente, esses animais foram amostrados ( $n = 20$  animais, sendo dez garoupas e dez beijupirás), armazenados a 4 °C em caixas de isopor com gelo e submetidos ao transporte para o Laboratório de Doenças de Animais Aquáticos (AQUAVET, Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais) para análise bacteriológica.

Durante o surto, foi relatado que os beijupirás apresentaram anorexia, inapetência, natação errática, exoftalmia, lesões em córnea e ulcerações no tegumento. Após o envio ao laboratório para exame, 100% desses animais vieram a óbito. As garoupas apresentaram ulcerações no tegumento, prurido e apenas algumas apresentaram mortalidade. Além disso, estas foram medicadas, via banho de imersão, com cloridrato de oxitetraciclina, em água doce entre três e cinco minutos, e sulfametoxazol com trimetoprim, em água salgada por uma hora. O tratamento foi concluído quatro dias antes de os peixes serem enviados ao laboratório. No momento em que foi observado o surto, a temperatura da água no sistema estava entre 18 °C e 19 °C e, no período em que houve mortalidade de alguns animais, o sistema de aquecimento da piscicultura apresentou problemas. Não havia histórico da introdução de novos animais na produção.

#### 4.2.2. AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA E EXAME BACTERIOLÓGICO

Ao chegar no laboratório, os peixes foram inspecionados para avaliação das lesões macroscópicas, pesados, descamados e desinfetados. Posteriormente, realizou-se a necropsia dos animais para avaliação de possíveis alterações patológicas e, em seguida, *swabs* de cérebro, rim, fígado e baço foram obtidos assepticamente e semeados em ágar triptona de soja acrescido de 5% de sangue de carneiro (ASA), ágar cisteína coração suplementado com 1% de hemoglobina bovina (CHAH), ágar Man Rogosa & Sharpe (MRS) e ágar tiosulfato, citrato, bile e sacarose (TCBS). Todas as placas foram incubadas a 28°C por um período de dois a sete dias para isolamento de patógenos bacterianos.

#### 4.2.3. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Fragmentos de cérebro, rim, baço, fígado, intestino, coração, brânquias e tegumento foram coletados para exame histopatológico. Para análise histológica, os tecidos foram fixados em formalina 10% tamponada (NBF) por 24 h. Em seguida, esses órgãos foram imersos em álcool a 70% até serem processados. Os tecidos fixados foram, então, levados a um processador de tecido de bancada semi-fechado TP1020 (Leica Microsystems, Alemanha). Neste aparelho os tecidos foram desidratados por imersão em série crescente de etanol (70-100%) e clarificação em xilol. Posteriormente, os tecidos foram incluídos em parafina por meio da central de inclusão EG1150 (Leica Biosystems, Alemanha).

Em seguida, foram obtidas secções do tecido, de forma sagital e seriada, com, aproximadamente, 4  $\mu\text{m}$  de espessura, com o auxílio de um micrótomo rotativo semiautomatizado RM2245 (Leica Biosystems), sendo colocadas em lâminas de vidro para coloração. A coloração, por sua vez, foi realizada com hematoxilina e eosina, de acordo com o proposto por LUNA (1968), com algumas modificações. A parafina dos cortes foi removida em banhos de xilol e os cortes foram hidratados em banhos de etanol, em ordem decrescente de concentração (100-70%), e água destilada, além de corados com hematoxilina de Harris, lavados em água corrente para retirar o excesso de hematoxilina e, em seguida, imersos em eosina Y. Posteriormente, realizou-se a desidratação, com banhos de etanol em ordem crescente de concentração (95-100%), finalizando com clarificação em xilol e montagem da lâmina com lamínula. As alterações histopatológicas foram observadas em diferentes aumentos com um microscópio Primo Star (Zeiss Microscopy).

As fotos das lâminas dos peixes foram obtidas através do microscópio O500 R (Opticam, Brasil) e capturadas pela câmera digital LOPT14003 (Opticam), com o auxílio do programa OPTHD (Opticam).

#### 4.2.4. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS POR MALDI-ToF EM TEMPO REAL E CONSTRUÇÃO DE *MAIN SPECTRA PROFILE* (MSP)

As colônias foram identificadas pelo MALDI-ToF, de acordo com o proposto por ASSIS *et al.* (2017). Entre uma e duas UFCs foram coletadas com palito de madeira estéril e aplicadas na placa de aço inoxidável polido (Bruker Daltonics). Foi adicionado 1  $\mu\text{L}$  de ácido fórmico a 70% (Sigma-Aldrich), sendo aguardada a sua secagem completa, à temperatura ambiente, e, em seguida, foi pipetado 1  $\mu\text{L}$  da matriz de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA) (Bruker Daltonics), que secou naturalmente. A calibração do equipamento foi realizada com o *Bacterial Test Standard* (BTS) (*E. coli* DH5 alpha; Bruker Daltonics), antes dos procedimentos. Os espectros foram obtidos seguindo as recomendações do fabricante, no software FlexControl e MicroFlex LT *mass spectrometer* (Bruker Daltonics). A placa de aço polido com os isolados preparados foi, então, inserida no equipamento Microflex LT (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) para identificação dos isolados.

Após isso, os isolados foram armazenados em caldo Mueller Hinton (MMH) cátion ajustado, glicerinado (15% de glicerol), com 2% de suplemento VX e 0.1% de

glicose, a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o uso. Em virtude da identificação pelo MALDI-ToF ter sido correspondente apenas a nível de gênero, foi necessária a realização do sequenciamento do gene 16S rRNA, para a verificação da espécie bacteriana dos isolados obtidos.

Após a confirmação da espécie pelo sequenciamento, um isolado foi selecionado aleatoriamente para inclusão de um MSP no banco de dados do MALDI-ToF, para que possibilitasse a identificação confiável a nível de espécie desses isolados (ASSIS *et al.*, 2017). Para isso, um isolado (FSM02) foi descongelado, semeado em ágar CHAH, incubado a  $28^{\circ}\text{C}$  por 48h. Após o período de incubação, foi realizada a extração em tubo, conforme proposto por ASSIS *et al.* (2017). Dessa forma, foi coletada a quantidade equivalente a  $1\text{ }\mu\text{L}$  de colônias bacterianas, sendo suspensas em  $300\text{ }\mu\text{L}$  de água destilada. Em seguida, foi adicionado um volume de  $900\text{ }\mu\text{L}$  de etanol e a solução foi homogeneizada, com o auxílio de um agitador vórtex (KASVI). A suspensão bacteriana foi, então, centrifugada duas vezes por dois minutos a  $15.000\text{ rpm}$ , e o sobrenadante removido. Foi aguardada a secagem completa, à temperatura ambiente, do *pellet* obtido que, por sua vez, foi ressuscitado em  $50\text{ }\mu\text{L}$  de ácido fórmico a 70% e em  $50\text{ }\mu\text{L}$  de acetonitrila. Novamente, a solução foi homogeneizada e centrifugada por dois minutos a  $15.000\text{ rpm}$ .

Em seguida,  $1\text{ }\mu\text{L}$  do sobrenadante foi adicionado em oito pontos diferentes da placa de aço polido. Aguardou-se a secagem completa da placa e, após isso, adicionou-se  $1\text{ }\mu\text{L}$  da matriz HCCA, que secou naturalmente. A calibração do equipamento foi realizada com o BTS, antes do início do procedimento, conforme explicado anteriormente. Em cada um dos oito pontos, os dados de massa/carga ( $m/z$ ) foram coletados em triplicatas, gerando um total de 24 espectros. A qualidade destes foi analisada pelo software FlexAnalysis (Bruker Daltonics), no qual os três espectros de pior qualidade foram descartados. Os espectros que restaram foram adicionados ao MALDI-ToF Biotyper versão 3 (Bruker Daltonics), gerando o MSP. A aprovação do MSP se deu pela obtenção de um escore mínimo de 2.700 e frequência de picos de 75%.

#### 4.2.5. ANÁLISES DA DIVERSIDADE DE PEPTÍDEOS DOS ISOLADOS DE *F. salinarina* POR MSP

Para a análise da diversidade de peptídeos, todos os isolados *F. salinarina* obtidos tiveram um MSP concebido conforme descrito no subtópico anterior (item 4.2.4.). Para tanto, os isolados foram descongelados, semeados em ágar CHAH à  $28^{\circ}\text{C}$ , por 48h. Em

seguida, passaram pelo processo de extração em tubo, leitura da amostra e geração do MSP. Posteriormente, os dados foram incluídos no software *in house* MSP-Share, em que um módulo, Dendrograma de Dice (DD), foi gerado para a comparar a similaridade proteica entre os isolados.

Este módulo é responsável por: (1) constatar os picos  $m/z$  nos MSPs; (2) calcular o coeficiente de Sørensen-Dice entre cada par de MSPs; (3) construir uma matriz de distância (por exemplo, 1-Dice); (4) organizar os MSPs hierarquicamente com o método de média aritmética entre grupos de pares não ponderados (UPGMA) e (5) dispor um dendrograma com a biblioteca *ggdendro* do software R (R CORE TEAM, 2021). O ponto de corte para tipagem foi baseado na similaridade de Dice, usando a média de todos os sítios menos 1.645 vezes o desvio padrão (isto significa que, admitindo a curva normal, 95% dos valores de similaridade ficaram acima do ponto de corte estabelecido). O poder discriminatório da técnica foi calculado pelo Índice de Diversidade de Simpson (SDI). Um SDI = 1 significa que o método é capaz de distinguir todos os isolados e, quando mais próximo a 0, indica homogeneidade da tipagem de cepas (HUNTER & GASTON, 1988).

#### 4.2.6. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA

Dois isolados foram selecionados, aleatoriamente, sendo um de beijupirá (FSM02) e outro de garoupa (FSM08), e submetidos aos testes de coloração de Gram, catalase e oxidase, seguidos de caracterização bioquímica. Para tanto, esses isolados foram descongelados, semeados em ágar CHAH e incubados a 28°C por 24 h.

#### 4.2.7. CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DOS ISOLADOS

##### 4.2.7.1. Extração do DNA

Para caracterização genética, foi realizada a extração do material genético dos isolados obtidos. Sendo assim, estes foram descongelados, estriados em ágar CHAH, incubados a 28°C por 48h. Em seguida, o material genético foi extraído por meio do kit de purificação Maxwell 16 Tissue DNA (Promega, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Após isso, o DNA extraído foi quantificado no espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, EUA). A pureza do ácido nucleico foi mensurada através da razão de absorbância em comprimento de onda a 260 nm/280 nm, seguindo as recomendações do fabricante. O material genético extraído e quantificado de cada isolado foi armazenado a -20°C até o uso.

