

Cadernos Técnicos de

ISSN 1676-6024

VETERINÁRIA e ZOOTECNIA

Nº 73 - JUNHO DE 2014

Sanidade em organismos aquáticos



Fundação de Estudo e
Pesquisa em Medicina
Veterinária e Zootecnia
FEPMVZ Editora

Conselho Regional de
Medicina Veterinária do
Estado de Minas Gerais
CRMV-MG



Conselho Regional de Medicina Veterinária do Estado de Minas Gerais

PROJETO DE EDUCAÇÃO CONTINUADA

É o CRMV-MG participando do processo de atualização técnica dos profissionais e levando informações da melhor qualidade a todos os colegas.



VALORIZAÇÃO PROFISSIONAL
compromisso com você

www.crmvmg.org.br



Editorial

Caros colegas,

Novamente temos a satisfação de encaminhar à comunidade veterinária e zootécnica mineira o volume 73 do Cadernos Técnicos, o segundo fascículo de 2014.

A Escola de Veterinária e o Conselho Regional de Medicina Veterinária de Minas Gerais, com satisfação consolidam a parceria e compromisso entre as duas instituições com relação à Educação Continuada da comunidade dos médicos veterinários e zootecnistas de Minas Gerais.

O presente número aborda, de forma objetiva, a temática sobre Sanidade em Organismos Aquáticos, discutindo sobre relevantes pontos das principais enfermidades que acometem a piscicultura nacional. O tema apresentado é importante, uma vez que a Sanidade de Organismos Aquáticos é uma área pouco conhecida pelos médicos veterinários e zootecnistas, mas que possui alta relevância para a cadeia produtiva do peixe de água doce. Deste modo, este volume poderá contribuir para o melhor entendimento destas questões pelos profissionais da área, além de apresentar os problemas e soluções àqueles que querem se iniciar nesta área.

Com este número do Cadernos Técnicos esperamos contribuir tanto para a conscientização quanto para a formação dos colegas, auxiliando para que possam construir as melhores opções de atendimento aos desafios de um novo setor em franca expansão na produção de alimentos em nosso país.

Portanto, parabéns à comunidade de leitores que utilizam o Cadernos Técnicos para aprofundar seu conhecimento e entendimento sobre Sanidade de Organismos Aquáticos, em benefício da sociedade.

Prof. Antonio de Pinho Marques Junior
Editor-Chefe do Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ABMVZ) - CRMV-MG nº 0918

Prof. José Aurélio Garcia Bergmann
Diretor da Escola de Veterinária da UFMG - CRMV-MG nº 1372

Prof. Marcos Bryan Heinemann
Editor do Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia - CRMV-MG nº 1372

Prof. Nivaldo da Silva
Presidente do CRMV-MG - CRMV-MG nº 0747

Universidade Federal de Minas Gerais

Escola de Veterinária

Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia - FEPMVZ Editora

Conselho Regional de Medicina Veterinária do Estado de Minas Gerais - CRMV-MG

www.vet.ufmg.br/editora

Correspondência:

FEPMVZ Editora

Caixa Postal 567

30161-970 - Belo Horizonte - MG

Telefone: (31) 3409-2042

E-mail:

editora.vet.ufmg@gmail.com

**Conselho Regional de Medicina Veterinária do Estado de Minas Gerais
- CRMV-MG**

Presidente:

Prof. Nivaldo da Silva

E-mail: crmvmg@crmvmg.org.br

**CADERNOS TÉCNICOS DE
VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

Edição da FEPMVZ Editora em convênio com o CRMV-MG

**Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e
Zootecnia - FEPMVZ**

Editor da FEPMVZ Editora:

Prof. Antônio de Pinho Marques Junior

Editor do Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia:

Prof. Marcos Bryan Heinemann

Editores convidados para esta edição:

Danielle Ferreira de Magalhães Soares

Pedro Lúcio Lithg

Revisora autônoma:

Angela Mara Leite Drumond

Tiragem desta edição:

9.300 exemplares

Layout e editoração:

Soluções Criativas em Comunicação Ltda.

Impressão:

O Lutador

**Permite-se a reprodução total ou parcial,
sem consulta prévia, desde que seja citada a fonte.**

Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia. (Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária da UFMG)

N.1- 1986 - Belo Horizonte, Centro de Extensão da Escola de Veterinária da UFMG, 1986-1998.

N.24-28 1998-1999 - Belo Horizonte, Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, FEP MVZ Editora, 1998-1999

v. ilustr. 23cm

N.29- 1999- Belo Horizonte, Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, FEP MVZ Editora, 1999-Periodicidade irregular.

1. Medicina Veterinária - Periódicos. 2. Produção Animal - Periódicos. 3. Produtos de Origem Animal, Tecnologia e Inspeção - Periódicos. 4. Extensão Rural - Periódicos.

I. FEP MVZ Editora, ed.

Prefácio

Henrique César Pereira Figueiredo - CRMV-MG 5839

Carlos Augusto Gomes Leal - CRMV-MG 7296

Professores de Sanidade e Doenças de Animais Aquáticos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais

A aquicultura é uma nova fronteira do agronegócio brasileiro. Com difusão por todo o território nacional, a produção de animais aquáticos atingiu, em 2001, a marca de 628 mil toneladas, e com estimativa de crescimento de 20% ao ano. Nesse cenário o Brasil ocupa o segundo lugar no ranking de países produtores das Américas, devendo em 2015, atingir a primeira posição. Na aquicultura brasileira destaca-se a produção da tilápia do Nilo e de espécies de peixes nativos, como o tambaqui, pacu e os híbridos de pintado. Juntamente com esse aumento de produção temos também um desafio significativo para os médicos veterinários e demais técnicos da aquicultura quanto aos aspectos sanitários da produção. Nos últimos anos diversas doenças infecciosas têm sido caracterizadas nas pisciculturas do país, muitas vezes causando perdas econômicas e atingindo taxas de mortalidade elevadas. Nessa edição de Cadernos Técnicos nós abordaremos as principais doenças infecciosas que ocorrem frequentemente nos sistemas de produção de peixes, bem como as alternativas disponíveis para o seu controle e prevenção. Muitas dessas doenças são consideradas como emergentes na aquicultura mundial, o que torna a difusão de novos conhecimentos estratégica para a atuação dos médicos veterinários que atuam nesse ramo da produção animal.

Sumário

1 Infecção por *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* em peixes9

Frederico Augusto de Alcântara Costa;

Carlos Augusto Gomes Leal (CRMV-MG 9014);

Henrique César Pereira Figueiredo (CRMV-MG 5839)

Streptococcus dysgalactiae subsp. *dysgalactiae* em peixes de água doce, uma doença emergente e perigosa.

2 Columnariose em peixes de água doce20

Gustavo M. Barony;

Henrique C. P. Figueiredo (CRMV-MG 5839);

Carlos A. G. Leal (CRMV-MG 9014)

Columnariose em peixes: ocorrência, sinais clínicos, diagnóstico, tratamento e controle em piscicultura.

3 Septicemia por *Aeromonas* móveis em peixes33

Thais F. Oliveira;

Guilherme C. Tavares (CRMV-MG: 11340);

Henrique C. P. Figueiredo (CRMV-MG 5839);

Carlos A. G. Leal (CRMV-MG 9014)

O artigo aborda os principais aspectos teóricos e práticos dos casos de septicemia por *Aeromonas* móveis em peixes cultivados.

4 Infecção por *Streptococcus iniae* em peixes45

Guilherme C. Tavares (CRMV-MG: 11340);

Henrique C. P. Figueiredo (CRMV-MG 5839);

Carlos A. G. Leal (CRMV-MG 9014)

Infecção por *Streptococcus iniae* em peixes: manifestação clínica, ocorrência e impacto para a piscicultura mundial.

5 Infecção por *Weissella ceti* em peixes57

Frederico Augusto de Alcântara Costa;

Carlos Augusto Gomes Leal (CRMV-MG 9014);

Henrique César Pereira Figueiredo (CRMV-MG 5839)

Doença septicêmica por *Weissella ceti* enfermidade emergente na truticultura brasileira.

6 Antibioticoterapia em peixes66

Guilherme C. Tavares (CRMV-MG: 11340);

Carlos A. G. Leal (CRMV-MG 9014);

Henrique C. P. Figueiredo (CRMV-MG 5839)

Antibioticoterapia em peixes: principais drogas, vias de administração e objetivos do tratamento.

7 Coleta e Remessa de Peixes para Diagnóstico de Doenças Infecciosas...79

Guilherme C. Tavares (CRMV-MG: 11340);

Henrique C. P. Figueiredo (CRMV-MG 5839);

Carlos A. G. Leal (CRMV-MG 9014)

O presente artigo descreve os principais procedimentos para coleta e remessa de peixes para o diagnóstico de doenças infecciosas.



[bigstockphoto.com](https://www.bigstockphoto.com)

1. Infecção por *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* em peixes

Frederico Augusto de Alcântara Costa¹

Carlos Augusto Gomes Leal² (CRMV-MG 9014)

Henrique César Pereira Figueiredo² CRMV-MG 5839)

¹Professor Adjunto, Médico Veterinário, Doutor, Faculdade de Medicina Veterinária/UFU

²Professor Adjunto, Médico Veterinário, Doutor, DMVP, Escola de Veterinária/UFMG

*autor para correspondência: figueiredoh@yahoo.com

1. Introdução

A infecção causada pela bactéria *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* (SDD) é bem descrita em peixes marinhos cultivados, causando perdas econômicas significativas principalmente para a cadeia produtiva de espécies do

gênero *Seriola* (“amberjack” e “yellowtail”) em países asiáticos. A bactéria causa lesões granulomatosas na musculatura dos peixes, geralmente no pedúnculo caudal.

No ano de 2007, esse patógeno foi identificado como causador de surto de infecção em uma fazenda de tilápia do Nilo no Estado do Ceará, Brasil.

No ano de 2007, esse patógeno foi identificado como causador de

surto de infecção em uma fazenda de tilápia do Nilo no Estado do Ceará, Brasil. O principal sinal clínico observado foi a presença de abscessos na musculatura na região da base da nadadeira caudal de alguns animais acometidos. Esse foi o primeiro relato de infecção por *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* em peixe de água doce. Desde então, diversos surtos vêm sendo observados em tilapiculturas na região Nordeste do Brasil. Apesar das taxas moderadas de mortalidade durante os surtos por SDD em tilápias, a doença tem causado perdas econômicas para os produtores, seja pela queda no desempenho produtivo ou pela condenação da carcaça dos peixes que apresentam lesões na musculatura. Outro agravante da doença é a presença de abscessos que podem reduzir a eficiência da antibioticoterapia em lotes de animais acometidos, dificultando que o quadro de infecção seja debelado.

No ano de 2007, esse pató SDD é também descrita como um patógeno emergente na piscicultura, provocando lesões granulomatosas na musculatura de peixes marinhos e de água doce que foi identificado como causador de surto de infecção em uma fazenda de tilápia do Nilo no Estado do Ceará, Brasil.

2. Etiologia

Streptococcus dysgalactiae é uma bactéria gram-positiva dividida em duas subespécies: *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDE), patógeno restrito de humanos; e *S. dysgalactiae* subsp.

dysgalactiae (SDD), geralmente causador de doenças em animais domésticos^{1,2}. Em seres humanos, a bactéria SDE causa principalmente faringite, além de lesões superficiais, como celulite e formação de abscessos³. A subespécie SDD é bem caracterizada como causadora de endometrite, mastite clínica e subclínica, artrite e celulite em bovinos, além de relatos de bacteremia, meningoencefalite e

mastite em ovinos^{4,5,6}. SDD é também descrita como um patógeno emergente na piscicultura, provocando lesões granulomatosas na musculatura de peixes marinhos e de água doce^{7,8}.

Os isolados de *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* causadores de doença em peixes são classificados como estreptococos α -hemolítico pertencente ao grupo C de Lancefield, catalase negativo e oxidase positivo⁹.

3. Epidemiologia

3.1 Espécies susceptíveis

O primeiro relato de infecção por *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* em peixes ocorreu no Japão, em 2002. A bactéria foi isolada de duas espécies ma-

rinhas cultivadas: “amberjack” (*Seriola dumerili*) e “yeollowtail” (*Seriola quinqueradiata*). Os animais acometidos apresentavam áreas com lesões necróticas, principalmente na região do pedúnculo caudal⁷. Desde o primeiro relato, surtos causados por SDD em fazendas de peixes marinhos têm sido descritos, incluindo diversas espécies, como: “kingfish” (*Seriola lalandi*), tainhas (*Mugil cephalus*, *Liza alata*, *Liza haematocheila*), “pompano” (*Trachinotus blochii*), esturjão (*Acipenser schrenkii*) e beijupirá (*Rachycentrum canadum*)^{10,11,12,13}.

Em 2007 foi relatado o primeiro caso de infecção por SDD em peixes de água doce. O surto aconteceu em uma fazenda de produção de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em tanques-rede no Estado do Ceará, Brasil⁸. Alguns animais dos lotes acometidos apresentavam abscessos na musculatura, principalmente na região da base da nadadeira, assim como observado em infecções por SDD em peixes marinhos⁷. Surtos causados por esse patógeno continuam ocorrendo em cultivos de tilápia do Nilo em tanque-rede nos Estados do Nordeste do país, e em alguns casos os lotes acometidos estão sendo diagnosticados com infecções concomitantes de *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* e *Streptococcus agalactiae*^{14,15}.

Animais dos lotes acometidos apresentavam abscessos na musculatura, principalmente na região da base da nadadeira.

3.2 Distribuição

Entender a distribuição dos isolados de um determinado patógeno e as relações entre essas amostras é essencial dentro dos estudos epidemiológicos para maior conhecimento da doença provocada por esse agente e para o desenvolvimento de métodos de controle mais eficazes. Atualmente, os estudos de diversidade genética dos isolados utilizando ferramentas de genotipagem diversas associados aos dados epidemiológicos da doença, que recebe o nome de epidemiologia molecular, vêm contribuindo para o conhecimento mais aprofundado do patógeno e sua distribuição.

Uma variabilidade genética de isolados de uma mesma espécie de patógeno pode implicar métodos de controle diferenciados, devido a diferentes perfis de susceptibilidade aos antibióticos. Além disso, essa diversidade genética pode estar relacionada também a uma conformação antigênica diferente entre os isolados, não havendo uma proteção cruzada no desenvolvimento de uma vacina homóloga. E, ainda, os estudos genéticos nos auxiliam no entendimento dos resultados epidemiológicos sobre distribuição e disseminação do patógeno.

As infecções por SDD em peixes marinhos ocorrem em grande par-

te do continente asiático, acometendo pisciculturas de diversas regiões do Japão, China, Taiwan, Malásia e Indonésia^{9,10,11}. As amostras de SDD oriundas dos diferentes países apresentam diversidade genética considerável. Estudos utilizando o BSFGE (“Biased Sinusoidal Field Gel Electrophoresis”) como método de genotipagem demonstram que os isolados de *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* da Malásia e Indonésia apresentam um padrão genético diferente e baixa relação epidemiológica com as amostras dos outros países asiáticos¹⁶.

No Brasil a bactéria SDD foi isolada de dois Estados: Ceará e Alagoas. Os sinais clínicos observados nos animais cultivados em fazendas de ambos os Estados foram similares. Um estudo de genotipagem dos isolados dos surtos ocorridos no país foi realizado recentemente. Foram testadas técnicas moleculares como sequenciamento de um gene bastante conservado para essa espécie, o *sodA*, métodos baseados na técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR - ERIC e REP-PCR), além da técnica de eletroforese em campo pulsátil (PFGE). Dentre os métodos de genotipagem, o PFGE foi considerado a técnica com maior poder

discriminatório e revelou a presença de três perfis genéticos diferentes. Os resultados demonstraram também que os padrões genéticos distintos estão relacionados à origem geográfica dos mesmos no Brasil¹⁴.

4. Manifestação clínica

Dependendo do estágio e do grau de infecção por *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*, os peixes acometidos podem apresentar escurecimento da pele e alterações comportamentais, como hiporexia e letargia. A presença de lesões no tecido muscular e/ou subcutâneo, como erosões, ulcerações e, principalmente, abscessos, são os sinais clínicos mais evidentes observados nas diferentes espécies susceptíveis^{11,17,18}. Essas lesões possuem uma maior predisposição de se desenvolverem no pedúnculo caudal, na musculatura próxima à base da nadadeira caudal (Figuras 1 e 2)^{17,11}. No entanto, em alguns casos,

Os peixes acometidos podem apresentar escurecimento da pele e alterações comportamentais, como hiporexia e letargia. A presença de lesões no tecido muscular e/ou subcutâneo, como erosões, ulcerações e, principalmente, abscessos.

as lesões podem ser observadas na base das nadadeiras peitorais e dorsal (Figuras 3 e 4)^{17,18,19}. Essas lesões acarretam em perdas econômicas significativas, uma vez que aumenta a taxa de carcaças descartadas durante o abate e processamento de pescado no frigorífico.

