



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

**Avaliação da patogenicidade de *Edwardsiella tarda*, *Chryseobacterium* sp.,
Streptococcus agalactiae e *Francisella orientalis* para Tambaqui (*Colossoma
macropomum*)**

Francisco Yan Tavares Reis

Belo Horizonte

2021

Francisco Yan Tavares Reis

**Avaliação da patogenicidade de *Edwardsiella tarda*, *Chryseobacterium* sp.,
Streptococcus agalactiae e *Francisella orientalis* para Tambaqui (*Colossoma
macropomum*)**

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

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Dr. Henrique César Pereira Figueiredo

Coorientador: Prof. Dr. Guilherme Campos Tavares

Belo Horizonte

2021

R375a	<p>Reis, Francisco Yan Tavares 1994 - Avaliação da patogenicidade de <i>Edwardsiella tarda</i>, <i>Chryseobacterium</i> sp., <i>Streptococcus Agalactiae</i> e <i>Francisella orientalis</i> para Tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>) / Francisco Yan Tavares Reis. – 2021. 57 f. il</p> <p>Orientador: Henrique César Pereira Figueiredo Coorientador: Guilherme Campos Tavares Dissertação (Mestrado) apresentado à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal. Bibliografias: f. 42 - 56</p> <p>1. Tambaqui - Peixe – Teses - 2. Ciência animal- Teses – 3. Peixe de água doce - Teses - I Figueiredo, Henrique César Pereira – II Tavares, Guilherme Campos – III. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – IV. Título.</p> <p style="text-align: center;">CDD – 636.089</p>
-------	--

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.



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

FOLHA DE APROVAÇÃO

FRANCISCO YAN TAVARES REIS

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração Medicina Veterinária Preventiva.

Aprovado(a) em 30 de março de 2021, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Henrique Cesar Pereira Figueiredo - Presidente - Orientador(a)

Dr.(a). Felipe Pierezan

Dr.(a). Sílvia Umeda Gallani



Documento assinado eletronicamente por Henrique Cesar Pereira Figueiredo, Coordenador(a) de curso de pós-graduação, em 30/03/2021, às 11:58, 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 Felipe Pierezan, Professor do Magistério Superior, em 30/03/2021, às 15:34, 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 Sílvia Umeda Gallani, Usuário Externo, em 30/03/2021, às 17:34, 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, informando o código verificador 0636521 e o código CRC 3104F0BC.

Dedico essa dissertação aos meus pais,
minha namorada e à minha avó.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Humberto e Aurilena, pelo apoio a essa jornada em busca de conhecimento.

Ao meu primo, Tonho e sua família, que me acolheram, ampararam e compartilharam a cultura do amazonense, durante parte do mestrado que estive em Manaus.

À minha namorada, Victória, pelos incentivos, conselhos, paciência, confiança e amparo durante todo o mestrado. Sem você o caminho teria sido infinitamente mais turbulento.

Ao meu orientador, Prof. Henrique César Pereira Figueiredo, e ao meu coorientador, Prof. Guilherme Campos Tavares, por todos os ensinamentos, incentivos, confiança e apoio. Sua excelência é motivação para a construção do meu caminho profissional.

Aos amigos e integrantes do AQUAVET, Fernanda, Márcia, Júlio, Peter, Guilherme, Renata, Henrique e Maria, seu companheirismo, auxílio, conselhos e momentos de descontração são essenciais para meu desenvolvimento pessoal e profissional.

À Profª. Sílvia Umeda Gallani, Prof. Gustavo Moraes Ramos Valladão e seus alunos do Laboratório de Microbiologia Aplicada de Organismos Aquáticos da Universidade Nilton Lins, pela receptividade, gentileza, amparo e ensinamentos. Sua dedicação é inspiradora.

Ao Prof. Felipe Pierezan e seus alunos Ágna, Sóstenes, Fabrício e Carlos Eduardo do Setor de Patologia Animal da Escola de Veterinária da UFMG, pela parceria e auxílio na condução da análise histológica dessa dissertação.

Ao Prof. Ronald Kennedy Luz pelo fornecimento dos peixes utilizados nesse trabalho.

Aos tambaquis utilizados nesse estudo por suas vidas. Suas contribuições auxiliam a construção de conhecimento.

À CAPES pelo fomento a essa pesquisa.

“Disease is universally recognized as one of the most serious threats to the commercial success of aquaculture.”

(Edward J. Noga)

RESUMO

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é a espécie de peixe nativo mais produzida no país. Atualmente, a susceptibilidade do tambaqui foi confirmada somente para uma bactéria, *Aeromonas hydrophila*. Sendo assim, este estudo tem como objetivo avaliar a suscetibilidade de *C. macropomum* a isolados de *Edwardsiella tarda*, *Chryseobacterium* sp., *Streptococcus agalactiae* e *Francisella orientalis*. Os isolados de *E. tarda* e *Chryseobacterium* sp. foram oriundos de órgãos internos de tambaquis saudáveis, enquanto que os isolados de *S. agalactiae* e *F. orientalis* foram oriundos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) apresentando sinais clínicos. Essas bactérias foram avaliadas quanto à sua patogenicidade para tambaqui por meio de infecção experimental. Para tanto, cada um desses isolados bacterianos, assim como caldo de crescimento bacteriano estéril para os grupos controle, foi inoculado em seis juvenis de tambaqui saudáveis por injeção intraperitoneal e, esses peixes foram observados quanto à ocorrência de sinais clínicos e mortes por um período definido. Os animais que morreram durante esse período e os sobreviventes ao final foram necropsiados e analisados por bacteriologia e histologia. Apenas os animais infectados por *S. agalactiae* apresentaram sinais clínicos com progressão para a morte de 83,3% dos tambaquis daquele grupo. O isolamento em cultura pura das bactérias recuperadas foi registrado para animais dos grupos de tambaqui infectados por *S. agalactiae*, *F. orientalis* e *E. tarda* e alterações histopatológicas encontradas foram descritas. Os animais infectados por *S. agalactiae* alterações histopatológicas associadas a inflamação neutrofílica e fibrinonecrótica no baço, fígado, cérebro e coração. Já os animais infectados por *F. orientalis* e *E. tarda* desenvolveram alterações histopatológicas associadas a esplenite, hepatite e nefrite granulomatosas. Por fim, concluímos que o postulado de Koch foi cumprido para a interação de *E. tarda* com tambaqui, enquanto que para a interação desse peixe com *Chryseobacterium* sp., o postulado de Koch não foi demonstrado. Já para as cepas bacterianas originalmente isoladas de tilápia, *S. agalactiae* e *F. orientalis*, a suscetibilidade do tambaqui em condições experimentais foi demonstrada.

Palavras-chave: Patógenos bacterianos, peixe amazônico, postulado de Koch, suscetibilidade.

ABSTRACT

Tambaqui (*Colossoma macropomum*) is the most produced native fish species, in Brazil. Currently, the susceptibility of tambaqui was confirmed only for one bacterial pathogen, *Aeromonas hydrophila*. Therefore, this study aims to evaluate the susceptibility of *C. macropomum* to isolates of *Edwardsiella tarda*, *Chryseobacterium* sp., *Streptococcus agalactiae* and *Francisella orientalis*. *E. tarda* and *Chryseobacterium* sp. strains were isolated from internal organs of healthy tambaquis, while *S. agalactiae* and *F. orientalis* strains were isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) showing clinical signs. These bacteria were evaluated for their pathogenicity to tambaqui through experimental infection. To this end, each of these bacterial strains and sterile bacterial broth, for the control groups, was inoculated into six healthy tambaqui juveniles by intraperitoneal injection after which the occurrence of clinical signs and deaths were observed for a defined period of time. Animals that died during this period and survivors at the end of experimental period were necropsied and analyzed for bacteriology and histology. Fish infected by *S. agalactiae* were the only ones who showed clinical signs with progression to the death of 83.3% of the tambaquis in that group. The isolation in pure culture of the recovered bacteria as well as histopathological findings were observed for animals of the groups infected by *S. agalactiae*, *F. orientalis* and *E. tarda*. Were observed histopathological findings in the spleen, liver, brain and heart of animals infected by *S. agalactiae*, which were related to neutrophilic and fibrinonecrotic inflammation. Meanwhile, animals infected by *F. orientalis* and *E. tarda* developed histopathological findings related to granulomatous nephritis, splenitis and hepatitis. Finally, we conclude that Koch's postulate was fulfilled for the interaction of *E. tarda* with tambaqui, whereas for the interaction of this fish with *Chryseobacterium* sp., Koch's postulate was not fulfilled. As for the bacterial strains originally isolated from tilapia, *S. agalactiae* and *F. orientalis*, the susceptibility of tambaqui in experimental conditions was demonstrated.

Key-words: Amazon fish, bacterial pathogens, Koch's postulate, susceptibility.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Imagens histológicas de órgãos de tambaquis (*C. macropomum*) saudáveis.....30
- Figura 2** - Achados de necropsia encontrados em juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*) infectados experimentalmente com *Edwardsiella tarda*.....31
- Figura 3** - Imagens histológicas de órgãos de tambaqui (*C. macropomum*) infectado experimentalmente por *E. tarda* (ED38).32
- Figura 4**- Curvas de mortalidade cumulativa dos grupos de tambaquis (*C. macropomum*) infectados com *Edwardsiella tarda*, *Chryseobacterium* sp., *Streptococcus agalactiae* e *Francisella orientalis*.34
- Figura 5** - Imagens histológicas de órgãos de tambaqui (*C. macropomum*) infectado experimentalmente por *S. agalactiae* (SA95).35
- Figura 6** - Imagem histológica de baço de tambaqui (*C. macropomum*) infectado experimentalmente por *F. orientalis* (FNO12).36

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 1 - Informações gerais dos isolados de <i>Edwardsiella tarda</i> , <i>Chryseobacterium</i> sp, <i>Streptococcus agalactiae</i> e <i>Francisella orientalis</i>	24
Tabela 2 - Descrição dos grupos experimentais.	26
Tabela 3 - Condições das suspensões bacterianas utilizadas para infecção experimental com <i>Edwardsiella tarda</i> , <i>Chryseobacterium</i> sp, <i>Streptococcus agalactiae</i> e <i>Francisella orientalis</i> em tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>).	27
Tabela 4 - Sinais clínicos, achados de necropsia, reisolamento bacteriano e alterações histológicas desenvolvidas por tambaquis infectados por <i>E. tarda</i> , <i>Chryseobacterium</i> sp., <i>S. agalactiae</i> e <i>F. orientalis</i>	33
Gráfico 1 - Curva de crescimento do isolado ED38, <i>E. tarda</i>	29
Gráfico 2 - Curva de crescimento do isolado CHRY004, <i>Chryseobacterium</i> sp.	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AQUAVET	Laboratório de Doenças de Animais Aquáticos
BHI	Ágar infusão cérebro e coração
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
CHAH	Ágar cisteína coração suplementado com 2% de hemoglobina bovina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dpi	Dias pós-infecção
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EUA	Estados Unidos da América
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
HCCA	Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico
HE	Coloração de hematoxilina e eosina
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
MALDI-TOF	<i>Matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MHS	Ágar Hsu-Shotts
MMH	Caldo Muller-Hinton cátion ajustado suplementado com 1% de VX e 1% de glicose
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Peixe BR	Associação Brasileira da Piscicultura
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
ST	<i>Sequence type</i>
TSA	Ágar triptona de soja
UFC	Unidades formadoras de colônias

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1.	PANORAMA DA AQUICULTURA.....	13
2.1.1.	Cenário produtivo mundial	13
2.1.2.	Cenário produtivo nacional	14
2.2.	TAMBAQUI.....	15
2.2.1.	Sanidade em Tambaqui	16
2.3.	<i>Edwardsiella tarda</i>	17
2.4.	<i>Chryseobacterium</i> spp	18
2.5.	<i>Streptococcus agalactiae</i>	19
2.6.	<i>Francisella orientalis</i>	21
2.7.	IMPORTÂNCIA DO POSTULADO DE KOCH PARA DEFINIÇÃO DE CAUSALIDADE EM DOENÇAS INFECCIOSAS	22
3.	OBJETIVO	24
4.	MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1.	ISOLADOS BACTERIANOS.....	24
4.2.	CURVAS DE CRESCIMENTO.....	25
4.3.	PEIXES E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	26
4.4.	INFEÇÕES EXPERIMENTAIS	27
4.5.	ANÁLISE BACTERIOLÓGICA	27
4.6.	ANÁLISE HISTOLÓGICA	28
5.	RESULTADOS	28
5.1.	IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS E CURVAS DE CRESCIMENTO	28
5.2.	RESULTADOS DOS GRUPOS CONTROLE	30
5.3.	PATOGENICIDADE DE <i>E. tarda</i> PARA TAMBAQUI (GRUPO ED)	31
5.4.	PATOGENICIDADE DE <i>Chryseobacterium</i> sp. PARA TAMBAQUI (GRUPO CHRY)	32
5.5.	PATOGENICIDADE DE <i>S. agalactiae</i> PARA TAMBAQUI (GRUPO SA)....	33
5.6.	PATOGENICIDADE DE <i>F. orientalis</i> PARA TAMBAQUI (GRUPO FNO)..	36
6.	DISCUSSÃO	37
7.	CONCLUSÃO	40
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

1. INTRODUÇÃO

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é um peixe redondo, de água doce, nativo da bacia amazônica e que realiza migrações reprodutivas, também chamadas de piracema. É uma espécie muito importante comercialmente pela elevada aceitação da sua carne, não só no Brasil, mas na Colômbia, Peru, Venezuela, Bolívia e Equador, além de ser parte importante do hábito alimentar da população desses países (Valladão et al., 2018). Segundo Gomes et al. (2010) esse peixe ganhou notoriedade por possuir bom desempenho zootécnico, rusticidade, aceitação de dieta à base de ração e boa eficiência reprodutiva. Enquanto isso, segundo o IBGE (2020), o tambaqui foi o segundo peixe mais produzido no Brasil, em 2019. Com a sua produção em cativeiro, é de se esperar que a exposição do tambaqui a agentes estressantes, como a alta densidade de estocagem e parâmetros de qualidade de água fora do ideal, leve à imunossupressão e consequente à instalação de doenças.

Os problemas sanitários enfrentados por essa cadeia produtiva incluem, principalmente, o acometimento por parasitas, como o acantocéfalo *Neoechinorhynchus buttnerae* (Aguiar et al., 2018), protozoários como *Ichthyophthirius multifiliis* (Santos et al., 2013) e *Piscinoodinium pillulare* (Martins et al., 2015), além de parasitos monogenéticos (Santos et al., 2013). A capacidade desses parasitos de superar a barreira física do peixe faz com que este se torne susceptível ao acometimento por patógenos oportunistas.

Quanto a bactérias patogênicas para *C. macropomum*, pouco tem sido discutido na literatura. O único relato científico nesse sentido foi redigido por Gallani et al. (2020) e verifica a patogenicidade de *Aeromonas hydrophila* para tambaqui através de cumprimento do postulado de Koch. Utilizando essa metodologia os autores comprovaram a existência de relação causa-efeito entre *A. hydrophila* e a septicemia hemorrágica desenvolvida após interação desse microrganismo com o tambaqui. Mesmo essa aeromonas móvel sendo a única bactéria comprovadamente patogênica para esse peixe amazônico, outras podem ocorrer no mesmo hospedeiro, mas ainda não ser sabido pela comunidade científica. Um fator que corrobora com a possibilidade de afecção do tambaqui por outras bactérias são as mudanças climáticas que induzem alterações nas relações entre microrganismos e organismos aquáticos (Johnson e Paull, 2011), levando à possível ocorrência de doenças emergentes (Peřkala-Safińska, 2018). A falta de conhecimento acerca da situação sanitária do tambaqui pode ser em decorrência da baixa frequência de exames laboratoriais de rotina nas pisciculturas, assim como pelo cultivo, relativamente, recente dessa espécie de peixe.

Edwardsiella tarda e *Chryseobacterium* spp. são frequentemente encontrados no ambiente, incluindo os corpos d'água, permitindo interações com os organismos aquáticos (Rocha e Manaia, 2016; White et al., 1973). Além disso, *E. tarda* é reconhecida como importante patógeno para peixes, visto que afeta diversas espécies com elevada importância comercial (Alcaide et al., 2006; Alexandrino et al., 1999; Hoshina, 1962;

Meyer e Bullock, 1973; SAE-OUI et al., 1984; Shetty et al., 2014; Van Damme e Vandepitte, 1980; Yasunaga et al., 1982). Novas *Chryseobacterium* spp., por sua vez, foram descritas após isolamento a partir de peixes doentes e sua interação com o hospedeiro foi capaz de cumprir o postulado de Koch, como *C. tructae* (Zamora et al., 2012a), *C. viscerum* (Zamora et al., 2012b), *C. aahli* (Loch e Faisal, 2014) e *C. aurantiacum* (Luo et al., 2018). Esses relatos indicam a velocidade com que novas espécies do gênero *Chryseobacterium* são descritas como causas de doença em diferentes espécies de peixes.

Ademais, duas bactérias são responsáveis por grandes perdas na tilapicultura brasileira, *Streptococcus agalactiae* e *Francisella orientalis* (Leal et al., 2014; Mian et al., 2009). *S. agalactiae* afeta tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e causa meningoencefalite e septicemia hemorrágica, enquanto que *F. orientalis* leva à ocorrência de infecção granulomatosa sistêmica e de curso crônico (Colquhoun e Duodu, 2011; Figueiredo et al., 2006). A ocorrência natural dessas bactérias em tambaqui ainda não foi relatada, no entanto, o compartilhamento de água, ferramentas ou estruturas entre os cultivos de tilápia e tambaqui tem o potencial de contribuir para a transmissão desses agentes para o novo hospedeiro. No reservatório da usina hidrelétrica Luís Eduardo Magalhães, por exemplo, localizada no estado do Tocantins, é feito o cultivo tanto de tilápia como de tambaqui (MAPA, 2020).

Sendo assim, a pesquisa por agentes bacterianos aos quais o tambaqui é, potencialmente, susceptível tem o papel de prover conhecimento científico capaz de indicar possíveis pósteros entraves sanitários na cadeia produtiva desse animal, assim como servir de alicerce para o estabelecimento de medidas preventivas e de tratamento eficazes, contribuindo para a atenuação dos prejuízos socioeconômicos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. PANORAMA DA AQUICULTURA

2.1.1. Cenário produtivo mundial

Segundo a FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) (2020a), em 2018 foram produzidos 178,5 milhões de toneladas (t) de pescado, sendo a aquicultura responsável por 46% desse total (82,1 milhões de t). Somente a produção de peixes por aquicultura rendeu um total de 54,3 milhões de t, sendo que 86,55% (47 milhões de t) desses peixes foram produzidos em água interiores. Enquanto isso, a obtenção de pescado por captura em águas interiores rendeu 12 milhões de t, em 2018. Esses dados corroboram para a afirmação de que a aquicultura possui um grande peso para o fornecimento de pescado em escala mundial, destacando-se na produção em águas interiores.

Em 2018, os maiores produtores de peixes foram países do continente asiático. A China domina esse ranking com a produção de 47,5 milhões de t, seguida da Índia, com 7 milhões de t e da Indonésia, com 5,5 milhões de t (FAO, 2020a). Vale ressaltar que a

alta produtividade desses países é em decorrência da aquicultura em águas interiores muito bem desenvolvida.

As três espécies de peixes mais produzidas no mundo são cultivadas em águas interiores. Segundo a FAO (2020b), a carpa-capim (*Ctenopharyngodon idellus*) lidera esse ranking, com 5704 mil t produzidas em 2018. A China é o país que mais cultiva esse peixe (5504,3 mil t), seguida por Bangladesh (56,7 mil t) e Irã (28,1 mil t) em terceiro. A carpa prateada (*Hypophthalmichthys molitrix*) ocupou, no mesmo ano, o segundo lugar no ranking das espécies mais cultivadas globalmente com 4788,5 mil t produzidas. A China é o país que detém os valores mais expressivos de produção de carpa prateada (3858,8 mil t), seguida da Índia (444 mil t) e de Bangladesh (221,9 mil t) em terceiro. Apesar dos grandes volumes de produção das carpas, no comércio internacional essas espécies são pouco valorizadas, sendo salmão, truta, bacalhau e atum, peixes mais valorizados. Já a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) ocupou o terceiro lugar no ranking dos peixes mais cultivados no mundo devido a produção de 4525,4 mil t. A China também se destaca no cultivo de tilápia do Nilo (1218,5 mil t) sucedida pela Indonésia (1171,6 mil t) em segundo lugar, em terceiro está o Egito (1051,4 mil t) e em quarto lugar está o Brasil (317 mil t).