#### 4.2.7.2. Sequenciamento do gene 16S rRNA

Para o sequenciamento do gene 16S rRNA, foi realizada, inicialmente, a reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando os *primers* universais C70 (*forward*) (5'-AGAGTTTGTATYMTGGC-3') e B37 (*reverse*) (5'-TACGGYTACCTTGTTACGA-3'), segundo o proposto FOX *et al.* (1995), com algumas modificações. Os primers foram sintetizados e purificados pela Integrated DNA Technologies (IDT, EUA). A reação foi realizada usando o kit de DNA polimerase, HotStarTaq, em um volume final de 38  $\mu$ L, contendo 1X de tampão de PCR, 0,2 mM de dNTPs, 0,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,25  $\mu$ M de cada *primer*, 0,0625 U/ $\mu$ L de Taq DNA polimerase e, a partir de, 100 ng de *template* de DNA. As condições da PCR consistiram em uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 15 min, seguida de 35 ciclos compostos por uma fase de desnaturação a 95°C por 1 min, seguida por uma etapa de anelamento dos *primers* a 58°C por 1 min e fase de extensão a 72°C por 1 min. Por fim, a etapa final de alongamento foi a 72°C por 15 min. A ciclagem térmica foi realizada no termociclador Veriti 96 poços (Life Technologies, EUA). Os produtos de PCR foram separados no QIAxcell Advanced usando o Kit QX DNA Screening (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante, para visualização de uma banda de, aproximadamente, 1500 pb.

Em seguida, procedeu-se a purificação dos produtos da PCR utilizando o Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, EUA), seguindo as recomendações do fabricante, para que fosse possível realizar o sequenciamento. As reações de sequenciamento foram realizadas com o Kit BigDye™ Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems, EUA), com os mesmos *primers*, e avaliadas com o analisador genético ABI 3500 (Life Technologies). As sequências, *forward* e *reverse*, oriundas do sequenciamento foram usadas para gerar os *contigs*, usando o software BioEdit (Ibis Biosciences, EUA), sendo, então, comparados com sequências, depositadas no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) através do algoritmo *Basic local alignment search tool* (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). O critério para identificação de espécies bacterianas, utilizando o gene 16S rRNA, foi estabelecido através da semelhança entre as sequências de nucleotídeos, de  $\geq 97\%$  (NGUYEN *et al.*, 2016; VĚTROVSKÝ & BALDRIAN, 2013).

#### 4.2.7.3. Análise filogenética

Após a obtenção das sequências dos isolados deste trabalho, foi realizada uma análise filogenética com o objetivo de verificar agrupamentos discriminatórios para *F. salinarum*. Sendo assim, as sequências do gene 16S rRNA disponíveis de isolados de *F.*

*salimarina* (anteriormente classificadas como *F. marina*) (*Francisella marina* E95-16, número de acesso: CP043552.1; *F. marina* E103-15, número de acesso: PRJNA563510; *F. salimarina* SYW-3, número de acesso: MN242376.1), de *F. orientalis* (*F. noatunensis* subsp. *orientalis* FNO371, número de acesso: PRJNA398204), de *F. noatunensis* (*F. noatunensis* subsp. *noatunensis* AL1108, número de acesso: KU860460.1), de *F. tularensis* (*Francisella tularensis* subsp. *novicida* TCH2015, número de acesso: PRJNA378245) e de *F. philomiragia* (*F. philomiragia* QH-5, número de acesso: KU593488.1), nas quais as identidades foram confirmadas a nível de espécie, foram obtidas do NCBI. Todas as sequências foram alinhadas usando o software MEGA v.11 (TAMURA *et al.*, 2021). As distâncias evolutivas foram calculadas usando modelo de Kimura dois-parâmetros (KIMURA, 1980) e o método escolhido para inferir a história evolutiva foi o *Neighbor-Joining* (SAITOU & NEI, 1987). A análise *bootstrap* foi realizada em 1000 réplicas a fim de se investigar a confiabilidade das árvores (FELSENSTEIN, 1985).

#### 4.2.7.4. REP-PCR

A análise da diversidade genética dos isolados foi realizada por meio da técnica de REP-PCR (VERSALOVIC *et al.*, 1998), de acordo com a metodologia proposta por COSTA *et al.* (2013). A reação de amplificação foi realizada com o primer GTG5 (5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3') (Life Technologies, EUA), com a utilização do kit de DNA polimerase, HotStarTaq, em um volume final de 25 µL. A mistura da reação foi composta por tampão 2X de PCR, 0,2 µM de dNTPs, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µM do primer, 5 U de Taq DNA polimerase e, a partir de, 100 ng de DNA de cada isolado. As etapas da PCR consistiram em uma desnaturação inicial de 95 °C por 15 min, seguido por 30 ciclos de 95 °C por 30 s, 45 °C por 1 min, 72 °C por 4 min e uma extensão final a 72 °C por 16 min. A reação de amplificação foi realizada no termociclador Veriti.

Os produtos correspondentes à PCR foram separados por eletroferese em gel de agarose (1,5%) e corados com brometo de etídio (0,5 µg/mL por 30 min). Um marcador de 1 kb (Promega) foi utilizado como padrão de tamanho molecular. O gel com os produtos da PCR, foram visualizados por transiluminação UV e as imagens foram capturadas usando o sistema digital de imagem L-Pix EX (Loccus Biotecnologia). As imagens capturadas foram avaliadas usando o software BioNumerics versão 6.6 (Applied Maths). O coeficiente de Dice foi utilizado para determinar as semelhanças entre os

padrões de bandas (DICE, 1945) e um dendrograma foi gerado usando a abordagem UPGMA.

#### 4.2.8. TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

O teste de disco difusão foi realizado obedecendo as diretrizes do protocolo VET03 estabelecidas pelo CLSI (2020). Foram utilizados discos contendo os antimicrobianos: amoxicilina (AML, 10 µg), eritromicina (ERI, 15 µg), florfenicol (FFC, 30 µg), norfloxacin (NOR, 10 µg), oxitetraciclina (OT, 30 µg), sulfametoxazol-trimetoprim (SXT, 25 µg), neomicina (NEO, 10 µg) e nitrofurantoína (NIT, 300 µg), os quais foram adquiridos comercialmente (Oxoid, UK).

Para o teste, todos os nove isolados de *F. salinarina* foram descongelados, semeados em ágar CHAH e incubados a 28 °C por 24 h. Após o período de incubação, colônias foram coletadas e suspensas em solução salina estéril para atingir um valor de absorvância, no comprimento de onda de 625 nm, entre 0,08 e 0,13, que foi avaliado usando um espectrofotômetro visível (Spectrum, China). Placas de ágar Muller-Hinton foram inoculadas com a suspensão bacteriana usando *swabs* estéreis. Em seguida, os discos antimicrobianos foram colocados no ágar e as placas foram incubadas a 28 °C por 24 horas. Além disso, foram utilizadas as cepas de controle de qualidade do teste, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658, as quais foram cultivadas em ágar TSA a 28 °C por 24 horas e submetidas às mesmas condições experimentais descritas acima. Todos os procedimentos foram realizados em triplicatas.

O diâmetro das zonas de inibição foi mensurado com o auxílio de uma régua. Os isolados foram classificados como selvagens (*wild type* = WT) ou não selvagens (*non-wild type* = NWT), de acordo com os valores de corte epidemiológicos ( $CO_{WT}$ ) calculados pela interpretação da resistência normalizada (NRI) (KRONVALL *et al.*, 2003; KRONVALL & SMITH, 2016; SMITH *et al.*, 2007). A análise de NRI foi realizada usando o programa de planilha automática MS Excel disponibilizada por P. Smith, W. Finnegan e G. Kronvall ([www.bioscand.se/nri](http://www.bioscand.se/nri)), sendo utilizada com a permissão do detentor da patente Bioscand AB, TĚABY, Suécia (patente europeia nº 1383913 e patente dos EUA nº 7.465.559).

### 4.3. RESULTADOS

#### 4.3.1. EXAME FÍSICO

Os peixes avaliados possuíam, aproximadamente, nove meses de idade com peso médio de 17,82 g e 83,41 g para garoupa e beijupirá (Tabela 12), respectivamente. Externamente, as garoupas apresentavam ulcerações tegumentares (Figura 12a) e os beijupirás alterações oculares (exoftalmia, opacidade e hemorragia) (Figura 12b). Internamente, nos beijupirás, foram visualizadas áreas hemorrágicas no fígado e no baço, além de hepatomegalia e esplenomegalia (Figura 12c). Já nas garoupas não foram visualizadas, a olho nu, alterações significativas em nenhum dos órgãos.

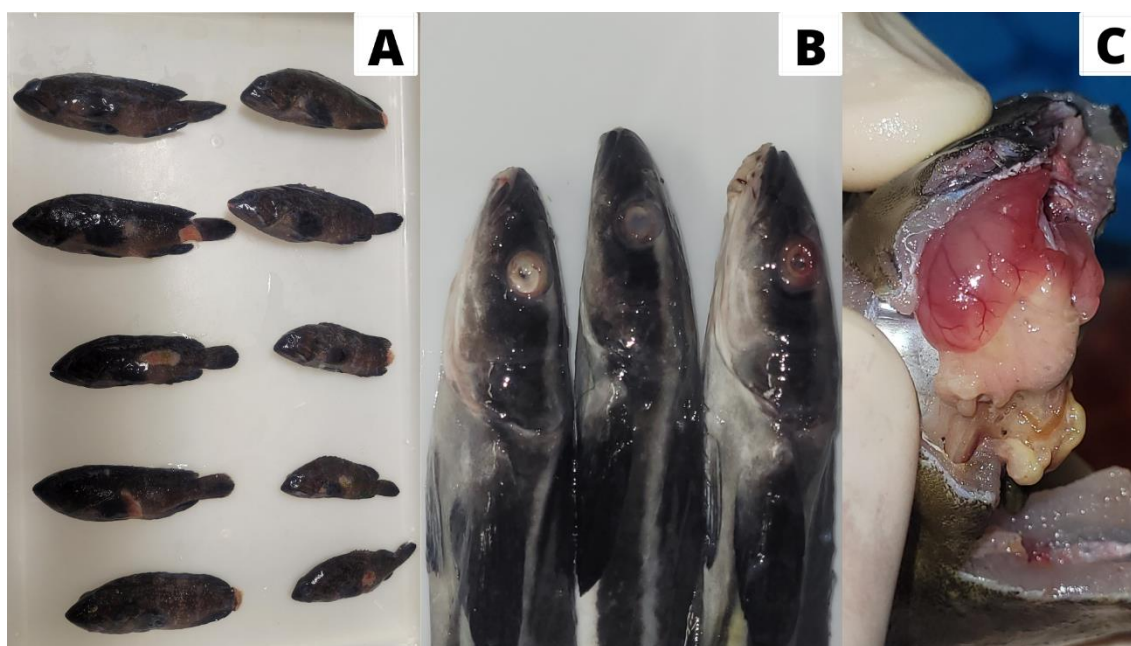


Figura 12 – Alterações visualizadas no exame físico de garoupas e beijupirás. Garoupas apresentando ulcerações tegumentares (A), beijupirás com alterações oculares (B) e áreas hemorrágicas no fígado (C).