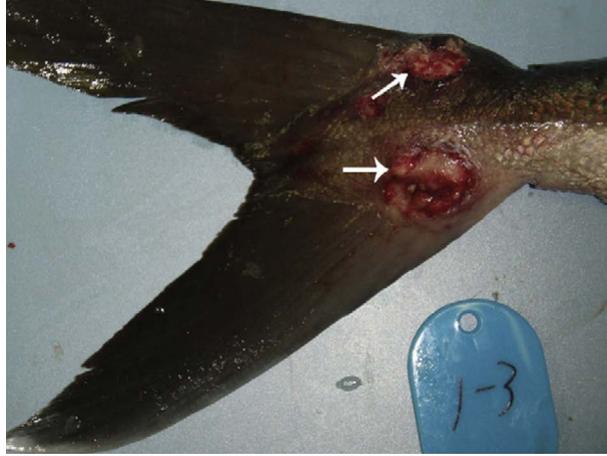


Figura 1. Presença de ulcerações (setas) no pedúnculo caudal de peixe da espécie *Seriola dumerili*¹⁷.



Figura 2. Tilápia do Nilo apresentando aumento de volume na região da base da nadadeira caudal, sugestivo de abscesso. Animal examinado durante surto de infecção por SDD em uma tilapicultura no Brasil.

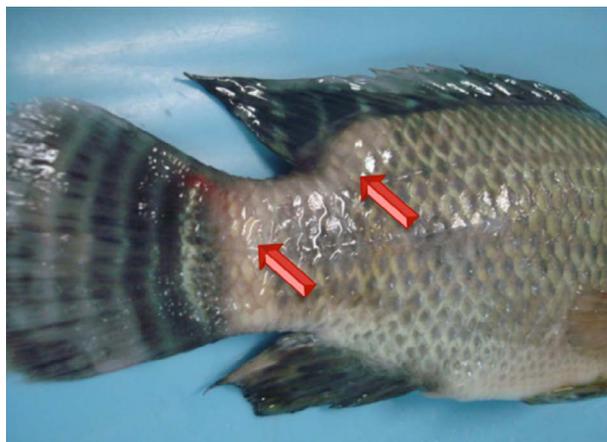


Figura 3. Presença de abscessos subcutâneos (setas) na base das nadadeiras caudal e dorsal em tilápia do Nilo infectada experimentalmente por SDD.



Figura 4. Presença de conteúdo purulento à incisão do abscesso (elipse).

5. Patogenia

Ainda se tem pouco conhecimento a respeito dos mecanismos utilizados pela bactéria *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* durante a infecção em peixes. Estudos histopatológicos de peixes marinhos acometidos por SDD demonstram um quadro de septicemia durante a infecção. Observou-se a presença de infiltrados inflamatórios não somente no pedúnculo caudal, como também no coração e no baço¹⁸. Além disso, foram observados microabscessos sistêmicos e inflamações granulomatosas multifocais, sugestivos de embolismo bacteriano¹⁷.

Quanto às vias de infecção da bactéria, diversas rotas foram testadas em laboratório para tentar entender o início do processo infeccioso. Em peixes marinhos do gênero *Seriola*, infecções experimentais utilizando rotas não invasivas, como imersão em água contendo a bactéria e a via oral, são capazes de causar a doença com reprodução dos sinais clínicos, como o aparecimento de abscessos na musculatura¹⁸. Em tilápias do Nilo, a reprodução da doença somente foi possível utilizando vias invasivas de infecção, ou seja, intraperitone-

Em peixes marinhos do gênero Seriola, infecções experimentais utilizando rotas não invasivas, como imersão em água contendo a bactéria e a via oral, são capazes de causar a doença.

al e intramuscular^{8,19}. Contudo, o padrão de transmissão observado nas fazendas brasileiras sugere que a água também seja um fator disseminador, como observado para *Seriola* sp⁹.

Alguns estudos demonstram que a virulência desse patógeno

em peixes está comumente associada à alta capacidade de se aderir e invadir os tecidos do hospedeiro. Essa habilidade da bactéria SDD é favorecida pelas propriedades hidrofóbicas e a alta capacidade de hemaglutinação de sua superfície celular⁸.

Além disso, outras hipóteses têm sido levantadas quanto aos possíveis mecanismos de virulência do patógeno. Por exemplo, a presença de genes que codificam a exotoxina “streptolisina S” em isolados de SDD de peixes indicam a importância dessa hemolisina na patogênese da doença²⁰.

6. Fatores predisponentes

Apesar de não haverem estudos detalhados, os fatores que predispõem ao desenvolvimento da doença causada por SDD parecem ser semelhantes àqueles descritos para outras infecções bacterianas em peixes, principalmente as estrepto-

O padrão de transmissão observado nas fazendas brasileiras sugere que a água também seja um fator disseminador.

cocosos. Dentre esses fatores, destacam-se as baixas concentrações de oxigênio dissolvido na água, aumento das taxas de compostos nitrogenados (principalmente amônia e nitrito) e elevação da temperatura da água. Todos esses fatores estão correlaciona-

Baixas concentrações de oxigênio dissolvido na água, aumento das taxas de compostos nitrogenados (principalmente amônia e nitrito) e elevação da temperatura da água.

dos e geralmente ocorrem em fase final de produção, quando as densidades de estocagem de peixes são maiores e as taxas de arraçoamento são consequentemente mais elevadas, em especial nos períodos mais quentes do ano. Isso favorece a queda na qualidade da água e uma maior susceptibilidade dos peixes à infecção por *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*. Além disso, esse patógeno tem uma maior taxa de crescimento em temperaturas mais elevadas, sendo observados os surtos em tilápia do Nilo produzidas em tanque-rede geralmente em ocasiões em que a temperatura da água está acima dos 30°C^{15,19}.

Em laboratório não foi possível reproduzir os sinais clínicos em tilápias do Nilo na ausência dos fatores predisponentes, mesmo em doses bacterianas elevadas e utilizando rotas de infecção invasivas⁸. Quando as mesmas doses do patógeno foram utilizadas durante infecção experimental, mas reproduzindo em condições laboratoriais os fatores de baixa qualidade de água (oxigênio

dissolvido abaixo de 2 mg/L e baixa renovação de água) e altas densidades de estocagem, os animais infectados apresentaram as lesões características da doença, como abscessos no pedúnculo caudal¹⁹. Essas observações sugerem que fatores que causam

estresse aos peixes e que ao mesmo tempo favorecem um maior crescimento da bactéria são cruciais para a ocorrência dos surtos de SDD em tilápia do Nilo.

Em peixes marinhos, embora a infecção por SDD ocorra também somente em fase final de abate (acima de 0,5 kg) e em altas densidades de estocagem, as infecções experimentais foram capazes de reproduzir os sinais clínicos da doença mesmo na ausência de fatores predisponentes, ou seja, em animais de menor peso e com menor densidade de peixes^{11,17}. Isso pode representar uma maior virulência das amostras de SDD isoladas de peixes marinhos e/ou uma maior susceptibilidade destes em relação à tilápia do Nilo.

Diagnóstico

As alterações causadas pela infecção por SDD em peixes, como abscesso e ulcerações na base da nadadeira caudal, embora sejam características, não podem ser consideradas lesões patognômicas da doença. A presença de abs-

cessos na musculatura pode ser observada também em outras doenças bacterianas, como no caso das infecções por *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus iniae*²¹. Portanto, não se pode dar um diagnóstico conclusivo de *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* em peixes somente pela observação das lesões.

O diagnóstico conclusivo da doença é realizado pelo isolamento bacteriano e subsequente identificação utilizando métodos fenotípicos e/ou moleculares. Os peixes a serem coletados para realização do diagnóstico devem ser animais vivos que apresentem os sinais clínicos da doença e que não tenham sido tratados com nenhum antibiótico nos 10 dias que precedem a coleta. Os tecidos de eleição para exame bacteriológico são cérebro, rim, baço e fígado, devendo ser feita a coleta de fragmentos ou “swab” de tecido de forma asséptica. No caso do diagnóstico de SDD, é importante que o animal com suspeita da doença seja enviado inteiro, e não fragmento de tecidos coletados por necropsia, para que o exame bacteriológico seja realizado de forma mais abrangente e eficaz. O isolamento do agente das lesões, como abscessos, erosões ou ulcerações, não é recomendado devido à alta contaminação por bactérias ambientais no tecido lesionado, reduzindo a eficiência do

O diagnóstico conclusivo da doença é realizado pelo isolamento bacteriano e subsequente identificação utilizando métodos fenotípicos e/ou moleculares.

exame diagnóstico.

Os meios de cultivo a serem utilizados para o isolamento de SDD são: ágar base suplementado com sangue a 10% (ágar sangue); BHI ágar (infusão cérebro coração); THA (Todd-Hewitt ágar); e ágar Congo Red.

O crescimento bacteriano ocorre a uma temperatura ótima de 28°C por um período de 24 a 72 horas¹³.

Após o isolamento, os testes de triagem a serem realizados são gram, catalase e oxidase. Os resultados obtidos são a observação de cocos gram-positivos ao microscópio e identificado como catalase negativo e oxidase positivo. Para confirmação do diagnóstico, devem ser realizados outros testes fenotípicos e/ou moleculares.

A identificação do grupo de Lancefield utilizando kits comerciais de soroglutinação são relativamente simples de serem realizados, e o resultado a ser observado para SDD será positivo para o grupo C. Outros exames fenotípicos podem ser realizados, como o teste de provas bioquímicas utilizando o API 20 Strep⁸.

Quanto aos testes moleculares, existe disponível a sequência de primers para uma PCR *S. dysgalactiae* específica, que pode ser utilizada como a confirmação mais acurada do diagnóstico²². A extração de DNA de amostras de SDD

para a PCR pode ser realizada pelas metodologias padrão utilizadas para bactérias gram-positivas ou com kit comercial de extração de DNA.

Tratamento

O principal tratamento recomendado em casos de surtos por *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* é a antibioticoterapia oral. No Brasil, somente os antibióticos à base de florfenicol são aprovados pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) para o uso em tilápias²³.

As amostras de SDD isoladas de peixes marinhos e de tilápia apresentam, até o momento, um perfil de sensibilidade ao florfenicol. Por outro lado, um grande número de amostras isoladas de peixes marinhos é resistente à oxitetraciclina e possui o gene de resistência *tet M*⁹.

Ainda existem muitas questões a serem esclarecidas quanto à eficiência real da antibioticoterapia *in vivo* em peixes infectados por SDD. Por um lado, o quadro clínico da doença parece facilitar o tratamento por via oral, uma vez que os animais acometidos continuam a se alimentar mesmo que em menores taxas, mas não apresentam uma

O principal tratamento recomendado em casos de surtos por S. dysgalactiae subsp. dysgalactiae é a antibioticoterapia oral.

anorexia marcante como observado em outras infecções bacterianas^{15,19}. Por outro lado, a presença de abscessos na musculatura pode reduzir a eficiência do antibiótico, diminuindo sua atuação

frente às células bacterianas no interior da lesão, seja pela membrana que envolve a região, criando uma barreira física, ou pelo baixo pH que pode reduzir a atividade do antimicrobiano^{15,19,24}.

Controle e prevenção

O controle e a prevenção da doença causada por SDD em peixes dependem fundamentalmente de um manejo sanitário bem estabelecido na fazenda e do diagnóstico adequado em casos de surtos. A inspeção dos peixes durante o processo de abate é importante para identificar possíveis lesões na musculatura, sugestivas de infecção por SDD. Em algumas fazendas, a doença pode estar ocorrendo sem que o produtor per-

ceba, uma vez que não existem taxas de mortalidade consideráveis. A identificação da doença o quanto antes permite a adoção de medidas que evitem a proliferação indesejada do patógeno, que poderá acometer outros lotes, causando perdas econômicas con-

O controle e a prevenção da doença causada por SDD em peixes dependem fundamentalmente de um manejo sanitário bem estabelecido na fazenda e do diagnóstico adequado em casos de surtos.

sideráveis pelo descarte da carcaça de animais que apresentarem lesões.

Na Ásia, uma vacina monovalente inativada contra SDD para prevenção da doença em peixes do gênero *Seriola* foi patenteada²⁵. No Brasil, não foi desenvolvido, até o momento, nenhum imunoprolático contra esse agente em tilápias. No entanto, a vacinação contra *Streptococcus agalactiae*, patógeno mais impactante para a tilapicultura nacional, já vem sendo empregada em muitas tilapiculturas. Diante disso, a possibilidade de desenvolver uma vacina polivalente contra *S. agalactiae* e *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* tende a ser uma realidade nos próximos anos, aproveitando o procedimento de vacinação para a proteção de tilápias do Nilo frente a dois patógenos presentes na piscicultura brasileira.

Uma vacina a ser desenvolvida contra SDD deve, no entanto, levar em consideração a diversidade no perfil genético apresentado entre os isolados de diferentes regiões^{14,19}. Essa variabilidade genética pode implicar diferentes perfis antigênicos das amostras nacionais de *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*.

7. Referências bibliográficas

1. VANDAMME, P.; POT, B.; FALSEN, E. *et al.* Taxonomic study of Lancefield streptococcal groups C, G, and L (*Streptococcus dysgalactiae*) and proposal of *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* subsp. nov. *Int J Syst Bacteriol*, v.46, p. 774–81, 1996.
2. SUZUKI, H.; LEFEBURE, T.; HUBISZ, M.J. *et al.* Comparative genomic analysis of the *Streptococcus dysgalactiae* species group: gene content, molecular adaptation, and promoter evolution. *Genome Biol. Evol.*, v.3, p.168–185, 2011.
3. BROYLES LN, VAN BENEDEN C, BEALL B, et al. Population-based study of invasive disease due to β -hemolytic streptococci of groups other than A and B. *Clin Infect Dis*;48:706-12, 2009.
4. AARESTRUP, F.M.; JENSEN, N.E. Genotypic and phenotypic diversity of *Streptococcus dysgalactiae* strains isolated from clinical and subclinical cases of bovine mastitis. *Vet Microbiol*, 53: 315–23, 1996.
5. CHENIER, S.; LECLERE, M.; MESSIER, S. *et al.* *Streptococcus dysgalactiae* cellulitis and toxic shock like syndrome in a brown Swiss cow. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.20, p.99–103, 2008.
6. SENO, N. e AZUMA, R. A study on heifer mastitis in Japan and its causative microorganisms. *Nat Inst Anim Health Q*, 23: 82–91, 1983.
7. NOMOTO, R.; MUNASINGHE, L.I.; JIN, D.H. *et al.* Lancefield group C *Streptococcus dysgalactiae* infection responsible for fish mortalities in Japan. *J. Fish Dis.*, v. 27, n. 12, p. 679-686, 2004.
8. NETTO, L. N.; LEAL, C. A. G.; FIGUEIREDO, H. C. P. *Streptococcus dysgalactiae* as an agent of septicemia in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *J. Fish Dis.*, v. 34, n. 9, p. 251-254, 2011.
9. ABDELSALAM, M.; CHEN, S.C.; YOSHIDA, T. Surface properties of *Streptococcus dysgalactiae* strains isolated from marine fish. *Bull Eur Assoc Fish Pathol*, 29:15–23, 2009.
10. ABDELSALAM, M.; ALAA, A.; EISSA, A. *Streptococcus dysgalactiae*: An emerging pathogen of fishes and mammals. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 1, 1–6, 2013.
11. NOMOTO, R.; UNOSE, N.; SHIMAHARA, Y. *et al.* Characterization of group C *Streptococcus dysgalactiae* isolated from farmed fish. *J. Fish Dis.*, v. 29, n. 11, p. 673-682, 2006.
12. YANG, W. e LI, A. Isolation and characterization of *Streptococcus dysgalactiae* from diseased *Acipenser schrenckii*. *Aquaculture*, 294:14–7, 2009.
13. QI, Z.T., TIAN, J.Y., ZHANG, Q.H., SHAO, R., QIU, M., WANG, Z.S., WEI, Q.J., HUANG, J.T. Susceptibility of Soiny Mullet (*Liza haematocheila*) to *Streptococcus dysgalactiae* and physiological response to formalin inactivated *S. dysgalactiae*. *Pakistan Veterinary Journal*, 33(2), 234-237, 2013.