A produção de peixe tem sido majoritariamente destinada ao consumo humano. Desde 1961 até 2017, o crescimento médio anual do consumo de peixe foi de 3,1%, enquanto que o crescimento populacional mundial por ano, no mesmo período, foi de 1,6%. Além disso, de toda fonte de proteína animal consumida no mundo, em 2017, 17% foi de pescado (FAO, 2020a). Dessa forma, podemos perceber a importância que o pescado possui para a manutenção da segurança alimentar no mundo.

2.1.2. Cenário produtivo nacional

No Brasil, em 2019, foram produzidas 529,6 mil t de peixe por meio da aquicultura (IBGE, 2020). No ranking estadual, o Paraná foi o maior produtor de peixes, sendo responsável por 23,9% do total nacional, acompanhado por São Paulo e Rondônia, que obtiveram produções correspondentes a 9,6% e 9,2% do total nacional, respectivamente. Tanto no Paraná, como em São Paulo, a tilápia do Nilo destaca-se como a espécie mais produzida, enquanto que em Rondônia, o tambaqui é a espécie que prevalece (IBGE, 2020).

Nacionalmente, a tilápia do Nilo é a espécie de peixe mais produzida. Em 2019, sua produção alcançou 323,7 mil t, correspondendo a 61,1% da quantidade de peixes cultivados no Brasil (IBGE, 2020). As regiões Sul e Sudeste do país, juntas, são responsáveis por 72,5% de toda tilápia cultivada no país. No ranking por estado, o Paraná se destaca por atingir 120,5 mil t de tilápia, seguido de São Paulo e Minas Gerais, com produções iguais a 45,6 (ou 14,1%) e 33,9 (ou 10,5%) mil t, respectivamente (IBGE, 2020).

Já o tambaqui é a segunda espécie de peixe mais produzida no Brasil. Em 2019, seu cultivo rendeu 101,1 mil t, o que corresponde a 19,1% do total de peixes produzidos por aquicultura (IBGE, 2020). Na região Norte do país, foram cultivados 73,2 mil t de

tambaqui, ou, 72,4% da produção total dessa espécie em todo Brasil. Rondônia é o estado que mais cultiva esse peixe amazônico, sendo responsável por 40,1 mil t, ou, 39,6% do total produzido nacionalmente. Em segundo e terceiro lugar estão Maranhão e Roraima com produções iguais a 11,1 mil t (ou 11%) e 10,7 mil toneladas (ou 10,6%), respectivamente (IBGE, 2020).

Apesar de existir uma clara separação espacial entre as regiões que mais produzem tambaqui (região Norte) e que mais produzem tilápia (regiões Sul e Sudeste), ainda existem regiões em que ambas as espécies são cultivadas. Segundo o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), em seu Boletim da Piscicultura em Águas da União 2018 – 2019, no reservatório da usina hidrelétrica Luís Eduardo Magalhães, localizada no estado do Tocantins, foram produzidas 27,05 t de tambaqui e 19,80 t de tilápia, em 2019 (MAPA, 2020).

2.2. TAMBAQUI

O tambaqui, de nome científico *Colossoma macropomum*, é um peixe redondo, de água doce e pertencente à família Serrasalmidae (revisado por Morais e O'sullivan, 2017). Essa espécie é nativa da bacia amazônica e realiza migrações reprodutivas também chamadas de piracema. Esse peixe é onívoro e em seu habitat natural se alimenta de sementes, folhas, frutas e zooplâncton, o que favorece o seu cultivo por demandarem pouco ou nenhum uso de alimento de origem animal (Valladão et al., 2018). Tambaqui é uma espécie muito importante comercialmente pela elevada aceitação da sua carne, não só no Brasil, mas na Colômbia, Peru, Venezuela, Bolívia e Equador, além de ser parte importante do hábito alimentar da população desses países (Valladão et al., 2018). Segundo GOMES et al. (2010), esse peixe possui características favoráveis ao cultivo, como bom desempenho zootécnico, rusticidade, aceitação de dieta à base de ração e número de alevinos obtidos.

Apesar de, atualmente, o tambaqui ser conhecido por possuir boas características para a produção em cativeiro, até o final da década de 1970 a obtenção dessa espécie se dava primariamente pela pesca extrativista. No entanto, nos anos 80 a sobrepesca assolou os estoques naturais do tambaqui levando o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) a instituir um período de defeso e outras restrições para a pesca desse peixe, de forma que este fosse capaz de reestabelecer-se na natureza (revisado por Morais e O'sullivan, 2017). Mesmo após os esforços do IBAMA, os tambaquís encontrados na natureza, capazes de alcançar até 100 cm de comprimento, não conseguiam, em sua maioria (99% da população), atingir 55 cm de comprimento nos anos de 2007 e 2008 (revisado por Morais e O'sullivan, 2017). As restrições do IBAMA mencionadas ainda se encontram em vigor.

Mesmo na ausência de dados estatísticos sobre a pesca do tambaqui, conseguimos indicar alguns entraves que essa atividade possui. Enquanto isso, o cultivo de tambaqui rendeu a produção de 101,1 mil toneladas, em 2018, demonstrando o potencial de crescimento que a aquicultura tem para o fornecimento dessa espécie aquática.

2.2.1. Sanidade em Tambaqui

Alguns artigos científicos, no anseio de indicar as boas características do tambaqui para a produção em cativeiro, propagaram a ideia de que o tambaqui é resistente a enfermidades, baseando-se, aparentemente, em observações empíricas (Paula, 2009; Pinheiro, 1990). No entanto, estudos que testam a ampla susceptibilidade do tambaqui e comprovam sua resistência a diversos patógenos não foram encontrados na literatura científica.

Os tambaquís são majoritariamente afetados por parasitos, como: monogenéticos, myxosporídeos, digenéticos, nematódeos, acantocéfalos e crustáceos, além de protozoários como *Ichthyophthirius multifiliis*, *Piscinoodinium pillulare*, *Tetrahymena* spp. e tricodinídeos (Pereira et al., 2016; Valladão et al., 2018). Dentre os parasitos, o acantocéfalo *Neoechinorhynchus buttnerae*, tem se destacado, recentemente por ser responsável por grandes prejuízos econômicos na cadeia produtiva do tambaqui (Castro et al., 2020).

Ainda não existem registros, na literatura científica, de vírus atuando como patógenos para *C. macropomum*. Quanto aos fungos temos raras indicações da afecção de larvas e ovos degenerados de tambaqui por *Saprolegnia* sp (Malta et al., 2001; Thomé, 2000).

A literatura científica indica apenas *Aeromonas hydrophila* como patogênica para *C. macropomum*, uma vez que a interação entre o tambaqui e essa bactéria foi testada através de estudos de infecção experimental com subsequente cumprimento ao postulado de Koch (Gallani et al., 2020). Nesse estudo, Gallani et al. (2020) observaram após infecção experimental, os mesmos sinais clínicos observados nos peixes dos quais foi realizado o primeiro isolamento de *A. hydrophila*, como letargia, lesões ulcerativas circulares, melanose, erosão de nadadeira, opacidade de córnea, hemorragia na região ventral dos peixes, assim como, emaciação e hemorragia anal. Foi ainda possível estabelecer uma dose letal mediana (DL₅₀) igual a $8,8 \times 10^7$ UFC/mL de *A. hydrophila* para o tambaqui. Uma vez comprovada a patogenicidade de *A. hydrophila* contra *C. macropomum*, os autores ainda indicaram, através de testes *in vitro*, opções de tratamento e controle potencialmente efetivas contra essa bactéria, como os antibióticos: ceftriaxona, florfenicol e oxitetraciclina; os desinfetantes: formaldeído, sulfato de cobre, hipoclorito de sódio a 5%, cloreto de sódio e peróxido de hidrogênio; além dos óleos essenciais de canela e cravo. Vale ressaltar que *A. hydrophila* é um importante patógeno de animais aquáticos, que desenvolve septicemia hemorrágica levando a mortes não somente em *C. macropomum*, mas também em diversas outras espécies de peixes (Bandeira Junior et al., 2019; Baumgartner et al., 2017; Faisal et al., 1989; Hossain et al., 2014; Soliman et al., 1989).

Outras bactérias como *Flavobacterium columnare*, *Streptococcus* sp., *Lactococcus garvieae*, *Edwardsiella tarda*, *Citrobacter* sp. e *Plesiomonas shigelloides*, que são consideradas patogênicas para outras espécies de peixes, já foram isoladas de tambaqui apresentando sinais clínicos (Carvalho, 2012; Pilarski et al., 2008). Não

obstante, ainda não são consideradas patogênicas para tabaqui, visto que estudos de causalidade, através de postulado de Koch não foram conduzidos, limitando o significado clínico desses achados.

Durante um programa de monitoramento conduzido pelo Aquacen Saúde Animal, da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, em conjunto com o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento em Rondônia, foram isoladas *Edwardsiella tarda* e *Chryseobacterium* sp, respectivamente, de rim e cérebro de juvenis de tabaquis saudáveis (dados não publicados). Apesar da ausência de sinais clínicos nos animais, as bactérias citadas foram encontradas nos órgãos internos (rim e cérebro) dos tabaquis, que em condições normais deveriam ser estéreis. Além disso, *Edwardsiella tarda* já é um patógeno de peixes bem reconhecido, enquanto que novas espécies do gênero *Chryseobacterium* têm sido recentemente descritas e isoladas de peixes doentes com patogenicidades heterogêneas (Gholamhosseini et al., 2018; Kim et al., 2020; Luo et al., 2018; Sebastião et al., 2019; Zamora et al., 2012b, 2012a).

Ademais, *Streptococcus agalactiae* e *Francisella orientalis* são importantes patógenos para peixes, em especial, no Brasil, para tilápias do Nilo. Em tabaquis, essas bactérias não foram isoladas de casos naturais, no entanto, sabe-se que *S. agalactiae* é uma bactéria capaz de atravessar a barreira interespecie, infectando outras espécies de peixes cultivadas na mesma unidade produtiva (Leira et al., 2019; Xavier, 2018) ou até mesmo espécies de classes diferentes, como isolados de humanos demonstrando patogenicidade para peixes (Wang et al., 2017). Enquanto isso, *F. orientalis* possui uma expressiva morbidade afetando diversos peixes suscetíveis (Chern e Chao, 1994; Lagos et al., 2017; Lewisch et al., 2016), além de potencial habilidade de persistir no ambiente pela produção de biofilme (Soto et al., 2015a).

Sendo assim, de forma geral, as quatro bactérias retratadas anteriormente, *E. tarda*, *Chryseobacterium* sp., *S. agalactiae* e *F. orientalis*, despertam curiosidade científica devido aos fatos já apresentados e serão revisados a seguir.

2.3. *Edwardsiella tarda*

Edwardsiella tarda, assim como, *E. anguillarum*, *E. hoshinae*, *E. ictaluri* e *E. piscicida*, são espécies do gênero *Edwardsiella*, que por sua vez pertence à família *Hafniaceae*. *E. tarda* é uma espécie de bactérias Gram negativas que possuem formato de bastonetes medindo 2-3 µm de comprimento e 1 µm de largura, são anaeróbias facultativas e possuem motilidade (revisado por Park et al., 2012). Além disso, essas bactérias parecem ser capazes de induzir apoptose nos linfócitos levando à imunossupressão do hospedeiro, assim como, parecem ser capazes de sobreviver e replicar dentro de fagócitos, viabilizando sua disseminação por todo o hospedeiro (Zhang et al., 2016; Pirarat et al., 2007). Por ser uma bactéria intracelular facultativa, o tratamento de infecções por *E. tarda* é mais dificultado devido a presença de barreiras extras, como a membrana plasmática e a membrana fagossomal/fagolisossomal da célula hospedeira (Kamaruzzaman et al., 2017). A hemaglutinina sensível à temperatura (Tsh) e a sialidase NanA, proteínas encontradas em *E. tarda*, possuem funções enzimáticas capazes de

conferir infectividade a essa bactéria, uma vez que parecem influenciar a interação do patógeno com a célula hospedeira (Hu et al., 2016; Vo et al., 2019).

Essa espécie de bactéria foi originalmente isolada de enguia japonesa (*Anguilla japonica*) no Japão, em 1962 (Hoshina, 1962), mas até hoje ela já foi isolada de *Ictalurus punctatus* (Meyer e Bullock, 1973), *Micropterus salmoides* (White et al., 1973), *Mugil cephalus* (Kusuda, 1976), *Evynnis japonica* (Kusuda et al., 1977), *O. niloticus* (Van Damme e Vandepitte, 1980), *Oncorhynchus tshawytscha* (Amandi et al., 1982), *Pagrus major* (Yasunaga et al., 1982), *Seriola quinqueradiata* (Yasunaga et al., 1982), *Paralichthys olivaceus* (Nakatsugawa, 1983), *Cyprinus carpio* (Sae-Oui et al., 1984), *Dicentrarchus labrax* (Blanch et al., 1990), *Scophthalmus maximus* (Nougayrede et al., 1994), *Clarias batrachus* (Sahoo et al., 1998), *Oncorhynchus mykiss* (Alexandrino et al., 1999), *Salvelinus fontinalis* (Uhland et al., 2000), *Catla catla* (Swain e Nayak, 2003), *Labeo rohita* (Swain e Nayak, 2003), *Anguilla anguilla* (Alcaide et al., 2006), *Silurus asotus* (Yu et al., 2009), *Arapaima gigas* (Choresca Jr. et al., 2011), *Brycon amazonicus* (Carvalho, 2012) *Pangasianodon hypophthalmus* (Shetty et al., 2014), *Piaractus mesopotamicus* (Sebastião et al., 2015) *Hippocampus erectus* (Wang et al., 2020) e até mesmo de peixes, taxonomicamente, próximos ao tambaqui, como pacu-azul, *Myleus micans*, (Lima et al., 2008) e tambacu, o híbrido *C. macropomum* x *Piaractus mesopotamicus* (Winckler et al., 2015).

Esses animais quando infectados por *E. tarda* demonstram sinais clínicos como, natação errática, perda de pigmentação, exoftalmia, opacidade de córnea, edema da superfície celomática, hemorragia petequiral nas nadadeiras e pele e hérnia retal (Park et al., 2012). Após a necropsia pode ser observada a presença de ascite translúcida ou sanguinolenta, além de congestão de fígado, rim e baço (Miyazaki e Kaige, 1985).

A identificação de *E. tarda* deve ser feita através de técnicas moleculares, como sequenciamento, especialmente do gene *dnaJ*, mas também dos genes *atpD*, *glnA* e *tuf*, análise de sequências multilocus ou *matrix assisted laser desorption/ionization – time of flight* (MALDI-TOF), uma vez que o uso de análises fenotípicas levou a erros de identificação dentre bactérias do gênero *Edwardsiella* (Buján et al., 2018; Piamsomboon et al., 2020).

2.4. *Chryseobacterium* spp

Chryseobacterium é um gênero de bactérias pertencente à família *Flavobacteriaceae* e que tem sido repetitivamente isolado de peixes doentes (Gholamhosseini et al., 2018; Kim et al., 2020; Lin et al., 2017; Sebastião et al., 2019; L. Zamora et al., 2012b). As características gerais dessas microrganismos foram revisadas por Loch e Faisal (2015). *Chryseobacterium* spp. são bacilos de 1-3 µm de comprimento e aproximadamente 0,5 µm de largura, Gram negativos e não possuem motilidade. Quando cultivado em meio de cultura sólido apresentam colônias variando em cor de amarelo-ouro pálido a amarelo-ouro brilhante devido à presença de um pigmento semelhante a flexirubina. Crescem bem em meios comerciais como ágar tripton de soja (TSA), *brain heart infusion* (BHI), ágar sangue e Muller-Hinton. Sua identificação deve

ser feita por uma caracterização polifásica, considerando aspectos bioquímicos, morfológicos, fisiológicos, perfil de ácidos graxos e análise filogenética após sequenciamento (Bernardet et al., 2005). No entanto, outras técnicas como espectrometria de massas por MALDI-TOF (Pérez-Sancho et al., 2018), e sequenciamento dos genes 16s rRNA e espaçador transcrito interno (ITS) têm sido utilizadas (Daroy et al., 2011).

Desde 1959, quando a primeira bactéria do gênero *Chryseobacterium* foi isolada de peixes doentes (*C. balustinum* em *Leuciscus leuciscus*) (Brisou et al., 1959), outras espécies do mesmo gênero têm sido isoladas de peixes apresentando sinais clínicos e alguns inclusive foram testados e cumpriram o postulado de Koch. *C. scophthalmum* foi isolado de *Scophthalmus maximus* apresentando hiperplasia de brânquias, ascite, hemorragia nos olhos, pele e mandíbula, além de necrose e hemorragia no cérebro, estômago, intestino, fígado e rim (Mudarris e Austin, 1989). Após infecção de juvenis de *S. maximus* saudáveis por imersão e injeção intraperitoneal sinais clínicos similares aos encontrados nos peixes naturalmente infectados foram encontrados e a mesma bactéria foi reisolada, cumprindo o postulado de Koch. *C. cucumeris* também cumpriu o postulado de Koch ao infectar *Misgurnus anguillicaudatus* causando lesões de pele (Kim et al., 2020). Pirapitinga (*Piaractus brachypomus*), um peixe taxonomicamente próximo do tambaqui, também foi afetado por *Chryseobacterium* sp., em coinfeção com *Aeromonas hydrophila*, e o postulado de Koch também foi cumprido (Abraham et al., 2017).

Na última década, várias *Chryseobacterium* spp. têm sido isoladas de peixes doentes, mas sem avaliação de causalidade por postulado de Koch. *C. joostei* foi recuperada de *Acipenser stellatus* com petéquias na superfície corporal, hemorragia visceral, sangramento no baço e ascite (Gholamhosseini et al., 2018). Em um estudo de monitoramento sanitário nos Estados Unidos da América, foram isoladas *C. viscerum*, *C. piscicola* e *C. chaponense* de peixes apresentando sinais clínicos inespecíficos (Loch et al., 2013). *C. indologenes* foi recuperado de lesões de pele de *Perca flavescens* e teve sua virulência avaliada para o mesmo peixe ($DL_{50} = 1,5 \times 10^8$ UFC/peixe) (Pridgeon et al., 2013). Já *C. shigense* foi obtido de *Oncorhynchus mykiss* doentes (Leydis Zamora et al., 2012).

Várias novas espécies de *Chryseobacterium* ainda foram descritas infectando peixes na última década: *C. tructae* (Zamora et al., 2012a) e *C. viscerum* (Zamora et al., 2012b) em *Oncorhynchus mykiss*, *C. aahli* em *Salvelinus namaycush* e *Salmo trutta* (Loch e Faisal, 2014), além de *C. aurantiacum*, que foi isolado da água onde bacalhaus-de-Murray (*Maccullochella peelii peelii*), apresentando ulcerações, estavam sendo cultivados (Luo et al., 2018). Esses dados representam o potencial patogênico dos isolados de *Chryseobacterium* sp. (Bernardet et al., 2005).

2.5. *Streptococcus agalactiae*

Streptococcus agalactiae, uma bactéria com formato de cocos, medindo 0,5-2 μ m de diâmetro, Gram positiva, anaeróbia facultativa e não móvel, é patogênica para seres humanos, bovinos e diversas outras espécies de animais incluindo peixes (Delannoy et al., 2013; Eisenberg et al., 2017; Keefe, 1997; Zeng et al., 2016).