#### 4.3.2. EXAME HISTOPATOLÓGICO

##### 4.3.2.1. Beijupirás

No baço de seis peixes, beijupirás 1, 3, 6, 7, 9 e 10 (Tabela 12), foram encontradas áreas multifocais de infiltrado inflamatório constituídos por numerosos macrófagos, linfócitos, melanomacrófagos e macrófagos epitelióides arranjados de forma concêntrica ao redor de centro necrótico e ocasionalmente delimitados por uma cápsula de tecido fibroso, indicando a presença de granulomas maduros (Figura 13). Além disso, também foram visualizadas no baço de sete animais (beijupirás 3, 5, 6, 7, 8, 9 e 10), áreas

multifocais com vasos sanguíneos com camadas íntima e média, da parede, hipereosinofílicas e fibrilares, condizentes com necrose fibrinóide, e obstruídos por acentuada quantidade de material eosinofílico fibrilar aderido ao endotélio, correspondentes a trombos de fibrina.

No fígado de um peixe (beijupirá 3), foram observadas áreas multifocais de infiltrado inflamatório constituídos por numerosos macrófagos, linfócitos, melanomacrófagos e macrófagos epitelioides arranjados de forma concêntrica ao redor de centro necrótico e ocasionalmente delimitados por uma cápsula de tecido fibroso (granulomas). No rim de quatro animais (beijupirás 6, 7, 8 e 9), foram vistas áreas de nefrite necrosante multifocal aguda acentuada com necrose fibrinoide e trombos de fibrina multifocais.

Na coróide de oito animais (beijupirás 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9 e 10), foram observados infiltrado linfo-histioplasmocitário acentuado associado a áreas com vasos sanguíneos com camadas íntima e média, da parede, hipereosinofílicas e fibrilares, correspondentes a necrose fibrinoide, e obstruídos por acentuada quantidade de material eosinofílico fibrilar aderido ao endotélio (os trombos de fibrina). Em um peixe (beijupirá 1), foi visto na esclera áreas multifocais a coalescentes de infiltrado inflamatório linfo-histioplasmocitário acentuado associado com afastamento das fibras colágenas e dilatação dos vasos linfáticos, condizentes com edema.

Nos rastros branquiais de quatro peixes (beijupirás 1, 2, 5 e 8) foram visualizados infiltrados inflamatórios linfo-histioplasmocitário moderados concentrados principalmente ao redor de vasos. No entanto, em dois desses animais (beijupirás 5 e 8), também foram observadas áreas com necrose fibrinoide e trombos de fibrina multifocais. No coração de dois animais foram encontradas alterações condizentes com miocardite granulomatosa focal moderada (beijupirás 6 e 7).

Não foram visualizadas alterações no cérebro e no intestino de nenhum desses animais.

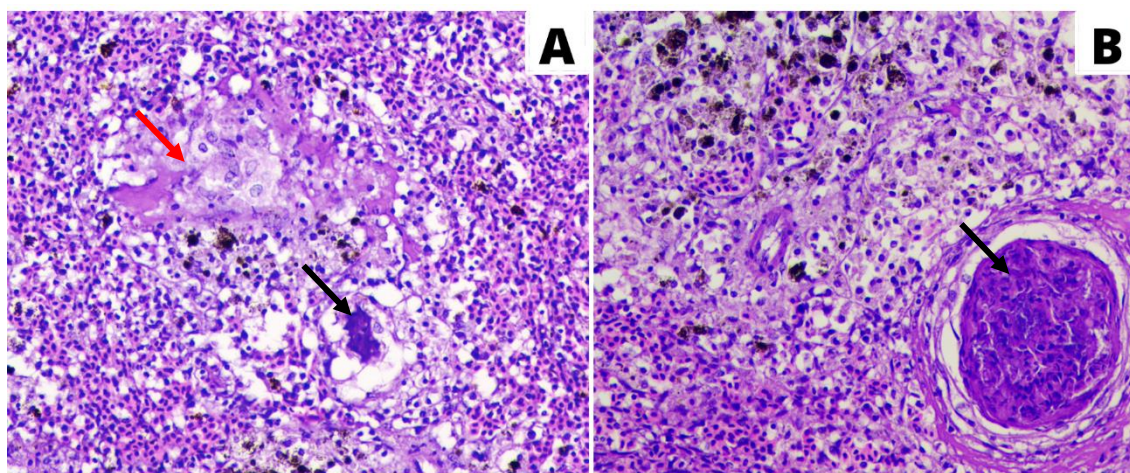


Figura 13 – Imagens histológicas de baços dos beijupirás. Área de agregado de macrófagos e acúmulo de material eosinofílico amorfo (necrose) (seta vermelha) e um pequeno granuloma maduro (seta preta) (A). Grande granuloma maduro, com centro contendo restos celulares e parede fina constituída por macrófagos achatados (B) (seta preta). Aumento de 40x.

#### 4.3.2.2 Garoupas

Os achados histopatológicos visualizados nas garoupas foram, sobretudo, relacionados às lesões de pele e musculatura. Em dois animais, garoupas 5 e 6 (Tabela 12), foram observadas lesões condizentes com dermatite e miosite necrosante, linfocitária e neutrofílica multifocal a coalescente aguda acentuada (Figura 14). As lesões observadas consistiram em áreas de epiderme com numerosas células epiteliais de revestimento tumefeitas com citoplasma acentuadamente vacuolizado e, por vezes, rompidas (degeneração balonosa), necrose e perda da epiderme com exposição da derme (ulceração) associada a infiltrado inflamatório linfo-histiocitário e neutrofílico acentuado com abundante acúmulo de material eosinofílico fibrilar (fibrina) e ocasionais formações de vesículas com coleções de células inflamatórias (micropústulas). Nas áreas de ulceração, o infiltrado inflamatório se estendeu pelas dermes superficial, profunda e pela musculatura com numerosas fibras musculares hipereosinofílicas, tumefeitas e com perda de estriações (degeneração) e fibras fragmentadas e floculares (necrose muscular). Adicionalmente, há numerosos vasos sanguíneos dilatados com lúmen repleto por hemácias (hiperemia).

No baço de um animal, garoupa 6, foram observadas áreas de acúmulos multifocais moderados de material eosinofílico (fibrina) (Figura 14c).

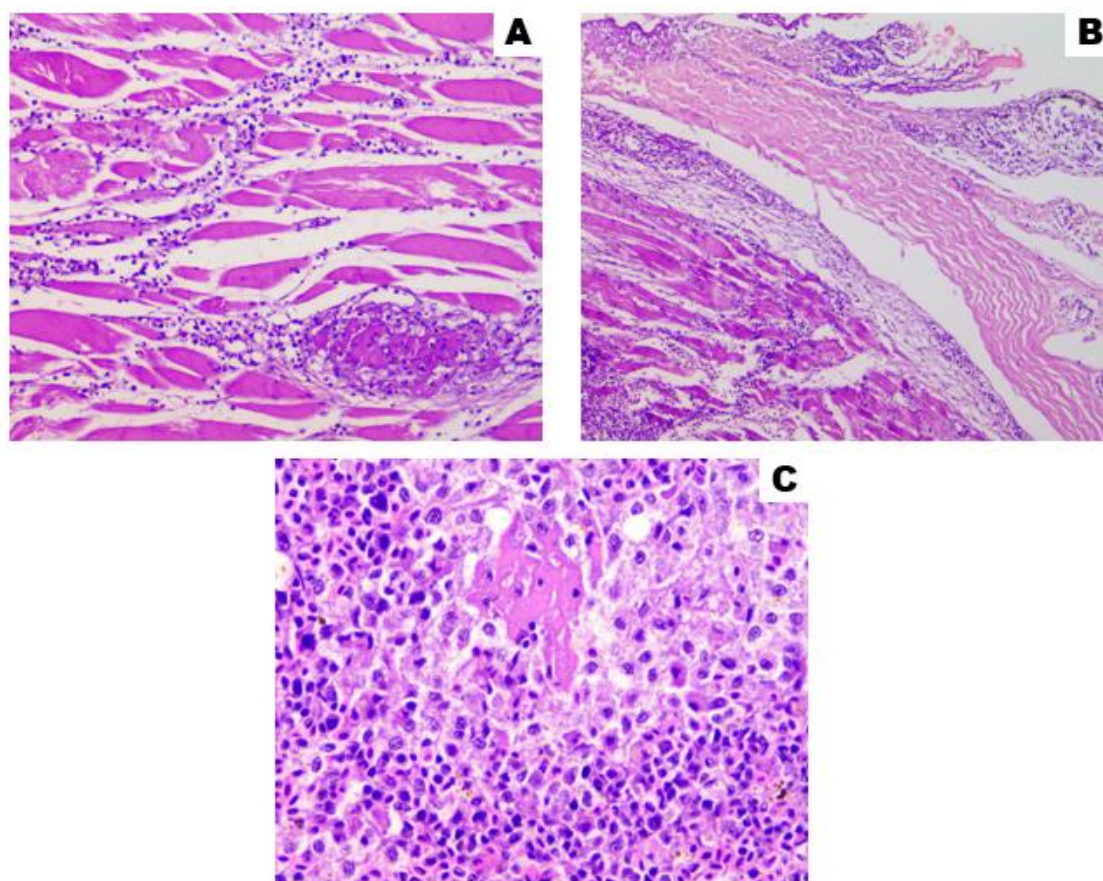


Figura 14 – Imagens histológicas de músculo (A), pele (B) e baço (C) de garoupas. Áreas com lesões de miosite necrosante (A) e dermatite (B), além de acúmulos de fibrina (C). Aumentos de 10x (B) e 20x (A e C).