14. COSTA, F.A.A., LEAL, C.A.G., LEITE, R.C., FIGUEIREDO, H.C.P. (2013) Genotyping of *Streptococcus dysgalactiae* strains isolated from Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Journal of Fish Diseases*, 2013. (doi: 10.1111/jfd.12125)
15. FIGUEIREDO, H. C. P.; LEAL, C. A. G.; CARVALHO-CASTRO, G. A.. Infecção por *Streptococcus dysgalactiae*: uma nova doença para a tilápia do Nilo. *Panorama da Aquicultura*, Rio de Janeiro, p. 42 - 49.
16. ABDELSALAM, M.; CHEN, S., YOSHIDA, T. Phenotypic and genetic characterizations of *Streptococcus dysgalactiae* strains isolated from fish collected in Japan and other Asian countries. *FEMS Microb. Lett.*, v. 302, n. 1, p. 32-38, 2010.
17. HAGIWARA, H., TAKANO, R., NOGUCHI, M., NARITA, M. A study of the lesion induced in *Seriola dumerili* by intradermal or intraperitoneal injection of *Streptococcus dysgalactiae*. *Journal of Comparative Pathology*, 140, 25-30, 2009.
18. HAGIWARA, H., TAKANO, R., NOGUCHI, M., NARITA, M. Lesions induced in *Seriola dumerili* following exposure to *Streptococcus dysgalactiae* by oral treatment or immersion. *Journal of Comparative Pathology*, 143, 262-267, 2010.
19. COSTA, F.A.A. Molecular epidemiology and development of vaccines against emerging pathogens for Brazilian fish farming: *Streptococcus dysgalactiae* and *Weissella ceti*. 2013. 64f. Tese (Doutorado, Ciência Animal) – Escola de Veterinária/UFMG, Belo Horizonte, MG.
20. ABDELSALAM M, CHEN SC, YOSHIDA T. Dissemination of streptococcal pyrogenic exotoxin G (spegg) with an IS-like element in fish isolates of *Streptococcus dysgalactiae*. *FEMS Microbiol Lett*;309:105–13, 2010.
21. FIGUEIREDO, H. C. P.; NETO, L. N.; LEAL, C.A.G. *et al.* *Streptococcus iniae* outbreaks in Brazilian Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) farms. *Braz. J. Microbiol.*, vol.43, n.2, pp. 576-580, 2012.
22. HASSAN A.A., KHAN I.U. E LAMMLER C. Identification of *Streptococcus dysgalactiae* strains of Lancefield group C, G and L by polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Medicine* 50, 161–165, 2003.
23. MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA. Compêndio de produtos veterinários. (2014). Disponível em: <<http://www.cpv.com.br/cpvs/index.html>>. Acesso em: 25 fev. 2014.
24. BROOK, I. Microbiology of polymicrobial abscesses and implications for therapy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 50, 805–810, 2002.
25. KYORITSU SEIYAKU KK. RYOKO, T. Inactivated vaccine using fish *Streptococcus dysgalactiae* as antigen. JP 2007-326794A. 20 dez., 2007.

2. Columnariose em peixes de água doce

Gustavo Morais Barony

Henrique César Pereira Figueiredo (CRMV-MG 5839)

Carlos Augusto Gomes Leal* (CRMV-MG 9014)

*carlosleal@vet.ufmg.br

1. Introdução

A columnariose é uma das principais doenças infecciosas de peixes de água doce em todo o mundo. Essa enfermidade é causada pela bactéria *Flavobacterium columnare*, que acomete tanto peixes cultivados como de vida livre. Há relatos da infecção por *F. columnare* em carpas, bagres, salmonídeos, enguias, tilápias e peixes ornamentais¹. Altamente im-

A columnariose é uma das principais doenças infecciosas de peixes de água doce em todo o mundo.

pactante, é a segunda enfermidade que mais causa prejuízos à indústria americana do bagre-do-canal (*Ictalurus punctatus*)². No Brasil, não existem dados

sobre seu impacto na produção de peixes; porém, surtos da doença são frequentemente observados nas pisciculturas nacionais^{3,4,5,6}.

Apesar de ser um patógeno clássico de peixes e há bastante tempo caracterizado, esse

microrganismo continua sendo um dos principais problemas sanitários para a piscicultura de água doce no Brasil^{3,4,5,6}.

Essa bactéria é um entrave principalmente para produção de formas jovens (larvas, alevinos e juvenis), essenciais para a viabilidade da cadeia produtiva piscícola de espécies nativas e exóticas no país. Ao longo do texto serão descritos os principais aspectos teóricos e práticos relacionados à ocorrência dessa doença, bem como seu diagnóstico, tratamento, prevenção e controle.

2. Agente etiológico: taxonomia e diversidade genética

Flavobacterium columnare é o agente etiológico da columnariose. O primeiro relato de ocorrência da doença data de 1922⁷. Fenotipicamente essa bactéria é caracterizada como: bastonete longo, gram-negativo, móvel (com motilidade do tipo “gliding” ou, na tradução literal do inglês, “motilidade por deslizamento”), forma colônias com diferentes morfologias, com coloração amarelada (produz um pigmento denominado flexirrubina) e não cresce em meios de cultura convencionais (Tabela 1). Pertencente à família Flavobacteriaceae, esse patógeno é amplamente disseminado em ambientes dulcícolas, bem como tem sido

Um dos principais problemas sanitários para a piscicultura de água doce no Brasil.

Flavobacterium columnare é o agente etiológico da columnariose.

frequentemente isolado do muco de superfície e brânquias de peixes de água de doce^{1,6,8}. *F. columnare* é capaz de sobreviver na água de cultivo por até dois anos, mantendo sua infectividade por até cinco meses⁹. A ocorrência dessa doença está associada a fatores predisponentes que aumentam a suscetibilidade dos animais ao agente etiológico. Amostras com alta vi-

Tabela 1 – Características fenotípicas da bactéria *Flavobacterium columnare*¹²

Teste fenotípico	Resultado
Produção de flexirrubina	+
Absorção de Vermelho-Congo	+
Produção de Catalase	+
Redução de Nitrato	+
Produção de H ₂ S	+
Hidrólise de quitina	-
Hidrólise de colágeno	+
Hidrólise de tirosina	+
Hidrólise de DNA	+
Hidrólise de lecitina	+
Crescimento em TSB*	-
Crescimento a 15°C	+
Crescimento a 37°C	+
Crescimento em 0% de NaCl	+
Crescimento em 0,5% de NaCl	+
Crescimento acima de 1% NaCl	-

* Caldo Soja Tripticasina

culência podem infectar peixes sadios; porém, fatores de risco que promovem exacerbado estresse nos peixes provocam o desencadeamento de surtos^{10,11}.

Desde sua primeira descrição em 1922, esse microrganismo sofreu diversas alterações na denominação de sua espécie bacteriana^{1,13}.

Inicialmente, devido à sua morfologia microscópica de bastonetes finos e alongados, e a apresentação clínica da doença caracterizada por lesões na região dorsal dos peixes, foi classificado como *Bacillus columnaris*. Após o primeiro isolamento em meio de cultura, foi possível sua caracterização fenotípica e a determinação de sua similaridade com os membros da ordem Myxobacteria. Como possuía a capacidade de degradação de colágeno, essa bactéria foi renomeada como *Chondrococcus columnaris*¹⁴. Posteriormente, foi reclassificada como *Flexibacter columnaris*¹², sendo alocada taxonomicamente na família Flavobacteriaceae¹³. A doença causada por esse microrganismo foi conhecida por muitos anos como flexibacteriose, sendo que alguns materiais didáticos disponíveis atualmente ainda utilizam essa denominação. Finalmente, em 1996, após a realização de estudos de taxonomia polifásica, essa bactéria

Flavobacterium columnare não cresce nos meios de cultura utilizados convencionalmente para o isolamento de bactérias patogênicas para peixes, como ágar sangue, ágar soja tripticaseína e ágar nutriente

foi reclassificada como *Flavobacterium columnare*¹³, sendo a denominação aceita e adotada pelo Manual de Bergey de Bacteriologia Sistemática.

Flavobacterium columnare é uma bactéria que apresenta peculiaridades quanto ao seu isolamento e cultivo *in vitro*. Não cresce nos meios de

cultura utilizados convencionalmente para o isolamento de bactérias patogênicas para peixes, como ágar sangue, ágar soja tripticaseína e ágar nutriente¹. Em geral, o cultivo desse microrganismo é realizado em meios relativamente pobres em nutrientes, mas com a presença de algumas substâncias essenciais para seu crescimento, como no caso o colágeno. Os principais meios de cultura utilizados para isolamento de *F. columnare* são: meio de Ordal; caldo ou ágar Shieh (na sua versão original ou modificado); e no meio de Hsu-Shotts¹⁵ (MHS) (Tabela 2).

Tabela 2 – Composição do meio de Hsu-Shotts (MHS)

Ingrediente	Quantidade (g/L)
Gelatina (colágeno)	3
Triptona	2
Extrato de Levedura	0,5
Cloreto de cálcio	0,15
Ágar Bacteriológico*	15

*Para meio sólido. Para caldo MHS, não usar o ágar.

Em condições de cultivo, essa bactéria pode apresentar quatro morfologias de colônia distintas¹⁶: lisa e rizoide, com coloração amarelada; rugosa e rizoide, com bordas irregulares e de coloração mais alaranjada; lisa, de bordas arredondadas e coloração amarelada; e, por fim, lisa, polimórfica, de coloração branca levemente amarelada.

Independentemente da morfologia, as colônias mantêm-se fortemente aderidas ao ágar, e o morfotipo mais comumente encontrado nos isolados de peixes é o rugosa-rizoide¹⁶ (Figura 1). Amostras com essa morfologia têm sido descritas como mais virulentas que isolados com demais morfotipos¹⁶. No Brasil, todos os isolados pertencentes

ao banco de bactérias do Laboratório de Doenças de Animais Aquáticos – AQUAVET (Escola de Veterinária – UFMG) apresentam essa morfologia, independentemente do hospedeiro de origem.

A dificuldade da diferenciação de isolados de *F. columnare* por análises fenotípicas acarretou o desenvolvimento de técnicas de biologia molecular para estudos de diversidade intraespecífica². A análise de polimorfismos no tamanho de fragmentos de restrição (RFLP) do gene 16S do RNA ribossômico (rRNA) foi padronizada e tem sido utilizada para avaliar a diversidade genética desse microrganismo^{2,17,18,19,20,21}. Essa metodologia permitiu a discriminação das amos-



Figura 1: Isolado de *F. columnare* em ágar MHS, onde pode ser verificada a morfologia rugosa-rizoide com coloração amarela característica das colônias.

tras de *F. columnare* em três variantes genéticas, ou genômicos^{2,18,21}. A distribuição mundial desses genômicos ainda é pouco conhecida, mas diversos estudos dos isolados permitiram uma associação do genômico e grau de virulência com diferentes temperaturas^{2,19,22}. O genômico I tem uma abrangência global¹⁹, sua ocorrência já foi descrita na Europa, América do Norte, Ásia e, pela primeira vez, em amostras de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil³. Entretanto, sua virulência e frequência são maiores em peixes de clima temperado, principalmente salmônídeos¹⁹, e isolados dessa variante podem crescer entre 15 e 37°C²¹. O genômico II tem sido frequentemente isolado de peixes de clima tropical e é incapaz de crescer na temperatura de 15°C^{2,10,19,22}. Essa variante é o principal associado a surtos de columnariose na produção do mais importante peixe da piscicultura americana, o bagre-do-canal (*Ictalurus punctatus*), e já foi isolado de surtos na piscicultura brasileira de duas espécies nativas, surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*) e pacamã (*Lophiosilurus alexandri*), e de tilápias do Nilo³.

O genômico II tem sido frequentemente isolado de peixes de clima tropical e é incapaz de crescer na temperatura de 15°C. Já foi isolado de surtos na piscicultura brasileira de duas espécies nativas.

Fatores de risco: animais jovens; estresse; qualidade da água; variações bruscas na temperatura; alta densidade; doenças associadas.

3. Patogênese e caracterização clínica da doença

A patogênese da doença está associada: à síntese e secreção de enzimas e fatores de virulência que propiciam a infecção e degradação tecidual; e à adesão às superfícies corpóreas e tecido branquial. A enzima condroitina-AC-liase e diversas proteases que degradam com-

ponentes do tegumento e tecido muscular (como o ácido hialurônico e sulfato de condroitina) são os principais fatores de virulência associados à degradação tecidual, propiciando a infecção e que ocasionam as lesões verificadas durante a infecção nos peixes^{20,23}.

Além desses, sua aderência às superfícies corpóreas (pele, brânquias e nadadeiras) tem sido descrita como uma etapa fundamental na patogênese da doença²⁴. Com o acometimento de regiões amplas da pele e tecido branquial, a infecção pode evoluir para um processo septicêmico, culminando com a morte dos animais^{24,25}.

Os principais fatores de risco para ocorrência de surtos de columnariose são: animais jovens (larvas e alevinos); estresse oriundo da manipulação grosseira; transporte prolongado;

problemas de qualidade da água; variações bruscas na temperatura da água; em regiões tropicais, a redução na temperatura da água; alta densidade de estocagem; lesões mecânicas no tegumento; doenças parasitárias associadas; outros fatores que promovam estresse aos peixes. No Brasil, os surtos são comumente observados: nos primeiros dias pós-eclosão em laboratórios de larvicultura; durante os processos de masculinização de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), principalmente quando realizado em “hapas” e com altas densidades de estocagem; durante o treinamento alimentar de espécies nativas carnívoras; pós-transporte; pós-voamento de tanques-rede, principalmente quando é necessária a utilização de “bolsões”; no inverno nas regiões Sul e Sudeste. Os surtos podem ocorrer de forma hiperaguda, cursando com mortalidades de até 80% do lote em 24-48 horas após o início da manifestação dos sinais clínicos da doença. No Brasil, a ocorrência da doença já foi descrita em piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*), cascudo (*Hypostomus plecostomus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*)⁵, além de surubim (*Pseudoplatystma corruscans*) e pacamã (*Lophiosilurus alexandri*)³, bem como tilápia do Nilo. Através da análise

A columnariose é uma doença caracterizada pelo acometimento da superfície externa dos peixes (pele, nadadeiras e brânquias), que raramente apresenta quadros de septicemia.

de RFLP do gene 16S do rRNA, os isolados de diferentes espécies nativas apresentaram variação genética^{3,5} intra e interespecífica, tendo sido vistos mais de um genótipo presentes em um único surto no país³.

A columnariose é uma doença caracterizada pelo acometimento da superfície externa dos peixes (pele, nadadeiras e brânquias), que raramente apresenta quadros de septicemia⁴. As brânquias são descritas como o principal órgão afetado na infecção por *F. columnare* em algumas espécies de peixes de clima temperado²⁶. Já em espécies tropicais, o tegumento é usualmente o tecido mais acometido pela bactéria. Os sinais clínicos da doença nas fases iniciais são caracterizados por letargia, anorexia, melanose (variável) e pela erosão de nadadeiras, principalmente da caudal e dorsal (Figura 2 A e B). Posteriormente, com a evolução da doença (24-48 horas após o contágio), ocorre o acometimento dos tecidos adjacentes, causando a erosão completa das nadadeiras, necrose da pele e do tecido muscular^{24,22}. Macroscopicamente, os animais apresentam áreas esbranquiçadas na pele, principalmente na região caudal e dorsal do corpo (Figura 2 C, D e E). Essa necrose circunscrita ao redor da nadadeira dorsal levou à denomina-



Figura 2 – Sinais clínicos de columnariose em peixes: A- erosão de nadadeira caudal em pacamã; B- erosão de nadadeiras caudal e dorsal em tilápia do Nilo; C- necrose da pele em pacamã; D- lesões em forma de sela em pacamã; E- alevino de tilápia com necrose da pele na região dorsal e cranial.

ção popular da enfermidade de “doença da sela” (*saddleback disease*), devido à aparência visual da lesão, semelhante a uma sela de montaria^{26,27}. Em estado avançado, podem ocorrer bacteremia e infecções secundárias por outros patógenos bacterianos e parasitários²⁷. No tecido branquial, o quadro se caracteriza inicialmente pela formação de áreas pálidas de coloração branca e amarelada, com produção excessiva de muco e congestão vascular^{10,27}. Microscopicamente, é possível visualizar alterações patológicas, como hiperplasia branquial, e, em casos mais graves, fusão de lamelas e até de filamentos branquiais¹⁰.

O diagnóstico da columnariose é baseado no isolamento e identificação da bactéria a partir de peixes moribundos, com sintomatologia clínica sugestiva.

4. Diagnóstico

O diagnóstico da columnariose é baseado no isolamento e identificação da bactéria a partir de peixes moribundos, com sintomatologia clínica sugestiva²⁸. Embora a columnariose seja uma doença comum e que pode infectar quase todos os peixes de água doce, é ainda frequentemente subdiagnosticada. O não crescimento em meios de cultura convencionais usados no diagnóstico de doenças de peixes e rápida evolução da enfermidade durante os surtos dificultam o diagnóstico²⁹.

Para o diagnóstico, os animais moribundos devem ser enviados preferencialmente vivos ao laboratório. Porém,

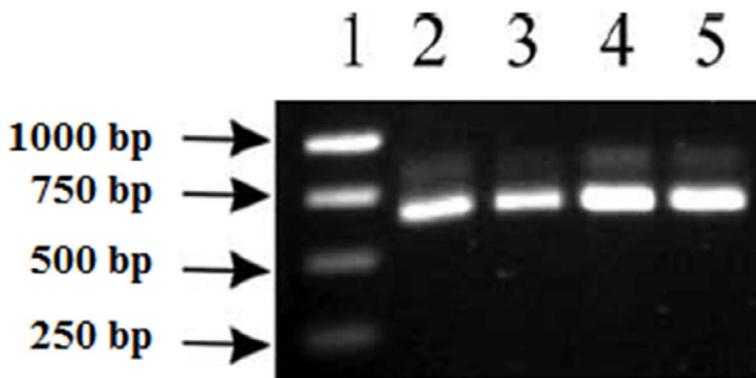


Figura 3 – Eletroforese em gel de agarose a 2% do amplicon da PCR espécie-específica para *Flavobacterium columnare*. 1 = marcador de DNA, 2-5 – amostras de *F. columnare*.