Os primeiros isolamentos de *S. agalactiae* em peixes ocorreram em *Oncorhynchus mykiss* e *Notemigonus chrysoleucas* nos anos de 1958 e 1966, respectivamente, quando também foi relatado o potencial contagioso e letal dessa bactéria para peixes (Hoshina et al., 1958; Robinson e Meyer, 1966). Ademais, outras espécies de peixes também foram relatadas com isolamento de *S. agalactiae*, como: *Lepomis cyanellus*, *Lepomis macrochirus* (Robinson e Meyer, 1966), *Arius felis*, *Brevoortia patronus*, *Cynoscion nothus*, *Dasyatis* sp., *Lagodon rhomboides*, *Leiostomus xanthurus*, *Micropogon undulates*, *Mugil cephalus* (Plumb et al., 1974), *Pomatomus saltatrix* (Baya et al., 1990), *Oncorhynchus mykiss* (Eldar et al., 1994), *Liza klunzingeri*, *Sparus auratus* (Evans et al., 2002), *Pampus argenteus* (Duremdez et al., 2004), *Oreochromis* sp. (Mian et al., 2009), *Danio rerio* (Patterson et al., 2012), *Schizothorax prenanti* (Geng et al., 2012), *Epinephelus lanceolatus* (Bowater et al., 2012), *Garra rufa* (Ruane et al., 2013), *Mikrogeophagus ramirezi*, *Puntius conchoniis* (Delannoy et al., 2013), híbrido de *Pseudoplatystoma facium* x *Leiarius marmoratus* (Godoy et al., 2013), *Scortum barcoo* (Liu et al., 2014), *Cirrhinus molitorella* (Li-Hui et al., 2015), *Fundulus grandis* (Soto et al., 2015b) híbrido de *Morone saxatilis* × *Morone chrysops* (Soto et al., 2015b), *Trachinotus ovatus* (Cai et al., 2016), *Geophagus brasiliensis*, *Prochilodus lineatus* (Leira, 2016), *Acanthopagrus schlegelii*, *Bidyanus bidyanus*, *Lateolabrax japonicus*, *Lates calcarifer*, *Liza macrolepis*, *Thunnus albacares* (Chu et al., 2016), *Rhamdia quelen* (Baldissera et al., 2017), *Trachinotus blochii* (Chong et al., 2017), *Schizopygopsis pylzovi* (Zhang et al., 2017), *Oryzias javanicus* (Amal et al., 2018), *Hoplias malabaricus*, *Arapaima gigas* (Xavier, 2018) e *Carcharhinus plumbeus* (Morick et al., 2020). Na literatura científica ainda não existem relatos de isolamento de *S. agalactiae* de tambaqui, no entanto, existem relatos de isolamento de *Streptococcus* sp., ou seja, com identificação apenas do gênero da bactéria nessa espécie de peixe (Majolo et al., 2014; EMBRAPA, 2016).

A infecção por *S. agalactiae* causa meningoencefalite e septicemia hemorrágica nos peixes, sendo que os sinais clínicos mais proeminentes são exoftalmia uni ou bilateral, distensão abdominal e natação errática, mas também pode ser observada perda de apetite, opacidade de córnea, hemorragia nas brânquias, opérculo, olhos e base das nadadeiras (Amal e Zamri-Saad, 2011; Chong et al., 2017; Figueiredo et al., 2006; Soto et al., 2015b). Por meio da necropsia pode ser observada presença de fluido sanguinolento na cavidade celomática, baço avermelhado e aumentado de tamanho, fígado pálido e aumentado de tamanho, assim como inflamação no coração e rim (Amal e Zamri-Saad, 2011; Soto et al., 2015b).

A transmissão de *S. agalactiae* ocorre por meio do contato direto entre peixes doentes e saudáveis, canibalismo de peixes mortos ou moribundos, por contato indireto através da bactéria presente na água e verticalmente (transmissão dos reprodutores para a prole) permitindo que a doença se manifeste gradualmente em diferentes sistemas de produção (Pradeep et al., 2016; Shoemaker et al., 2017).

Os microrganismos da espécie *S. agalactiae* podem ser divididos em 10 sorotipos, Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII e IX, baseado em seu fenótipo capsular (Lancefield,

1934; Slotved et al., 2007). Desses, os sorotipos Ia, Ib, II e III são encontrados, no Brasil, com distribuição geográfica caracterizada (Chideroli et al., 2017; Godoy et al., 2013; Tavares et al., 2018). O sorotipo Ib é mais prevalente no Brasil como um todo, com exceção da região norte onde o cultivo de tilápia não é permitido (Barony et al., 2017). O sorotipo III é encontrado na região Nordeste do país (Chideroli et al., 2017; Leal et al., 2019b), enquanto que o sorotipo Ia foi encontrado apenas no estado da Bahia (Godoy et al., 2013). Já o sorotipo II, diferentemente dos sorotipos Ia, Ib e III que foram isolados de tilápias, foi obtido em uma piscicultura do híbrido *Leiarius marmoratus* x *Pseudoplatystoma corruscans* localizada no estado de São Paulo (Tavares et al., 2018).

A diversidade genética dessa bactéria no Brasil também já foi determinada. Barony et al. (2017) identificaram dois *sequence types* (ST) predominantes, pertencentes ao sorotipo Ib, são eles: ST260 e ST927, além de uma linhagem com ST não determinável, denominada “non-typeable”. Os isolados de *S. agalactiae* com ST não tipável estavam alocados na região Centro-Sul do Brasil, enquanto que os isolados do ST260 e ST927 estavam alocados na região Nordeste (Barony et al., 2017; Godoy et al., 2013). Os isolados de *S. agalactiae* sorotipo Ia encontrados são pertencentes ao ST103, que é um ST de isolados de múltiplos hospedeiros (Godoy et al., 2013). Enquanto que os isolados do sorotipo III são pertencem ao ST283, que é uma linhagem de *S. agalactiae* encontrada em múltiplos hospedeiros (Leal et al., 2019b).

S. agalactiae cresce bem em meios sólidos comerciais, como ágar Todd-Hewitt, TSA, BHI e ágar sangue submetidos a temperatura de 22 a 37 °C por 48 horas. Após o crescimento, morfologicamente, essas bactérias apresentam-se, como colônias cinza opacas medindo de 1 a 2 mm de diâmetro (Amal e Zamri-Saad, 2011). Essa bactéria pode ser identificada por testes bioquímicos, no entanto, as técnicas moleculares, como PCR espécie-específico, sequenciamento do gene 16s rRNA e MALDI-TOF são mais eficientes (Assis et al., 2017; Leigh et al., 2018; Qasem et al., 2010).

A tilápia do Nilo, a espécie de peixe mais produzida no Brasil, é largamente afetada por *S. agalactiae* (Barony et al., 2017; Figueiredo et al., 2006; Godoy et al., 2013; Leal et al., 2019b; Pereira et al., 2010). No Brasil, sua produção é, majoritariamente, realizada em tanques-rede instalados em águas da união (Peixe BR, 2021). O cultivo de outras espécies de peixe, como o tambaqui, nas mesmas unidades produtivas que a tilápia do Nilo, como é observado no reservatório da usina hidrelétrica Luís Eduardo Magalhães, localizada no estado do Tocantins (MAPA, 2020), tem o potencial de favorecer a transmissão, principalmente, de *S. agalactiae*, devido a facilidade com que essa bactéria consegue atravessar a barreira interespecie.

2.6. *Francisella orientalis*

Francisella orientalis, anteriormente classificada como *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* (Ramirez-Paredes et al., 2020), é uma bactéria intracelular facultativa, Gram negativa, aeróbica e de formato cocoide ou bastonete curto medindo de 0,5 a 1,5 µm (Ottem et al., 2009). Sua temperatura de crescimento ótimo está entre 28 e 29°C, sendo que as cepas virulentas causam doença em peixes de clima tropical quando a

temperatura está abaixo de 25°C, e suas colônias apresentam-se cinza esverdeadas em ágar cisteína coração suplementado com 2% de hemoglobina bovina (CHAH) (Ramirez-Paredes et al., 2020).

Os primeiros casos reconhecidos de infecção por *Francisella orientalis* ocorreram no ano de 1992, em *Oreochromis niloticus* (Chen et al., 1994; Chern e Chao, 1994), atualmente, a infecção por essa bactéria ainda causa prejuízos econômicos para a cadeia produtiva da tilapicultura (Ramirez-Paredes et al., 2020). No Brasil, a tilápia do Nilo é produzida, majoritariamente, em tanques-rede, conferindo um potencial risco de transmissão de patógenos, incluindo *F. orientalis* para a comunidade de peixes nativos daquele corpo d'água (Carreon, 2018). Além disso, *F. orientalis* é capaz de formar biofilme podendo levar a uma maior persistência desse patógeno no tanque-rede (Soto et al., 2015a).

Outros peixes também são suscetíveis a infecção por *F. orientalis* como: *Haemulon flavolineatum*, *Haemulon carbonarium*, *Haemulon aurolineatum*, *Anisotremus virginicus*, *Haemulon sciurus*, *Haemulon chrysargyreum*, *Haemulon parra*, *Haemulon macrostomum* (Soto et al., 2014), o híbrido de *Morone chrysops* × *Morone saxatilis* (Ostland et al., 2006), *Cirrhilabrus* spp. e *Chromis viridis* (Camus et al., 2013). Já foi verificada, através de infecção experimental, a susceptibilidade de outras espécies de peixe à *F. orientalis*, como *Lepomis gibbosus* (Lewis et al., 2016) e *Danio rerio* (Lagos et al., 2017), mas não para *C. macropomum*.

F. orientalis causa infecção granulomatosa sistêmica de curso crônico (Colquhoun e Duodu, 2011). Os sinais clínicos apresentados pelos diferentes hospedeiros envolve palidez, emaciação, erosão de pele, natação errática e exoftalmia (Birkbeck et al., 2011; Camus et al., 2013; Soto et al., 2014). Já os granulomas podem ser observados na maioria dos órgãos, mas, principalmente, no rim, baço e fígado (Birkbeck et al., 2011; Colquhoun e Duodu, 2011, Ostland et al., 2006; Soto et al., 2014). Esses órgãos podem ainda estar aumentados de tamanho (Birkbeck et al., 2011).

F. orientalis é uma bactéria fastidiosa que requer cisteína para o seu crescimento, portanto devem ser utilizados meios sólidos que possuem esse amino ácido em sua composição, como CHAH e ágar Thayer-Martin para permitir o seu crescimento. Sua identificação pode ser feita através de PCR espécie-específica, sequenciamento do gene 16s rRNA, hibridização *in situ* e qPCR (Colquhoun e Duodu, 2011; Soto et al., 2010).

2.7. IMPORTÂNCIA DO POSTULADO DE KOCH PARA DEFINIÇÃO DE CAUSALIDADE EM DOENÇAS INFECCIOSAS

Em 1882, Robert Koch estabeleceu critérios lógicos a serem seguidos para que os bacilos tuberculosos pudessem ser associados à causa da tuberculose (Koch, 1882). Posteriormente, o conjunto desses critérios passaram a ser conhecidos como postulados de Koch e, este, começou a ser utilizado para determinar causalidade entre diversos

microrganismos e suas respectivas doenças. Os seguintes critérios constituem o postulado de Koch atualmente (Vonaesch et al., 2018):

- 1 - O microrganismo deve estar presente em indivíduos doentes.
- 2 - O microrganismo deve ser isolado do indivíduo doente e crescer em cultura pura.
- 3 - Quando o microrganismo em cultura pura, é inoculado experimentalmente em um hospedeiro suscetível, a mesma doença observada no hospedeiro original deve emergir.
- 4 - O microrganismo deve ser recuperado em cultura pura do hospedeiro infectado experimentalmente.

O postulado de Koch representou um grande avanço na ciência através do qual foi possível compreender as doenças infecciosas e, assim, estabelecer formas de prevenção e controle.

Apesar de útil, o postulado de Koch não é universal, visto que ele é capaz de responder a diversas questões sobre a relação hospedeiro-microrganismo, no entanto, para algumas doenças, critérios específicos podem não ser aplicáveis. Isso pode acontecer por diversos motivos. Existem alguns microrganismos que não são cultiváveis em cultura pura, como por exemplo alguns organismos viáveis mas não cultiváveis, outros podem apenas não ter um meio de cultura padronizado. Além disso, a inoculação de um microrganismo em um hospedeiro pode nem sempre levar a doença visto que, mesmo que o hospedeiro experimental seja da mesma espécie que o hospedeiro original, diferenças entre indivíduos podem conferir resistência ao patógeno. Dentro de uma mesma espécie de microrganismo podem, também, existir diferenças entre linhagens que conferem maior ou menor virulência de uma cepa, ou até mesmo a passagem em cultivo *in vitro* pode induzir a redução de virulência, entre outros motivos (Jindal, 2018; Wilson et al., 2011).

Modelos alternativos ao postulado de Koch têm sido utilizados para estabelecer causalidade entre um microrganismo e uma doença, mas utilizando como base a lógica empregada por Koch em seus estudos. Por exemplo, em vez de usar um modelo microbiológico, como é o postulado de Koch original, pode-se utilizar de um modelo molecular, onde devem-se obedecer os seguintes critérios: a sequência de ácidos nucleicos do agente etiológico deve estar presente, o número de cópias dessa sequência deve diminuir à medida que a doença regride, no tecido saudável deve ocorrer ausência ou baixa quantidade de cópias, o número de cópias deve estar correlacionado com a severidade da doença, a sequência nucleotídica do agente etiológico deve estar correlacionada com o tecido doente e as evidências baseadas na sequência devem ser reproduzíveis (Falkow, 1988; Fredricks e Relman, 1996).

Atualmente, a utilização do modelo microbiológico é indicado com o emprego concomitante de técnicas histopatológicas e/ou imunológicas, onde a presença do agente pode ser verificada, assim como sua associação com as lesões tanto em nível histológico, como em nível celular, o que torna o ensaio mais robusto (Hosainzadegan et al., 2020).

3. OBJETIVO

Avaliar a patogenicidade de isolados de *Edwardsiella tarda*, *Chryseobacterium* sp., *Streptococcus agalactiae* e *Francisella orientalis* para a espécie tambaqui (*Colossoma macropomum*) em condições experimentais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ISOLADOS BACTERIANOS

Foram selecionadas bactérias isoladas tanto de monitorias sanitárias em fazendas de tambaqui, como de surtos bacterianos em tilapiculturas (Tabela 1). As bactérias isoladas de tambaqui, *Edwardsiella tarda* e *Chryseobacterium* sp., foram recuperadas durante um programa de monitoramento conduzido pelo Aquacen Saúde Animal em conjunto com o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento a partir de animais assintomáticos (dados não publicados).

Essas bactérias estão mantidas congeladas no banco de bactérias do Laboratório de Doenças de Animais Aquáticos (AQUAVET) da Universidade Federal de Minas Gerais à temperatura de -70 °C em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) com 15% de glicerina.

Tabela 1 – Informações gerais dos isolados de *Edwardsiella tarda*, *Chryseobacterium* sp., *Streptococcus agalactiae* e *Francisella orientalis*.

Espécie	Código	Hospedeiro	Órgão	Sinais clínicos	Estado	Ano	Método de Identificação
<i>Edwardsiella tarda</i>	ED38	Tambaqui	Rim	Não	Rondônia	2017	MALDI-TOF
<i>Chryseobacterium</i> sp	CHRY004	Tambaqui	Cérebro	Não	Rondônia	2017	MALDI-TOF/ Sequenciamento
<i>Streptococcus agalactiae</i>	SA95	Tilápia do Nilo	Cérebro	Sim	Alagoas	2010	MALDI-TOF
<i>Francisella orientalis</i>	FNO12	Tilápia do Nilo	Rim	Sim	Minas Gerais	2012	MALDI-TOF

Foi utilizada a espectrometria de massa através do *matrix assisted laser desorption/ionization – time of light* (MALDI-TOF) para identificar todos os isolados bacterianos (como descrito no tópico “ANÁLISE BACTERIOLÓGICA”), no entanto, a identificação a nível de espécie para *Chryseobacterium* spp. é pouco confiável através desse método devido à baixa representação nos bancos de dados das empresas que produzem esse equipamento (Pérez-Sancho et al., 2018), sendo necessária a complementação por outras técnicas. Portanto, foi realizado sequenciamento do gene 16s rRNA do isolado CHRY004 (Lin et al., 2017).

Para tanto, primeiramente, o isolado CHRY004 foi estriado em placa de petri contendo ágar triptona de soja (TSA) e incubado a 28 °C por 48h. Após o crescimento

bacteriano, foi realizada extração térmica de DNA desse isolado de acordo a metodologia utilizada por Ribeiro Junior et al. (2016) com modificações, onde as colônias bacterianas foram imersas em 100 µL de água livre de nucleases e submetidas a temperatura de 95 °C por 15 minutos no termociclador Veriti (Applied Biosystems, EUA). Em seguida, o DNA extraído foi quantificado pelo espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Estados Unidos da América) e a pureza medida através da razão de absorbância 260 nm/280 nm. Uma razão igual a 1,8 ($\pm 0,5$) foi necessária para continuar o processamento.

A amplificação do gene 16s rRNA ocorreu por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os *primers* universais C70 (*forward*) (5'- AGAGTTTGATYMTGGC-3') e B37 (*reverse*) (5'-TACGGYTACCTTGTTACGA-3'), segundo Fox et al. (1995). A PCR foi realizada no termociclador Veriti, sob as seguintes condições: um estágio inicial de desnaturação a 95° C por 15 minutos foi conduzido, seguido por 35 ciclos, compostos por uma etapa de desnaturação a 95°C por 1 minuto, uma segunda etapa de anelamento dos *primers* a 58°C por 45 segundos e uma terceira etapa de extensão a 72°C por 1 minuto, além de um estágio final de alongação a 72° C por 15 minutos. Esse método foi seguido de eletroforese em gel de agarose para verificar a amplificação do gene 16S rRNA. Em seguida, foi realizada a purificação do produto da PCR utilizando o AMPure XP (Beckman Coulter, EUA) para que fosse possível realizar o sequenciamento.

A preparação para o sequenciamento teve início com a amplificação do DNA no termociclador Veriti, utilizando os mesmos *primers* da PCR anterior, porém com o auxílio do Kit BigDye™ Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems, EUA) e com as seguintes condições de PCR: estágio inicial a 96°C por 1 minuto, seguido de um estágio composto por 30 ciclos de 96°C por 15 segundos, uma segunda etapa a 50°C por 15 segundos e uma terceira etapa a 60°C por 4 minutos. Após esse passo, as amostras foram precipitadas com o auxílio de isopropanol 65% e etanol 60%. O passo de precipitação foi seguido pelo sequenciamento propriamente dito das amostras no analisador genético ABI 3500 (Applied Biosystems, EUA), onde os fluoróforos representantes de cada dideoxinucleotídeo são detectados e montados em sequência. As sequências (*forward* e *reverse*) foram editadas no BioEdit, formando os *contigs* para blastagem no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). O limite fixado para a identificação de espécies bacterianas foi de 97% de semelhança para o gene 16S rRNA (Nguyen et al., 2016; Vermeulen et al., 2016; Větrovský and Baldrian, 2013).

4.2.CURVAS DE CRESCIMENTO

As curvas de crescimento dos isolados de *E. tarda* e *Chryseobacterium* sp. foram estabelecidas para permitir sua coleta no tempo em que atingir, aproximadamente, 10⁸ UFC/mL. Para tanto, cada uma das cepas bacterianas foi descongelada e plaqueada em TSA sob temperatura de incubação correspondente a 28°C. Após o crescimento, uma colônia de cada espécie bacteriana foi inoculada em caldo BHI e incubado a 28°C sob baixa agitação (100 rpm). O crescimento de cada cepa bacteriana foi acompanhado ao longo do tempo por mensurações da densidade ótica em espectrofotômetro (600 nm) até

que atingisse valor próximo a um, e por plaqueamentos de diluições seriadas da suspensão bacteriana, para determinar a densidade bacteriana em UFC/mL. Para *S. agalactiae* e *F. orientalis* esses dados foram estabelecidos em estudos anteriores (Pereira et al., 2019; Pereira et al., 2010).

4.3. PEIXES E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Os experimentos *in vivo* foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sob o número 378/2019 para os ensaios utilizando *S. agalactiae* e *F. orientalis* e sob o número 152/2020 para as infecções que fazem uso de *E. tarda* e *Chryseobacterium* sp. Foram utilizados 38 juvenis de tambaqui oriundos do Laboratório de Aquicultura da UFMG e pesando, em média, 51,69 g ($\pm 16,07$). Após a chegada ao laboratório, os animais passaram por um período de aclimação de 15 dias. A fim de assegurar a ausência de infecções bacterianas no lote, seis peixes foram eutanasiados por overdose em benzocaína (300mg/L) para análise bacteriológica de cérebro, rim, fígado, baço e músculo em TSA e ágar Hsu-Shotts (MHS). O estudo foi constituído por seis grupos experimentais, sendo cinco grupos compostos por seis tambaquês e um composto por dois tambaquês. Esses animais foram mantidos em aquários de 60 L com renovação de 50% da água a cada 48 h e aeração constante. O alimento foi ofertado duas vezes ao dia até saciedade aparente com ração peletizada comercial contendo 32% de proteína bruta. Nesse ensaio experimental foram usados dois grupos controle, um (Controle BHI) para limitar os efeitos da temperatura à 28°C e do BHI como inóculo, utilizados nos grupos ED, CHRY e SA, e outro (Controle MMH), para limitar os efeitos da temperatura à 22°C e do MMH (caldo Muller-Hinton cátion ajustado suplementado com 1% de VX e 1% de glicose) como inóculo, utilizados no grupo FNO (Tabela 2).

Tabela 2 – Descrição dos grupos experimentais.