#### 4.3.3. IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA PELO MALDI-ToF

Foi visualizado crescimento bacteriano em rim, fígado e baço em 12 dos 20 animais (Tabela 12). Entre esses isolados obtidos, *Francisella salinarina* (n = 9 peixes), *Vibrio harveyi* (n = 4) e *Photobacterium damsela* (n = 1) foram identificados pelo MALDI-TOF. A princípio, 88,9% (n = 8) das cepas analisadas de *F. salinarina*, antes da inclusão do MSP, foram identificadas apenas a nível de gênero e 11,1% (n = 1) não apresentou dados confiáveis para identificação. Os escores obtidos variaram de 1.603 a 1.807 (Tabela 14) e, devido a aproximação com os espectros de *F. philomiragia*, foi possível inferir que as cepas isoladas pertenciam ao gênero *Francisella*.

Tabela 12. Resultado da identificação bacteriana dos isolados oriundos de garoupas e beijupirás.

Peixe	Peso (g)	Identificação bacteriana
Garoupa 1	24,18	-
Garoupa 2	23,38	-
Garoupa 3	16,85	-
Garoupa 4	20,14	-
Garoupa 5	20,15	<i>Francisella salimarina</i>
Garoupa 6	21,83	<i>Vibrio harveyi</i>
Garoupa 7	12,51	-
Garoupa 8	21,87	-
Garoupa 9	7,3	<i>Francisella salimarina</i>
Garoupa 10	10,03	-
Beijupirá 1	99,32	<i>Francisella salimarina</i>
Beijupirá 2	64,13	<i>Vibrio harveyi</i>
Beijupirá 3	68,18	<i>Francisella salimarina</i> <i>Photobacterium damsela</i> <i>Vibrio harveyi</i>
Beijupirá 4	82,36	-
Beijupirá 5	75,11	<i>Francisella salimarina</i>
Beijupirá 6	89,75	<i>Vibrio harveyi</i>
Beijupirá 7	81,92	<i>Francisella salimarina</i>
Beijupirá 8	92,94	<i>Francisella salimarina</i>
Beijupirá 9	96,86	<i>Francisella salimarina</i>
Beijupirá 10	83,6	<i>Francisella salimarina</i>

#### 4.3.4. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA

Foram isoladas de sete beijupirás e duas garoupas, colônias cinzas esbranquiçadas, lisas e convexas com crescimento ASA, CHA e TCBS, entre 24 e 48 horas a 28°C. Na microscopia, foram visualizadas bactérias pleomórficas e Gram-negativas. FSM02 e FSM08 foram positivos para os testes de catalase e oxidase (Tabela 13). Com relação às *strips* de identificação API 20E, o único resultado positivo, para ambos os isolados, foi a produção de acetoina a partir da glicose, também conhecida como reação Voges-Proskauer (VP) (Tabela 13).

Tabela 13. Resultado da caracterização bioquímica dos isolados FSM02 e FSM08, além dos dados das cepas previamente caracterizadas bioquimicamente em estudos anteriores, E95-16 (SOTO *et al.*, 2018) e SYSU SWM-1 (LI *et al.*, 2020).

Teste	Componentes ativos	Reações/enzimas	Resultados			
			FSM02	FSM08	E95-16	SYSU SYW-1
CAT		Catalase	+	+	+	+
OX		Citocromo-oxidase	+	+	-	+
ONPG	2-nitrofenil-βD-galactopiranosida	β-galactosidase	-	-	-	-
<u>ADH</u>	L-arginina	Arginina DiHidrolase	-	-	-	+
<u>LDC</u>	L-lisina	Lisina DesCarboxilase	-	-	-	Não realizado
<u>ODC</u>	L-ornitina	Ornitina DesCarboxilase	-	-	-	Não realizado
<u>CIT</u>	Citrato de sódio	Utilização do CITrato	-	-	-	Não realizado
<u>H<sub>2</sub>S</u>	Tiosulfato de sódio	Produção do H <sub>2</sub> S	-	-	-	-
<u>URE</u>	Ureia	UREase	-	-	-	Não realizado
TDA	L-triptofano	Triptofano DesAminase	-	-	-	Não realizado
IND	L-triptofano	produção de INDol	-	-	-	-
<u>VP</u>	Piruvato de sódio	produção de acetoína (Voges Proskauer)	+	+	+	Não realizado
<u>GEL</u>	Gelatina (origem bovina)	GELatinase	-	-	+	+
GLU	D-glucose	fermentação/oxidação (GLUcose)	-	-	-	-
MAN	D-manitol	fermentação/oxidação (MANitol)	-	-	-	Não realizado
INO	Inositol	fermentação/oxidação (INOsitol)	-	-	-	Não realizado
SOR	D-sorbitol	fermentação/oxidação (SORbitol)	-	-	-	Não realizado
RHA	L-ramnose	fermentação/oxidação (Ramnose)	-	-	-	Não realizado
SAC	D-sacarose	fermentação/oxidação (SACarose)	-	-	-	Não realizado
MEL	D-melbiose	fermentação/oxidação (MELbiose)	-	-	-	Não realizado
AMY	Amigdalina	fermentação/oxidação (AMÍgdalina)	-	-	-	Não realizado
ARA	L-arabinose	fermentação/oxidação (ARAbinose)	-	-	-	Não realizado
NO <sub>2</sub>	Nitrato de potássio	produção de NO <sub>2</sub>	-	-	-	Não realizado
N <sub>2</sub>	Nitrato de potássio	redução ao gás N <sub>2</sub>	-	-	-	Não realizado

-: Negativo; +: positivo.

#### 4.3.5. CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA

##### 4.3.5.1. Sequenciamento do gene 16S rRNA

Um *amplicon* de, aproximadamente, 1500 pares de bases (pb) foi gerado como resultado da amplificação do gene 16S rRNA. As sequências provenientes dos nove isolados apresentaram cobertura e identidade superiores a 99% com outras sequências depositadas de *F. salinarina* no banco de dados NCBI (Tabela 14). Sendo assim, houve a confirmação a nível de espécie para esses isolados.

Tabela 14. Identificação das cepas de *F. salinarina* pelo sequenciamento do gene 16S rRNA e MALDI-ToF (valores de escores antes e após a inclusão do MSP).

Cepa	Sequenciamento do gene 16S rRNA			MALDI Biotyper			
	Espécie	Ident.	Cobertura	Antes da inclusão do MSP		Após a inclusão do MSP	
				Organismo de melhor correspondência	Valor de escore	Organismo de melhor correspondência	Valor de escore
FSM01	<i>F. marina</i>	100%	99.79%	<i>F. philomiragia</i>	1.807	<i>F. salinarina</i>	2.062
FSM02	<i>F. marina</i>	100%	100%	<i>F. philomiragia</i>	1.796	<i>F. salinarina</i>	2.476
FSM03	<i>F. marina</i>	100%	99%	<i>F. philomiragia</i>	1.781	<i>F. salinarina</i>	2.121
FSM04	<i>F. marina</i>	100%	100%	<i>F. philomiragia</i>	1.769	<i>F. salinarina</i>	2.194
FSM05	<i>F. marina</i>	99.93%	100%	<i>F. philomiragia</i>	1.722	<i>F. salinarina</i>	2.084
FSM06	<i>F. marina</i>	100%	100%	<i>F. philomiragia</i>	1.745	<i>F. salinarina</i>	2.057
FSM07	<i>F. marina</i>	100%	100%	No reliable identification	1.603	<i>F. salinarina</i>	2.107
FSM08	<i>F. marina</i>	100%	100%	<i>F. philomiragia</i>	1.708	<i>F. salinarina</i>	2.327
FSM09	<i>F. marina</i>	100%	100%	<i>F. philomiragia</i>	1.714	<i>F. salinarina</i>	2.053

##### 4.3.5.2. Árvore filogenética

A construção da árvore filogenética fundamentada nas sequências do gene 16S rRNA revelou que todos os nove isolados obtidos estavam intimamente relacionados com outros isolados de *F. salinarina*, cujas sequências do gene 16S rRNA estavam depositadas no NCBI, os quais são: E95-16, E103-15 e SYW-3 (Figura 15). As cepas AL1108, FNO371 e QH-5 se apresentaram em ramos distintos da árvore em relação aos isolados deste estudo. A cepa TCH2015 foi escolhida para representar o *outgroup*. Sendo assim, este resultado fundamenta a identificação dos isolados como *F. salinarina*.

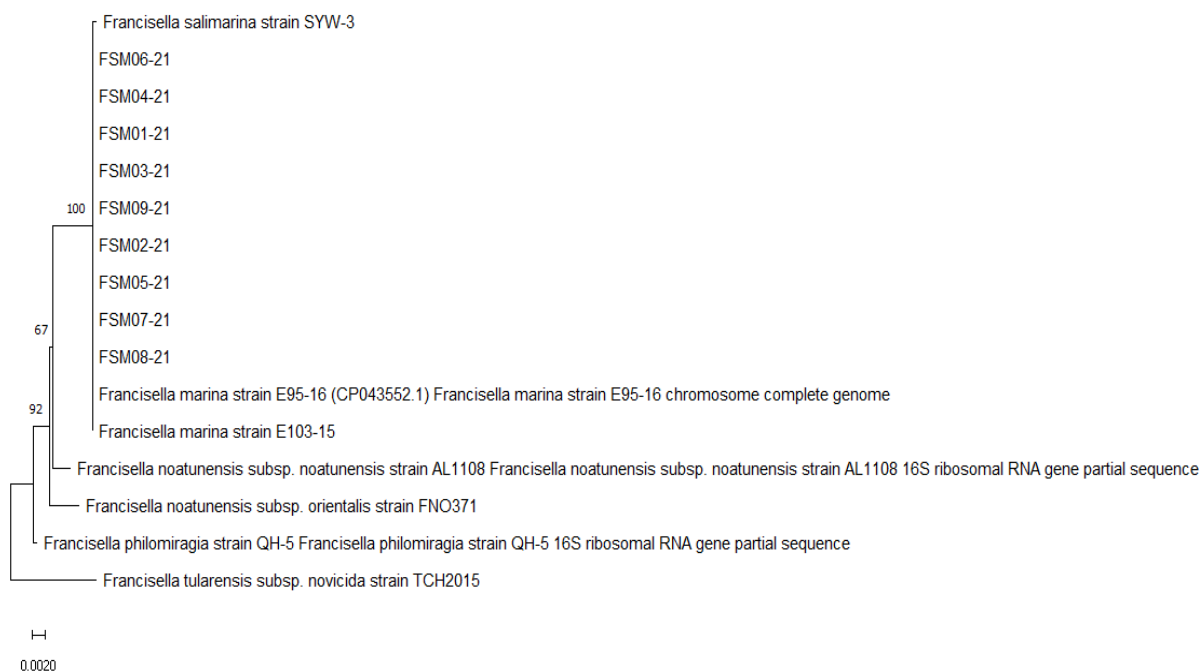


Figura 15 - Árvore filogenética utilizando o método *Neighbor-Joining* baseada nas sequências do gene 16S rRNA (~1500 pb) dos isolados obtidos neste trabalho em comparação a outras cepas da espécie *F. salimarina* e de espécies distintas do gênero *Francisella* (teste de *bootstrap*, 1000 réplicas). *Francisella tularensis* subsp. *novicida* TCH2015 representa o *outgroup*.