é plenamente possível a realização do diagnóstico a partir de animais enviados resfriados, em caixas isotérmicas com gelo (normal ou reciclável). O tempo de transporte máximo recomendado nesses casos é de 48 horas. O congelamento promove a lise das células de *F. columnare*, devido à formação de cristais de gelo e rompimento da célula bacteriana em temperaturas abaixo de 0°C. Assim sendo, o envio de material congelado não é recomendado para o diagnóstico bacteriológico da doença. Mas, a partir desse material, é possível a detecção do patógeno por métodos moleculares.

Os principais tecidos utilizados para o isolamento da bactéria são rim, fígado, tecido subcutâneo adjacente às áreas de necrose da pele e tecido branquial, nos casos de infecção desse órgão³⁰. Posteriormente, ao isolamento em culturas puras em meios específicos (como supramencionado), a morfologia da colônia, morfologia microscópica na coloração de gram, e testes de catalase e oxidase são utilizados com triagem inicial. A confirmação da espécie bacte-

riana pode ser realizada por testes fenotípicos³ e moleculares (PCR e PCR em tempo real).

Com a popularização dos métodos moleculares, diversas técnicas têm sido utilizadas para a confirmação da espécie bacteriana e para detecção da bactéria *F. columnare* a partir de determinados tecidos de peixes infectados^{31,32}. A primeira ferramenta molecular padronizada para diagnóstico de *F. columnare* foi a PCR e sequenciamento do gene da subunidade 16S do RNA ribossômico²¹. No ano de 2004, foi desenvolvida uma PCR espécie-específica para a confirmação e detecção de *F. columnare*³¹. Esse método tem sido utilizado pelo AQUAVET (EV-UFGM) desde 2007 e vem apresentando uma alta eficiência para o diagnóstico da doença. Na Figura 3 é apresentada uma imagem do produto da PCR espécie-específica para *F. columnare* com peso molecular de 675 pares de base, após a eletroforese em gel de agarose.

Adicionalmente, outros métodos mais modernos, como PCR em tempo

real (qPCR), são disponíveis para a confirmação da espécie e detecção desse patógeno a partir de amostras de tecidos³².

5. Tratamento

Por ser uma doença bacteriana que acomete o tegumento e/ou as brânquias, os tratamentos em casos de surtos de columnariose são baseados na realização de banhos com substâncias desinfetantes ou a antibioticoterapia oral dos lotes¹. Devido à rápida progressão da doença, e para uma terapia eficaz, esta deve ser iniciada o mais rápido possível, imediatamente após a observação de sinais clínicos. Assim sendo, em casos de evolução hiperaguda da doença (dependendo dos fatores de risco e virulência da amostra), pode não haver tempo hábil para a execução de tratamentos nos lotes acometidos²⁹. Além do tratamento terapêutico, banhos profiláticos podem ser realizados com substâncias desinfetantes, para evitar a ocorrência da infecção em fases críticas em que a enfermidade frequentemente acomete os animais, por exemplo, pós o transporte de animais³³.

As principais substâncias utilizadas para o tratamento da columnariose via banho são o cloreto de sódio (NaCl,

Tratamentos baseados na realização de banhos com substâncias desinfetantes ou a antibioticoterapia oral dos lotes.

As principais substâncias utilizadas para o tratamento da columnariose via banho são o cloreto de sódio (NaCl, sal comum), permanganato de potássio, sulfato de cobre e cloramina-T.

sal comum), permanganato de potássio, sulfato de cobre e cloramina-T. A utilização de cloreto de sódio acima de 0,5% *in vitro* inibe o crescimento e a aderência de colônias de *F. columnare*

em ágar. Isso fez com que diversos autores testassem *in vivo* a utilização desse sal, e diversos resultados abordam uma redução significativa de mortalidade por uso de banhos de 1% de NaCl^{10,26,27}. No Brasil, melhores resultados no controle da columnariose em casos de surtos em larvas e juvenis de tilápia do Nilo têm sido obtidos com banhos de 2% de NaCl por 30 minutos, por três dias consecutivos. O cloreto de sódio deve ser utilizado com cautela em espécies de peixes nativos, pois muitas dessas não apresentam boa resistência a variações na osmolaridade da água e podem morrer. Adicionalmente, de maneira profilática, pode ser realizada a salinização a 0,5% da água em sistemas de recirculação, comumente utilizados nas fases iniciais do cultivo, como incubação de ovos e na larvicultura. Essa osmolaridade mais elevada inibe o crescimento e consequentemente a ocorrência de surtos de columnariose. Dados da literatura demonstram que o per-

manganato de potássio (2 mg/L), sulfato de cobre (0,5 mg/L por 12 horas, adição na água do tanque) e cloramina-T (15 mg/L) são eficientes na profilaxia da infecção por *F. columnare*, sendo que, em casos de surtos, concentrações maiores por períodos curtos de tempo são utilizadas¹. Porém, esquemas terapêuticos definidos para controle da columnariose com essas substâncias são descritos apenas para truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), bagre-do-canal e outras espécies não cultivadas no país.

A antibioticoterapia oral é a principal alternativa para o tratamento da columnariose em casos de surtos agudos, principalmente em sistemas de cultivo em que a realização de banhos é difícil ou inviável (Ex. gaiolas, tanques de terra de amplas dimensões etc.). Os antibióticos são em geral misturados à ração nas próprias fazendas ou ainda podem ser incorporados na ração durante a fabricação. Para isso a empresa de ração deve possuir uma licença específica de acordo a legislação vigente no país, e a requisição da mistura deve ser realizada por um médico veterinário regularmente matriculado no conselho de classe. Atualmente, produtos à base dos antibióticos oxitetraciclina (OTC) e florfenicol (FFC) são licenciados para uso na aquicultura e utilizados no tratamento da columnariose. Apesar da ampla sensibilidade das amostras de *F. columnare* a esses antibióticos, na práti-

ca os tratamentos ainda podem apresentar falhas, devido à anorexia ocasionada pela infecção e a não ingestão da ração medicada^{25,33}.

A OTC é uma droga eficiente no combate de columnariose, bem como de outras doenças causadas por bactérias gram-negativas e positivas²⁷. Na literatura, as doses recomendadas para o tratamento da infecção por *F. columnare* variam entre 50 e 100 mg OTC por quilo de peso vivo, em via oral, durante 10 dias^{26,27}. O florfenicol apresenta-se também altamente eficiente no tratamento da columnariose quando administrado por via oral. A dose recomendada pelo fabricante é de 10 mg de FFC por quilo de peso vivo, durante 10 dias consecutivos. Essa dosagem tem se mostrado eficiente no controle da doença em alevinos de tilápia do Nilo e peixes nativos, principalmente bagres e tambaqui (*Colossoma macropomum*). Já para algumas espécies de peixes exóticos, como “Sunshine bass”, doses 50% maiores desse fármaco têm sido recomendadas³⁴. Embora as amostras de *F. columnare* ainda não tenham apresentado resistência a OTC e FFC, os estudos de resistência a antibióticos na aquicultura brasileira ainda não são muito amplos. Por isso o uso de antibióticos deve ser realizado com cautela, apenas como medida de controle, e, se possível, sinergicamente com substâncias desinfetantes para que seja reduzido o risco de seleção e desenvolvimento de amostras resistentes¹.

6. Controle e prevenção

A prevenção e controle da doença devem se basear em boas práticas de manejo e a adoção de medidas para evitar e mitigar os fatores de risco que propiciam a ocorrência da doença^{15,27}. Além disso, tratamentos profiláticos podem (e devem) ser realizados em situações de estresse que predispõem a ocorrência da columnariose. Como as substâncias desinfetantes atuam de maneira inespecífica, geralmente alterando a fisiologia da célula bacteriana ou inativando componentes da superfície do microrganismo, a indução de resistência a esses produtos é improvável ou de baixa possibilidade. Assim sendo, esses tratamentos podem ser utilizados rotineiramente com segurança.

Diversos estudos demonstram a associação entre a ocorrência de surtos de columnariose e altos níveis de amônia/nitrito, alta densidade de estocagem e lesões cutâneas^{10,24}. Durante o transporte dos animais (larvas, alevinos e juvenis) e diferentes fases do cultivo (incubação de ovos e larvas; masculinização em hapas; treinamento alimentar de peixes nativos carnívoros etc.), a concentração de oxigênio dissolvido, bem como outros parâmetros limnológicos devem ser estritamente monitorados e controlados.

A prevenção e controle da doença devem se basear em boas práticas de manejo e a adoção de medidas para evitar e mitigar os fatores de risco.

Amplamente utilizadas na prevenção de outras doenças bacterianas em peixes, o uso de vacinas não é um método consagrado para imunoprofilaxia da columnariose. Embora existam diversas vacinas bem-sucedidas experimentalmente, a utilização comercial dessas é ainda restrita, sendo adotadas em alguns poucos países. A imunização via banho com uma bacterina demonstrou proteger carpas comuns da columnariose em condições experimentais. Contudo, esse produto não induz resposta imune humoral significativa e protetora nesses peixes. Resultados semelhantes foram obtidos com uso de bacterina semelhante em bagre-do-canal¹².

No Brasil, estudo avaliando o uso de bacterina por via injetável e oral demonstrou que, por via parenteral, a indução de imunoglobulinas específicas é significativa; porém, sua concentração não está diretamente relacionada à proteção contra a doença²⁹.

Nos EUA, uma vacina viva atenuada administrada por imersão é licenciada para o uso em bagre-do-canal. Sua principal aplicação é para imunização de larvas entre 10 e 48 dias pós-eclosão. Em condições experimentais, esse produto propiciou uma porcentagem relativa de sobrevivência (RPS) dos animais vacinados de 57 a 94 %. Apesar da eficiência e aplicabilidade, esse produto possui in-

certezas quanto à sua segurança. Existe a possibilidade teórica de recuperação da virulência da amostra vacinal após a administração nos animais ou sua liberação no ambiente³⁵. Testes laboratoriais demonstram uma pequena chance da reinfecção dos peixes com a amostra vacinal³⁵. Porém, isso poderia permitir que esse patógeno voltasse a ocasionar doença na espécie cultivada ou em outras de vida livre, podendo dizimá-las nas visões mais cataclísmicas. Por esse motivo, em diversos países, principalmente na Comunidade Europeia, o uso de vacinas vivas atenuadas é proibido.

7. Referências bibliográficas

- DECLERCQ, A.M., HAESBROUCK, F., VAN DEN BROECK, W., BOSSIER, P., DECOSTERE, A. Columnaris disease in fish: a review with emphasis on bacterium-host interactions. *Veterinary Research*, v. 44, 2013.
- ARIAS, C.R., WELKER, T.L., SHOEMAKER, C.A., ABENATHY, J.K., KLESIOUS, P.H. Genetic fingerprinting of *Flavobacterium columnare* isolates from cultured fish. *Journal of Applied Microbiology*.
- BARONY, G.M., LUZ, R.K., FIGUEIREDO, H.C.P., LEAL, C.A.G. New hosts and genetic diversity of *F.columnare* strains isolated from diseased tilapia and native Brazilian species. *Journal of Fish Diseases*, Paper submetido, 2014.
- FIGUEIREDO, H.C.P., KLESIOUS, P.H., ARIAS, C.R., EVANS, J., SHOEMAKER, C.A., PEREIRA JR., D.J., PEIXOTO, M.T.D. Isolation and characterization of strains of *Flavobacterium columnare* from Brazil. *Journal of Fish Diseases*, v. 28, p. 199-204, 2005.
- 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. *Braz. J. Biol.*, v. 68, p. 409-414, 2008.
- SEBASTIÃO, F.A., PILARSKI, F., LEMOS, M.V.F. Isolation and molecular characterization of *Flavobacterium columnare* strains from fish in Brazil. *Journal of Bacteriology Research*, v. 2, p. 22-29, 2010.
- DAVIS, H.S. A new bacterial disease in freshwater fishes. *United States Bureau of Fisheries Bulletin*, v. 38, p. 38-63, 1922.
- PILARSKI, F. Estudo da Columnariose de quatro espécies de peixes tropicais: Isolamento e Caracterização de *Flavobacterium columnare*. 69 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2002.
- KUNTITU, H.M.T., SUNDBERG, L.-R., PULKKINEN, K., VALTONEN, E.T. Environment may be the source of *Flavobacterium columnare* outbreaks at fish farms. *Environmental Microbiology Reports*, v. 4, p. 398-402, 2012.
- SHOTTS, E.B., STARLIPER, C.E. Flavobacterial Diseases: Columnaris Diseases, Cold-water Disease and Bacterial Gill Disease. In: Who, P.T.K., Bruno, D.W. FISH DISEASES AND DISORDERS VOLUME 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections. Oxon: CAB International, 1999, p. 559-576.
- WEDEMEYER, G.A. PHYSIOLOGY OF FISH IN INTENSIVE CULTURE SYSTEMS. 1. ed. Londres, UK: Clapman & Hall, 1996, 232 p.
- BERNARDET, J.F., GRIMONT, P.A.D. Deoxyribonucleic acid relatedness and phenotypic characterization of *Flexibacter columnaris* sp. nov., nom. rev., *Flexibacter psychrophilus* sp. nov., nom. rev., and *Flexibacter maritimus*. *Int. J. of Syst. Evol. Microbiol.*, v. 39, p. 346-354, 1989.
- BERNARDET, J.F., SEGERS, P., VANCANNEYT, M., BERTHE, M., KERSTERS, K., VANDAMME, P. Cutting a Gordian knot: emended classification and description of the genus *Flavobacterium*, emended description of the family *Flavobacteriaceae*, and proposal of *Flavobacterium hydatis* nom. nov. (basonym, *Cytophaga aquatilis* Strohl and Tait 1978). *Int. J. of Syst. Evol. Microbiol.*, v. 46, p. 128-148, 1996.
- ORDAL, E.J., RUCKER, R.R. Pathogenic myxobacteria. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v. 56, p. 15-18, 1944.
- BULLOCK, G.L., HSU, T.C., SHOTTS JR., E.B. Columnaris disease of fishes. *US Fish & Wildlife Publications*, v. 129, 1989.
- KUNTITU, H.M.T., SUOMALAINEN, L.R., JOKINEN, E.I., VALTONEN, E.T. *Flavobacterium columnare* colony types: Connection to adhesion and virulence? *Microbial Pathogenesis*, v. 46, p. 21-

- 27, 2009.
17. AVENDANO-HERRERA R., GHERARDELLI V., OLMOS P., GODOY M.G., HEISINGER A. & FERNANDEZ J. *Flavobacterium columnare* associated with mortality of salmonids farmed in Chile: A case report of two outbreaks. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, v. 31, p. 36–44, 2011.
 18. DARWISH, A.M., ISMAIEL, A.A. Genetic diversity of *Flavobacterium columnare* examined by restriction fragment length polymorphism and sequencing of the 16S ribosomal DNA gene and the 16S–23S rDNA spacer. *Molecular and Cellular Probes*, v. 19, p. 267-274, 2005.
 19. LAFRENTZ, B.R., LAPATRA, S. E., SHOEMAKER, C.A., KLESIUS, P.H. Reproducible challenge model to investigate the virulence of *Flavobacterium columnare* genomovars in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Diseases of Aquatic Organisms*, v. 101, p. 115-121, 2012.
 20. SUOMALAINEN, L.-R., TIIROLA, M., VALTONEN, E.T. Chondroitin AC lyase activity is related to virulence of fish pathogenic *Flavobacterium columnare*. *Journal of Fish Diseases*, v. 29, p. 757-763, 2006.
 21. TRIYANTO, WAKABAYASHI, H. Genotypic diversity of strains of *Flavobacterium columnare* from diseased fishes. *Fish Pathology* v. 34, p. 65-71, 1999.
 22. OLIVARES-FUSTER, O., BAKER, J.L., TERHUNE, J.S., SHOEMAKER, C.A., KLESIUS, P.H., ARIAS, C.R. Host-specific association between *Flavobacterium columnare* genomovars and fish species. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 30, p. 624-633, 2007.
 23. XIE, H.X., NIE, P., CHANG, M.X., LIU, Y., YAO, W.J. Gene cloning and functional analysis of glycosaminoglycan-degrading enzyme chondroitin AC lyase from *Flavobacterium columnare* G4. *Archives of Microbiology*,
 24. DECOSTERE, A., HAESEBROUCK, F., TURNBULL, J.F., CHARLIER, G. Influence of water quality and temperature on adhesion of high and low virulence *Flavobacterium columnare* strains to isolated gill arches. *Journal of Fish Diseases*, v. 22, p.1-11, 1999.
 25. ROBERTS, R.J. The Bacteriology of Teleosts. In: ROBERTS, R.J. *Fish Pathology*. West Sussex: Wiley-Blackwell, 2012. p. 339-382.
 26. AUSTIN, B., AUSTIN, D. Bacterial Fish Pathogens: Diseases of Farmed and Wild Fish. 4. ed. Chichester, UK: Praxis Publishing, 2007. 552 p.
 27. NOGA E.J. 2010. *Fish Disease: Diagnoses and treatment*. Second edition. Wiley-Blackwell. 382-383.
 28. FARMER, B. IMPROVED METHODS FOR THE ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF *FLAVOBACTERIUM COLUMNARE*. 62 p. Dissertação. (Master of Science) – Agricultural and Mechanical College, Louisiana State University. 2002.
 29. LEAL, C.A.G., CARVALHO-CASTRO, G.A., SACCHETIN, P.S.C., LOPES, C.O., MORAES, A.M., FIGUEIREDO, H.C.P. Oral and parenteral vaccines against *Flavobacterium columnare*: evaluation of humoral immune response by ELISA and in vivo efficiency in Nile tilapia. *Aquaculture International*, v. 18, p. 657-666, 2010.
 30. MORISSON, C., CORNICK, J., SHUM, G., ZWICKER, B. Microbiology and histopathology of 'saddleback' disease of underyearling Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, v. 4, p. 243-258, 1981.
 31. DARWISH, A.M., ISMAIEL, A.A., NEWTON, J.C., TANG, J. Identification of *Flavobacterium columnare* by a species-specific polymerase chain reaction and renaming of ATCC43622 strain to *Flavobacterium johnsoniae*. *Molecular and Cellular Probes* v.24, p. 421-427, 2004.
 32. PANANGALA, V.S., SHOEMAKER, C.A., KLESIUS, P.H. TaqMan real-time polymerase chain reaction assay for rapid detection of *Flavobacterium columnare*. *Aquaculture research*, v. 38, p. 508-517, 2007.
 33. FIGUEIREDO, H. C. P., LEAL, C. A. G. Columnarrose: Doença da Piscicultura Moderna. *Panorama da Aqüicultura*, v. 17, p. 32-37, 2007.
 34. DARWISH, A.M., BEBAK, J.A., SCHRADER, K.K. Assessment of Aquaflor[®], copper sulphate and potassium permanganate for control of *Aeromonas hydrophila* and *Flavobacterium columnare* infection in sunshine bass, *Morone chrysops* female × *Morone saxatilis* male. *Journal of Fish Diseases*, v. 35, p. 637-647, 2012.
 35. SHOEMAKER, C.A., KLESIUS, P.H., EVANS, J.J. Immunization of eyed channel catfish, *Ictalurus punctatus*, eggs with monovalent *Flavobacterium columnare* vaccine and bivalent *F. columnare* and *Edwardsiella ictaluri* vaccine. *Vaccine*, v. 25, p. 1126-1131, 2007.