Grupo	Número de peixes	Temperatura da água	Inóculo
Controle BHI	6	28°C	BHI estéril
Grupo ED	6	28°C	<i>Edwardsiella tarda</i> + BHI
Grupo CHRY	6	28°C	<i>Chryseobacterium</i> sp. + BHI
Grupo SA	6	28°C	<i>Streptococcus agalactiae</i> + BHI
Controle MMH	2	22°C	MMH estéril
Grupo FNO	6	22°C	<i>Francisella orientalis</i> + MMH

4.4. INFECÇÕES EXPERIMENTAIS

Para o preparo das suspensões bacterianas (Tabela 3) cada cepa foi cultivada em TSA, com exceção de *F. orientalis* que foi cultivada em ágar cisteína-coração suplementado com 2% de hemoglobina bovina (CHAH). Em seguida, uma única colônia de cada espécie bacteriana foi transferida para caldo BHI e incubada a uma temperatura de 28°C sob baixa agitação (100 rpm), com exceção de *F. orientalis* que foi cultivada em caldo Muller-Hinton cátion ajustado (*Becton, Dickinson and Company*, Franklin Lakes, EUA) suplementado com 1% de VX (Laborclin, São Paulo, Brasil) e 1% de glicose (MMH), porém sob as mesmas condições de temperatura e agitação. O crescimento bacteriano foi acompanhado por mensurações da densidade ótica (600 nm) de cada suspensão bacteriana. A coleta ocorreu quando a densidade ótica atingiu o correspondente à concentração bacteriana de 10^8 UFC/mL, de acordo com as curvas de crescimento estabelecidas anteriormente.

Tabela 3 – Condições das suspensões bacterianas utilizadas para infecção experimental com *Edwardsiella tarda*, *Chryseobacterium* sp, *Streptococcus agalactiae* e *Francisella orientalis* em tambaqui (*Colossoma macropomum*).

Grupo	Densidade ótica (600 nm)	Densidade bacteriana (UFC/mL)
Grupo ED	0,29	$2,4 \times 10^8$
Grupo CHRY	0,21	$3,0 \times 10^8$
Grupo SA	0,20	$1,0 \times 10^8$
Grupo FNO	0,20	$3,4 \times 10^8$

Anteriormente à infecção experimental, os tambaquis foram anestesiados por imersão em solução de benzocaína a 100 mg/L. Os animais, então, receberam a injeção por via intraperitoneal com um volume de 0,1 ml de inóculo bacteriano (10^7 UFC/ peixe), BHI estéril ou MMH estéril, de acordo com o grupo experimental.

Após a infecção, os grupos ED e CHRY foram observados por 21 dias, enquanto que os grupos SA e FNO foram observados por 15 dias (quatro vezes ao dia) para registrar a ocorrência de sinais clínicos e mortes. Aqueles recém-mortos foram submetidos à necropsia seguida das análises bacteriológica e histopatológica. Ao fim do período de observação, os sobreviventes foram eutanasiados por overdose de benzocaína (300 mg/L) e submetidos às mesmas análises, a fim de determinar se eram carreadores assintomáticos.

4.5. ANÁLISE BACTERIOLÓGICA

Os animais dos grupos ED, CHRY, Controle BHI e Controle MMH necropsiados tiveram amostras de cérebro, rim, fígado e baço coletados assepticamente. Já dos animais do grupo SA foram coletados cérebro e rim, enquanto que do grupo FNO foram coletados rim e baço. Os fragmentos dos grupos ED, CHRY e SA foram estriados em TSA e MHS, enquanto que os do grupo FNO foram estriados em CHAH, seguidos de incubação a

28°C/24 horas. As amostras bacteriológicas positivas foram identificadas por MALDI-TOF, como descrito por Assis et al. (2017).

Para a identificação bacteriana em tempo real pelo MALDI-TOF, uma colônia de cada amostra foi adicionada em um poço da placa alvo utilizando um palito de madeira estéril. Em seguida, foi adicionado 1 µL de ácido fórmico a 70%, aguardada a completa secagem, adicionado 1 µL de matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA) e, novamente, aguardada a completa secagem ao ar. A placa alvo de aço polido com os isolados já preparados foi, então, inserida no Microflex LT (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) para identificação das bactérias através das proteínas ionizadas liberadas após exposição aos tiros de laser.

De acordo com as recomendações do fabricante do Microflex LT, escores ≥ 2000 representam identificação em nível de espécie, escores ≥ 1700 e ≤ 1999 representam identificação em nível de gênero e escores ≤ 1699 representam identificação não confiável. Isolados com identificação não confiável foram adicionalmente identificadas por sequenciamento do gene 16s rRNA.

4.6. ANÁLISE HISTOLÓGICA

O exame histológico foi realizado para descrição das principais lesões microscópicas causadas pelos agentes bacterianos testados. Para tanto, os peixes positivos para o isolamento bacteriano foram analisados histologicamente. Os órgãos utilizados para o exame foram cérebro, rim, fígado, baço, assim como outros órgãos que tenham apresentado lesão macroscópica induzida pelo processo infeccioso. Os órgãos foram fixados em uma solução de formalina 10% tamponada por 24 horas, e então imersos em uma solução de etanol a 70%, até utilização. Os tecidos fixados foram processados no equipamento TP1020 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) para desidratação em uma série crescente de etanol (70-100%) e diafanização em xilol. Posteriormente, os tecidos foram incluídos em parafina com o auxílio da central de inclusão EG1150 (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha).

Cortes sagitais e seriados foram realizados com espessura aproximada de 4 µm no micrótomo rotativo semiautomatizado RM2245 (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha). As secções foram coradas com hematoxilina e eosina (HE), assim como pela coloração de Gram, conforme descrito por Luna (1968). As fotos foram registradas no microscópio DM4000 B (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) com câmera digital DFC 500 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha).

5. RESULTADOS

5.1. IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS E CURVAS DE CRESCIMENTO

Os resultados do MALDI-TOF identificaram o isolado ED38 como *E. tarda* com escore igual a 2345, SA95 como *S. agalactiae* com escore igual a 2244, FNO12 como *F. orientalis* com escore igual a 2431 e CHRY004 como *Chryseobacterium* sp. com escore igual a 1909. O gene 16s rRNA do isolado CHRY004 foi sequenciado e comparado

através do BLAST, sendo obtida uma cobertura de 100% e similaridade de 99,6% para *Chryseobacterium* sp.

As curvas de crescimento para ED38 e CHRY004 foram estabelecidas e estão demonstradas nos gráficos 1 e 2.

Gráfico 1 – Curva de crescimento do isolado ED38, *E. tarda*.

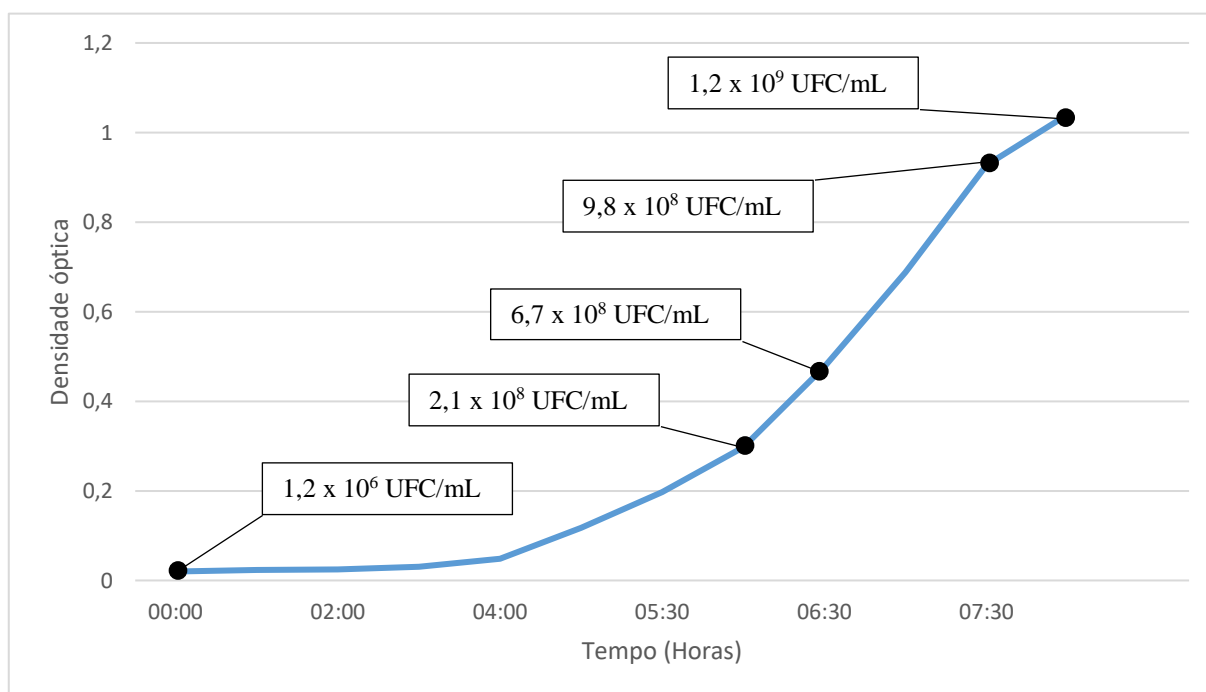
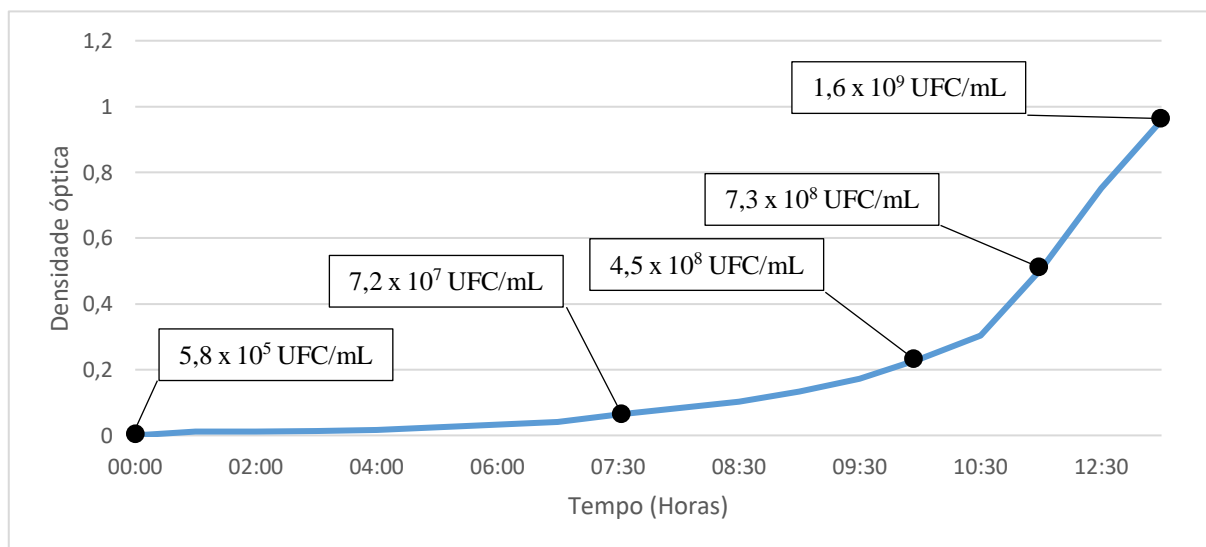


Gráfico 2 – Curva de crescimento do isolado CHRY004, *Chryseobacterium* sp.



5.2.RESULTADOS DOS GRUPOS CONTROLE

Os tambaquis dos grupos controle não apresentaram sinais clínicos ou mortalidade. A normorexia foi restabelecida no dia seguinte à injeção intraperitoneal. Não houve crescimento bacteriano ou alterações histológicas nos órgãos internos desses animais (Figura 1).

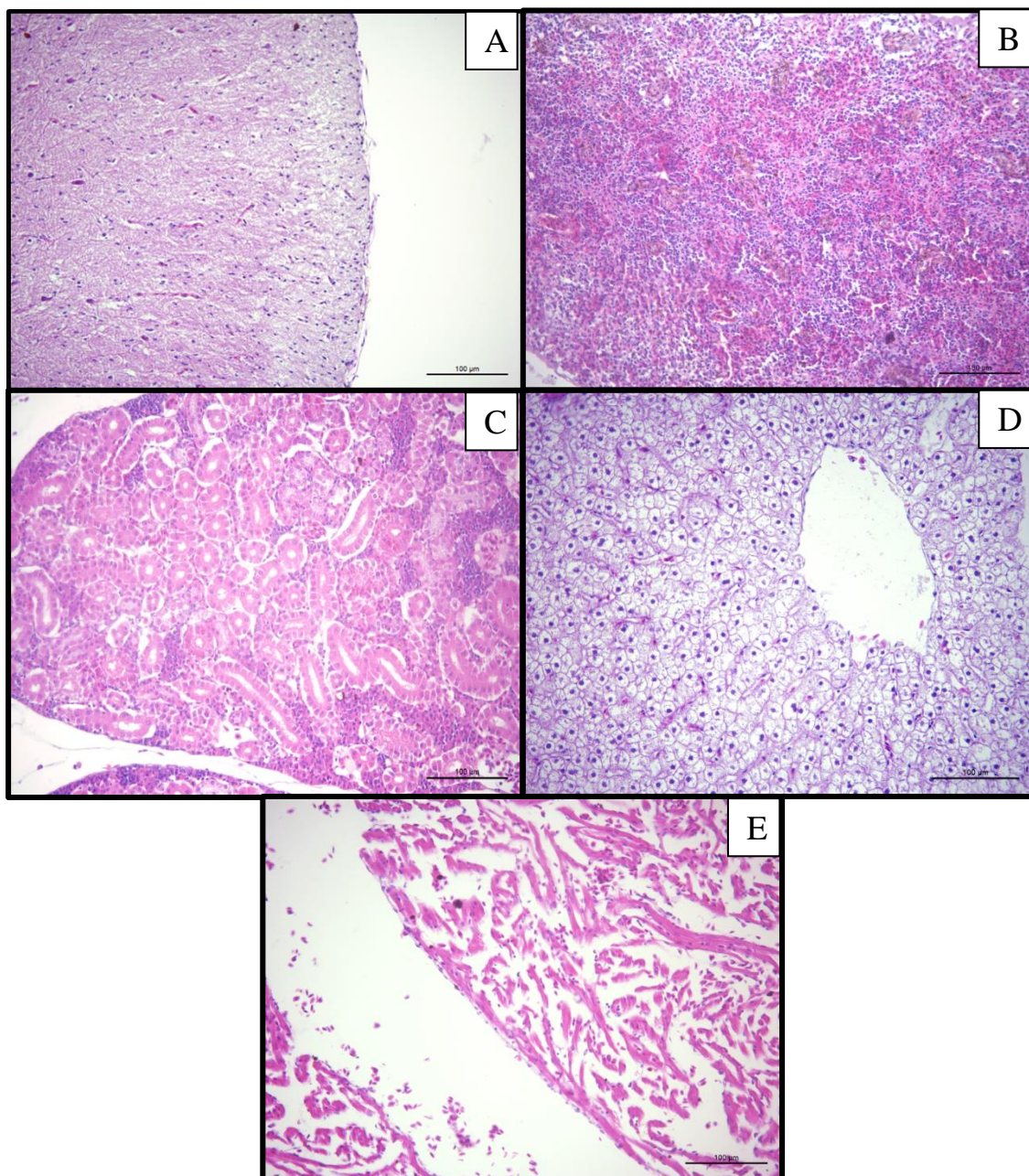


Figura 1 – Imagens histológicas de órgãos de tambaquis (*C. macropomum*) saudáveis. Cérebro (A), baço (B), rim (C), fígado (D) e coração (E) de tambaqui sem alterações histológicas. Coloração de HE. Aumento de 20x.

5.3.PATOGENICIDADE DE *E. tarda* PARA TAMBAQUI (GRUPO ED)

Os animais não apresentaram sinais clínicos e não se alimentaram no primeiro dia pós-infecção (dpi). Além disso, não foram observadas mortes durante o período experimental. Na necropsia, dois animais apresentaram esplenomegalia, além de áreas multifocais a coalescentes esbranquiçadas arredondadas e milimétricas na superfície e ao corte do baço e rim (Figura 2). *E. tarda* foi reisolada de cinco dos seis peixes infectados. Quando considerados os órgãos afetados, *E. tarda* foi isolada do baço de três animais, fígado de outros três animais e rim de um animal (Tabela 4). Não ocorreu reisolamento de *E. tarda* a partir de cérebro de nenhum dos peixes (Tabela 4). *Paenibacillus glucanolyticus* também foi isolado de rim de um tambaqui.



Figura 2 - Achados de necropsia encontrados em juvenis de tambaqui (*C. macropomum*) infectados experimentalmente com *Edwardsiella tarda*. Áreas multifocais a coalescentes levemente esbranquiçadas arredondadas e milimétricas (setas brancas) por toda a superfície e ao corte de baço (A) e rim (B).

Os animais com reisolamento de *E. tarda* (cinco animais), apresentaram inflamação granulomatosa multifocal. No baço e no fígado dos cinco animais foram observados numerosos granulomas multifocais constituídos por infiltrado, predominantemente, de macrófagos epitelióides com raros linfócitos e, por vezes, com interior contendo restos celulares e material amorfo eosinófilo (necrose), característico de granuloma maduro (Figura 3 – A, C e D).

No rim de um animal foram observados raros granulomas multifocais de, aproximadamente, 20 a 50 μm , constituídos por infiltrado, predominantemente, de macrófagos com raros linfócitos (Figura 3 – B).

Não foram observadas alterações histológicas no cérebro.

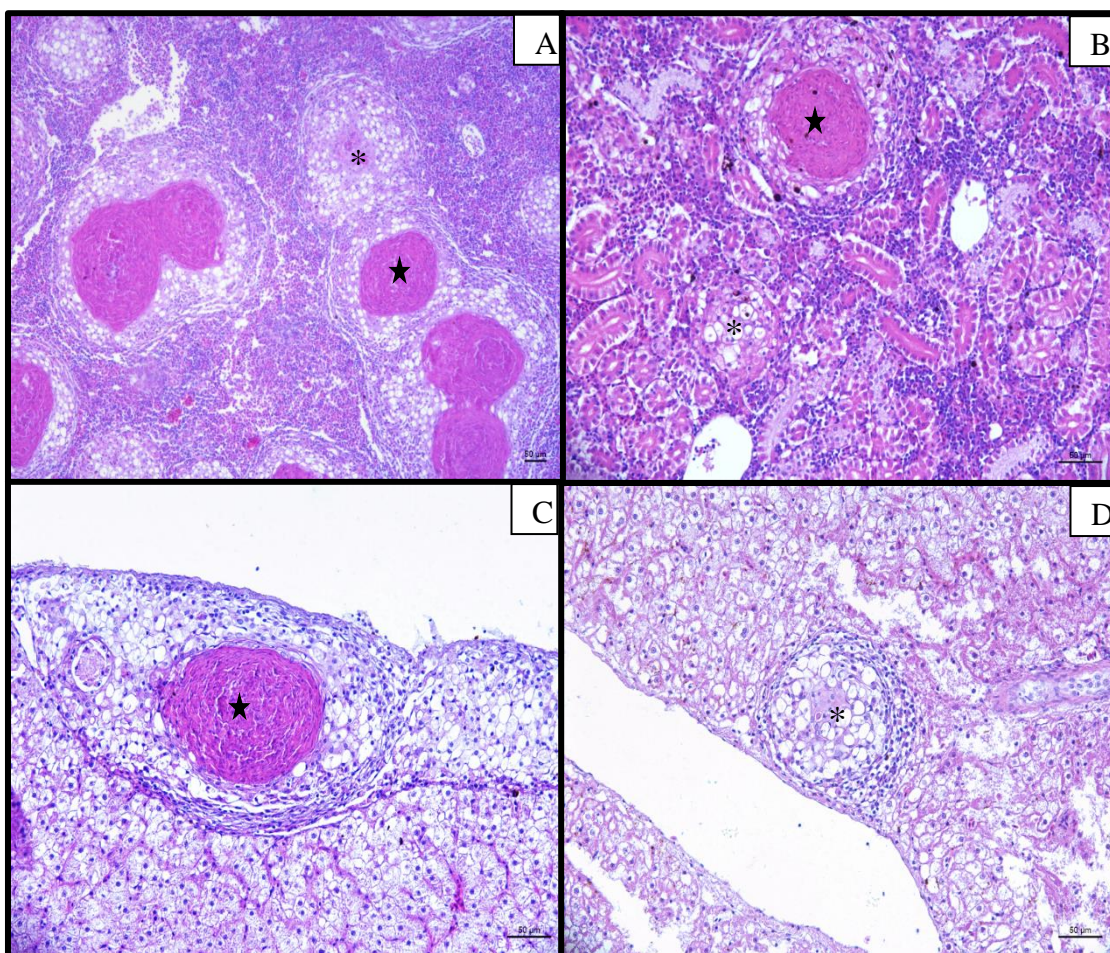


Figura 3 - Imagens histológicas de órgãos de tabaqui (*C. macropomum*) infectado experimentalmente por *E. tarda* (ED38). Baço (A), rim (B) e fígado (C e D). Granuloma maduro (estrela); Granuloma imaturo (asterisco). Coloração de HE. Aumento de 10x: Figura 3 – A; Aumento de 20x: Figura 3 – B, C e D.