#### 4.3.6. CONSTRUÇÃO DE MSP PARA *F. salimarina*

Para que fosse possível identificar as cepas de *F. salimarina* pela técnica de MALDI-ToF MS, um MSP espécie-específico foi criado utilizando a cepa FSM02 (Figura 16). O MSP apresentou faixa de picos  $m/z$  de 3075 a 13624 com reprodutibilidade que variou de 90.48-100%. Com a criação do MSP espécie-específico para o patógeno *Francisella salimarina* no banco de dados do aparelho, 100% das cepas foram identificadas a nível de espécie (Tabela 14), sendo os escores mínimo e máximo 2.053 e 2.476, respectivamente.

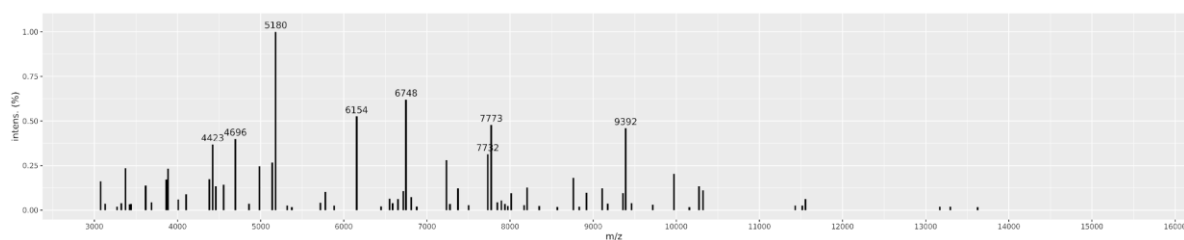


Figura 16 - *Main Spectra Profile* (MSP) da cepa de *F. salimarina* (FSM02). O eixo x representa a relação  $m/z$  e o eixo y a intensidade relativa da  $m/z$ .

#### 4.3.7. DIVERSIDADES GENÉTICA E PEPTÍDICA

##### 4.3.7.1. Tipagem por MSP

Com relação a diversidade de peptídeos analisada, os MSPs mostraram ser clonalmente relacionados, a partir do ponto de corte calculado de 85% (Figura 17). O índice de diversidade de Simpson foi igual a 1.

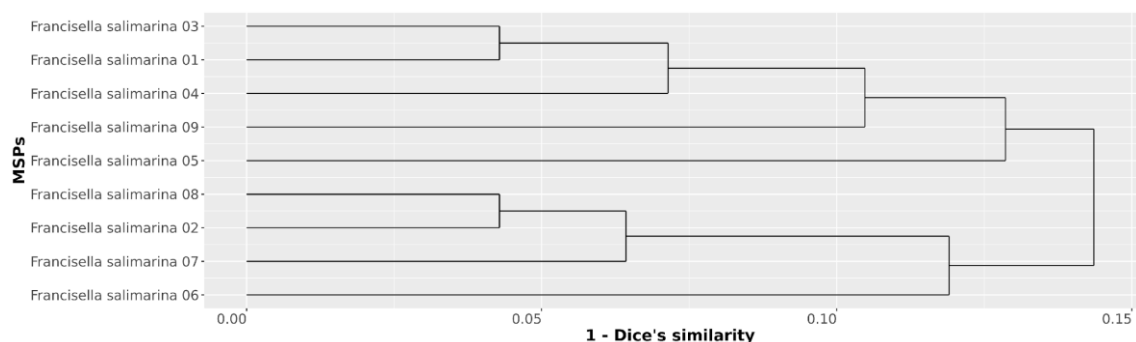


Figura 17 – Dendrograma de MSPs demonstrando o resultado da tipagem peptídica para os nove isolados de *F. salinarina*.

##### 4.3.7.2. REP-PCR

Pela técnica de REP-PCR observou-se amplificação de seis bandas, com variação de tamanho entre 5000 e 500 pb. Um único padrão de bandas foi visualizado (Figura 18). Este resultado demonstra que apenas um clone bacteriano estava circulante na piscicultura, independente do hospedeiro aquático. O índice de diversidade de Simpson foi igual a 1.

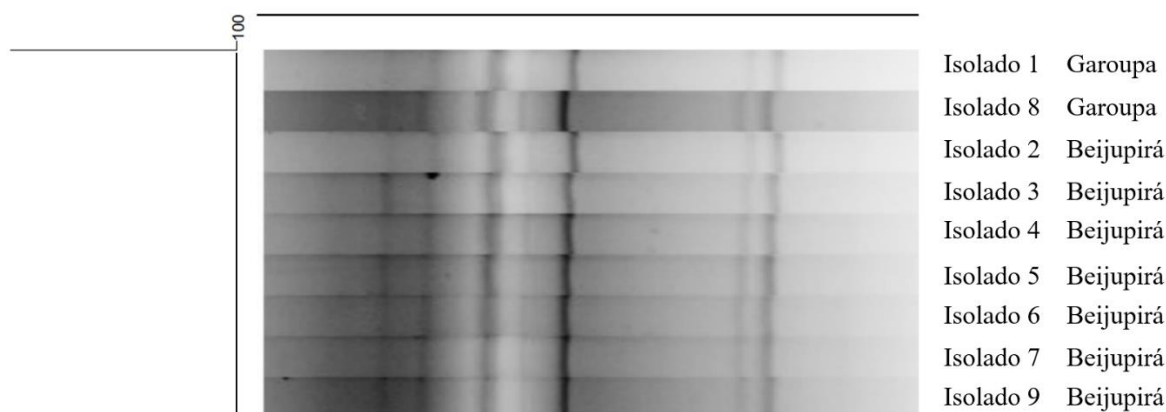


Figura 18 - Dendrograma representando o resultado da REP-PCR para os nove isolados de *F. salinarina* oriundos de garoupas e beijupirás.

## 4.3.8. ANTIBIOGRAMA

As cepas de referência *Escherichia coli*, ATCC 25922, e *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, ATCC 33658, utilizadas para controle de qualidade do teste, apresentaram diâmetros dos halos de inibição dentro dos limites aceitáveis estabelecidos pelo CLSI (CLSI, 2020). Os valores mínimo e máximo, de média e desvio padrão dos diâmetros das zonas de inibição dos antimicrobianos utilizados para os isolados de *F. salinarina*, considerando as triplicatas realizadas, estão dispostos na Tabela 15. Como comentado anteriormente, em virtude de existirem apenas nove isolados, o ponto de corte calculado para os isolados de *F. salinarina*, em relação aos antimicrobianos, é provisório, estando apresentado na Tabela 16. Com relação aos pontos de corte para amoxicilina (AML) e para sulfametoxazol-trimetoprim (SXT), todos os isolados do estudo não apresentaram nenhum halo de inibição para estes antimicrobianos. Dessa forma, os diâmetros corresponderam ao valor do disco de AML e SXT, que foram de 6 mm, não sendo possível determinar o ponto de corte epidemiológico provisório para estes dois antimicrobianos. Sendo assim, pode-se inferir que 100% dos isolados foram resistentes à amoxicilina e ao sulfametoxazol-trimetoprim (Tabela 16). Todos os isolados foram WT para os antimicrobianos, com exceção de AML e SXT.

Tabela 15. Valores mínimo e máximo, média e desvio padrão dos diâmetros de halos de inibição dos antimicrobianos utilizados para os isolados de *F. salinarina*.

<b>Antimicrobianos</b>	<b>Valor mínimo</b>	<b>Valor máximo</b>	<b>Média ± DP</b>
Neomicina	20	22	20,74 ± 1,43
Oxitetraciclina	26	31	29,63 ± 2,08
Amoxicilina	6	6	6 ± 0
Norfloxacina	35	41	36,70 ± 3,10
Eritromicina	21	28	24,48 ± 2,72
Nitrofurantoína	25	29	26,44 ± 3
Florfenicol	37	41	39,11 ± 2,38
Sulfametoxazol-trimetoprim	6	6	6 ± 0

Tabela 16. Ponto de corte epidemiológico provisório dos antimicrobianos para *F. salinarina* e resultado do antibiograma realizado nos nove isolados.

Antimicrobianos								
	NEO	OT	AML	NOR	ERI	NIT	FFC	SXT
<b>CO<sub>WT</sub></b>	<b>16</b>	<b>24</b>	<b>-</b>	<b>24</b>	<b>19</b>	<b>20</b>	<b>29</b>	<b>-</b>
FSM01	20	29	6	41	25	29	41	6
FSM02	21	30	6	36	26	27	41	6
FSM03	21	29	6	35	26	26	40	6
FSM04	21	30	6	36	23	26	39	6
FSM05	20	31	6	36	25	26	38	6
FSM06	20	30	6	37	24	25	38	6
FSM07	22	26	6	35	21	25	37	6
FSM08	21	31	6	38	28	29	41	6
FSM09	22	30	6	35	22	25	37	6
ATCC 25922	19	26	16	35	13	25	23	26
ATCC 33658	21	29	33	38	26	25	33	28

Abreviações: CO<sub>WT</sub>: ponto de corte epidemiológico, NEO: neomicina, OT: oxitetraciclina, AML: amoxicilina, NOR: norfloxacina, ERI: eritromicina, NIT: nitrofurantoína, FFC: florfenicol, SXT: sulfametoxazol-trimetoprim.