3. Septicemia por *Aeromonas* móveis em peixes

Thais F. Oliveira

Guilherme C. Tavares (CRMV-MG: 11340)

Henrique C. P. Figueiredo (CRMV-MG 5839)

Carlos A. G. Leal* (CRMV-MG 9014)

*carlosleal@vet.ufmg.br

[bigstockphoto.com](https://www.bigstockphoto.com)

1. Introdução

Septicemia por *Aeromonas* móveis é a denominação conferida à doença causada por bactérias mesófilas e móveis do gênero *Aeromonas* em peixes¹. As principais espécies patogênicas relacionadas a esse gênero bacteriano são: *A. caviae*, *A. sobria*, *A. bestiarum*, *A. veronii* e *A. hydrophila*. Essas espécies são ubíquas em ambientes aquáticos e, dentre elas, a bactéria *Aeromonas hydrophila*

*Septicemia por *Aeromonas* móveis é a denominação conferida à doença causada por bactérias mesófilas e móveis do gênero *Aeromonas* em peixes.*

destaca-se como principal agente etiológico envolvido em quadros septicêmicos¹. Essa bactéria também tem sido isolada a partir de amostras de água potável e alimentos, sendo de significativa importância tanto para a saúde pública humana como para a saúde animal². Casos

de surtos causados por esse patógeno têm sido relatados mundialmente em diferentes hospedeiros, como, por exemplo, répteis, anfíbios e mamíferos³. Em peixes, as infecções por *Aeromonas*

móveis causam alta mortalidade e significativas perdas econômica na piscicultura⁴. No Brasil, essas bactérias têm sido descritas como agentes etiológicos de surtos em fazendas de espécies de peixes exóticos e nativos⁵.

2. Agente etiológico: Taxonomia e Diversidade

Pertence à classe Gammaproteobacteria, ordem Aeromonadales e família Aeromonadaceae, as bactérias do gênero *Aeromonas* são microrganismos ubíquos em ambientes aquáticos. Além disso, essas bactérias têm sido frequentemente isoladas de peixes saudáveis e doentes, produtos alimentícios, fezes de animais e de seres humanos, assim como de outras amostras clínicas e ambientais⁶. A primeira descrição de um exemplar desse gênero data de 1891, quando Stainer relatou a ocorrência de infecções em rãs causadas por um microrganismo denominado à época como *Bacillus hydrophillus fuscus* (hoje *Aeromonas hydrophila*). Alguns anos depois, em 1894, foi realizado o relato da infecção em truta-arco-íris por um patógeno similar. Porém, a descrição formal do gênero ocorreu décadas depois, sendo realizada por Stainer em 1943. Na década de 1970, as espécies de *Aeromonas* foram classificadas em dois grupos em função da sua temperatura de crescimento, motilidade e produção de pigmentos. Um grupo foi composto

por amostras mesófilas, móveis e não pigmentadas, associado principalmente com infecções em seres humanos, tendo como principal representante a espécie *Aeromonas hydrophila*. O outro grupo foi composto por isolados psicrotrofícos imóveis e pigmentados, tendo como principal representante o patógeno de peixes *Aeromonas salmonicida*⁷.

As *Aeromonas* são caracterizadas como bastonetes, gram-negativos, não formadores de esporos, em geral oxidase positiva, anaeróbicas facultativas e quimiorganotróficas. Adicionalmente, são capazes de crescer a 0 % de NaCl, mas não em 6% de NaCl, produzem ácido a partir de inositol e a maioria delas é resistente ao agente vibriostático 0/129 (2,4- diamino - 6,7 - diisopropilpteridina). De acordo com a última versão do Manual de Bergey de Bacteriologia Sistemática, 14 espécies bacterianas são pertencentes ao gênero *Aeromonas*, sendo essas *Aeromonas hydrophila* (com três subespécies: *hydrophila*, *dhakensis* e *ranae*), *Aeromonas bestiarum*, *Aeromonas salmonicida* (com cinco subespécies: *salmonicida*, *masoucida*, *smithia*, *achromogenes* e *pectinolytica*), *Aeromonas caviae*, *Aeromonas media*, *Aeromonas eucrenophila*, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas veronii*, *Aeromonas jandaei*, *Aeromonas schubertii*, *Aeromonas trota*, *Aeromonas allosaccharophila*, *Aeromonas encheleia* e *Aeromonas popoffii*. Porém, mais 11 novas espécies foram descritas em artigos científicos e são aceitas atual-

mente: *Aeromonas simiae*, *Aeromonas molluscorum*, *Aeromonas bivalvium*, *Aeromonas tecta*, *Aeromonas aquariorum*, *Aeromonas piscicola*, *Aeromonas fluvialis*, *Aeromonas taiwanensis*, *Aeromonas sanarellii*, *Aeromonas diversa* e *Aeromonas rivuli*⁸. Adicionalmente, estudo recente demonstrou que as bactérias *Aeromonas hydrophila subsp. dhakensis* e *Aeromonas aquariorum* tratam-se do mesmo microrganismo, sendo proposta sua reclassificação como *Aeromonas dhakensis*⁸.

A identificação das espécies de *Aeromonas* tem sido historicamente realizada por métodos fenotípicos e moleculares⁸. Numerosos sistemas bioquímicos têm sido propostos para a identificação desses microrganismos. Apesar da ampla utilização, esses testes são capazes apenas de discriminar com segurança as espécies em três grandes grupos fenotípicos: o complexo "*Aeromonas hydrophila*" (composto por *A. hydrophila*, *A. bestiarum*, *A. salmonicida* e *A. popoffii*); complexo "*Aeromonas caviae*" (*A. caviae*, *A. media* e *A. eucrenophila*); e o complexo "*Aeromonas sobria*" (*A. sobria*, *A. veronii*, *A. jandaei* e *A. trota*). As demais espécies descritas recentemente apresentam padrões fenotípicos que as classificam dentro dos três supramencionados complexos. As identificações fenotípicas para essas bactérias são imprecisas e geram resultados inconclusivos na maioria dos casos. Nesse contexto, os métodos moleculares têm se apresentado como uma solu-

ção para suplantar esses problemas⁷.

Em 1997, Borrel e colaboradores desenvolveram uma técnica baseada na RFLP de produtos de PCR do gene 16S rRNA para a identificação de *Aeromonas spp.*⁹. Esse método tem sido amplamente utilizado para identificação de amostras isoladas de casos clínicos de doenças em peixes⁸. No entanto, em alguns casos, essa técnica não é capaz de diferenciar espécies estreitamente relacionadas, que apresentam sequências muito similares do gene 16S rRNA. Isso tem sido verificado em parte das novas espécies de *Aeromonas* descritas na literatura. A espécie *A. piscicola* apresenta o mesmo padrão de RFLP que *A. salmonicida* e a sequência 16S rRNA 99,8-100% similar à *A. bestiarum*. O mesmo ocorre com *A. caviae* e *A. aquariorum*, que apresentam 99,8% de similaridade no gene 16S rRNA e o mesmo padrão de RFLP. Porém, *A. aquariorum* foi isolada originalmente de peixes ornamentais, mas não tem sido até agora isolada de espécies aquícolas. A RFLP também não é útil para 8% das amostras de *Aeromonas* que apresentam mutações no gene 16S rRNA na região alvo das endonucleases utilizadas⁷.

O sequenciamento e análise filogenética de genes "housekeeping", como *gyrB* e *rpoD*, tem sido utilizado de maneira complementar à RFLP para uma melhor discriminação das espécies de *Aeromonas*. Além desses, esquemas de análise de sequências em múltiplos

locus (MLST) têm sido desenvolvidos para avaliação de *Aeromonas* spp.⁷. O primeiro MLST para *Aeromonas* com acesso público foi criado por Martino e colaboradores (2011) (<http://pubmlst.org/aeromonas>)¹⁰. Esse inclui seis genes (*gyrB*, *Grol*, *gltA*, *metG*, *ppsA* e *recA*, com total de 3.084 nucleotídeos). O método foi testado em 96 amostras contendo isolados de referência e de campo, sendo 79,2 % obtidas a partir de peixes doentes e o restante de amostras de água.

A técnica permitiu a identificação precisa dos isolados e tem sido considerada uma alternativa viável para identificação e determinação das relações epidemiológicas das amostras de *Aeromonas*^{7,10}. Além de permitir a identificação das espécies, o MLST é um método utilizado para a avaliação da diversidade genética de amostras de uma mesma espécie. Em estudo recente realizado no AQUAVET, 30 amostras de *A. hydrophila* isoladas de casos clínicos de doenças em peixes e água das fazendas foram avaliadas pelo MLST¹⁰. Uma alta diversidade genética foi observada nesses isolados, com mais de

As bactérias do gênero Aeromonas são frequentemente isoladas em ambientes aquáticos e na microbiota de peixes, anfíbios e outros mamíferos.

No Brasil, casos foram descritos em carpa, tilápia, piracanjuba, beta, pacu e matrinxã.

Infecções por Aeromonas podem se manifestar como doença ulcerativa ou em quadros de septicemia hemorrágica.

20 tipos genéticos (*sequence types*) distintos caracterizados.

3. Principais hospedeiros e doença clínica

As bactérias do gênero *Aeromonas* são frequentemente isoladas em ambientes aquáticos e na microbiota de peixes, anfíbios e outros mamíferos^{6,11}. Esses patógenos têm sido associados a casos de infecção em um amplo número de espécies de peixes cultivados e de vida livre no mundo. No Brasil, casos de infecção por *Aeromonas* spp. foram descritos em carpa (*Cyprinus carpio*)¹², tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), jundiá (*Rhamdia quelen*), piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), beta (*Betta splendens*)⁵, pacu (*Piaractus mesopotamicus*)¹ e matrinxã (*Brycon amazonicus*)¹³. Os surtos têm sido historicamente impactantes, principalmente em sistemas de cultivo de espécies nativas. Contudo, recentemente, as infecções por *A. hydrophila* têm aumentado em fazendas de tilápia do Nilo.

As infecções por *Aeromonas* podem se manifestar de formas clinicamente distintas em peixes, principalmente

como doença ulcerativa (semelhante à furunculose causada por *A. salmonicida* em peixes de clima temperado) (Figura 1) ou em quadros de septicemia hemorrágica (Figura 2)⁷. Esta última é a manifestação mais comum e importante da enfermidade, e é geralmente associada a infecções por *Aeromonas hydrophila* no Brasil. A infecção está associada a um quadro de infecção generalizada, acometendo principalmente rins, fígado, baço, brânquias, musculatura esquelética e cérebro¹. Sinais clínicos de

letargia, anorexia, brânquias pálidas e melanose são observados inicialmente. Com a evolução do quadro clínico, pode-se observar hiperemia, petéquias e hemorragia na pele, boca e base das nadadeiras (Figura 2). Adicionalmente, ascite, exoftalmia e natação errática podem ser observadas^{1,14,15}. A sintomatologia nervosa e o quadro de septicemia podem ser confundidos com os sinais clínicos ocasionados por infecções por *Streptococcus* sp., sendo necessário um diagnóstico laboratorial mais acurado

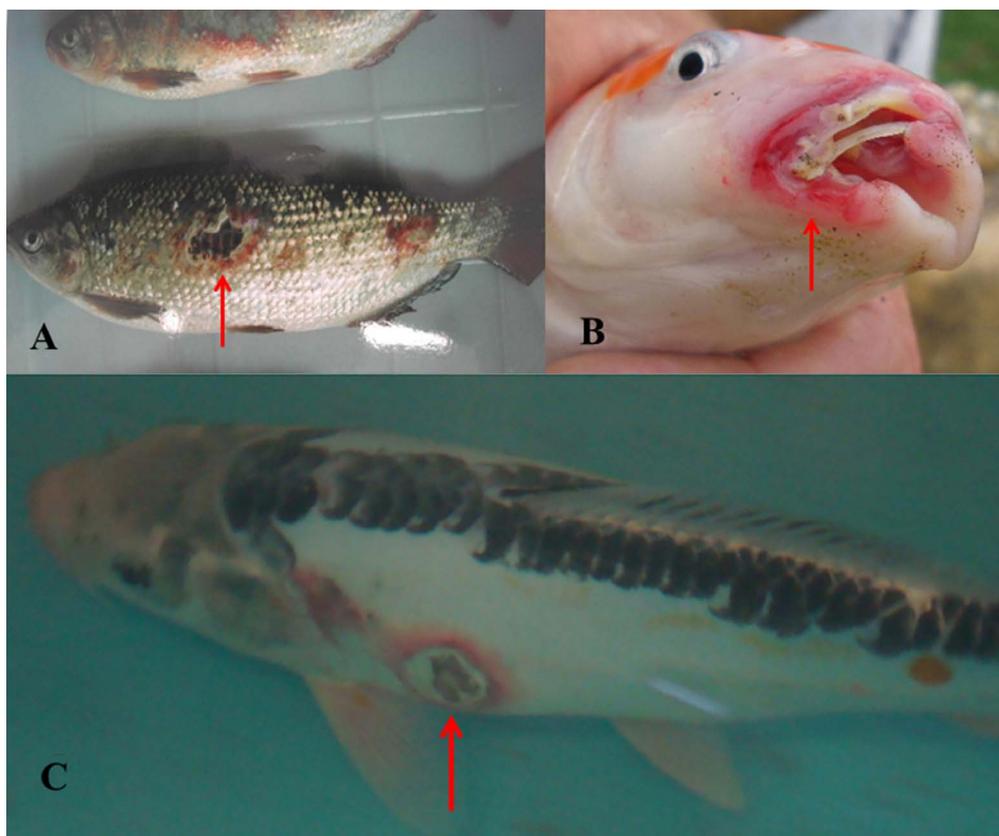


Figura 1: doença ulcerativa causada por *Aeromonas hydrophila* em peixes: A- piracanjuba coletada durante um surto em fazenda no Brasil apresentando ulceração cutânea (seta); B- carpa colorida apresentando ulceração na boca; C- carpa colorida com ulceração cutânea (seta).

para determinar o agente etiológico envolvido no surto¹.

À necropsia podem ser observados a presença de exsudato serosanguinolento na cavidade celomática, hemorragia visceral, hepatomegalia, fígado pálido com petéquias, esplenomegalia, rins hiperplásicos e friáveis. Petéquias e sufusões podem ser observadas na parede interna da cavidade celomática^{16,17,18}. Na histopatologia, pode-se observar lesões cutâneas sem bordas definidas com inflamação granulocítica necrosante e conteúdo exsudativo abundante. Observa-se a desintegração de fibras musculares caracterizada por edema intersticial inflamatório. Os rins apresentam-se com distrofia e formação de gotículas hialinas no epitélio

À necropsia podem ser observados a presença de exsudato serosanguinolento na cavidade celomática, hemorragia visceral, hepatomegalia, fígado pálido com petéquias, esplenomegalia, rins hiperplásicos e friáveis.

dos túbulos proximais. E a parede da bexiga natatória pode estar espessada, congestionada e com infiltrado edematoso¹⁹. Em peixes com septicemia, pode ser observada necrose dos tecidos do rim, baço e mucosa intestinal, assim como áreas de necrose focal no coração, fígado, pâncreas e gônadas.