5.4.PATOGENICIDADE DE *Chryseobacterium* sp. PARA TAMBAQUI (GRUPO CHRY)

Os animais do grupo CHRY não apresentaram sinais clínicos de infecção durante o período experimental. No entanto, não se alimentaram até três dpi. Também não foram observadas mortes ou isolamento bacteriano a partir dos tabaquis desse grupo (Tabela 4).

Tabela 4 - Sinais clínicos, achados de necropsia, reisolamento bacteriano e alterações histológicas desenvolvidas por tambaquis infectados por *E. tarda*, *Chryseobacterium* sp., *S. agalactiae* e *F. orientalis*.

Isolado	Peixe	Sinais clínicos	Achados de necropsia	Reisolamento bacteriano				Alterações histológicas			
				Cérebro	Rim	Fígado	Baço	Cérebro	Rim	Fígado	Baço
<i>E. tarda</i>	1	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+
	2	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+
	3	-	-	-	*	+	-	-	+	+	+
	4	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
	5	-	-	-	-	-	-	Não processado			
	6	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>Chryseobacterium</i> sp.	1	-	-	-	-	-	-	Não processado			
	2	-	-	-	-	-	-	Não processado			
	3	-	-	-	-	-	-	Não processado			
	4	-	-	-	-	-	-	Não processado			
	5	-	-	-	-	-	-	Não processado			
	6	-	-	-	-	-	-	Não processado			
<i>S. agalactiae</i>	1	+	-	+*	+*	Não processado		-	-	+	+
	2	+	-	+*	+*	Não processado		+	-	-	+
	3	+	-	+	+*	Não processado		-	+	+	+
	4	+	-	+	+	Não processado		+	-	+	+
	5	-	-	+	+	Não processado		-	-	+	+
	6	-	-	-	-	Não processado		Não processado			
<i>F. orientalis</i>	1	-	-	Não processado		-	+	-	-	-	+
	2	-	-	Não processado		+	+	-	-	+	-
	3	-	-	Não processado		-	+	-	+	+	-
	4	-	-	Não processado		+	+	-	-	+	+
	5	-	-	Não processado		+	-	-	-	+	-
	6	-	+	Não processado		-	+	-	+	+	-

Positivo (+). Negativo (-). Isolamento de bactéria diferente da inoculada (*). Positivo com adicional isolamento de bactéria diferente da inoculada (+*).

5.5.PATOGENICIDADE DE *S. agalactiae* PARA TAMBAQUI (GRUPO SA)

No grupo infectado por *S. agalactiae*, quatro tambaquis apresentaram-se letárgicos, além de não se alimentarem a partir do primeiro dpi. No segundo dpi, cinco animais morreram (83,3%) (Figura 4) e foram submetidos à necropsia, não sendo observadas alterações macroscópicas. Já com relação à análise bacteriana, foi obtido isolamento de *S. agalactiae* tanto de cérebro como de rim dos cinco peixes que morreram do grupo SA. Além de *S. agalactiae*, *Plesiomonas shigelloides* foi isolada de rim de três animais e cérebro de um animal, assim como *Aeromonas* sp foi isolada de cérebro de um animal desse grupo (Tabela 4).

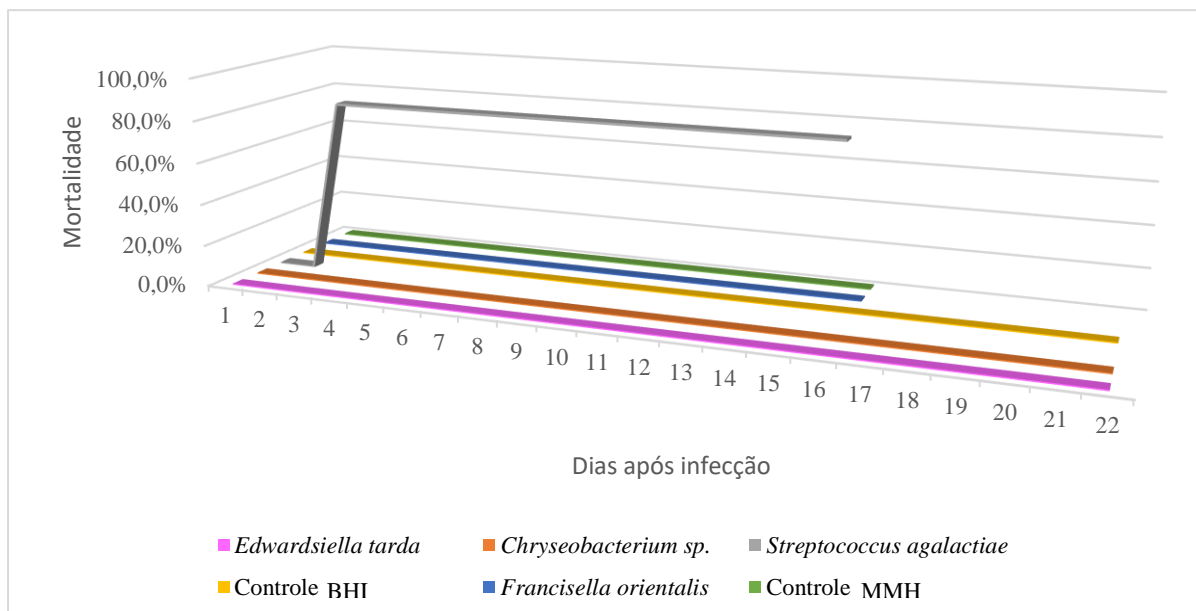


Figura 4 – Curvas de mortalidade cumulativa dos grupos de tabaquais infectados com *Edwardsiella tarda*, *Chryseobacterium sp.*, *Streptococcus agalactiae* e *Francisella orientalis*.

Os animais dos quais *S. agalactiae* foi isolada (cinco), apresentaram inflamação neutrofílica e fibrinonecrótica. Os baços de todos os animais apresentavam áreas multifocais com perda da arquitetura do parênquima e substituição por restos celulares e material eosinófilo amorfo (necrose e fibrina), além de numerosos macrófagos e neutrófilos. Em alguns desses focos, foram observados agregados de bactérias cocoides basofílicas de, aproximadamente, 1µm de diâmetro. Em algumas regiões, a cápsula esplênica apresentou-se intensamente espessada devido a deposição de material eosinófilo fibrinoso, infiltrado inflamatório discreto de neutrófilos e agregados bacterianos, constituídos de cocos basófilos semelhantes aos encontrados no parênquima do órgão. Dois animais também apresentaram acúmulo de material eosinófilo amorfo (trombo de fibrina) com agregados de bactérias cocoides basofílicas medindo, aproximadamente, 1µm de diâmetro, no lúmen dos vasos sanguíneos esplênicos (Figura 5 – A e B). A coloração de Gram evidenciou a presença das bactérias Gram positivas em meio a essas lesões no parênquima e nos trombos de fibrina.

Os encéfalos de dois animais apresentaram as seguintes alterações: no parênquima, foi observada a presença de raros vasos sanguíneos moderadamente dilatados com agregado de bactérias cocoides basofílicas de, aproximadamente, 1µm de diâmetro. Enquanto que um animal apresentou, na meninge, vasos sanguíneos com acúmulo de material eosinófilo amorfo (trombo de fibrina) e agregados de bactérias cocoides basofílicas de 1µm de diâmetro, além de áreas multifocais de infiltrado inflamatório, predominantemente, mononuclear com material eosinófilo fibrinoso (Figura 5 - C e D).

No fígado e no coração de três animais foram observadas: áreas multifocais aleatórias com infiltrado de raros neutrófilos e macrófagos, por vezes, com agregados bacterianos constituídos de cocos basofílicos de, aproximadamente, 1 μm de diâmetro (Figura 5 – F). Ocasionalmente, próximo ao pâncreas e no rim de um animal foi observada dilatação de vasos sanguíneos devido à presença de bactérias cocoides basofílicas de, aproximadamente, 1 μm de diâmetro (Figura 5 - E).

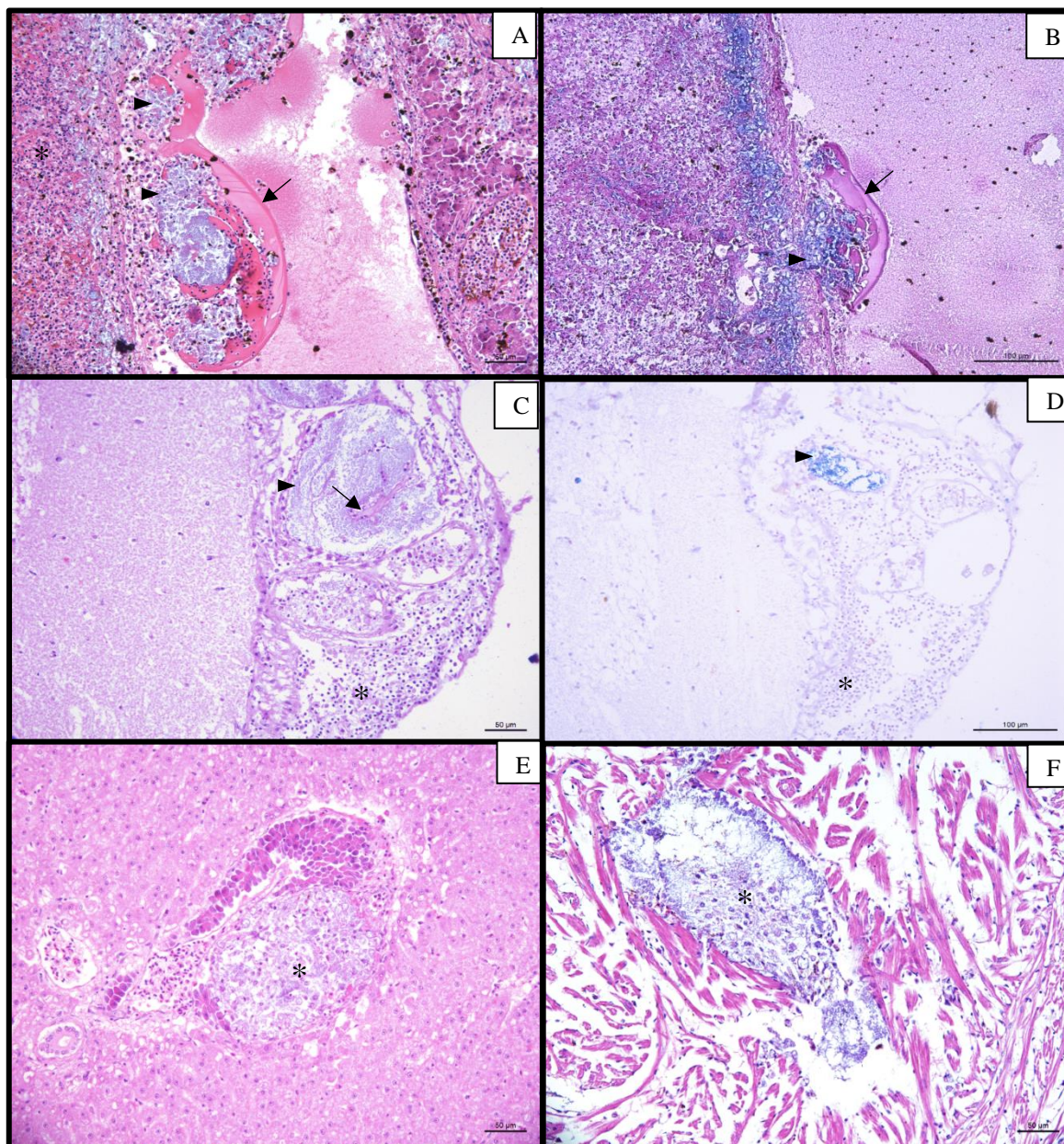


Figura 5 - Imagens histológicas de órgãos de tambaqui (*C. macropomum*) infectado experimentalmente por *S. agalactiae* (SA95). Baço (A e B), cérebro (C e D), fígado (E) e coração (F). Figura 5-A, C, E e F: Coloração de HE; Figura 5 – B e D: Coloração de Gram. Material fibrinoso aderido à parede de um vaso sanguíneo e o ocluindo parcialmente (setas); Agregado de bactérias (cabeças de seta); Infiltrado inflamatório (asterisco). Aumento de 40x: Figura 5-A; Aumento de 20x: Figura 5-B, C, D, E e F.

5.6.PATOGENICIDADE DE *F. orientalis* PARA TAMBAQUI (GRUPO FNO)

Os peixes do grupo FNO não apresentaram sinais clínicos de infecção. No entanto, houve sobra de ração em todos os momentos em que esta foi ofertada. Apesar disso, não foram observadas mortes durante todo o período experimental. Esplenomegalia foi observada em um dos peixes durante a necropsia. Já com relação à análise bacteriana, foi observado crescimento de *F. orientalis* em todos os peixes desse grupo. Foi possível isolar *F. orientalis* tanto de baço (cinco animais) como de rim (três animais) dos tambaquis desse grupo (Tabela 4).

Os animais do grupo FNO apresentaram inflamação granulomatosa multifocal. No baço de dois tambaquis infectados com *F. orientalis* foram observados numerosos granulomas multifocais de aproximadamente 100 µm de diâmetro, constituídos por infiltrado, predominantemente, de macrófagos epitelióides e raros linfócitos. (Figura 3 – A).

No fígado (cinco animais) e no rim (dois animais) foram observados ocasionais granulomas multifocais de, aproximadamente, 20 µm a 50 µm de diâmetro, constituídos por infiltrado, predominantemente, de macrófagos epitelióides e raros linfócitos.

No encéfalo dos tambaquis infectados experimentalmente por *F. orientalis* não foram observadas alterações histológicas.

Em geral, as lesões granulomatosas encontradas nos animais do grupo FNO não possuíam centro necrótico.

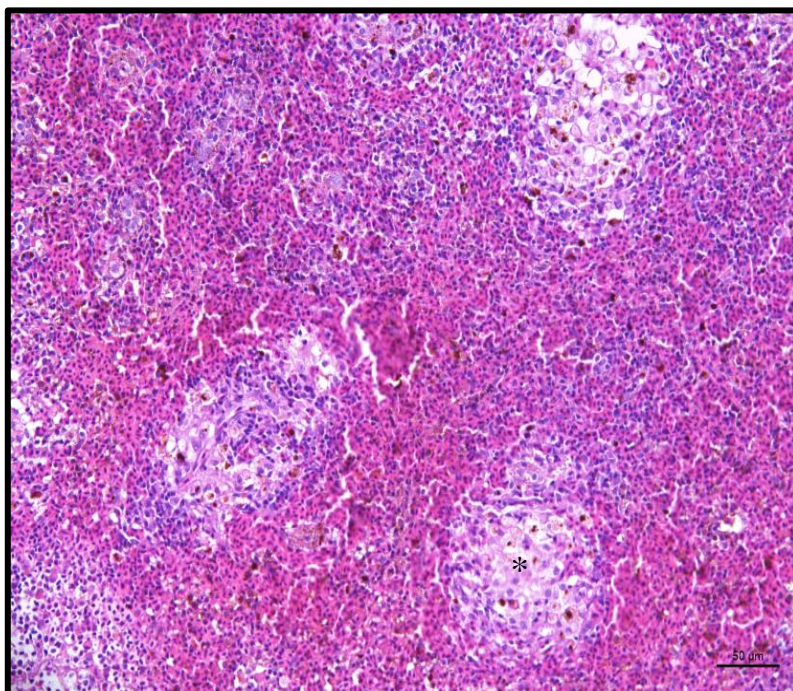


Figura 6 - Imagem histológica de baço de tambaqui (*C. macropomum*) infectado experimentalmente por *F. orientalis* (FNO12). Coloração de HE. Granuloma (asterisco). Aumento de 20x.

6. DISCUSSÃO

A patogenicidade de isolados de *S. agalactiae*, *E. tarda* e *F. orientalis* para *C. macropomum* foi demonstrada. Apesar da metodologia empregada para a avaliação de suscetibilidade ser a mesma para todos os grupos experimentais, apenas as interações de *E. tarda* e *Chryseobacterium* sp. com o tambaqui foram avaliadas quanto ao postulado de Koch nesse estudo, uma vez que essas cepas foram originalmente isoladas de indivíduos da mesma espécie, *C. macropomum*. Nesse sentido, esse estudo demonstra que o postulado de Koch foi cumprido para a interação de *E. tarda* com tambaqui. Até a finalização da redação desse estudo, *Aeromonas hydrophila* era a única bactéria com patogenicidade demonstrada, através de comprovação experimental (postulado de Koch) para essa espécie de peixe (Gallani et al., 2020).

Para as interações do tambaqui com *S. agalactiae* e com *F. orientalis*, que foram originalmente isoladas de tilápias do Nilo, a mesma lógica científica utilizada por Koch foi empregada, porém, como essas bactérias foram testadas em uma espécie de peixe diferente da espécie do hospedeiro original, o postulado de Koch não pôde ser aplicado. Nesse sentido, a suscetibilidade, em condições experimentais, de *C. macropomum* a *S. agalactiae* e a *F. orientalis* foi demonstrada nesse estudo.

Apesar da ausência de sinais clínicos e mortalidade nos tambaquis infectados por *E. tarda*, o reisolamento em cultura pura ocorreu, assim como, o desenvolvimento de infecção granulomatosa multifocal detectada por análise histológica, constatando que esses isolados exercem efeito patogênico em *C. macropomum*. Estudos anteriores indicam a capacidade de evasão dessa bactéria do sistema imune (Cheng et al., 2017; Li et al., 2015; Li et al., 2019), assim como sua persistência dentro de macrófagos (Qin et al., 2017), o que pode explicar a ausência de sinais clínicos e mortes, apesar da presença de alterações histopatológicas.

Wang et al. (2020) fizeram uso de três doses infectantes diferentes em cavalos marinhos (*Hippocampus erectus*), 1×10^4 UFC/peixe, 1×10^6 UFC/peixe e 1×10^8 UFC/peixe, sendo observados sinais clínicos nos três grupos experimentais, enquanto que mortes (67,5%) foram observadas apenas no grupo de maior dose. Em estudos posteriores, o emprego de mais grupos experimentais testando diferentes densidades bacterianas de *E. tarda* no inóculo injetado em tambaquis pode contribuir para o estabelecimento de uma relação dose-efeito. Além disso, sabe-se que fatores ambientais, como alta temperatura, alta densidade de estocagem, alta quantidade de matéria orgânica, baixo teor de oxigênio e alta concentração de amônia podem predispor para a ocorrência de infecções por *E. tarda* (Benli e Yildiz, 2004; Uhland et al., 2000), mas em tambaqui a correlação desses fatores com a doença ainda não foi estabelecida.

Além disso, em nossos estudos com tambaqui, *E. tarda* foi responsável pela indução de inflamação granulomatosa multifocal, que também foi observada em tilápias e pargo japonês (*Pagrus major*) (Miyazaki e Kaige, 1985), mas que difere das lesões histológicas encontradas em linguado japonês (*Paralichthys olivaceus*) (inflamação supurativa em rim e fígado), bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) (inflamação necrosante

em rim, fígado e baço) e em cavalo marinho (enterite) (Darwish et al., 2000; Miyazaki e Kaige, 1985; Wang et al., 2020). A inflamação granulomatosa em tilápia e pargo japonês, que é precedida pela infiltração de macrófagos, é capaz de encerrar as células de *E. tarda* e dessa forma deter sua disseminação, levando a uma maior eficiência na redução da densidade bacteriana, quando comparada com a inflamação supurativa desenvolvida por linguado japonês, onde o crescimento bacteriano supera a atividade bactericida dos macrófagos e neutrófilos (Miyazaki and Kaige, 1985).

Os resultados de nossos estudos contribuem para a inclusão do tambaqui ao já conhecido vasto espectro de hospedeiros de *E. tarda*.