#### 4.4. DISCUSSÃO

No Brasil, ocorrências de surtos de doença granulomatosa, com taxas de mortalidade significativas, são investigadas desde 2012, em peixes de água doce, especialmente em *Oreochromis niloticus* (tilápia do Nilo), ocasionados pela bactéria *Francisella orientalis* (LEAL *et al.*, 2014). Em peixes marinhos, sobretudo em beijupirás, aspectos relacionados a lesões granulomatosas em fígado, rim e baço, são frequentemente associadas ao *Photobacterium damsalae* subsp. *piscicida* (GONÇALVES *et al.*, 2016; SHIMADA *et al.*, 2020), que desde 2010 tem atingido sistemas de cultivo dessa espécie de peixe aqui no país (FIGUEIREDO *et al.*, 2011). Com relação ao acometimento de peixes marinhos por *Francisella* spp., no Brasil, não havia descrições na literatura científica, até o presente momento. Este é um trabalho inédito que relata a ocorrência de surto com mortalidade associado com a presença de *F. salinarina* em peixes marinhos em território brasileiro.

Os animais enviados para exame bacteriológico apresentavam sinais clínicos característicos de doenças infecciosas em peixes. As principais alterações visualizadas foram ulcerações no tegumento nas garoupas, e alterações oculares nos beijupirás. A mortalidade observada em *R. canadum* foi de 100% após o envio dos animais para exame, dado relevante em virtude da perda gerada em decorrência desse surto. Já com relação à *E. marginatus*, apenas algumas vieram a óbito. Acredita-se que parte desses animais conseguiram debelar a infecção, em virtude de terem sido medicados.

O início do surto se deu no período em que a temperatura da região estava mais baixa, esse também foi o momento em que o sistema de aquecimento da propriedade estava apresentando defeito. Com relação ao estudo publicado por SOTO *et al.* (2018), o início do surto se deu em 30-40 dias após a eclosão das larvas de peixes, na estação chuvosa e durante a transição alimentar de *Artemia* sp. para ração peletizada. Esses dados são importantes de serem mencionados, pois, em condições favoráveis, bactérias ubíquas da água podem ser capazes de provocar enfermidades (MOHANTY & SAHOO, 2007; NARDOCCI *et al.*, 2014), com sinais clínicos inespecíficos. *F. salinarina* já foi isolada previamente em água do mar (LI *et al.*, 2020). Não se sabe a origem desse microrganismo na propriedade. No entanto, em virtude de ter sido relatado que não houve introdução de novos animais no sistema, acredita-se que os isolados deste estudo poderiam estar presentes, naturalmente, na água do sistema de cultivo e com a ocorrência de eventos estressantes, como a mudança de temperatura da água, terem ocasionado os surtos.

Os achados patológicos mais significativos foram os relacionados às lesões granulomatosas no baço, no fígado e no coração dos beijupirás, sendo também observadas em pargos previamente (SOTO *et al.*, 2018). Infecções granulomatosas sistêmicas são comumente visualizadas em tilápias do Nilo infectadas por *F. orientalis* (SOTO *et al.*, 2009; LEAL *et al.*, 2014). Essas alterações ocorrem em virtude da tentativa falha do sistema imune do hospedeiro em combater esse patógeno intracelular (LEAL *et al.*, 2018). Outro achado que merece destaque é a necrose fibrinóide encontrada na coróide desses animais. SOTO *et al.* (2018) também visualizaram lesões na coróide em tilápias infectadas experimentalmente. Além disso, nas garoupas, as lesões mais predominantes foram observadas no tegumento e na musculatura, sendo lesões em musculatura esquelética encontradas em uma tilápia do Nilo infectada experimentalmente com esse microrganismo (SOTO *et al.*, 2018).

Em concordância com o descrito por SOTO *et al.* (2018) e HENNEBIQUE *et al.* (2022), neste estudo foram isoladas colônias de coloração cinza, com crescimento

observado em 24h. Além disso, essas colônias apresentaram crescimento em ASA, CHAH e TCBS. Adicionalmente, além de ASA, HENNEBIQUE *et al.* (2022) relataram o crescimento deste microrganismo em ágar chocolate e ágar triptona de soja (TSA). As cepas analisadas neste estudo foram positivas para os ensaios de catalase e oxidase, em concordância com o observado por LI *et al.* (2020) e HENNEBIQUE *et al.* (2022), mas diferentemente do encontrado por SOTO *et al.* (2018), em que os testes de oxidase, nos isolados avaliados, se apresentaram como negativos. Com relação aos resultados do kit API 20E, corroborando com os resultados de SOTO *et al.* (2018), a produção de acetoína a partir da glicose, reação de Voges-Proskauer (VP), foi positiva. Mas esses autores também relataram como positivo a gelatinase, o que não ocorreu neste trabalho.

Os resultados dos exames bacteriológicos e moleculares revelaram a presença de *Francisella salinarina* em nove dos 20 animais analisados. Apesar de inicialmente, a identificação desse microrganismo, por MALDI-ToF, ter sido realizada apenas a nível de gênero, com a construção e inclusão do MSP no banco de dados do equipamento, o MALDI-TOF se mostrou uma ferramenta promissora para identificação dessa espécie bacteriana. Embora outros patógenos tenham sido isolados em alguns peixes, como *Vibrio harveyi* (n = 4) e *Photobacterium damsela* (n = 1), por terem sido encontrados em quantidades inferiores e pelas características das lesões encontradas, principalmente nos beijupirás, acreditamos que estes não foram os agentes primários causadores do surto. Mas para confirmar essa hipótese, seria necessária a realização de um estudo que seguisse os postulados de Koch para confirmar a patogenicidade de *F. salinarina* para essas espécies de peixes. Além da infecção experimental com *F. salinarina*, coinfeções desse agente com *V. harveyi* e *P. damsela* seriam necessárias, para que seja possível avaliar a função desempenhada pelos microrganismos em conjunto, além de determinar o agente primário causador do surto.

Tanto a análise da diversidade peptídica quanto a da diversidade genética realizada neste estudo, evidenciou que as cepas obtidas são clonais entre si, independentemente do hospedeiro. Dessa forma, podemos inferir que apenas um clone estava circulante na propriedade, assim como o demonstrado por SOTO *et al.* (2018). Os autores fizeram análises das diversidades genética e peptídica das duas cepas de *F. salinarina* com relação a outras espécies do gênero *Francisella*, concluindo-se que os isolados obtidos de *F. salinarina* eram também clonais entre si e divergentes de outras espécies de *Francisella*. Esses dados são embasados pelos resultados da análise filogenética do presente estudo, em que os isolados de *F. salinarina* encontrados neste

trabalho se relacionam intimamente com outros isolados desta espécie bacteriana, estando em ramos vizinhos em relação à *F. noatunensis* e *F. orientalis*, e mais distantes de *F. philomiragia* e *F. tularensis* subsp. *novicida*. Isolados filogeneticamente próximos possibilitam o estabelecimento de medidas profiláticas de forma mais fácil, no caso de surtos de doença, quando comparados a isolados filogeneticamente distintos.

Com relação aos resultados do antibiograma, todos os isolados foram susceptíveis a neomicina, eritromicina, norfloxacina, nitrofurantoína, oxitetraciclina e florfenicol, de acordo com o ponto de corte epidemiológico provisório calculado. Contudo, para confirmar estes resultados, mais isolados de *F. salimarina* seriam necessários para que fosse possível obedecer aos critérios para o cálculo do ponto de corte epidemiológico local (SMITH, 2020). Já para amoxicilina e sulfametoxazol-trimetoprim, parece que todos os isolados são resistentes a esses antimicrobianos, mesmo não sendo possível calcular o ponto de corte epidemiológico, em virtude de não ter a formação da zona de inibição, evidenciando que os isolados não foram inibidos por essas moléculas. SOTO *et al.* (2018) também observaram o comportamento dos isolados dessa espécie bacteriana (E103-15 e E95-16) frente a antimicrobianos, por meio do método de Concentração Inibitória Mínima (CIM). Dos 18 antibióticos que eles utilizaram, apenas 6 eram comuns com o presente trabalho. Desses, sulfametoxazol-trimetoprim, amoxicilina e eritromicina apresentaram altos valores de CIM. HENNEBIQUE *et al.* (2022) também concluíram, por meio do CIM, que a cepa do referido trabalho (CHUGA-F75) era resistente a sulfametoxazol-trimetoprim. Diante disso, esses dados evidenciam a resistência de *Francisella salimarina* a amoxicilina e a sulfametoxazol-trimetoprim.

Não existe nenhum antimicrobiano licenciado para uso em sistemas de peixes marinhos no Brasil. Os únicos liberados, pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), para utilização no tratamento de enfermidades infecciosas em sistemas de produção de algumas espécies de peixes de água doce, são a oxitetraciclina e o florfenicol. Em decorrência dos isolados deste trabalho terem sido susceptíveis a esses antimicrobianos licenciados, testes deveriam ser realizados com o objetivo de verificar a eficácia dessas moléculas frente a infecção por esse microrganismo nessas espécies de peixes. Além disso, é necessária a avaliação da toxicidade destes fármacos para garoupas e beijupirás.

Portanto, pode-se concluir que este é o primeiro relato no mundo de surto com mortalidade em garoupas e beijupirás, associados a *F. salimarina*, sendo a segunda descrição deste microrganismo associado a enfermidades em peixes marinhos. Todos os

isolados obtidos mostraram ser clonalmente relacionados entre si, independente do hospedeiro, indicando a presença de um único clone circulante na propriedade. As cepas foram sensíveis aos antimicrobianos autorizados para uso em pisciculturas no Brasil, os quais poderiam ser testados para o tratamento dos animais acometidos por esse microrganismo.

#### 4.5.REFERÊNCIAS

ASSIS, G. B. N.; PEREIRA, F. L.; ZEGARRA, A. U.; TAVARES, G. C.; LEAL, C. A.; FIGUEIREDO, H. C. P. Use of MALDI-TOF Mass Spectrometry for the Fast Identification of Gram-Positive Fish Pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01492

CLSI. **Methods for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing of Bacteria Isolated From Aquatic Animals**. 2nd ed. CLSI guideline VET03. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020.