A presença de melanina livre ou lipofuscina pode ser observada a partir da ruptura de melano-macrófagos¹⁴. A gravidade da infecção é dependente do estado imunológico dos peixes. Casos mais graves podem acometer diferentes órgãos, prejudicando funções vitais e levando o peixe ao óbito^{14,15}.

A transmissão da bactéria *A. hydrophila* em sistemas de cultivo ocorre por via direta com contato direto de peixes

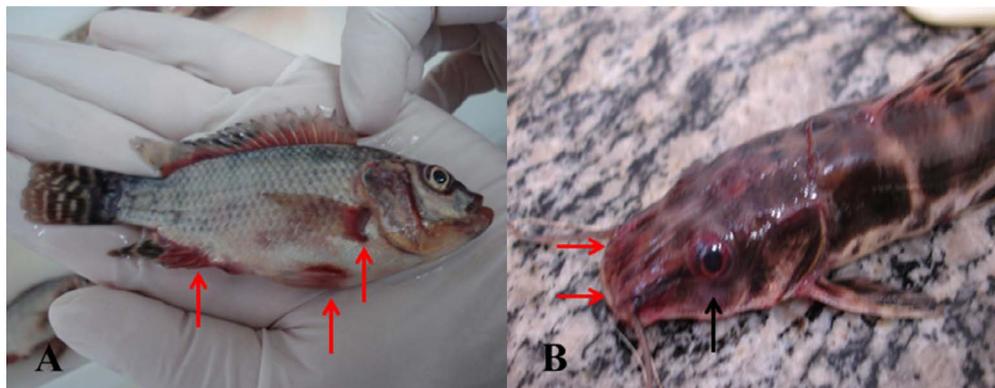


Figura 2: septicemia hemorrágica causada por *Aeromonas hydrophila* em peixes: A- tilápia do Nilo infectada experimentalmente, em que pode ser verificado um quadro severo de hemorragia na base de nadadeiras (setas); B- pintado amazônico (*Leiarius marmoratus* x *Pseudoplatystoma reticulatum*) apresentando hiperemia pronunciada na região periocular (seta preta) e hiperemia cutânea (setas vermelhas).

infectados e sadios, e por contato indireto, através da veiculação da bactéria via água. Adicionalmente, a ingestão de ração contaminada tem sido descrita como uma potencial fonte de infecção para os peixes¹⁴.

4. Patogênese da Doença e Fatores de Risco

A interação entre *Aeromonas hydrophila* e o peixe depende de diversos mecanismos para que ocorra a infecção. Fatores de virulência como antígeno O, cápsula, camada S, exotoxinas (hemolisinas e enterotoxinas), exoenzimas que digerem componentes celulares e o sistema de secreção tipo III (SSTT) estão relacionados à patogênese da doença em peixe¹.

As estruturas de superfície, como cápsulas e flagelos laterais, de *Aeromonas hydrophila* estão relacionadas à auto-agregação e hemaglutinização. Os lipopolissacarídeos (LPS), presentes na membrana externa desse microrganismo, exercem potente efeito pró-inflamatório, ocasionando distúrbios vasculares sistêmicos. O antígeno O (porção mais externa do LPS) é responsável por promover a evasão bacteriana contra componentes do sistema complemento e células fagocíticas. Adicionalmente, esse patógeno possui várias enzimas, como proteases, hemolisinas, amilase, gelatinase, entre outras,

*Fatores predisponentes:
baixa qualidade da
água, altas densidades,
alto estresse dos
animais.*

que geralmente estão relacionadas com a lise de células e tecidos¹⁵.

O sistema de secreção do tipo III é um fator de virulência importante nessa bactéria. Esse sistema é constituído por uma estrutura basal que ancora um injectsoma em formato de agulha na membrana celular da bactéria, e é normalmente induzido por contato entre bactéria-hospedeiro. A partir desse sistema, a bactéria é capaz de introduzir toxinas bacterianas diretamente no citoplasma da célula do peixe. Tais substâncias alteram as funções celulares e impedem que ocorra uma resposta imune e, conseqüentemente, a eliminação da bactéria^{1,5}.

A intensificação da piscicultura propicia alterações no ambiente dos sistemas de cultivo e o estresse dos peixes. Esses são fatores predisponentes para o aparecimento de surtos de infecções por *Aeromonas* móveis¹. Baixa qualidade da água, altas densidades de estocagem e a realização de manejos de maneira incorreta, com alto estresse dos animais, corroboram o desencadeamento de surtos da doença¹. A infecção por *A. hydrophila* ocorre com maior frequência em períodos de temperaturas mais baixas, quando a resposta imunológica

dos peixes é mais baixa devido à anorexia e baixa qualidade da água. Porém, em temperaturas mais elevadas (acima de 30°C), surtos da doen-

ça também podem ocorrer^{1,16}. Surtos da doença têm sido comumente verificados no país: após o transporte dos peixes (principalmente associados a intercorrências no transporte de origens diversas, como problemas na depuração, temperatura elevada durante o transporte etc.), principalmente de juvenis de espécies nativas; nos primeiros dias após o povoamento de gaiolas; após a seleção e classificação dos peixes (principalmente animais adultos, em que a operação é mais difícil, conseqüentemente mais estressante para os animais); em cultivos em gaiolas sob altas densidades de estocagem associados à elevação da temperatura da água; em peixes cultivados em tanques de terra durante o inverno, em regiões onde a temperatura da água encontra-se abaixo da zona de conforto térmico para a espécie cultivada; entre outros¹.

Por se tratar de uma bactéria ubíqua em ambientes aquáticos, a infecção por *Aeromonas hydrophila* é citada por alguns autores como sendo oportunista, já que está diretamente associada a condições de estresse dentro do sistema de cultivo^{20,21}. Entretanto, a identificação de fatores de virulência altamente específicos e a patogenicidade elevada de algumas amostras dessa espécie bacteriana,

sugerem a especificidade desse microrganismo como patógeno primário para peixes^{5,22}.

5. Diagnóstico

O diagnóstico das infecções por *Aeromonas* móveis é baseado no isolamento e identificação do microrganismo. O diagnóstico clínico apresenta pouca aplicabilidade, pois os sinais clínicos da doença são genéricos e podem ser confundidos com outras infecções bacterianas em peixes, como estreptococoses e infecções por *Edwardsiella*. Para o diagnóstico via exame bacteriológico, os peixes com sintomatologia clínica da doença devem ser coletados e enviados vivos ou sob refrigeração (em caixa de isopor, para evitar a degradação dos peixes) ao laboratório. O exame bacteriológico é baseado na coleta asséptica de fragmentos de diferentes órgãos dos peixes, principalmente cérebro e rim, e inoculadas em meios de cultivo, como ágar sangue ou ágar soja tripticaseína (TSA). A antisepsia na coleta dos

fragmentos de órgãos é essencial para um diagnóstico acurado dos casos de infecção por *Aeromonas* móveis. Como algumas amostras não patogênicas desses microrganismos são constituintes da microbiota do muco

O diagnóstico das infecções por Aeromonas móveis é baseado no isolamento e identificação do microrganismo. O diagnóstico clínico apresenta pouca aplicabilidade.

e trato digestório, essas podem contaminar as amostras e originar resultados falso-positivos. Por muitos anos as *Aeromonas* foram hegemonicamente os patógenos mais frequentemente associados a infecções em peixes cultivados. Atualmente, o cenário é bem mais amplo quanto ao número de patógenos que acometem as pisciculturas. Dentre outros fatores, muitos desses casos pretéritos de infecções por *Aeromonas* móveis podem ter sido ocasionados por problemas no isolamento e resultados falso-positivos¹.

Após a incubação de 24-48 horas a 28°C, são realizados testes primários de caracterização bacteriana, como coloração de gram, catalase e oxidase. Posteriormente, a identificação da espécie bacteriana pode ser realizada por métodos bioquímicos e moleculares, mas, como supramencionado, os testes moleculares são os mais indicados. A metodologia que apresenta maior celeridade e menor custo por exame é a amplificação por PCR (reação em cadeia da polimerase) do gene 16S rRNA seguido da análise de RFLP^{1,9}. Outros métodos, como o sequenciamento e análise com o algoritmo BLAST de genes conservados (*housekeeping*), como *rpoD*, *gyrB* e *cps60*, podem ser utilizados; porém, apresentam tempo e custos mais elevados. A avaliação filogenética da sequência do gene 16S rRNA não apresenta

boa resolução para identificação das espécies de *Aeromonas* (alta variabilidade intra e interespecie); portanto, não é aplicável. Após a identificação da espécie bacteriana, no caso da espécie *Aeromonas hydrophila*, alguns métodos têm sido utilizados para caracterização e diferenciação de amostras patogênicas e não patogênicas. Um exemplo é a detecção de genes estruturais do sistema de secreção do tipo III (SSTT), que conferem maior virulência à bactéria⁵. Adicionalmente, a realização de testes de sensibilidade a antimicrobianos são importantes para a prescrição da correta antibioticoterapia para o tratamento do caso. Diversos estudos relatam a ocorrência de amostras de *Aeromonas* resistentes a diferentes antibióticos, incluindo a oxitetraciclina, um dos fármacos mais comumente utilizados para o tratamento de doenças bacterianas em peixes. É importante atentar que os patógenos de animais aquáticos apresentam critérios e metodologias específicas para realização de testes de sensibilidade a antimicrobianos. Para esses microrganismos, não é recomendada a utilização de protocolos padrão de antibiograma e determinação da CIM (concentração inibitória mínima) para patógenos veterinários. Os procedimentos aceitos internacionalmente para determinação da sensibilidade a antimicrobianos em amostras de *Aeromonas* móveis são os descritos nos manuais VET03-A

(discos de difusão) e VET04-A (CIM) do “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI)^{23,24}.

6. Tratamento, Controle e Prevenção

O tratamento é realizado com a administração de antibióticos, principalmente por via oral, adicionados à ração. No Brasil, dois antibióticos são licenciados para uso na aquicultura e aplicáveis ao tratamento das infecções por *Aeromonas* móveis, a oxitetraciclina e o florfenicol²⁵. As doses administradas para o tratamento da doença são de 100mg/Kg de peso vivo (PV) para oxitetraciclina e 10mg/Kg de PV para florfenicol. Independentemente do fármaco utilizado, o tratamento deve ser realizado por 10 dias consecutivos¹⁵. O

tratamento terapêutico, apesar da eficiência dos fármacos, pode apresentar falhas devido à anorexia gerada pela doença.

Desse modo, o tratamento dos lotes nos casos de surtos terá objetivo metafilático. Esse visa ao tratamento de toda a população do tanque, mas terá eficiência principalmente nos peixes ainda sadios ou em período de incubação da doença (evitando assim a infecção), como também animais subclínicos ou no início do quadro clínico e que ainda apresentam apetite¹. Nos casos de surtos, mesmo

O tratamento é realizado com a administração de antibióticos, principalmente por via oral, adicionados à ração.

após a introdução da antibioticoterapia, mortalidades podem continuar a ocorrer. Isso decorre do fato supracitado, de que os animais doentes não irão ingerir a ração com o medicamento, chegando a óbito.

A profilaxia pode ser obtida a partir de boas práticas de manejo, evitando altas densidades de estocagem, realização de arraçoamento correto e reduzindo injúrias e fatores estressantes que poderiam favorecer a ocorrência de surtos por esse patógeno. Controle da qualidade da água também deve ser realizado rotineiramente¹⁶; assim como o controle de infestações parasitárias, a partir da realização de banhos terapêuticos com permanganato de potássio, sulfato de cobre ou cloreto de sódio. A

presença desses agentes infecciosos pode acarretar em lesões de tegumento e predispor às infecções secundárias por

agentes bacterianos, principalmente *A. hydrophila*. Adicionalmente, podem ser administradas vitaminas C e E, que promovem a estimulação do sistema imune dos peixes¹⁷. A vacinação é uma alternativa para a prevenção das infecções por *Aeromonas* nas pisciculturas mundiais. No mundo, existem vacinas comerciais apenas para a prevenção de surtos ocasionados por *Aeromonas salmonicida* em

A profilaxia pode ser obtida a partir de boas práticas de manejo.

peixes (AQUAVAC® FNM e NORVAX® MINOVA 6)²⁶. Porém, não existem vacinas comerciais para a prevenção das infecções por *A. hydrophila*. Diferentes tipos de vacinas têm sido testados em condições experimentais contra esse patógeno a partir de componentes da própria bactéria. Contudo, essas diferentes preparações apresentam variáveis graus de proteção em peixes devido à alta variabilidade antigênica das amostras de *A. hydrophila*^{27,28}. No Brasil, não existe nenhuma vacina licenciada para uso em pisciculturas²⁹.

7. Referências bibliográficas

- FIGUEIREDO, H. C. P.; CARVALHO-CASTRO, G. A.; LEAL, C. A. G. et al. Quem tem medo de *Aeromonas*? *Panorama da Aquicultura*, v. 18, n. 108, p. 26-31, 2008.
- EDBERG, S. C.; BROWME, F. A.; ALLEN, M. J. Issues for microbial regulation: *Aeromonas* as a model. *Crit. Rev. Microbiol.*, v. 33, n. 1, p.89-100, 2007.
- VIVAS, J.; CARRACEDO, B.; RIANO, J. et al. Behavior of an *Aeromonas hydrophila* aroA live vaccine in water microcosm. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 70, n. 5, p. 2702-2708, 2004.
- FANG, H. M.; GE, H.; SIN, Y. M. Cloning, characterization and expression of *Aeromonas hydrophila* major adhesion. *Fish Shellfish Immunol.*, v. 16, n. 5, p. 645-658, 2004.
- CARVALHO-CASTRO, G. A.; LOPES, C. O.; LEAL, C. A. G. et al. Detection of type III secretion system genes in *Aeromonas hydrophila* and their relationship with virulence in Nile tilapia. *Vet. Microbiol.*, v. 144, n. 3-4, p. 371-376, 2010.
- JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity and infection. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 23, n. 1, p.35-73, 2010.
- BEAZ-HIDALGO, R.; FIGUERAS, M. J. *Aeromonas* spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease. *J. Fish. Dis.*, v. 36, n. 4, p. 371-388, 2013.
- BEAZ-HIDALGO, R.; MARTINEZ-MURCUA, A.; FIGUERAS, M. J. Reclassification of *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* Huys et al. 2002 and *Aeromonas aquariorum* MARTINEZ-MURCIA et al. 2008 as *Aeromonas dhakensis* sp. nov. comb nov. and emendation of the species *Aeromonas hydrophila*. *Syst. Appl. Microbiol.*, v. 36, n. 3, p. 171-176, 2013.
- BORRELL, N.; ACINAS, S. G.; FIGUERAS, M. J. et al. Identification of *Aeromonas* clinical isolates by restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 16S rRNA genes. *J. Clin. Microbiol.*, v. 35, n. 7, p. 1671-1674, 1997.
- MARTINO, M. E.; FASOLATO, L.; MONTEMURRO, F. et al. Determination of microbial diversity of *Aeromonas* strains on the basis of multilocus sequence typing, phenotype, and presence of putative virulence genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 77, n. 14, p. 4986-5000, 2011.
- LORÉN, J. G.; FARFÁN, M.; FUSTÉ, M. C. Molecular phylogenetics and temporal diversification in the genus *Aeromonas* based on the sequence of five housekeeping genes. *PLoS One*, v. 9, n. 2, e88805.
- FALCO, A.; FROST, P.; MIEST, J. et al. Reduced inflammatory response to *Aeromonas salmonicida* infection in common carp (*Cyprinus carpio* L.) fed with β -glucan supplements. *Fish Shellfish Immunol.*, v. 36, n. 6, p. 1051-1057, 2012.
- OLIVEIRA, S. R.; SOUZA, R. T. Y.; BRASIL, E. M. et al. LD50 of the bactería *Aeromonas hydrophila* to matrinxã, *Brycon amazonicus*. *Acta Amazonica*, v. 41, n. 2, p. 321-326, 2011.
- NOGA, E. J. Fish disease: diagnosis and treatment. BlackwellPublishing, 2010, 367p.
- AUSTIN, B.; AUSTIN, D.A. *Bacterial Fish Pathogens. Diseases of Farmed and Wild Fish*, 4. ed. Chichester: Springer/Prazis Publishing, 2007. 553p.
- KUBITZA, F. Principais parasitoses e doenças em tilápias. *Panorama da Aquicultura*, v. 10, n. 60, p. 39-53, 2000.
- KUBITZA, F. Antecipando-se às doenças na tilapicultura. *Panorama da Aquicultura*, v. 15, n. 89, p. 15-23, 2005.
- LEMOS, J. B.; RODRIGUES, M. E. B.; LOPES, J. P. Diagnóstico de ectoparasitas e bactéria em tilápias (*Oreochromis niloticus*) cultivadas na região de Paulo Afonso, Bahia.