O grupo de tambaquis infectados experimentalmente por *Chryseobacterium* sp. (CHRY004) não demonstraram suscetibilidade à bactéria. Sebastião et al. (2019) conduziram infecções experimentais utilizando cinco isolados de *Chryseobacterium* spp. (recuperadas de peixes apresentando sinais clínicos) em três potenciais hospedeiros diferentes, truta arco-íris (*Onchorhynchus mykiss*), truta marrom (*Salmo trutta*) e esturjão branco (*Acipenser transmontanus*), e, de forma semelhante aos nossos resultados, não conseguiram cumprir o postulado de Koch.

Em estudos comparativos entre diferentes métodos de identificação o sequenciamento do gene 16s rRNA tem sido utilizado como referência (Lin et al., 2018, 2017). No presente estudo e no estudo realizado por Sebastião et al. (2019), a identificação dos isolados de *Chryseobacterium* spp. através do sequenciamento do gene 16s rRNA não foi definitiva, mas segundo Sebastião et al. (2019), alguns dos seus isolados podem representar *Chryseobacterium* spp. ainda não descritas. A identificação de novas espécies de *Chryseobacterium* têm sido realizada através de estudos polifásicos, que comparam os resultados de diversos métodos de identificação, incluindo filogenia por sequenciamento do gene 16s rRNA, mas também hibridização DNA-DNA *in silico*, análise de identidade nucleotídica média (ANI) em genômica, análise de éster metílico de ácidos graxos (FAME), análise fisiológica, análise quimiotaxonômica e análise bioquímica (Oh et al., 2020; Chaudhary et al 2021; Indu et al., 2020; Lee et al., 2020).

Dentre os isolados bacterianos testados nesse estudo, *S. agalactiae* foi o único que induziu mortalidade nos tambaquis, com a taxa de mortalidade atingindo 83,33% no segundo dpi. Resultados similares foram encontrados em tilápias infectadas experimentalmente por *S. agalactiae* em densidade bacteriana próxima a 1×10^7 UFC/peixe por injeção intraperitoneal. Esses resultados de mortalidade variam de 90% a 100% com a maioria das mortes ocorrendo em até três dpi (Mian et al., 2009; Pereira et al., 2010; Soto et al., 2016). Sendo assim, a suposição de que as principais estratégias patogênicas de *S. agalactiae* são proliferação massiva e progressão severa das lesões nos órgãos alvos aparentam, também, ser válidas para tambaqui (Iregui et al., 2016).

Paixão et al. (2017) utilizaram a dose de 10^5 UFC/peixe para infectar tambaqui o que levou a indução de hiporexia, apesar da ausência de mortes, que pode ter decorrido do uso de uma cepa de *S. agalactiae* originária de humano saudável. SA95 é uma cepa de *S. agalactiae* originária de tilápia apresentando sinais clínicos e que possui dose letal

mediana já estabelecida para seu hospedeiro original ($2,4 \times 10^4$ UFC) (Oliveira et al., 2018). Sendo assim, o uso de dose menor à utilizada no presente estudo tem o potencial de induzir uma doença de progressão mais próxima ao observado para tilápias em condições naturais.

Apesar da progressão da doença induzida por *S. agalactiae* em tambaqui ter sido severa ao ponto de não serem observados sinais clínicos mais consistentes, além de letargia e anorexia, as lesões histopatológicas indicaram a ocorrência de inflamação neutrofílica e fibrinonecrótica em baço, cérebro, fígado e coração, além de meningite fibrinosa, que são semelhantes às alterações histopatológicas encontradas em outros peixes infectados pela bactéria (Iregui et al., 2016; Owatari et al., 2020; Palang et al., 2020; Soto et al., 2016, 2015c).

A análise bacteriológica realizada nesse estudo levou ao isolamento de outras bactérias não utilizadas nos ensaios de infecção: *Paenibacillus glucanolyticus*, *Pseudomonas shigelloides* e *Aeromonas* sp. No entanto, todas essas bactérias são ubíquas em água doce e, apesar de *P. shigelloides* e *Aeromonas* sp. possuírem potencial patogênico para peixes, seu isolamento de tambaquis mortos por *S. agalactiae*, provavelmente, está associado ao processo de invasão *postmortem* ao tecido do peixe (Janda et al., 2016; Rather et al., 2019; Silveira, 2003).

Inflamação granulomatosa, observada nos tambaquis infectados por *F. orientalis*, (FNO12) é comumente relatada em infecções por *F. orientalis* em outros peixes (Colquhoun e Duodu, 2011). Carpa comum (*Cyprinus carpio*) e panga (*Pangasianodon hypophthalmus*) infectados experimentalmente por *F. orientalis* também não desenvolveram sinais clínicos ou mortalidade, mas em contraste com o observado em tambaqui, *F. orientalis* não foi reisolada e não induziu alterações histopatológicas, não demonstrando patogenicidade para esses peixes (Dong et al., 2016). Já em tilápia do Nilo, perca gigante (*Lates calcarifer*) e achigã (*Micropterus salmoides*), *F. orientalis* induziu taxas de mortalidade iguais a 100%, 64,28% e 21,42%, respectivamente, taxas de reisolamento bacteriano iguais a 82,71%, 35,71% e 21,42%, assim como sinais clínicos e alterações histopatológicas características (Poudyal et al., 2020). Sendo assim, a infecção por *F. orientalis* aparenta desenvolver diferentes graus de patogenicidade dependendo do hospedeiro.

Sabe-se que *F. orientalis* é um patógeno capaz de sobreviver e replicar dentro de macrófagos. Essa característica foi relatada por Soto et al. (2010), onde após ser fagocitada, *F. orientalis* consegue evadir dos vacúolos fagocíticos para o citoplasma do macrófago. Esse evento, assim como a indução de apoptose para escapar do macrófago quando os nutrientes dentro dessa célula se tornam escassos, parecem estar associados com o gene que codifica para o *locus* de crescimento intracelular (*iglC*) (Soto et al., 2013), sendo, portanto, importante para a virulência de *F. orientalis*. Uma maior expressão de genes que codificam para citocinas, como TNF-alfa e IFN-gama, foi observada (Vojtech et al. 2009). Essas citocinas são responsáveis pela inibição do crescimento bacteriano e ativação da morte bacteriana através da produção de óxido nítrico nos macrófagos, que histologicamente infiltram no tecido formando o granuloma (Fortier et al., 1992). No

entanto, esse sistema pode ser inibido pelo aumento na expressão do gene *socs3*. As proteínas SOCS já foram identificadas em várias espécies de peixes (Wang et al., 2011) levando a restrição no espectro de hospedeiros de *F. orientalis*. Em nosso estudo, demonstramos, mesmo que sem a descrição dos mecanismos utilizados, que *F. orientalis* é capaz de sobreviver à ação dos macrófagos do tambaqui, visto que a recuperação dessa bactéria ocorreu em todos os animais infectados. Além disso, a ausência de áreas necróticas no interior dos granulomas pode ser em decorrência do tempo de observação experimental que, possivelmente, não permitiu a evolução das lesões.

Em nosso estudo, os tambaquis infectados por *F. orientalis* foram mantidos na temperatura de água igual a 22°C, já que temperaturas baixas parecem induzir uma maior infectividade dessa bactéria em tilápias, sendo inclusive observada dose letal mediana menor ($2,4 \times 10^{2,21}$ UFC) para tilápias mantidas a 22°C, do que para tilápias mantidas a 28°C ($1,64 \times 10^{5,74}$ UFC) (Pereira et al., 2019; Soto et al., 2012). No entanto, foi observado que *F. orientalis*, exposta a mudanças de temperatura, modula sua expressão de genes associados ao metabolismo, estresse oxidativo e a choque térmico, indicando a capacidade de adaptação da bactéria a ambas temperaturas, 22°C e 28°C (Pereira et al., 2019). Genes da ilha de patogenicidade da *Francisella* são altamente expressos em ambas temperaturas, também, sugerindo alta virulência nas temperaturas citadas (Pereira et al., 2019). Além disso, a infecção por *F. orientalis* de peixe-zebra mantido em água com temperatura igual a 28°C conseguiu induzir doença e letalidade (Brudal et al., 2014). Sendo assim, estudos posteriores avaliando a infecção por *F. orientalis* de tambaqui mantidos na temperatura de 28°C são necessários, já que essa temperatura de água é regularmente encontrada nos cultivos de tambaqui e as ilhas de patogenicidade são altamente expressas não somente a 22°C, mas também a 28°C (Pereira et al., 2019).

Em nossos estudos de infecção experimental utilizando *F. orientalis* e *E. tarda* em tambaqui, a localização das células bacterianas no corte histológico com as colorações de HE e Gram não ficou evidente. Esse problema poderia ser sanado com o uso da técnica de imunohistoquímica que consegue localizar com mais eficiência essas bactérias nos cortes histológicos permitindo o estudo de outros aspectos de sua patogenicidade, como a via de entrada no tecido, as células preferencialmente afetadas e a completa dispersão do agente através do tecido considerando o tempo de infecção (Darwish et al., 2000; Poudyal et al., 2020; Soto et al., 2012; Wang et al., 2020).

7. CONCLUSÃO

Sendo assim, aqui demonstramos que, sob condições experimentais, *E. tarda*, originalmente isolada de tambaqui, assim como *S. agalactiae*, e *F. orientalis*, originalmente isoladas de tilapia do Nilo, são agentes patogênicos para *C. macropomum*. Enquanto isso, *Chryseobacterium* sp., em condições experimentais, não demonstrou capacidade patogênica para tambaqui. O conhecimento de novos microrganismos aos quais o tambaqui é suscetível é o gatilho inicial para o surgimento de uma sequência de

perguntas científicas importantes para o desenvolvimento sustentável da cadeia produtiva.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, T.J., SARKER, S., DASH, G., PATRA, A., ADIKESAVALU, H. *Chryseobacterium* sp. PLI2 and *Aeromonas hydrophila* co-infection in pacu, *Piaractus brachypomus* (Cuvier, 1817) fries cultured in West Bengal, India. **Aquaculture**, v. 473, p. 223–227, 2017.
- AGUIAR, L.S., DE OLIVEIRA, M.I.B., DE MATOS, L.V., GOMES, A.L.S., DA COSTA, J.I., DA SILVA, G.S. Distribution of the acanthocephalan *Neoechinorhynchus buttnerae* and semiquantitative analysis of histopathological damage in the intestine of tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Parasitol. Res.**, v. 117, n. 6, 1689–1698, 2018.
- ALCAIDE, E., HERRAIZ, S., ESTEVE, C. Occurrence of *Edwardsiella tarda* in wild European eels *Anguilla anguilla* from Mediterranean Spain. **Dis. Aquat. Organ.**, v. 73, n. 1, p. 77–81, 2006.
- ALEXANDRINO, A.C., OKUMURA, M.P.M., BALDASSI, L., TABATA, Y.A., PAULI, A.O.S. DE, ARAUJO, A.P. DE, ROSA, M.B. Ocorrência de infecção por *Edwardsiella tarda* Em truta arco-iris (*Oncorhynchus mykiss*) em cultivo intensivo. **Bol. do Inst. Pesca**, v. 25, p. 121–123, 1999.
- AMAL, M.N.A., ZAMRI-SAAD, M. Streptococcosis in Tilapia (*Oreochromis niloticus*): A Review. **Pertanika J. Trop. Agric. Sci.**, v. 34, n. 2, p. 195–206, 2011.
- AMAL, M.N.A., ZARIF, S.T., SUHAIBA, M.S., AIDIL, M.R.M., SHAQINAH, N.N., ZAMRI-SAAD, M., ISMAIL, A. The effects of fish gender on susceptibility to acute *Streptococcus agalactiae* infection in Javanese medaka *Oryzias javanicus*. **Microb. Pathog.**, v. 114, p. 251–254, 2018.
- AMANDI, A., HIU, S.F., ROHOVEC, J.S., FRYER, J.L. Isolation and characterization of *Edwardsiella tarda* from fall chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 43, n.6, p. 1380–1384, 1982.
- 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. **Front. Microbiol.**, v. 8, n. 1492, p. 1-12, 2017.
- BALDISSERA, M.D., SOUZA, C.F., PARMEGGIANI, B.S., SANTOS, R.C.V., LEIPNITZ, G., MOREIRA, K.L.S., DA ROCHA, M.I.U.M., DA VEIGA, M.L., BALDISSEROTTO, B. *Streptococcus agalactiae* impairs cerebral bioenergetics in experimentally infected silver catfish. **Microb. Pathog.**, v. 111, p. 28–32, 2017
- BANDEIRA JUNIOR, G., DE FREITAS SOUZA, C., DESCOVI, S.N., ANTONIAZZI, A., CARGNELUTTI, J.F., BALDISSEROTTO, B. *Aeromonas hydrophila* infection in silver catfish causes hyperlocomotion related to stress. **Microb. Pathog.**, v. 132, p. 261–265, 2019.
- 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. **Sci. Rep.**, v. 7, n. 13538, p. 1-10, 2017.
- BAUMGARTNER, W.A., FORD, L., HANSON, L. Lesions caused by virulent *Aeromonas hydrophila* in farmed catfish (*Ictalurus punctatus* and *I. punctatus* × *I. furcatus*) in Mississippi. **J. Vet. Diagnostic Investig.**, v. 29, n. 5, p. 747–751, 2017.

- BAYA, A.M., LUPIANI, B., HETRICK, F.M., ROBERSON, B.S., LUKACOVIC, R., MAY, E., POUKISH, C. Association of *Streptococcus* sp. with fish mortalities in the Chesapeake Bay and its tributaries. **J. Fish Dis.**, v. 13, n. 3, p. 251–253, 1990.
- BENLI, A. C. K.; YILDIZ, H. Y. Blood parameters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) spontaneously infected with *Edwardsiella tarda*. **Aquaculture Research**, v. 35, n. 14, p. 1388-1390, 2004.
- BERNARDET, J., VANCANNEYT, M., MATTE-TAILLIEZ, O., GRISEZ, L., TAILLIEZ, P., BIZET, C., NOWAKOWSKI, M., KEROUAULT, B., SWINGS, J. Polyphasic study of *Chryseobacterium* strains isolated from diseased aquatic animals. **Syst. Appl. Microbiol.**, v. 28, n. 7, p. 640–660, 2005.
- BIRKBECK, T.H., FEIST, S.W., VERNER - JEFFREYS, D.W. Francisella infections in fish and shellfish. **J. Fish Dis.**, v. 34, n. 3, p. 173–187, 2011.
- BLANCH, A.R., PINTÓ, R.M., JOFRE, J.T. Isolation and characterization of an *Edwardsiella* sp. strain, causative agent of mortalities in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Aquaculture**, v. 88, n. 3-4, p. 213–222, 1990.
- BOWATER, R.O., FORBES-FAULKNER, J., ANDERSON, I.G., CONDON, K., ROBINSON, B., KONG, F., GILBERT, G.L., REYNOLDS, A., HYLAND, S., MCPHERSON, G., BRIEN, J.O., BLYDE, D. Natural outbreak of *Streptococcus agalactiae* (GBS) infection in wild giant Queensland grouper, *Epinephelus lanceolatus* (Bloch), and other wild fish in northern Queensland, Australia. **J. Fish Dis.**, v. 35, n. 3, p. 173–186, 2012.
- BRISOU, J., TYSSE, C., VACHER, B. Etude de trois souches microbiennes de la famille des Pseudomonadaceae dont la synergie provoque une maladie de caractere septicemique chez les poissons blancs de la Dordogne, du Lot et de leurs affluents. **Ann. Inst. Pasteur**, v. 96, p. 689–696, 1959.
- BRUDAL, E.; ULANOVA, L. S; LAMPE, E. O.; RISHOVD, A.; GRIFFITHS, G.; WINTHER-LARSEN, H. C. Establishment of Three *Francisella* Infections in Zebrafish Embryos at Different Temperatures. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 6, p. 2180-2194, 2014.
- 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. **Syst. Appl. Microbiol.**, v. 41, n. 1, p. 30–37, 2018.
- CAI, X.H., PENG, Y.H., WANG, Z.C., HUANG, T., XIONG, X.Y., HUANG, Y.C., WANG, B., XU, L.W., WU, Z.H. Characterization and identification of streptococci from golden pompano in China. **Dis. Aquat. Organ.**, v. 119, n. 3, p. 207–217, 2016.
- CAMUS, A.C., DILL, J.A., MCDERMOTT, A.J., CLAUSS, T.M., BERLINER, A.L., BOYLAN, S.M., SOTO, E. *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* infection in Indo-Pacific reef fish entering the United States through the ornamental fish trade. **J. Fish Dis.**, v. 36, n. 7, p. 681–684, 2013.
- CARREON, M.M. *Francisella noatunensis orientalis* em tilápias do nilo cultivadas em tanques-rede na bacia do rio araguari, MG. 2018. 69f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

- CARVALHO, E.C. **Identificação fenotípica e molecular de bactérias patogênicas associadas à criação de peixes amazônicos.** 2012. 120f. Dissertação (Mestrado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus.
- CASTRO, L. DE A., JERÔNIMO, G.T., DA SILVA, R.M., SANTOS, M.J., RAMOS, C.A., PORTO, S.M. DE A. Occurrence, pathogenicity, and control of acanthocephalosis caused by *Neoechinorhynchus buttnerae*: A review. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 29, n. 3, p. 1-7, 2020.
- CHAUDHARY, D. K.; DAHAL, R. H.; KIM, D.; KIM, J. *Chryseobacterium cheonjiense* sp. nov., isolated from forest soil. **Archives of Microbiology**, v. 203, p. 725-731, 2021.
- CHEN, S.-C., TUNG, M.-C., CHEN, S.-P., TSAI, J.-F., WANG, P.-C., CHEN, R.-S., LIN, S.-C., ADAMS, A. Systematic granulomas caused by a rickettsia-like organism in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), from southern Taiwan. **J. Fish Dis.**, v. 17, n. 6, p. 591-599, 1994.
- CHENG, Z.; GOND, Q.; WANG, Z.; CHEN, Z.; YE, J.; LI, J.; WANG, J.; YANG, M.; LING, X.; PENG, B. *Edwardsiella tarda* Tunes Tricarboxylic Acid Cycle to Evade Complement-Mediated Killing. **Front Immunol.**, v. 8, p. 1-13, 2017.
- CHERN, R.S., CHAO, C.B. Outbreaks of a Disease Caused by Rickettsia-like Organism in Cultured Tilapias in Taiwan. **Fish Pathol.**, v. 29, n. 2, p. 61-71, 1994.
- CHIDEROLI, R.T., AMOROSO, N., MAINARDI, R.M., SUPHORONSKI, S.A., DE PADUA, S.B., ALFIERI, A.F., ALFIERI, A.A., MOSELA, M., MORALEZ, A.T.P., DE OLIVEIRA, A.G., ZANOLO, R., DI SANTIS, G.W., PEREIRA, U.P. Emergence of a new multidrug-resistant and highly virulent serotype of *Streptococcus agalactiae* in fish farms from Brazil. **Aquaculture**, v. 470, p. 45-51, 2017.
- CHONG, S.M., WONG, W.K., LEE, W.Y., TAN, Z.B., TAY, Y.H., TEO, X.H., CHEE, L.D., FERNANDEZ, C.J. *Streptococcus agalactiae* outbreaks in cultured golden pomfret, *Trachinotus blochii* (Lacépède), in Singapore. **J. Fish Dis.**, v. 40, n. 7, p. 971-974, 2017.
- CHORESCA JR., C.H.; GOMEZ, D.K.; SHIN, S.P.; KIM, J.H.; HAN, J.E.; JUN, J.W.; PARK, S.C. Molecular detection of *Edwardsiella tarda* with gyrB gene isolated from pirarucu, *Arapaima gigas* which is exhibited in an indoor private commercial aquarium. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 5, p. 848-850, 2011.
- CHU, C., HUANG, P.-Y., CHEN, H.-M., WANG, Y.-H., TSAI, I.-A., LU, C.-C., CHEN, C.-C. Genetic and pathogenic difference between *Streptococcus agalactiae* serotype Ia fish and human isolates. **BMC Microbiol.**, v. 16, n. 175, p. 1-9, 2016.
- COLQUHOUN, D.J., DUODU, S. *Francisella* infections in farmed and wild aquatic organisms. **Vet. Res.**, v. 42, n. 47, p. 1-15, 2011.
- DAROY, M.L.G., LOPEZ, J.S., TORRES, B.C.L., LOY, M.J., TUAÑO, P.M.C., MATIAS, R.R. Identification of unknown ocular pathogens in clinically suspected eye infections using ribosomal RNA gene sequence analysis. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 17, n. 5, p. 776-779, 2011.
- DARWISH, A., PLUMB, J.A., NEWTON, J.C. Histopathology and pathogenesis of experimental infection with *Edwardsiella tarda* in channel catfish. **J. Aquat. Anim. Health.**, v. 12, n. 4, p. 255-266, 2000.