COSTA, F. A. A.; LEAL, C. A. G.; LEITE, R. C.; FIGUEIREDO, H. C. P. Genotyping of *Streptococcus Dysgalactiae* Strains Isolated from Nile Tilapia, *Oreochromis Niloticus* (L.). **Journal of Fish Diseases**, v. 37, n. 5, p. 1–7, 2013. DOI: 10.1111/jfd.12125

DICE, L. R. Measures of the amount of ecologic association between species. **Ecology**, v. 26, n. 3, p. 297–302, 1945. DOI: <https://doi.org/10.2307/1932409>

FAO. 2022. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2022: Towards Blue Transformation**. Rome: [s. n.], 2022. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, n. 4, p. 783–791, 1985. DOI: 10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x

FIGUEIREDO, H. C. P.; LEAL, C. A. G.; COSTA, F. A. A. Fotobacteriose em bijupirá cultivado: uma “velha” doença em uma produção “Jovem”. **Panorama da Aqüicultura**, n. 125, 2011. Disponível em: <<https://panoramadaaquicultura.com.br/fotobacteriose-em-bijupira-cultivado-uma-velhadoenca-em-uma-producao-jovem/>>. Acesso em 15 abr. 2023.

FOX, J. G.; YAN, L. L.; DEWHIRST, F. E.; PASTER, B. J.; SHAMES, B.; MURPHY, J. C.; HAYWARD, A.; BELCHER, J. C.; MENDES, E. N. *Helicobacter bilis* sp. nov., a novel *Helicobacter* species isolated from bile, livers, and intestines of aged, inbred mice. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 445–454, 1995. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.33.2.445-454.1995>

GONÇALVES, E. L. T.; SANCHES, E. G.; MARTINS, M. L.; TSUZUKI, M. Y. Detecção, controle e prevenção de fotobacteriose em cultivo de bijupirá. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 5, p. 465-472, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2016000500006>

HENNEBIQUE, A.; CASPAR, Y.; MAURIN, M.; BOISSET, S.; PELLOUX, I.; GALLEGO-HERNANZ, M. P.; BURUCOA, C.; CAZENAVE-ROBLOT, F.; PLOUZEAU, C.; RAMMAERT, B. Ulceroglandular Infection and Bacteremia Caused by *Francisella salinarina* in Immunocompromised Patient, France. **Emerging Infectious Diseases**, v. 28, n. 2, p. 465-467, 2022. DOI: 10.3201/eid2802.211380

- HUNTER, P. R. & GASTON, M. A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n. 11, p. 2465-2466, 1988. DOI: 10.1128/jcm.26.11.2465-2466.1988
- KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, n. 2, p. 111-120, 1980. DOI: 10.1007/BF01731581
- KRKOŠEK, M. Host Density Thresholds and Disease Control for Fisheries and Aquaculture. **Aquaculture Environment Interactions**, v. 1, n. 1, p. 21–32, 2010. DOI: 10.3354/aei0004
- KRONVALL, G. Determination of the real standard distribution of susceptible strains in zone histograms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 22, n. 1, p. 7–13, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(03\)00107-9](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(03)00107-9).
- KRONVALL, G. & SMITH, P. Normalized resistance interpretation, the NRI method: review of NRI disc test applications and guide to calculations. **Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 124, p. 1023-1030, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/apm.12624>.
- LEAL, C. A. G.; QUEIRÓZ, G. A.; FIGUEIREDO, H. C. P. Franciselose: um desafio de inverno para a tilapicultura brasileira. **Panorama da Aquicultura**, n. 165, 2018. Disponível em: <<https://panoramadaaquicultura.com.br/franciselose-desafioparatilapicultura-brasileira/>>. Acesso em: 15 abr. 2023.
- LEAL, C. A. G.; TAVARES, G. C.; FIGUEIREDO, H. C. P. Outbreaks and genetic diversity of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* isolated from farm-raised Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Brazil. **Genetic and Molecular Research**, v. 13, n. 3, p. 5704–5712, 2014. DOI: <https://doi.org/10.4238/2014.July.25.26>
- LI, L. -H.; LUO, H. -M.; FENG, J. -H.; MING, Y. -Z.; ZHENG, M. -L.; DENG, G. -Y.; CHEN, C.; LI, W. -J.; XIAO, M.; QU, P. -H. *Francisella salimarina* sp. nov., isolated from coastal seawater. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, p. 3264-3272, 2020. DOI: 10.1099/ijsem.0.004164
- LUNA, L. G. **Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology**, 3 ed. New York: McGraw-Hill, 1968. 258p.
- MELLO, G. L. Produção de garoupas no brasil: realidade e perspectivas. **Aquaculture Brasil**, 2021. Disponível em: <https://www.aquaculturebrasil.com/coluna/204/producao-de-garoupas-no-brasil:-realidade-e-perspectivas>. Acesso em 08 mai. 2023.
- MOHANTY, B. R. & SAHOO, P. K. Edwardsiellosis in Fish: A Brief Review. **Journal of Biosciences**, v. 32, n. 3, p. 1331–1344, 2007
- MOREIRA, D. Criação de garoupa no Ceará desperta atenção de produtores e pesquisadores. **Governo do Estado do Ceará**, 2022. Disponível: <https://www.ceara.gov.br/2022/02/24/criacao-de-garoupa-no-ceara-desperta-atencao-de-produtores-e-pesquisadores/>. Acesso em 08 mai. 2023.
- NARDOCCI, G.; NAVARRO, C.; CORTÉS, P. P.; IMARAI, M.; MONTOYA, M.; VALENZUELA, B.; JARA, P.; ACUÑA-CASTILLO, C.; FERNÁNDEZ, R. Neuroendocrine Mechanisms for Immune System Regulation during Stress in Fish. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 40, n. 2, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.08.001>

NASCIMENTO, M. S.; CARVALHO, C. V. A.; PASSINI, G.; SOARES, M.; EVANGELISTA, D. K. R.; SOUSA, D. N. **Panorama da piscicultura marinha no Brasil: desafios e perspectivas**. 1. ed. Palmas, TO: Embrapa Pesca e Aquicultura, 2022. 40 p. ISSN 2318-1400. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/234347/1/doc-51-2022.pdf>. Acesso em: 08 mai. 2023.

NGUYEN, N. -P.; WARNOW, T.; POP, M.; WHITE, B. A perspective on 16S rRNA operational taxonomic unit clustering using sequence similarity. **Npj biofilms and microbiomes**, v. 2, n. 16004, 2016. DOI: 10.1038/npjbiofilms.2016.4

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2021.

SAITOU, N. & NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, n. 4, v. 4, p. 406–425, 1987. DOI: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>

SHIMADA, M. R.; YUNIS-AGUINAGA, J.; CUEVA-QUIROZ, V. A.; FILHO, J. R. E.; MOURIÑO, J. L. P.; CLAUDIANO, G. S.; MORAES, F. R.; MORAES, J. R. E. Isolation and characterization of pathology in case of massive mortality by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in *Rachycentron canadum*. **Bioscience Journal**, v. 36, n. 5, p. 1732-1741, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.14393/BJ-v36n5a2020-41745>

SMITH, P. Eight rules for improving the quality of papers on the antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from aquatic animals. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 139, p. 87–92, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3354/DAO03476>

SMITH, P.; RUANE, N. M.; DOUGLAS, I.; CARROLL, C.; KRONVALL, G.; FLEMING, G. T. A. Impact of inter-lab variation on the estimation of epidemiological cut-off values for disc diffusion susceptibility test data for *Aeromonas salmonicida*. **Aquaculture**, v. 272, n. 1-4, p. 168-179, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.07.216>

SOTO, E.; GRIFFIN, M. J.; MORALES, J. A.; CALVO, E. B.; SEBASTIÃO, F. A.; PORRAS, A. L.; VÍQUEZ-RODRÍGUEZ, X.; REICHLEY, S. R.; ROSSER, T. G.; WARE, C.; BYRNE, B. A.; GARCÍA, J. C.; LAFRENTZ, B. R.; CAMUS, A. C. *Francisella marina* sp. nov., Etiologic Agent of Systemic Disease in Cultured Spotted Rose Snapper (*Lutjanus guttatus*) in Central America. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 16, e00144-18, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.00144-18>

SOTO, E.; HAWKE, J. P.; FERNANDEZ, D.; MORALES, J. A. *Francisella* sp., an emerging pathogen of tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), in Costa Rica. **Journal of Fish Diseases**, v. 32, n. 8, p. 712-722, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2009.01070.x>

TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. **Molecular Biology and Evolution**, v. 38, n. 7, p. 3022–3027, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.

TAVARES-DIAS, M. & MARTINS, M. L. An overall estimation of losses caused by diseases in the Brazilian fish farms. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 41, n. 4, p. 913-918, 2017. DOI: 10.1007/s12639-017-0938-y

VALENTI, W. C.; BARROS, H. P.; MORAES-VALENTI, P.; BUENO, G. W.; CAVALLI, R. O. Aquaculture in Brazil: past, presente and future. **Aquaculture Reports**, 19, 100611, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100611>

VERSALOVIC, J.; BRUIJN, F. J. De; LUPSKI, J. R. Repetitive Sequence-based PCR (rep-PCR) DNA Fingerprinting of Bacterial Genomes. In: de Bruijn, F.J., Lupski, J.R., Weinstock, G.M. (eds) **Bacterial Genomes**. Springer, Boston, MA, p. 437-454, 1998. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6369-3\\_34](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6369-3_34)

VĚTROVSKÝ, T. & BALDRIAN, P. The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, e57923, 2013. DOI: [10.1371/journal.pone.0057923](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057923)

## CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados apresentados neste trabalho auxiliam na compreensão acerca do comportamento de *E. tarda* e *F. salinarina* em surtos ocorridos em sistemas de cultivo de peixes, no Brasil. Os conhecimentos adquiridos fornecem subsídios para a elaboração de medidas epidemiológicas para controle e de prevenção de surtos ocasionados por essas bactérias em tambaqui, beijupirá e garoupa. No entanto, estudos mais concretos são necessários para a melhor compreensão da patogênese de *F. salinarina*, além do conhecimento mais aprofundado acerca de características epidemiológicas dessas duas espécies bacterianas.

Os resultados obtidos relacionados a resistência das cepas aos antimicrobianos geram uma preocupação, em virtude da disseminação de patógenos resistentes aos antimicrobianos liberados para uso em pisciculturas, dificultando o tratamento de enfermidades bacterianas. Dito isso, é essencial que haja estudos que abordem alternativas para o tratamento de peixes acometidos por infecções bacterianas e uma ampliação no monitoramento de patógenos resistentes circulantes na piscicultura nacional.