- Rev. Bras. Eng. Pesca*, v. 1, n. 1, p. 75-90, 2006.
19. REHULKA, J. *Aeromonas* causes severe skin lesions in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): clinical pathology, haematology and biochemistry. *Acta Veterinaria Brno*, v. 71, n. 3, p. 351-360, 2002.
 20. FIGUERAS, M. J.; BEAZ-HIDALGO, R.; PAREDES, K. Furunculosis y otras infecciones producidas por *Aeromonas*. In: Enfermedades infecciosas del cultivo de Salmonidos en Chile y el Mundo (ed. by R. Avendan˜o-Herrera), p. 285-374. Niva Chile S.A., Puerto Varas, Chile. 2011.
 21. KOZINSKA, A.; PEKALA, A. Characteristics of disease spectrum in relation to species, serogroups and adhesion ability of motile aeromonads in fish. *Scientific World Journal*, 2012, 949358.
 22. PRIDGEON, J. W.; KLESIUS, P. H.; SONG, L. et al. Identification, virulence, and mass spectrometry of toxic ECP fractions of West Alabama isolates of *Aeromonas hydrophila* obtained from a 2010 disease outbreak. *Vet. Microbiol.* v. 163, n. 3-4, p. 336-343, 2013.
 23. CLSI. Methods for antimicrobial disc susceptibility testing of bacterial isolated from aquatic animals: Approved Guideline VET03-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne. 2006.
 24. CLSI. Methods for broth dilution susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals: Approved Guideline VET04-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne.
 25. PADUA, S. B.; MENEZES FILHO, R. N.; CRUZ, C. Alevinos saudáveis: o ponto de partida para uma produção estável. *Panorama da Aquicultura*, v. 22, n. 134, p. 30-37, 2012.
 26. MSD ANIMAL HEALTH. Vaccines and related products. Disponível em: <http://www.thefishsite.com/focus/msd-animal-health/216/merck-product-overview-vaccines>. Acesso em: 17 mai. 2014.
 27. POOBALANE, S.; THOMPSON, K. D.; ARDO, L. et al. Production and efficacy of an *Aeromonas hydrophila* recombinant S-layer protein vaccine in fish. *Vaccine*, v. 28, n. 20, p. 3540-3547, 2010.
 28. TU, F. P.; CHU, W. H.; ZHUANG, X. Y. et al. Effect of oral immunization with *Aeromonas hydrophila* ghosts on protection against experimental fish infection. *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 50, n. 1, p.13-17, 2010.
 29. FIGUEIREDO, H. C. P.; LEAL, C. A. G. Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. *R. Bras. Zootec.*, v. 37, suplemento especial, p.08-14, 2008.



4. Infecção por *Streptococcus iniae* em peixes

Guilherme C. Tavares (CRMV-MG: 11340)
Henrique C. P. Figueiredo (CRMV-MG 5839)
Carlos A. G. Leal* (CRMV-MG 9014)
*carlosleal@vet.ufmg.br

[bigstockphoto.com](https://www.bigstockphoto.com)

1. Introdução

Streptococcus iniae é considerado um dos principais agentes etiológicos causadores de estreptococoses em diversas espécies de peixes de água doce e marinhos. As infecções em peixes causadas por essa bactéria estão associadas a quadros de septicemia e meningoc

Streptococcus iniae é considerado um dos principais agentes etiológicos causadores de estreptococoses em diversas espécies de peixes de água doce e marinhos.

encefalite, altos índices de mortalidade e perdas econômicas significativas¹.

O primeiro isolamento e a identificação desse patógeno data de 1976 e foram realizados a partir de abscessos subcutâneos em uma espécie amazônica de golfinho de água doce (*Inia geoffrensis*)². Desde então, observaram-se infecções por *S.*

iniae em pisciculturas na maioria dos continentes (Figura 1). Surtos da doença em peixes foram relatados nos Estados Unidos, Canadá, Caribe, Japão, China, Singapura, Taiwan, Israel, Bahrein, Indonésia e Austrália^{3,4,5,6}. No Brasil, esse microrganismo foi associado pela primeira vez a um caso de surto em fazendas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) no ano de 2012¹.

Essa bactéria é um dos patógenos de maior relevância para a produção comercial de peixes tropicais, principalmente na Ásia³. Nesse continente, os principais peixes acometidos são as tilápias, sendo observadas mortalidades de 30 a 50% do

No Brasil, esse microrganismo foi associado pela primeira vez a um caso de surto em fazendas de tilápia do Nilo no ano de 2012

Foi por muitos anos considerado o principal entrave sanitário para as tilapiculturas.

plantel em casos de surto⁷. Esse microrganismo foi por muitos anos considerado o principal entrave sanitário para as tilapiculturas naquela região, bem como no restante do mundo⁸.

Apesar de sua importância histórica, os casos de infecção por esse patógeno vêm apresentando um decréscimo nos últimos anos, sendo sobrepujados pelos casos de surtos causados por *Streptococcus agalactiae*. Adicionalmente, casos de infecção por *S. iniae* têm sido relatados em seres humanos, principalmente como doença ocupacional (infecções cutâneas) oriunda da manipulação de peixes de cultivos vivos infectados,



Figura 1. Mapa demonstrando a distribuição mundial (países marcados em vermelho) da ocorrência de surtos por *Streptococcus iniae* em pisciculturas.

assim como de peixes ornamentais^{6,7}. Em pessoas imunossuprimidas, ocorrências de casos de bacteremia, artrite, meningite, endocardite e osteomielite também já foram descritas^{4,7}.

2. Etiologia e Diversidade Genética

Pertencente à família Streptococcaceae, o gênero *Streptococcus* abrange uma ampla gama de espécies bacterianas associadas a processos infecciosos em seres humanos e em animais, bem como microrganismos saprófitos ou não patogênicos. Atualmente, 104 espécies e 20 subespécies bacterianas são descritas como pertencentes a esse gênero⁹. Os *Streptococcus* são cocos gram-positivos, com diâmetro de 0,3-2,0 µm, organizados em pares ou cadeia lineares curtas, catalase negativos, não móveis e não formadores de esporos¹⁰. Além das características fenotípicas, o tipo de hemólise e a sorotipagem baseada na antigenicidade de polissacarídeos capsulares, denominados de Grupos de Lancefield, têm sido empregados para caracterizar as diferentes espécies de *Streptococcus*¹¹.

Seis espécies têm sido descritas como os principais agentes etiológi-

cos causadores de septicemia e meningoencefalite em peixes: *Streptococcus parauberis*¹², *Streptococcus agalactiae*¹³, *Streptococcus dysgalactiae*¹⁴, *Streptococcus iniae*^{1,3}, *Streptococcus phocae*¹⁵ e *Streptococcus ictaluri*¹¹. No Brasil, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* e *S. iniae* foram descritos como agentes causadores de septicemia e meningoencefalite em tilápia do Nilo^{1,13,14}.

S. iniae é uma das principais espécies bacterianas do gênero *Streptococcus*. Essa bactéria pode ser encontrada no ambiente aquático, em sedimentos, em

Os principais agentes etiológicos causadores de septicemia e meningoencefalite em peixes: Streptococcus parauberis¹², Streptococcus agalactiae¹³, Streptococcus dysgalactiae¹⁴, Streptococcus iniae^{1,3}, Streptococcus phocae¹⁵ e Streptococcus ictaluri.

peixes portadores e/ou outros animais aquáticos. Após sua introdução em uma propriedade, mesmo com a remoção de animais doentes, a bactéria pode permanecer em biofilmes na tubulação, tanques e filtros da piscicultura¹⁶. *S. iniae* é anaeróbio facultativo e cresce muito bem em meios de cultivos, como ágar BHI, ágar sangue e ágar Todd-Hewitt.

Colônias mucoides com áreas β-hemolítica, após 24 a 48 horas de incubação a 28°C em placas de ágar sangue, são observadas^{1,17}. Não crescem a 10°C e 45°C nem em meios de cultivo com pH 9,6¹⁷. Os isolados obtidos dessa bactéria não se enquadram em nenhum grupo de Lancefield, e a identificação bioquímica

a partir de kits comerciais é inconclusiva¹.

A caracterização de isolados de *S. iniae* em grupos de acordo com as características fenotípicas, bioquímicas e de virulência é uma forma importante de identificar e tipagem de isolados patogênicos. Porém, essa forma de tipagem não foi capaz de distinguir as amostras invasivas das não invasivas, assim como isolados obtidos de seres humanos e peixes¹⁸.

A utilização de ferramentas moleculares para a genotipagem desses isolados tem sido realizada por diferentes metodologias, como RFLP (Polimorfismo de Fragmentos de Restrição)¹⁹, RAPD (Amplificação Randômica de DNA Polimórfico)²⁰ e PFGE (Eletroforese em Campo Pulsátil)²¹. Por RFLP, os isolados de *S. iniae* apresentaram padrões genéticos distintos de acordo com a origem geográfica (Estados Unidos e Israel), mas não houve distinção entre os isolados obtidos de trutas e tilápias dentro de cada região¹⁹. Já por RAPD, os isolados obtidos de trutas são distintos de isolados oriundos de outros peixes²⁰. Na comparação de isolados obtidos de seres huma-

No Brasil, os isolados de tilápia do Nilo apresentaram dois padrões genéticos distintos.

Casos de infecção por S. iniae foram descritos em seres humanos, golfinhos e peixes.

A transmissão da bactéria ocorre por contato direto, entre peixes infectados e sadios, e por contato indireto, através da veiculação do patógeno, via água

nos e peixes, observou-se alta similaridade entre eles quando analisados por PFGE²¹. No Brasil, os isolados de tilápia do Nilo apresentaram dois padrões genéticos

distintos quando avaliados por PFGE. Amostras com diferentes genótipos foram isoladas de um mesmo caso, mostrando que diferentes clones podem ocorrer simultaneamente durante um caso de surto¹. A estrutura genética das populações de *S. iniae* isoladas de tilápias em diferentes regiões do mundo ainda é desconhecida.

3. Espécies susceptíveis, transmissão e doença clínica em tilápias

Casos de infecção por *S. iniae* foram descritos em seres humanos^{4,7}, golfinhos², morcegos⁵ e peixes. Atualmente existem 34 espécies de peixes, de água doce e marinhos, susceptíveis à infecção por *S. iniae*, incluindo diferentes espécies e híbridos de tilápia (Tabela 1).

A transmissão da bactéria ocorre por contato direto, entre peixes infectados e sadios, e por contato indireto, através da veiculação do patógeno, via água principalmente. Em condi-

Tabela 1. Principais espécies de peixes susceptíveis à infecção por *Streptococcus iniae*

Espécies susceptíveis*	
Acanthopagrus australis ³	Oreochromis niloticus ¹
Anisotremus spp. ³	Pagrus pagrus ⁴
Arothron hispidus ³	Paralichthys olivaceus ³
Cromileptes altivelis ³	Plecoglossus altivelis ³
Dicentrarchus labrax ³	Pomadasys stridens ³
Epinephalis tauvina ³	Sardinops melanostictus ¹⁷
Epinephelus guttatus ¹⁸	Scaridae spp. ³
Haemulidae spp. ³	Scarus taeniopterus ²²
Ictalurus punctatus ¹⁷	Sciaenops ocellatus ³
Lates calcarifer ³	Seriola quinqueradiata ³
Lutjanus campechanus ²²	Siganus spp. ³
Morone chrysops x M. saxatilis ³	Sparisoma aurofrenatum ²²
Mugus cephalus ³	Sparisoma viridae ³
Ocyurus chrysurus ²²	Sparus aurata ⁴
Onchorhynchus kisutch ³	<i>Synodus variegates</i> ³
Onchorhynchus rhodurus var. macrostemus ³	<i>Tilapia niloticus x T. aureas</i> ³
Oncorhynchus mykiss ⁴	<i>Variola louti</i> ³

*Os números sobrescritos são referentes as publicações que descrevem a espécie como susceptível.

ções experimentais, a transmissão pode ser realizada por: coabitação entre animais infectados e sadios; por via oral; via injeção intraperitoneal; e via banhos de imersão em peixes com ou sem presença de lesões cutâneas. No campo, a presença de peixes portadores parece ser o principal reservatório da bactéria. Quando esses coabitam os sistemas de cultivo com animais sadios ou estão presentes no ambiente (Ex. peixes de vida livre nos mananciais onde estão alojadas as gaiolas ou tanques-rede), na

No campo, a presença de peixes portadores parece ser o principal reservatório da bactéria.

presença dos fatores de risco, o microrganismo é transmitido e causa infecção nos animais sadios²³. Canibalismo e a ingestão de fezes de ani-

mais contaminados também são descritos como potenciais formas de propagação da infecção por *S. iniae* em sistemas de cultivo comerciais²³.

No Brasil, os casos da infecção por *S. iniae* foram observados em peixes na fase de pré-abate²⁴. Porém, acredita-se que alevinos possam ser portadores assintomáticos da bactéria e introduzir

esse patógeno em planctos livres. Dessa forma, uma larvicultura que possua matrizes infectadas com a bactéria pode disseminar a doença entre propriedades em diferentes regiões do país. Como os alevinos não apresentam sinais clínicos da doença (em uma infecção natural), são alojados nas fazendas e poderão manifestar a doença na fase adulta, após a introdução e transmissão do patógeno para os outros peixes da propriedade²⁴. Em condições experimentais, mesmo alevinos de tilápias do Nilo podem apresentar sinais clínicos da infecção por *S. iniae*, fato que não é observado em condições de campo^{8,25}.

A infecção por *S. iniae* causa uma doença septicêmica em tilápias, sendo capaz de invadir diferentes órgãos do peixe acometido e se multiplicar. Um dos principais tecidos acometidos pela bactéria é o sistema nervoso central, onde é verificado um quadro severo de meningoencefalite. Por esse motivo, alguns dos principais sinais clínicos da doença são de origem nervosa, como, por exemplo, a natação errática e perda de equilíbrio e orientação do peixe na

Os alevinos não apresentam sinais clínicos da doença.

A infecção por S. iniae causa uma doença septicêmica em tilápias, sendo capaz de invadir diferentes órgãos do peixe.

Sinais clínicos da doença são de origem nervosa, como, por exemplo, a natação errática e perda de equilíbrio e orientação do peixe na lâmina d'água.

lâmina d'água. Outros sinais clínicos observados em peixes infectados são anorexia, letargia, melancolia, distúrbios respiratórios, exoftalmia, opacidade de córnea, hemorragia e ulceração de tegumento, hemorragia perianal e ascite^{4,22,23,24,25,26}. Na necropsia, podem ser verificados: acúmulo de líquido serossanguinolento na cavidade celomática; esplenomegalia; hepatomegalia e palidez dos órgãos internos; petéquias e sufusões em órgãos da cavidade celomática⁴. Na avaliação histopatológica, as principais alterações patológicas causadas pela infecção

são: epicardite e pericardite fibrogranulomatosa; esteatose granulomatosa do pericárdio; perihepatite fibrinosa; atrofia de lamelas secundárias das brânquias; cérebro com meningite fibrinosa e infiltrado perivascular mononuclear, vasculite e gliose; vasculite granulocítica multissistêmica pode ser visualizada na bexiga natatória, rim e baço do peixe acometido²². Estudo recente confirmou o cérebro como órgão-alvo da bactéria, sendo diagnosticado, por análise histopatológica, um quadro de leptomeningite linfocítica, meningo-

encefalite, encefalite e meningite em tilápias do Nilo infectadas por via intraperitoneal²⁷.

O curso da doença no peixe infectado é variável e depende da presença e intensidade dos fatores de risco, virulência da amostra e *status* imune do peixe²⁴. Em geral, duas formas de manifestação clínica da doença são observadas: 1- forma subaguda; 2- forma aguda. A forma subaguda ocorre entre 2-4 dias pós-infecção, com evolução gradual, e os peixes infectados apresentam sinais clínicos de injúria de tegumento, melnose e natação errática. Nessa forma, a morbidade e mortalidades observadas são baixas nas propriedades acometidas. Já a forma aguda é a mais grave e devastadora da doença. Sua evolução ocorre de maneira muito rápida e altas mortalidades são observadas, principalmente durante a noite. A observação de sinais clínicos é muitas vezes limitada, devido à evolução rápida da doença e morte aguda dos animais. Apesar disso, peixes com opacidade de córnea e exoftalmia podem ser verificados²³.

Isolados de *S. iniae* são descritos na literatura como altamente patogênicos para peixes. Porém, as amostras brasileiras isoladas de tilápia do Nilo parecem ser menos virulentas quando comparadas a isolados de *S. iniae* de diferentes regiões do mundo²⁴. No país existe uma baixa casuística de surtos

Duas formas de manifestação clínica da doença são observadas: 1- forma subaguda; 2- forma aguda.

causados por *S. iniae*, fato que, especulativamente, pode estar associado à baixa virulência das amostras¹. Contudo, não existem evidências científicas que atestem

essa informação. Além da virulência das amostras, fatores ligados às linhagens de peixes cultivadas e sistemas de produção adotados no país podem contribuir ou influenciar a ocorrência dessa doença. Uma maior prevalência da infecção por *S. agalactiae* pode propiciar um efeito de exclusão competitiva com relação a *S. iniae*. Esse fenômeno também tem sido observado em outras regiões do mundo. Em algumas tilapiculturas da América Central, onde programas de vacinação massal contra *S. agalactiae* têm sido realizados, a ocorrência de casos de infecção por *S. iniae* tem incrementado. Isso denota que, em condições naturais, essa competição entre patógenos pode existir. Quando exercida uma pressão de seleção sobre um deles, como, por exemplo, um programa de vacinação, o outro microrganismo circulante, que até então estava inibido, pode reemergir como causador de surtos²⁸.