- DELANNOY, C.M.J., CRUMLISH, M., FONTAINE, M.C., POLLOCK, J., FOSTER, G., DAGLEISH, M.P., TURNBULL, J.F., ZADOKS, R.N. Human *Streptococcus agalactiae* strains in aquatic mammals and fish. **BMC Microbiol.**, v.13, n. 41, p. 1-9, 2013.
- DONG, H.T., NGUYEN, V.V., KAYANSAMRUAI, P., GANGNONNGIW, W., SENAPIN, S., PIRARAT, N., NILUBOL, D., RODKHUM, C. *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* infects striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) and common carp (*Cyprinus carpio*) but does not kill the hosts. **Aquaculture**, v. 464, p.190–195, 2016.
- DUREMDEZ, R., AL-MARZOUK, A., QASEM, J.A., AL-HARBI, A., GHARABALLY, H. Isolation of *Streptococcus agalactiae* from cultured silver pomfret, *Pampus argenteus* (Euphrasen), in Kuwait. **J. Fish Dis.**, v. 27, n. 5, p. 307–310, 2004.
- EISENBERG, T., RAU, J., WESTERHÜS, U., KNAUF-WITZENS, T., FAWZY, A., SCHLEZ, K., ZSCHÖCK, M., PRENGER-BERNINGHOFF, E., HEYDEL, C., STING, R., GLAESER, S.P., PULAMI, D., VAN DER LINDEN, M., EWERS, C. *Streptococcus agalactiae* in elephants – A comparative study with isolates from human and zoo animal and livestock origin. **Vet. Microbiol.**, v. 204, p. 141-150, 2017.
- ELDAR, A., BEJERANO, Y., BERCOVIER, H. *Streptococcus shiloi* and *Streptococcus difficile*: Two new streptococcal species causing a meningoencephalitis in fish. **Curr. Microbiol.**, v. 28, p. 139–143, 1994.
- EMBRAPA. **Agentes patogênicos de tabaquis cultivados, com destaque para registros em Rio Preto da Eva, AM.** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Manaus, 2016.
- EVANS, J.J., KLESIUS, P.H., GILBERT, P.M., SHOEMAKER, C.A., AL SARAWI, M.A., LANDSBERG, J., DUREMDEZ, R., AL MARZOUK, A., AL ZENKI, S. Characterization of beta-haemolytic Group B *Streptococcus agalactiae* in cultured seabream, *Sparus auratus* L., and wild mullet, *Liza klunzingeri* (Day), in Kuwait. **J. Fish Dis.**, v. 25, n. 9, p. 505–513, 2002.
- FAISAL, M., POPP, W., RETAI, M. *Aeromonas hydrophila*-related septicemia in the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Berl Munch Tierarztl Wochenschr**, v. 102, n. 3, p. 87–93, 1989.
- FALKOW, S. Molecular Koch's postulates applied to microbial pathogenicity. **Rev. Infect. Dis.**, v. 10, n. 2, p. 274-276, 1988.
- FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2020: Sustainability in Action.** Food and Agriculture Organisation, Roma, 2020a.
- FAO. **Fishery and Aquaculture Statistics 2018.** Food and Agriculture Organisation, Roma, 2020b.
- 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. **Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.**, v. 58, n.4, p. 678-680, 2006.
- FORTIER, A. H.; POLSINELLI, T.; GREEN, S. J.; NACY, C. A. Activation of macrophages for destruction of *Francisella tularensis*: identification of cytokines, effector cells, and effector molecules. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 817–825, 1992.

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. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 2, p. 445-454, 1995.

FREDRICKS, D.N.; RELMAN, D.A. Sequence-Based Identification of Microbial Pathogens: a Reconsideration of Koch's Postulates. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, n. 1, p. 18-36, 1996.

GALLANI, S.U., VALLADÃO, G.M.R., ASSANE, I.M., ALVES, L. DE 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. **Microb. Pathog.**, v. 149, p. 1-7, 2020.

GENG, Y., WANG, K.Y., HUANG, X.L., CHEN, D.F., LI, C.W., REN, S.Y., LIAO, Y.T., ZHOU, Z.Y., LIU, Q.F., DU, Z.J., LAI, W.M. *Streptococcus agalactiae*, an Emerging Pathogen for Cultured Ya-Fish, *Schizothorax prenanti*, in China. **Transbound. Emerg. Dis.**, v. 59, n. 4, p. 369–375, 2012.

GHOLAMHOSSEINI, A., TAGHADOSI, V., SHIRY, N., AKHLAGHI, M., SHARIFIYAZDI, H., SOLTANIAN, S., AHMADI, N. First isolation and identification of *Aeromonas veronii* and *Chryseobacterium joostei* from reared sturgeons in Fars province, Iran. **Vet. Res. Forum**, v. 9, n. 2, p. 113–119, 2018.

GODOY, D.T., CARVALHO-CASTRO, G.A., LEAL, C.A.G., PEREIRA, U.P., LEITE, R.C., FIGUEIREDO, H.C.P. Genetic diversity and new genotyping scheme for fish pathogenic *Streptococcus agalactiae*. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 57, n. 6, p. 476-483, 2013.

GOMES, L.C., SIMÕES, L.N., ARAÚJO-LIMA, C.A.R.M. **Tambaqui (*Colossoma macropomum*)**, In: BALDISSEROTTO, B., GOMES, L.C. (Eds.), *Espécies Nativas Para Piscicultura No Brasil*. Santa Maria: UFSM, 2010. p. 175–204.

HOSAINZADEGAN, H., KHALILOV, R., GHOLIZADEH, P. The necessity to revise Koch's postulates and its application to infectious and non-infectious diseases: a mini-review. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 39, n. 2, p. 215-218, 2020.

HOSHINA, T. On a new bacterium, *Paracolobactrum anguillimortiferum* n. sp. **Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish**, v. 28, n. 2, p. 162–164, 1962.

HOSHINA, T., SANO, T., MARIMOTO, Y. A *Streptococcus* pathogenic to fish. **J. Tokyo Univ. Fish.**, v. 44, p. 57–58, 1958.

HOSSAIN, M.J., SUN, D., MCGAREY, D.J., WRENN, S., ALEXANDER, L.M., MARTINO, M.E., XING, Y., TERHUNE, J.S., LILES, M.R. An asian origin of virulent *Aeromonas hydrophila* responsible for disease epidemics in united states-farmed catfish. **MBio**, v. 5, n. 3, p. 1-7, 2014.

HU, Y. H.; ZHOU, H. Z.; JIN, Q. W.; ZHANG, J. The serine protease autotransporter Tsh contributes to the virulence of *Edwardsiella tarda*. **Vet Microbiol.**, v. 189, p. 68-74, 2016.

IBGE. **Produção da Pecuária Municipal 2019**. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Rio de Janeiro, 2020.

INDU, B.; KUMAR, G.; SMITA, N.; SHABBIR, A.; SASIKALA, C; RAMANA, C. V.

- Chryseobacterium candidae* sp. nov., isolated from a yeast (*Candida tropicalis*). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 93-99, 2020.
- IREGUI, C.A., COMAS, J., VÁSQUEZ, G.M., VERJÁN, N. Experimental early pathogenesis of *Streptococcus agalactiae* infection in red tilapia *Oreochromis* spp. **J. Fish Dis.** v. 39, n. 2, p. 205–215, 2016.
- JANDA, J.M., ABBOTT, S.L., MCIVER, C.J. *Plesiomonas shigelloides* revisited. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 29, n. 2, p. 349-374, 2016.
- JINDAL, S.K. Koch's postulates – Pitfalls and relevance in the 21st century. **Indian J. Tuberc.**, v. 65, n. 1, p. 6-7, 2018.
- JOHNSON, P.T.J., PAULL, S.H. The ecology and emergence of diseases in fresh waters. **Freshw. Biol.** v. 56, n. 4, p. 638–657, 2011.
- KAMARUZZAMAN, N.A.; KENDALL, S.; GOOD, L. Targeting the hard to reach: challenges and novel strategies in the treatment of intracellular bacterial infections. **Br. J. Pharmacol.**, v. 174, n. 14, p. 2225-2236, 2017.
- KEEFE, G.P. *Streptococcus agalactiae* mastitis: A review. **Can. Vet. J.**, v. 38, n. 7, p. 429-437, 1997.
- KIM, S.G., GIRI, S.S., KIM, S.W., KWON, J., LEE, S. BIN, PARK, S.C. First Isolation and Characterization of *Chryseobacterium cucumeris* SKNUCL01, Isolated from Diseased Pond loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) in Korea. **Pathogens**, v. 9, n. 397, p. 1-15, 2020.
- KOCH, R. The etiology of tuberculosis. **Berliner Klin. Wochenschrift**, v. 19, n. 15, p. 221–230, 1882.
- KUSUDA, R. *Edwardsiella tarda* from an epizootic of mullets (*Mugil cephalus*) in Okitsu Bay. **Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.**, v. 42, n. 3, p. 271-275, 1976.
- KUSUDA, R., ITAMI, T., MUNEKIYO, M., NAKAJIMA, H. Characteristics of *Edwardsiella* sp. from an epidemic in cultured crimson sea breams. **Bull. Japanese Soc. Sci. Fish.**, v. 43, n. 2, p. 129–134, 1977.
- LAGOS, L., TANDBERG, J.I., REPNIK, U., BOYSEN, P., ROPSTAD, E., VARKEY, D., PAULSEN, I.T., WINTHER-LARSEN, H.C. Characterization and vaccine potential of membrane vesicles produced by *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* in an adult zebrafish model. **Clin. Vaccine Immunol.** v. 24, n. 5, p. 1-19, 2017.
- LANCEFIELD, R.C. A serological differentiation of specific types of bovine hemolytic streptococci (Group B). **J. Exp. Med.**, v. 59, n. 4, p. 441–458, 1934.
- LEAL, C.A.G., QUEIROZ, G.A., PEREIRA, F.L., TAVARES, G.C., FIGUEIREDO, H.C.P. *Streptococcus agalactiae* sequence type 283 in farmed fish, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 25, n. 4, p. 776–779, 2019.
- 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. **Genet. Mol. Res.**, v. 13, n. 3, p. 5704–5712, 2014.
- LEE, J.; YOON, S.; LEE, G.; LEE, D.; HUH, C.; KIM, G. *Chryseobacterium vaccae* sp.

nov., isolated from raw cow's milk. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 9, p. 4859-4866, 2020.

LEIGH, W.J., ZADOKS, R.N., JAGLARZ, A., COSTA, J.Z., FOSTER, G., THOMPSON, K.D. Evaluation of PCR primers targeting the *groEL* gene for the specific detection of *Streptococcus agalactiae* in the context of aquaculture. **J. Appl. Microbiol.**, v. 125, n. 3, p. 666–674, 2018.

LEIRA, M.H. **Susceptibilidade de serratálmínídeos e seus híbridos a parasitos em sistema de recirculação indoor e de peixes em policultivo a bactérias**. 2016. 98f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

LEIRA, M.H.; BOTELHO, H.A.; LAGO, A.A.; FREITAS, R.T.F.; GARCIA, A.M.; SANTOS, H.C.A.S. Identification of pathogens in fish polyculture systems in southern Minas Gerais, Brazil. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 13, p. 13-17, 2019.

LEWISCH, E., MENANTEAU-LEDOUBLE, S., TICHY, A., EL-MATBOULI, M. Susceptibility of common carp and sunfish to a strain of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* in a challenge experiment. **Dis. Aquat. Organ.**, v. 121, n. 2, p. 161–166, 2016.

LI-HUI, L., DE-FENG, Z., NING-QIU, L., CUN-BIN, S., XI, Y., XIAO-ZHE, F., QIANG, L. Identification, serotype analysis and drug sensitivity test of *Streptococcus agalactiae* from *Cirrhinus molitorella*. **J. South. Agric.**, v. 46, n. 11, p. 2053–2058, 2015.

LI, H.; SUN, B.; NING, X.; JIANG, S.; SUN, L. A Comparative Analysis of *Edwardsiella tarda*-Induced Transcriptome Profiles in RAW264.7 Cells Reveals New Insights into the Strategy of Bacterial Immune Evasion. **Int J Mol Sci.**, v. 20, n. 22, p. 1-20, 2019.

LI, M.; SUN, L.; LI, J. *Edwardsiella tarda* evades serum killing by preventing complement activation via the alternative pathway. **Fish Shellfish Immunol.**, v. 43, n. 2, p. 325-329, 2015.

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*. **Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.**, v. 60, n. 1, p. 275–277, 2008.

LIN, J.N., LAI, C.H., YANG, C.H., HUANG, Y.H. Differences in Clinical Manifestations, Antimicrobial Susceptibility Patterns, and Mutations of Fluoroquinolone Target Genes between *Chryseobacterium gleum* and *Chryseobacterium indologenes*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 5, p. 1-10, 2019.

LIN, J.N., LAI, C.H., YANG, C.H., HUANG, Y.H., LIN, H.F., LIN, H.H. Comparison of four automated microbiology systems with 16S rRNA gene sequencing for identification of *Chryseobacterium* and *Elizabethkingia* species. **Sci. Rep.**, v. 7, n. 13824, p. 1–5, 2017.

LIN, J.N.; TENG, S.H.; LAI, C.H.; YANG, C.H.; HUANG, Y.H.; LIN, H.F.; LIN, H.H. Comparison of the Vitek MS and Bruker Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Systems for Identification of *Chryseobacterium* Isolates from Clinical Specimens and Report of Uncommon *Chryseobacterium* Infections in Humans. **J Clin Microbiol.**, v. 56, n. 11, p. 1-6, 2018.

LIU, L., LI, Y.W., HE, R.Z., XIAO, X.X., ZHANG, X., SU, Y.L., WANG, J., LI, A.X. Outbreak of *Streptococcus agalactiae* infection in barcoo grunter, *Scortum barcoo* (McCulloch & Waite), in an intensive fish farm in China. **J. Fish Dis.**, v. 37, n. 12, p.

1067–1072, 2014.

LOCH, T.P., FAISAL, M. Emerging flavobacterial infections in fish: A review. **J. Adv. Res.**, v. 6, n. 3, p. 283-300, 2015.

LOCH, T.P., FAISAL, M. *Chryseobacterium aahli* sp. nov., isolated from lake trout (*Salvelinus namaycush*) and brown trout (*Salmo trutta*), and emended descriptions of *Chryseobacterium ginsenosidimutans* and *Chryseobacterium gregarium*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 64, n. 5, p. 1573–1579, 2014.

LOCH, T.P., FUJIMOTO, M., WOODIGA, S.A., WALKER, E.D., MARSH, T.L., FAISAL, M. Diversity of Fish-Associated *Flavobacteria* of Michigan. **J. Aquat. Anim. Health**, v. 25, n. 3, p. 149–164, 2013.

LUNA, L.G. **Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology**, 3 ed. New York: McGraw-Hill, 1968. 258p.

LUO, T., LIU, Y., CHEN, C., LUO, Q., RAO, Q., HUANG, M., TU, J., LIN, Q., WENG, B. *Chryseobacterium aurantiacum* sp. nov., isolated from a freshwater pond used for murray cod (*Maccullochella peelii peelii*) culture. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 68, n. 11, p. 3397–3403, 2018.

MAJOLO, C., CHAGAS, E.C., MARTINS, V.F.S., ROCHA, S.I.B., FUJIMOTO, R.Y. Isolamento de *Streptococcus* sp. em tambaqui (*Colossoma macropomum*) cultivados em tanque escavado. **XIII Encontro Bras. Patol. Org. Aquáticos**, 2014.

MALTA, J.C. DE O., GOMES, A.L.S., ANDRADE, S.M.S. DE, VARELLA, A.M.B. Infestações maciças por acantocéfalos, *Neoechinorhynchus buttnerae* Golvan, 1956, (Eoacanthocephala: Neoechinorhynchidae) em tambaquis jovens, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) cultivados na Amazônia Central. **Acta Amaz.**, v. 31, n. 1, p. 133–143, 2001.

MAPA. **Boletim da Piscicultura em águas da união 2018 - 2019**, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, Brasília, 2020.

MARTINS, M.L., CARDOSO, L., DE PÁDUA, S.B. Protozoan infections in farmed fish from Brazil: diagnosis and pathogenesis. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 24, n. 1, 2015.

MEYER, F.P., BULLOCK, G.L. *Edwardsiella tarda*, a new pathogen of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Appl. Microbiol.**, v. 25, n. 1, p. 155–156, 1973.

MIAN, G.F., GODOY, D.T., LEAL, C.A.G., YUHARA, T.Y., COSTA, G.M., FIGUEIREDO, H.C.P. Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia. **Vet. Microbiol.**, v. 136, n. 1-2, p. 180–183, 2009.

MIYAZAKI, T., KAIGE, N. Comparative Histopathology of Edwardsiellosis in Fishes. **Fish Pathol.**, v. 20, n. 2-3, p. 219–227, 1985.

MORAIS, I. DA S., O’SULLIVAN, F.L.A. Biologia, habitat e cultivo do tambaqui *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1816), **Scientia Amazonia**, v. 6, n. 1, p. 81-93, 2017.

MORICK, D., DAVIDOVICH, N., BIGAL, E., ROSENBLUTH, E., BOUZNACH, A., ROKNEY, A., RON, M., WOSNICK, N., TCHERNOV, D., SCHEININ, A.P. Fatal infection in a wild sandbar shark (*Carcharhinus plumbeus*), caused by *Streptococcus agalactiae*, type Ia-ST7. **Animals**, v. 10, n. 28, p. 1-7, 2020.

MUDARRIS, M., AUSTIN, B. Systemic disease in turbot *Scophthalmus maximus* caused by a previously unrecognised Cytophaga-like bacterium. **Dis. Aquat. Organ.**, v. 6, n. 3, p. 161–166, 1989.

NAKATSUGAWA, T. *Edwardsiella tarda* Isolated from Cultured Young Flounder. **Fish Pathol.**, v. 18, n. 2, p. 99–101, 1983.

NGUYEN, N.P., WARNOW, T., POP, M., WHITE, B. A perspective on 16S rRNA operational taxonomic unit clustering using sequence similarity. **NPJ Biofilms Microbiomes**, v. 16004, p. 1-8, 2016.

NOUGAYREDE, P., VUILLAUME, A., VIGNEULLE, M., FAIVRE, B., LUENGO, S., DELPRAT, J. First isolation of *Edwardsiella tarda* from diseased turbot (*Scophthalmus maximus*) reared in a sea farm in the Bay of Biscay. **Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.**, v. 14, n. 4, p. 128–129, 1994.

OH, W. T.; JUN, J. W.; GIRI, S. S.; YUN, S.; KIM, H. J.; KIM, S. G.; KIM, S. W.; HAN, S. J.; KWON, J.; PARK, S. C. Isolation of *Chryseobacterium siluri* sp. nov., from liver of diseased catfish (*Silurus asotus*). **Heliyon**, v. 2, n. 2, p. 1-6, 2020.

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.

OSTLAND, V., STANNARD, J., CREEK, J., HEDRICK, R., FERGUSON, H., CARLBERG, J., WESTERMAN, M. Aquatic Francisella-like bacterium associated with mortality of intensively cultured hybrid striped bass *Morone chrysops* × *M. saxatilis*. **Dis. Aquat. Organ.**, v. 72, n. 2, p. 135–145, 2006.

OTTEM, K.F., NYLUND, A., KARLSBAKK, E., FRIIS-MØLLER, A., KAMAISHI, T. Elevation of *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* Mikalsen et al. (2007) to *Francisella noatunensis* comb. nov. [syn. *Francisella piscicida* Ottem et al. (2008) syn. nov.] and characterization of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* subsp. nov., two important fish pathogens. **J. Appl. Microbiol.**, v. 106, n. 4, p. 1231–1243, 2009.

OWATARI, M.S., JESUS, G.F.A., CARDOSO, L., LEHMANN, N.B., MARTINS, M.L., MOURIÑO, J.L.P. Can histology and haematology explain inapparent *Streptococcus agalactiae* infections and asymptomatic mortalities on Nile tilapia farms? **Res. Vet. Sci.**, v. 129, p. 13–20, 2020.

PAIXÃO, A.E.M.; SANTOS, J.C.; PINTO, M.S.; PEREIRA, D.S.P.; RAMOS, C.E.C.O.; CERQUEIRA, R.B.; NAVARRO, R.D.; SILVA, R.F. Effect of commercial probiotics (*Bacillus subtilis* and *Saccharomyces cerevisiae*) on growth performance, body composition, hematology parameters, and disease resistance against *Streptococcus agalactiae* in tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Aquacult. Int.**, v. 25, p. 2035-2045, 2017.