## APÊNDICE

### Artigos científico publicado em Revista – fator de impacto: 3.0 (2022)

Francisco Yan Tavares Reis, **Victória Pontes Rocha**, Peter Charrie Janampa-Sarmiento, Henrique Lopes Costa, Renata Catão Egger, Naísa Cristine Passos, Carlos Henrique Santos de Assis, Sarah Portes Carneiro, Ágna Ferreira Santos, Brendhal Almeida Silva, Fernanda Alves Dorella, Márcia Pimenta Leibowitz, Ronald Kennedy Luz, Felipe Pierezan, Sílvia Umeda Gallani, Guilherme Campos Tavares e Henrique César Pereira Figueiredo. *Edwardsiella tarda* in tambaqui (*Colossoma macropomum*): A Pathogenicity, Antimicrobial Susceptibility, and Genetic Analysis of Brazilian Isolates, *Animals*, 2023, 13, 2910. DOI: <https://doi.org/10.3390/ani13182910>

### Artigos de divulgação técnica

MARRA, C. A.; **ROCHA, V. P.**; TAVARES, G.C. Principais aspectos sanitários na produção de peixes ornamentais. *CADERNOS TÉCNICOS DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA (UFMG)*, v. 105, p. 125-134, 2022.

### Resumos publicados em congressos

Núbia Braga, **Victória Pontes Rocha**, Leonardo Gorza, Henrique César Pereira Figueiredo, Guilherme Campos Tavares, Galileu Veras. Detecção de patógenos bacterianos em rãs-touro (*Aquarana catesbeiana*) doentes In: XVII Encontro Brasileiro de Patologistas de Organismos Aquáticos, realizado no período de 04 a 06 de outubro de 2023, em Belo Horizonte/MG.

Sarah Portes Carneiro, **Victória Pontes Rocha**, Julia Miranda Trindade, Henrique César Pereira Figueiredo, Isabella Bias Fortes, Guilherme Campos Tavares. Avaliação da sensibilidade de espécies de *Aeromonas* isoladas de peixes ornamentais aos antimicrobianos pela técnica do antibiograma. In: XVII Encontro Brasileiro de Patologistas de Organismos Aquáticos, realizado no período de 04 a 06 de outubro de 2023, em Belo Horizonte/MG.

Luiz Fagner Ferreira Nogueira, **Victória Pontes Rocha**, Júlio César Câmara Rosa, Fabiana Pilarski, Santiago Benites de Pádua, Maria José Tavares Ranzani-Paiva, Carlos Augusto Gomes Leal, Henrique César Pereira Figueiredo, Guilherme Campos Tavares. Reclassificação taxonômica de cepas de *Lactococcus garvieae* obtidos de peixes nativos e ornamentais no Brasil através do sequenciamento do gene *gyrB*. In: X Aquaciência: Congresso Brasileiro de Aquicultura e Biologia Aquática, 2023, Florianópolis. ANAIS DO 10º CONGRESSO BRASILEIRO DE AQUICULTURA E BIOLOGIA AQUÁTICA, 2023.

Júlia Miranda Trindade, **Victória Pontes Rocha**, Luiz Fagner Ferreira Nogueira, Carlos Augusto Gomes Leal, Henrique César Pereira Figueiredo, Guilherme Campos Tavares. Caracterização da diversidade genética de *Lactococcus garvieae* e *Lactococcus petauri* isolados de espécies nativas e exóticas de peixes. In: X Aquaciência: Congresso Brasileiro de Aquicultura e Biologia Aquática, 2023, Florianópolis. ANAIS DO 10º CONGRESSO BRASILEIRO DE AQUICULTURA E BIOLOGIA AQUÁTICA, 2023.

**Victória Pontes Rocha**, Danise Gauer, Henrique César Pereira Figueiredo, Guilherme Campos Tavares. Avaliação da diversidade genética e sensibilidade aos antimicrobianos

de isolados de *Francisella salimarina* oriundos de peixes marinhos no Brasil. In: Anais da VII CONFERENCIA LATINOAMERICANA SOBRE CULTIVO DE PECES NATIVOS, 2022.

**Victória Pontes Rocha**; Júlio César Câmara Rosa; Carlos Augusto Gomes Leal; Henrique César Pereira Figueiredo; Guilherme Campos Tavares. Sorotipagem de cepas de *Lactococcus garvieae* provenientes de diferentes espécies peixes no Brasil. In: IX Congresso Brasileiro de Aquicultura e Biologia Aquática, AquaCiência 2021 Digital, 2021, São Paulo. ANAIS DO 9º CONGRESSO BRASILEIRO DE AQUICULTURA E BIOLOGIA AQUÁTICA, 2021.

Henrique Lopes Costa; Renata Catão Egger; **Victória Pontes Rocha**; Guilherme Campos Tavares; Henrique César Pereira Figueiredo. Tipagem molecular de cepas de *Edwardsiella tarda* isoladas de tambaqui (*Colossoma macropomum*) por meio de técnicas baseadas em gel de agarose e espectrometria de massa. In: XVI ENBRAPOA ONLINE: Conectando saberes em sanidade de animais aquáticos, 2021. Anais do XVI ENBRAPOA ONLINE: Conectando saberes em sanidade de animais aquáticos, 2021.

**Victória Pontes Rocha**; Henrique Lopes Costa; Sonia Rumiko Suzuki França; Henrique César Pereira Figueiredo; Felipe Pierezan; Guilherme Campos Tavares. Primeiro relato da infecção por *Francisella marina* em garoupas (*Epinephelus marginatus*) e bijupirás (*Rachycentron canadum*) no Brasil. In: XVI ENBRAPOA ONLINE: Conectando saberes em sanidade de animais aquáticos, 2021. Anais do XVI ENBRAPOA ONLINE: Conectando saberes em sanidade de animais aquáticos, 2021.

**Victória Pontes Rocha**; Maria Laura Ramos; Naísa Cristine Passos; Danise Gae; Henrique César Pereira Figueiredo; Guilherme Campos Tavares. Principais bactérias detectadas em peixes nativos doentes encaminhados para exame laboratorial, em 2020 e 2021, na Universidade Federal de Minas Gerais. In: XVI ENBRAPOA ONLINE: Conectando saberes em sanidade de animais aquáticos, 2021. Anais do XVI ENBRAPOA ONLINE: Conectando saberes em sanidade de animais aquáticos, 2021.

Ágna Ferreira Santos; Francisco Yan Tavares Reis; **Victória Pontes Rocha**; Henrique César Pereira Figueiredo; Guilherme Campos Tavares; Felipe Pierezan. Estudo da formação de granulomas em tambaquis (*Colossoma macropomum*) infectados experimentalmente com *Francisella orientalis*. In: XVI ENBRAPOA ONLINE: Conectando saberes em sanidade de animais aquáticos, 2021. Anais do XVI ENBRAPOA ONLINE: Conectando saberes em sanidade de animais aquáticos, 2021.

Sarah Portes Carneiro; Carlos Henrique Santos de Assis; **Victória Pontes Rocha**; Julia Miranda Trindade; Henrique César Pereira Figueiredo; Guilherme Campos Tavares. Principais patógenos bacterianos detectados em peixes ornamentais doentes, recebidos na escola de veterinária da UFMG, entre 2020 e 2021. In: XVI ENBRAPOA ONLINE: Conectando saberes em sanidade de animais aquáticos, 2021. Anais do XVI ENBRAPOA ONLINE: Conectando saberes em sanidade de animais aquáticos, 2021.

### **Trabalhos premiados**

O trabalho intitulado “Identificação de genes de resistência a antimicrobianos em isolados de *Edwardsiella tarda* oriundos de peixes no Brasil” dos autores Júlia Miranda Trindade, **Victória Pontes Rocha**, Luiz Fagner Ferreira Nogueira, Henrique César Pereira

Figueiredo, Guilherme Campos Tavares recebeu o prêmio de destaque no XVII Encontro Brasileiro de Patologistas de Organismos Aquáticos, realizado no período de 04 a 06 de outubro de 2023, em Belo Horizonte/MG.

O trabalho intitulado “Caracterização da diversidade genética de *Lactococcus garvieae* e *Lactococcus petauri* isolados de espécies nativas e exóticas de peixes” dos autores Júlia Miranda Trindade, **Victória Pontes Rocha**, Luiz Fagner Ferreira Nogueira, Carlos Augusto Gomes Leal, Henrique César Pereira Figueiredo, Guilherme Campos Tavares recebeu o prêmio de destaque como o mais votado da sessão de pôsteres do dia 13 de abril de 2023, no evento X Aquaciência – Congresso Brasileiro de Aquicultura e Biologia Aquática, realizado no período de 10 a 14 de abril de 2023, em Florianópolis/SC.

O trabalho intitulado “Sorotipagem de cepas de *Lactococcus garvieae* provenientes de diferentes espécies peixes no Brasil” que foi apresentado oralmente por **Victória Pontes Rocha** foi eleito o primeiro melhor trabalho do IX Congresso Brasileiro de Aquicultura e Biologia Aquática – AquaCiência 2021 Digital realizado de 14 a 16 de setembro de 2021.

### **Publicações em andamento**

**Victória Pontes Rocha**, Júlia Miranda Trindade, Luiz Fagner Ferreira Nogueira, Silvia Umeda Gallani, Rafael Romero Nicolino, Henrique César Pereira Figueiredo and Guilherme Campos Tavares. *Phenotypic and genotype detection of Brazilian E. tarda isolates resistant to antimicrobials*, em preparação, 2023.

**Victória Pontes Rocha**, Danise Gauer, Henrique Lopes Costa, Sóstenes Apolo Correia Marcelino, Luiz Fagner Ferreira Nogueira, Felipe Pierezan, Henrique César Pereira Figueiredo e Guilherme Campos Tavares. *First report of Francisella salinarum infection in dusky grouper (Epinephelus marginatus) and cobia (Rachycentron canadum) in Brazil*, em preparação, 2023.

**Victória Pontes Rocha**, Náisa Cristine Passos, Sarah Portes Carneiro, Angélica Emanuely Costa do Rosário, Angelo Carlo Chaparro Barbanti, Guilherme Campos Tavares. Infecções por *Lactococcus* spp. em peixes. In: Fabiana Pilarsky, Guilherme Campos Tavares, Gustavo Moraes Ramos Valladão, Geovana Dotta, Maria de Los Angeles Perez Lizama, Ricardo Massato Takemoto. Sanidade de Organismos Aquáticos: Avanços no Diagnóstico, Controle e Monitoramento de Doenças, Abrapoa, 2024, p. 33-52.