PALANG, I., WITHYACHUMNARNKUL, B., SENAPIN, S., SIRIMANAPONG, W., VANICHVIRIYAKIT, R. Brain histopathology in red tilapia *Oreochromis* sp. experimentally infected with *Streptococcus agalactiae* serotype III. **Microsc. Res. Tech.**, v. 83, n. 8, p. 877–888, 2020.

PARK, S. BIN, AOKI, T., JUNG, T.S. Pathogenesis of and strategies for preventing *Edwardsiella tarda* infection in fish. **Vet. Res.**, v. 43, n. 67, p. 1-11, 2012.

PATTERSON, H., SARALAHTI, A., PARIKKA, M., DRAMSI, S., TRIEU-CUOT, P., POYART, C., ROUNIOJA, S., RÄMET, M. Adult zebrafish model of bacterial meningitis in *Streptococcus agalactiae* infection. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 38, n. 3, p. 447–455, 2012.

PAULA, F.G. **Desempenho do tambaqui (*Colossoma macropomum*), da pirapitinga (*Piaractus brachypomum*), e do híbrido tambatinga (*C. macropomum* x *P. brachypomum*) mantidos em viveiros fertilizados na fase de engorda.** 2009. 69f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias - Veterinária) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

PEIXE BR. **Anuário 2021 Peixe BR da Piscicultura.** Associação Brasileira de Piscicultura, São Paulo, 2021.

PEKALA-SAFIŃSKA, A. Contemporary threats of bacterial infections in freshwater fish. **J. Vet. Res.**, v. 62, n. 3, p. 261-267, 2018.

PEREIRA, F.L., TAVARES, G.C., DE CARVALHO, A.F., ROSA, J.C.C., REZENDE, C.P., LEAL, C.A.G., FIGUEIREDO, H.C.P. Effects of temperature changes in the transcriptional profile of the emerging fish pathogen *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*. **Microb. Pathog.**, v. 133, n. 103548, p. 1-12, 2019.

PEREIRA, U.P., MIAN, G.F., OLIVEIRA, I.C.M., BENCHETRIT, L.C., COSTA, G.M., FIGUEIREDO, H.C.P. Genotyping of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from fish, human and cattle and their virulence potential in Nile tilapia. **Vet. Microbiol.**, v. 140, n. 1-2, p. 186-192, 2010.

PÉREZ-SANCHO, M., VELA, A.I., KOSTRZEWA, M., ZAMORA, L., CASAMAYOR, A., DOMÍNGUEZ, L., FERNÁNDEZ-GARAYZÁBAL, J.F. First analysis by MALDI-TOF MS technique of *Chryseobacterium* species relevant to aquaculture. **J. Fish Dis.**, v. 41, n. 2, p. 389-393, 2018.

PIAMSOMBOON, P., JARESITTHIKUNCHAI, J., HUNG, T.Q., ROYTRAKUL, S., WONGTAVATCHAI, J. Identification of bacterial pathogens in cultured fish with a custom peptide database constructed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). **BMC Vet. Res.**, v. 16, n. 52, p. 1-10, 2020.

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 J. Biol.**, v. 68, n. 2, p. 409–414, 2008.

PINHEIRO, M.H.P. **Resultados de um cultivo do híbrido Tambaqui, *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818, x Pirapitinga, *Colossoma brachypomum* Cuvier, 1818, da densidade de 5.000 peixes/ha.** 1990. 26f. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Peca) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

PIRARAT, N., MAITA, M., ENDO, M., KATAGIRI, T. Lymphoid apoptosis in *Edwardsiella tarda* septicemia in tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish Shellfish Immunol.**, v. 22, n. 6, p. 608–616, 2007.

PLUMB, J.A., SCHACHTE, J.H., GAINES, J.L., PELTIER, W., CARROLL, B. *Streptococcus* sp. from Marine Fishes Along the Alabama and Northwest Florida Coast of the Gulf of Mexico. **Trans. Am. Fish. Soc.**, v. 103, n. 2, p. 358–361, 1974.

POUDYAL, S., PULPIPAT, T., WANG, P.C., CHEN, S.C. Comparison of the pathogenicity of *Francisella orientalis* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), Asian seabass (*Lates calcarifer*) and largemouth bass (*Micropterus salmoides*) through experimental intraperitoneal infection. **J. Fish Dis.**, v. 43, n. 9, p. 1097–1106, 2020.

PRADEEP, P. J.; SUEBSING, R.; SIRTHAMMAJAK, S.; KAMPEERA, J.; JITRAKORN, S.; SAKSMERPROME, V.; TURNER, W.; PALANG, I.; VANICHVIRIYAKIT, R.; SENAPIN, S.; JEFFS, A.; KIATPATHOMCHAI, W.; WITHYACHUMANARNKUL, B. Evidence of vertical transmission and tissue tropism of Streptococcosis from naturally infected red tilapia (*Oreochromis* spp.). **Aquaculture Reports**, v. 3, p. 58-66, 2016.

PRIDGEON, J.W., KLESIUS, P.H., GARCIA, J.C. Identification and virulence of *Chryseobacterium indologenes* isolated from diseased yellow perch (*Perca flavescens*). **J. Appl. Microbiol.**, v. 114, n. 3, p. 636–643, 2013.

QASEM, J.A., AL-ZENKI, S., AL-MARZOUK, A. Identification and characterization of *Streptococcus agalactiae* isolates using 16s rRNA sequencing and Cellular Fatty Acid composition analysis. **Pakistan J. Biol. Sci.**, v. 13, n. 1, p. 9–15, 2010.

QIN, L.; SUN, Y.; ZHAO, Y.; XU, J.; BI, K. In vitro model to estimate *Edwardsiella tarda*-macrophage interactions using RAW264.7 cells. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 60, p. 177-184, 2017.

RAMIREZ-PAREDES, J.G., LARSSON, P., THOMPSON, K.D., PENMAN, D.J., BUSSE, H.J., ÖHRMAN, C., SJÖDIN, A., SOTO, E., RICHARDS, R.H., ADAMS, A., COLQUHOUN, D.J. Reclassification of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* ottem et al. 2009 as *Francisella orientalis* sp. nov., *Francisella noatunensis* subsp. *chilensis* subsp. nov. and emended description of *Francisella noatunensis*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 70, n. 3, p. 2034–2048, 2020.

RATHER, M.A., WILLAYAT, M.M., WANI, S.A., HUSSAIN, S.A., SHAH, S.A. Enterotoxin gene profile and molecular epidemiology of *Aeromonas* species from fish and diverse water sources. **J. Appl. Microbiol.**, v. 127, n. 3, p. 921–931, 2019.

RIBEIRO JUNIOR, J.C., TAMANINI, R., SOARES, B.F., DE OLIVEIRA, A.M., SILVA, F. DE G., DA SILVA, F.F., AUGUSTO, N.A., BELOTI, V. Eficiência da fervura e outros quatro métodos para extração do DNA genômico de bactérias esporuladas deteriorantes do leite. **Semin. Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5, p. 3069–3078, 2016.

ROBINSON, J.A., MEYER, F.P. Streptococcal Fish Pathogen. **J. Bacteriol.**, v. 92, n. 2, p. 512, 1966.

ROCHA, C.N. DA, MANAIA, C.M. Multidrug resistance phenotypes are widespread over different bacterial taxonomic groups thriving in surface water. **Sci. Total Environ.**, v. 563–564, p. 1–9, 2016.

RUANE, N.M., COLLINS, E.M., GEARY, M., SWORDS, D., HICKEY, C., GEOGHEGAN, F. Isolation of *Streptococcus agalactiae* and an aquatic birnavirus from doctor fish *Garra rufa*. **L. Ir. Vet. J.**, v. 66, n. 16, p. 1-4, 2013.

SAE-OUI, D., MUROGA, K., NAKAI, T. A case of *Edwardsiella tarda* infection in cultured colored carp *Cyprinus carpio*. **Fish Pathol.**, v. 19, n. 3, p. 197–199, 1984.

SAHOO, P.K., MUKHERJEE, S.C., SAHOO, S.K. *Aeromonas hydrophila* versus

Edwardsiella tarda: a pathoanatomical study in *Clarias batrachus*. **J. Aquac.**, v. 6, p. 57–66, 1998.

SANTOS, E.F., TAVARES-DIAS, M., PINHEIRO, D.A., NEVES, L.R., MARINHO, R. DAS G.B., DIAS, M.K.R. Fauna parasitária de tambaqui *Colossoma macropomum* (Characidae) cultivado em tanque-rede no estado do Amapá, Amazônia oriental. **Acta Amaz.**, v. 43, n. 1, p. 105–112, 2013.

SEBASTIÃO, F.D.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.

SEBASTIÃO, F.D.A., LOCH, T.P., MARANCIK, D.P., GRIFFIN, M.J., MARET, J., RICHEY, C., SOTO, E. Identification of *Chryseobacterium* spp. isolated from clinically affected fish in California, USA. **Dis. Aquat. Organ.**, v. 136, n. 3, p. 227–234, 2019.

SHETTY, M., MAITI, B., VENUGOPAL, M.N., KARUNASAGAR, I., KARUNASAGAR, I. First isolation and characterization of *Edwardsiella tarda* from diseased striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage). **J. Fish Dis.**, v. 37, n. 3, p. 265–271, 2014.

SHOEMAKER, C.A., XU, D.H., SOTO, E. *Streptococcus iniae* and *S. agalactiae*. In: Woo, P.T.K., Cipriano, R.C. (Eds.), Fish Viruses and Bacteria. Oxfordshire:CABI, p. 298–310, 2017.

SILVEIRA, A.B. **Identificação e caracterização de isolados de *Paenibacillus* spp provenientes de amostras de água e de solo.** 2003. 137f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SLOTVED, H.C., KONG, F., LAMBERTSEN, L., SAUER, S., GILBERT, G.L. Serotype IX, a proposed new *Streptococcus agalactiae* serotype. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, n. 9, p. 2929–2936, 2007.

SOLIMAN, M.K., EASA, M.E.S., FAISAL, M., ABOU-ELAZM, I.M., HETRICK, F.M. Motile aeromonas infection of striped (grey) mullet *Mugil cephalus*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 56, n. 4, p. 323–335, 1989.

SOTO, E.; ABRAMS, S. B.; REVAN, F. Effects of temperature and salt concentration on *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* infections in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Diseases of aquatic organisms**, v. 101, p. 217-223, 2012.

SOTO, E., BOWLES, K., FERNANDEZ, D., HAWKE, J.P. Development of a real-time PCR assay for identification and quantification of the fish pathogen *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*. **Dis. Aquat. Organ.**, v. 89, n. 3, p. 199–207, 2010.

SOTO, E.; FERNANDEZ, D.; THUNE, R.; HAWKE, J. P. Interaction of *Francisella asiatica* with tilapia (*Oreochromis niloticus*) innate immunity. **Infect Immun.**, v. 78, n. 5, p. 2070-2078, 2010.

SOTO, E., HALLIDAY-SIMMONDS, I., FRANCIS, S., KEARNEY, M.T., HANSEN, J.D. Biofilm formation of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*. **Vet. Microbiol.**, v. 181, n. 3-4, p. 313–317, 2015a.

SOTO, E., ILLANES, O., HILCHIE, D., MORALES, J.A., SUNYAKUMTHORN, P., HAWKE, J.P., GOODWIN, A.E., RIGGS, A., YANONG, R.P., POUDER, D.B.,

- FRANCIS-FLOYD, R., ARAUZ, M., BOGDANOVIC, L., CASTILLO-ALCALA, F. Molecular and immunohistochemical diagnosis of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. **J. Vet. Diagnostic Investig.**, v. 24, n. 5, p. 840–845, 2012.
- SOTO, E.; KIDD, S.; MENDEZ, S.; MARANCIK, D.; REVAN, F.; HILTCHIE, D.; CAMUS, A. *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* pathogenesis analyzed by experimental immersion challenge in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). **Veterinary Microbiology**, v. 164, n. 1–2, p. 77-84, 2013.
- SOTO, E., PRIMUS, A.E., POWDER, D.B., GEORGE, R.H., GERLACH, T.J., CASSLE, S.E., JOHNSON, T., BOYD, S., HANDSEL, T., YANONG, R.P.E. Identification of *Francisella noatunensis* in novel host species French grunt (*Haemulon flavolineatum*) and caesar grunt (*Haemulon carbonarium*). **J. Zoo Wildl. Med.**, v. 45, n. 3, p. 727–731, 2014.
- SOTO, E., WANG, R., WILES, J., GREEN, C., PLUMB, J., HAWKE, J., SOTO, E. Characterization of isolates of *Streptococcus agalactiae* from diseased farmed and wild marine fish from the U.S. Gulf coast, Latin America, and Thailand. **J. Aquat. Anim. Health**, v. 27, n. 2, p. 123–134, 2015b.
- SOTO, E., ZAYAS, M., TOBAR, J., ILLANES, O., YOUNT, S., FRANCIS, S., DENNIS, M.M.. Laboratory-controlled Challenges of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) with *Streptococcus agalactiae*: Comparisons between Immersion, Oral, Intracoelomic and Intramuscular Routes of Infection. **J. Comp. Pathol.**, v. 155, n. 4, p. 339–345, 2016
- SWAIN, P., NAYAK, S.K. Comparative sensitivity of different serological tests for seromonitoring and surveillance of *Edwardsiella tarda* infection of Indian major carps. **Fish Shellfish Immunol.**, v. 15, n. 4, p. 333–340, 2003.
- TAVARES, G.C.; QUEIROZ, G. A.; ASSIS, G.B.N.; LEIBOWITZ, M.P.; TEIXEIRA, J.P., FIGUEIREDO, H.C.P.; LEAL, C.A.G. Disease outbreaks in farmed Amazon catfish (*Leiaris marmoratus* x *Pseudoplatystoma corruscans*) caused by *Streptococcus agalactiae*, *S. iniae*, and *S. dysgalactiae*. **Aquaculture**, v. 495, p. 384-392, 2018.
- THOMÉ, M.P.M. **A condições sanitárias e o manejo na incubação larvicultura e alevinagem do tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Cuvier, 1818) (Osteichthyes: Serrasalmidae) no estado do Amazonas.** 2000. 88f. Dissertação (Mestrado de Biologia de Água Doce e Pesca Interior) - Instituto Nacional d Pesquisas da Amazônia, Manaus.
- UHLAND, F.C., HÉLIE, P., HIGGINS, R. Infections of *Edwardsiella tarda* among brook trout in Quebec. **J. Aquat. Anim. Health**, v. 12, n. 1, p. 74–77, 2000.
- VALLADÃO, G.M.R., GALLANI, S.U., PILARSKI, F. South American fish for continental aquaculture. **Rev. Aquac.**, v. 10, n. 2, p. 351–369, 2018.
- VAN DAMME, L.R.; VANDEPITTE, J. Frequent isolation of *Edwardsiella tarda* and *Plesiomonas shigelloides* from healthy Zairese freshwater fish: a possible source of sporadic diarrhea in the tropics. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 39, n. 3, p. 475–479, 1980.
- VERMEULEN, E.T., LOTT, M.J., ELDRIDGE, M.D.B., POWER, M.L. Evaluation of next generation sequencing for the analysis of *Eimeria* communities in wildlife. **J. Microbiol. Methods**, v. 124, p. 1-9, 2016.

- 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, p. 1-10, 2013.
- VO, L. K.; TSUZUKI, T.; KAMADA-FUTAGAMI, Y.; CHIGWECHOKHA, P. K.; HONDA, A.; OISHI, K.; KOMATSU, M.; SHIOZAKI, K. Desialylation by *Edwardsiella tarda* is the initial step in the regulation of its invasiveness. **Biochem J.**, v. 476, n. 21, p. 3183-3196, 2019.
- VOJTECH, L. N.; SANDERS, G. E.; CONWAY, C.; OSTLAND, V.; HANSEN J. D. Host Immune Response and Acute Disease in a Zebrafish Model of *Francisella* Pathogenesis. **Infection and immunity**, v. 77, n. 2, p. 914-925, 2009.
- WANG, R., LI, L., HUANG, YIN, HUANG, T., TANG, J., XIE, T., LEI, A., LUO, F., LI, J., HUANG, YAN, SHI, Y., WANG, D., CHEN, M., MI, Q., HUANG, W. Pathogenicity of Human ST23 *Streptococcus agalactiae* to Fish and Genomic Comparison of Pathogenic and Non-pathogenic Isolates. **Front. Microbiol.**, v. 8, n. 1933, p. 1-11, 2017.
- WANG, T.; GORGOGNONE, B.; MAEHR, T.; HOLLAND, J. W.; VECINO, J. L.; WADSWORTH, S.; SECOMBES, C. J. Fish suppressors of cytokine signaling (SOCS): gene discovery, modulation of expression and function. **J. Signal Transduct.**, v. 2011, p. 1-20, 2011.
- WANG, X., WANG, F., CHEN, G., YANG, B., CHEN, J., FANG, Y., WANG, K., HOU, Y. *Edwardsiella tarda* induces enteritis in farmed seahorses (*Hippocampus erectus*): An experimental model and its evaluation. **Fish Shellfish Immunol.**, v. 98, p. 391–400, 2020
- WHITE, F.H., SIMPSON, C.F., WILLIAMS, L.E. Isolation of *Edwardsiella tarda* from aquatic animal species and surface waters in Florida. **J. Wildl. Dis.**, v. 9, n. 3, p. 204–208, 1973.
- WILSON, B.A., SALYERS, A.A., WHITT, D.D., WINKLER, M.E. **Bacterial Pathogenesis: a Molecular Approach**, 3^a. ed. Washington:American Society for Microbiology, 2011.
- 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 J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 52, n. 1, p. 63–67, 2015.
- XAVIER, R. G. C. **Ocorrência e diversidade genética de *Streptococcus agalactiae* isolados de casos clínicos de doença em pirarucu (*Arapaima gigas*) e traíra (*Hoplias malabaricus*)**. 2018. 29f. Monografia (Residência em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- YASUNAGA, N., OGAWA, S., HATAI, K. Characteristics of fish pathogen *Edwardsiella* isolated from several species of cultured marine fishes. **Bull. Nagasaki Pref. Inst. Fish**, v. 8, p. 57–65, 1982.
- YU, J.-H., HAN, J.J., PARK, K.S., PARK, K.H., PARK, S.W. *Edwardsiella tarda* infection in Korean catfish, *Silurus asotus*, in a Korean fish farm. **Aquac. Res.**, v. 41, n. 1, p. 19–26, 2009.
- ZAMORA, LEYDIS, VELA, A.I., PALACIOS, M.A., DOMÍNGUEZ, L.,

FERNÁNDEZ-GARAYZÁBAL, J.F. First isolation and characterization of *Chryseobacterium shigense* from rainbow trout. **BMC Vet. Res.**, v. 8, n. 77, p.1-5, 2012.

ZAMORA, L., VELA, A.I., PALACIOS, M.A., SÁNCHEZ-PORRO, C., MOORE, E.R.B., DOMÍNGUEZ, L., VENTOSA, A., FERNÁNDEZ-GARAYZÁBAL, J.F. *Chryseobacterium tructae* sp. nov., isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Syst. Appl. Microbiol.**, v. 35, n. 5, p. 315–319, 2012a.

ZAMORA, L., VELA, A.I., PALACIOS, M.A., SÁNCHEZ-PORRO, C., SVENSSON-STADLER, L.A., DOMÍNGUEZ, L., MOORE, E.R.B., VENTOSA, A., FERNÁNDEZ-GARAYZÁBAL, J.F. *Chryseobacterium viscerum* sp. nov., isolated from diseased fish. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 62, n. 12, p. 2934–2940, 2012b.

ZENG, S.J., TANG, X.S., ZHAO, W.L., QIU, H.X., WANG, H., FENG, Z.C. Clinical analysis of cases of neonatal *Streptococcus agalactiae* sepsis. **Genet. Mol. Res.**, v. 15, n. 2, p. 1-7, 2016.

ZHANG, L.; NI, C.; XU, W.; DAI, T.; YANG, D.; WANG, Q.; ZHANG, Y.; LIU, Q. Intramacrophage Infection Reinforces the Virulence of *Edwardsiella tarda*. **J Bacteriol.**, v. 198, n. 10, p. 1534-1542, 2016.

ZHANG, Y.-W., GENG, Y., YU, Z.-H., WANG, K.-Y., CHENG, D.-F., XIANG, Z.-G., LI, Y.-J., GUO, K.-N., MOU, W.-H. Serotypes and molecular typing of *Streptococcus agalactiae* isolated from fish. **Acta Hydrobiol. Sin.**, v. 41, n. 4, p. 800–806, 2017.