4. Patogênese e fatores de risco para a doença

Até o momento, a patogênese e mecanismos de virulência de *S. iniae* patogênicos para peixes não são completamente conhecidos¹⁶. Sabe-se que

a bactéria tem a capacidade de invadir e se disseminar na corrente sanguínea de peixes, infectando diferentes órgãos. Para isso, fatores de virulência, como polissacarídeo capsular, citolisina S, a enzima fosfoglicomutase e a proteína “M-like”, são requeridos^{24,26}. O polissacarídeo capsular e a proteína “M-like” possibilitam a evasão da bactéria do sistema imune dos peixes, evitando a fagocitose pelos macrófagos^{29,30}. A citolisina S é uma proteína que provoca hemólise nas hemácias dos peixes³¹. A fosfoglicomutase, por sua vez, confere uma maior rigidez à parede celular da bactéria, inibindo, dessa forma, a ação de peptídeos antimicrobianos³². A associação desses fatores modula a virulência das amostras bacterianas, potencializando a surgimento da doença nos peixes.

As condições de cultivo e alterações de fatores ambientais causam estresse fisiológico nos peixes e predispõem à ocorrência da doença²⁴. Em pisciculturas, os principais fatores predisponentes para a ocorrência de surtos de *S. iniae* são as altas densidades de estocagem e o aumento da temperatura da água. Outro ponto importante é a idade do lote, pois, como mencionado anteriormente, a doença ocorre geralmente em peixes adultos. O tipo de sistema de produção também pode predispor à ocorrência

da doença ou potencializá-la. O cultivo de peixes em tanques-rede é o principal sistema de produção utilizado no Brasil e, nesse sistema, os peixes são criados em altas densidades de estocagem, o que favorece a infecção por *S. iniae*. Todos esses

fatores foram observados nos surtos da infecção por *S. iniae* no Brasil. Os casos ocorreram durante o verão, com temperatura da água igual ou superior a 30°C, em tilápias do Nilo adultas, cultivadas em tanque-rede¹. Como supracitado, a frequência

de ocorrência da doença no país é baixa. Portanto, outros fatores de risco podem ser essenciais para a infecção por *S. iniae* em tilapicultura, sendo esses não verificados ou poucos presentes nas pisciculturas nacionais.

5. Diagnóstico

O diagnóstico e a identificação do agente infeccioso podem ser realizados através da associação de sinais clínicos e exames laboratoriais. Devido à ampla gama de hospedeiros susceptíveis e sinais clínicos genéricos verificados nos casos de infecções em peixes pelas diferentes espécies do gênero *Streptococcus*, o diagnóstico laboratorial é indispensável para a determinação do agente etiológico envolvido³³. O diagnóstico de estreptococose por *S. iniae* em peixes é baseado no isolamento e identificação

O diagnóstico e a identificação do agente infeccioso podem ser realizados através da associação de sinais clínicos e exames laboratoriais.

do microrganismo. Peixes moribundos com sintomatologia clínica da doença devem ser coletados e encaminhados vivos ou refrigerados para os laboratórios de diagnóstico²⁴.

No laboratório, o diagnóstico pode ser realizado por bacteriologia ou por métodos moleculares. Por causar quadros de septicemia e meningoencefalite, o isolamento de *S. iniae* pode ser realizado a partir da coleta do sistema nervoso central e de órgãos altamente vascularizados ou que desempenham funções imunológicas, como rim, fígado e baço, dos peixes acometidos. Fragmentos desses órgãos são coletados de maneira asséptica e plaqueados em ágar sangue²⁴, ágar BHI (Infusão Cérebro Coração) TSA (ágar Soja Trypticaseína) ou THA (Todd-Hewitt). Após o período de incubação de 24-48 horas, a identificação primária do agente infeccioso é baseada na avaliação da morfologia das colônias por microscopia óptica (coloração pelo método de Gram), tipo de hemólise, padrão de antígenos capsulares (não classificado em nenhum grupo Lancefield) e testes bioquímicos (catalase e oxidase, por exemplo)³⁴. Entretanto, isolados suspeitos não podem ser identificados como *S. iniae* apenas pelo uso de testes sorológicos e bioquímicos. O uso de kits comerciais, como Slidex Latex Agglutination

e API 20 Strep, não são capazes de identificar *S. iniae*²⁴.

Com o desenvolvimento e popularização de técnicas moleculares para identificação de microrganismos e diagnóstico de doenças, foi possível a realização de reações de PCR para identificação de *S. iniae* com iniciadores espécie-específicos ou universais para genes conservados associadas ao sequenciamento e à análise filogenética³. A grande vantagem desses testes é que, além da confirmação da espécie bacteriana envolvida no surto, permitem também o diagnóstico direto a partir de tecidos infectados sem a necessidade de isolamento bacteriano²⁴.

6. Tratamento, prevenção e controle

A antibioticoterapia oral tem se mostrado eficaz no tratamento nos casos de infecção por *S. iniae* em peixes. Já foi demonstrado que os antibióticos à base de cefatoxima, eritromicina, ofloxacina, penicilina, tetraciclina, florfenicol e vancomicina são eficazes no controle de *S. iniae* em ensaios experimentais “*in vitro*”. “*In vivo*”, a administração de florfenicol foi eficiente para o controle da mortalidade de tilápias do Nilo infectadas experimentalmente com *S. iniae*³⁵.

No Brasil, apenas antibióticos à base de florfenicol e oxitetraciclina podem

A antibioticoterapia oral tem se mostrado eficaz no tratamento nos casos de infecção por S. iniae em peixes.

ser utilizados para conduzir uma intervenção terapêutica em surtos dentro de uma piscicultura comercial³⁶. No contexto nacional, a droga que tem se mostrado mais aplicável ao tratamento das infecções por *S. iniae* é florfenicol. O tratamento terapêutico deve ser realizado por via oral, misturado à ração, durante a fase de surto da doença. Este tem por objetivo evitar a infecção dos animais sadios e promover a cura dos animais subclínicos ou em fases iniciais da doença, que ainda ingerem ração. De acordo com dados de genéricos de literatura, o florfenicol na dose de 10 mg/kg de peixe/dia, por um período de 10 dias, é eficiente no controle da infecção por *S. iniae*¹⁰. Porém, estudo realizado por Gaunt e colaboradores demonstrou que uma dose 50% maior (15 mg/Kg de peso vivo) apresenta melhor eficiência no controle da infecção por *S. iniae* em tilápias do Nilo³⁵. Alternativamente, a administração de antibiótico à base de oxitetraciclina tem sido descrita na literatura como eficiente no controle de infecções contra bactérias gram-positivas e gram-negativas em peixes¹⁰. Contudo, não existem dados demonstrando a sua aplicação terapêutica em tilápias infectadas por *S. iniae*. Como a oxitetraciclina possui capacidade reduzida de transpor a barreira hematoencefálica, e o sistema nervoso central é um dos principais al-

A vacinação é uma alternativa para a prevenção e controle das infecções por Streptococcus iniae nas pisciculturas.

vos da bactéria, essa terapia pode incorrer em falhas.

A vacinação é uma alternativa para a prevenção e controle das infecções por *Streptococcus iniae* nas pisciculturas. Diversas vacinas têm sido desenvolvidas contra diferentes *Streptococcus* patogênicos para peixes, sendo que, atualmente, no mundo, já existem vacinas comercializadas contra *S. iniae* (Norvax Strep Si e Aquavac Garvetil)^{26,37}. Esses produtos, de acordo com os fabricantes, são indicados para utilização em trutas-

arco-íris, tilápias do Nilo ou qualquer outra espécie susceptível supramencionada. As vacinas desenvolvidas, inicialmente, foram eficazes no combate da doença, sendo capaz de reduzir de 50% para 5% as mortalidades causadas por esse patógeno em fazen-

das. Porém, esses imunobiológicos não apresentaram eficácia de proteção por longos períodos, pois a bactéria foi capaz de variar o polissacarídeo capsular. Isso promoveu a emergência de uma nova cepa de *S. iniae*, com um sorotipo capsular diferente do daquela utilizada na produção da vacina. Dessa forma, novas vacinas estão sendo desenvolvidas para tentar induzir imunidade aos diferentes sorotipos de *S. iniae*^{16,25,26,37}. No Brasil, não existem vacinas licenciadas contra esse patógeno. Além disso, não existem estudos da eficiência das vacinas comer-

ciais disponíveis no mundo frente a desafios com as amostras isoladas no país.

O controle da infecção por *S. iniae* em pisciculturas é baseado na manutenção adequada das condições ambientais, aquisição de alevinos livres do patógeno, realização de tratamentos táticos com antibióticos, descarte adequado de animais mortos e/ou com sinais clínicos de doença neurológica, boas práticas de manejo, manejo sanitário e a implementação de um programa de biossegurança. Esses são procedimentos genéricos recomendados para minimizar o impacto e impedir a introdução de doenças infecciosas em uma piscicultura^{24,37}.

7. Referências bibliográficas

- FIGUEIREDO, H. C. P.; NOBREGA-NETTO, L.; LEAL, C. A. G. et al. *Streptococcus iniae* outbreaks in brazilian Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) farms. *Braz. J. Microbiol.*, v. 43, n. 2, p. 576-580, 2012.
- PIER, G. B.; MADIN, S. H. *Streptococcus iniae* sp. nov., beta hemolytic *Streptococcus* isolated from an amazon freshwater dolphin, *Iniae geoffrensis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v. 26, n. 4, p.545-553, 1976.
- AGNEW, W.; BARNES, A. C. *Streptococcus iniae*: An aquatic pathogen of global veterinary significance and challenging candidate for reliable vaccination. *Vet. Microbiol.*, v. 122, n. 1-2, p. 1-15, 2007.
- EL AAMRI, F.; CABALLERO, M. J.; REAL, F. et al. *Streptococcus iniae* in gilthead seabream (*Sparus aurata*, L.) and red porgy (*Pagrus pagrus*, L.): ultrastructural analysis. *Vet. Pathol.*, (in press), p. 1-4, 2014.
- NAWAWI, R. A., BALANO, J.; BARNES, A. C. Genetic variability amongst *Streptococcus iniae* isolates from Australia. *J. Fish. Dis.*, v. 31, n. 4, p. 305-309, 2008.
- ZHOU, S. M.; XIE, M. Q.; ZHU, X. Q. et al. Identification and genetic characterization of *Streptococcus iniae* strains isolated from diseased fish in China. *J. Fish Dis.*, v. 31, n. 11, p. 869-875, 2008.
- DODSON, S. V.; MAURER, J. J.; SHOTTS, E. B. Biochemical and molecular typing of *Streptococcus iniae* isolated from fish and human cases. *J. Fish Dis.*, v. 22, n. 5, p. 331-336, 1999.
- ZHOU, S. M.; FAN, Y.; ZHU, X. Q. et al. Rapid identification of *Streptococcus iniae* by specific PCR assay utilizing genetic markers in ITS rDNA. *J. Fish Dis.*, v. 34, n. 4. P. 265-217, 2011.
- LPSN. List of prokaryotic names with standing in nomenclature: Genus *Streptococcus*. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/streptococcus.html>>. Acesso em: 30 jan. 2014.
- AUSTIN, B.; AUSTIN, D.A. *Bacterial Fish Pathogens. Diseases of Farmed and Wild Fish*, 4. ed. Chichester: Springer/Praxis Publishing, 2007. 553p.
- SHEWMAKER, P. L.; CAMUS, A. C.; BAILIFF, T. et al. *Streptococcus ictaluri* sp. nov., isolated from Channel Catfish *Ictalurus punctatus* broodstock. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 57, n. 7, p. 1603-1606, 2007.
- DOMEÉNECH, A.; DERENAAANDEZ-GARAYZABAL, J. F.; PASCUAL, C. et al. Streptococcosis in cultured turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), associated with *Streptococcus parauberis*. *J. Fish Dis.*, v. 19, n. 1, p. 33-38, 1996.
- MIAN, G. F.; GODOY, D. T.; LEAL, C. A. G. et al. Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia. *Vet. Microbiol.* v. 136, n. 1-2, p. 180-183, 2008.
- NOBREGA-NETTO, L.; LEAL, C.A.G.; FIGUEIREDO, H.C.P. *Streptococcus dysgalactiae* as an agent of septicemia in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *J. Fish Dis.*, v. 34. n. 3, p. 251-254, 2011.
- GIBELLO, A.; MATA, A. I.; BLANCO, M. M. et al. First identification of *Streptococcus phocae* isolated from Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *J. Clin. Microbiol.*, v. 43, n. 1, p. 526-527, 2005.
- MILLARD, C. M.; BAIANO, J. C. F.; CHAN, C. et al. Evolution of the capsular operon of *Streptococcus iniae* in response to vaccination. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 78, n. 23, p. 8219-8226, 2012.
- KUSUDA, R.; SALATI, F. *Enterococcus seriolicida* and *Streptococcus iniae*. In: WOO, P. T. K.; BRUNO, D. W. *Fish diseases and disorders: viral, bacterial and fungal infections*. Nova Iorque, CABI Publishing, p. 309-3013, 1999.
- DODSON, S. V.; MAURER, J. J.; SHOTTS, E. B.

- Biochemical and molecular typing of *Streptococcus iniae* isolated from fish and human cases. *J. Fish Dis.*, v. 22, n. 5, p. 331-336, 1999.
19. ELDAR, A.; LAWHON, S.; FRELIER, P. F. et al. Restriction fragment length polymorphisms of 16s rDNA and of whole rRNA genes (ribotyping) of *Streptococcus iniae* strains from the United States and Israel. *FEMS Microbiol. Let.*, v. 151, n. 2, p. 155-162, 1997.
 20. KVITT, H.; COLORNI, A. Strain variation and geographic endemism in *Streptococcus iniae*. *Dis. Aquat. Organ.*, v. 61, n. 1-2, p. 67-73, 2004.
 21. NAWAWI, R. A.; BAIANO, J.; BARNES, A. C. Genetic variability amongst *Streptococcus iniae* isolates from Australia. *J. Fish Dis.*, v. 31, n. 4, p. 305-309, 2008.
 22. KEIRSTEAD, N. D.; BRAKE, J. W.; GRIFFIN, M. J. et al. Fatal septicemia caused by the zoonotic bacterium *Streptococcus iniae* during an outbreak in Caribbean reef fish. *Vet. Pathol.*, (in press), 2013.
 23. BROMAGE, E. S.; OWENS, L. Infection of barramundi *Lates calcarifer* with *Streptococcus iniae*: effects of different routes of exposure. *Dis. Aquat. Org.*, v. 52, n. 3, p. 199-205, 2002.
 24. FIGUEIREDO, H. C. P.; NOBREGA-NETTO, L.; LEAL, C. A. G. *Streptococcus iniae*: um grande vilão da aquicultura mundial identificado no Brasil. *Panorama da Aquicultura*, v. 19, n. 112, p. 26-29, 2009.
 25. SHELBY, R. A.; KLESIOUS, P. H.; SHOEMAKER, C. A. et al. Passive immunization of tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), with anti-*Streptococcus iniae* whole sera. *J. Fish Dis.*, v. 25, n. 1, p. 1-6, 2002.
 26. LOCKE, J. B.; VICKNAIR, M. R.; OSTLAND, V. E. et al. Evaluation of *Streptococcus iniae* killed bacterin and live attenuated vaccines in hybrid striped bass through injection and bath immersion. *Dis. Aquat. Org.*, v. 89, n. 2, p. 117-123, 2010.
 27. BAUMS, C. G.; HERMEYER, K. LEIMBACH, S. et al. Establishment of a model of *Streptococcus iniae* meningoencephalitis in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J. Comp. Path.*, v. 149, n. 1, p. 94-102, 2013.
 28. BACHRACH, G.; ZLOTKIN, A.; HURVITZ, A. et al. Recovery of *Streptococcus iniae* from diseased fish previously vaccinated with a streptococcus vaccine. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 67, n. 8, p. 3756-3758, 2001.
 29. LOWE, B. A.; MILLER, J. D.; NEELY, M. N. Analysis of the polysaccharide capsule of the systemic pathogen *Streptococcus iniae* and its implications in virulence. *Infect. Immun.*, v. 75, n. 3, p. 1255-1264, 2007.
 30. LOCKE, J. B.; AZIZ, R. K.; VICKNAIR, M. R. et al. *Streptococcus iniae* M-like protein contributes to virulence in fish and is a target for live attenuated vaccine development. *PLoS ONE*, v. 3, n. 7, e2824, 2008.
 31. LOCKE, J. B.; COLVIN, K. M.; VARKI, N. et al. *Streptococcus iniae* β -hemolysin streptolysin S is a virulence factor in fish infection. *Dis. Aquat. Org.*, v. 76, n. 1, p. 17-26, 2007.
 32. BUCHANAN, J. T.; STANNARD, J. A.; LAUTH, X. et al. *Streptococcus iniae* phosphoglucosyltransferase is a virulence factor and a target for vaccine development. *Infect. Immun.*, v. 73, n. 10, p. 6935-6944, 2005.
 33. MATA, A. I.; GIBELLO, A.; CASAMAYOR, A. et al. Multiplex PCR assay for detection of bacterial pathogens associated with warm-water streptococcosis in fish. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 70, n. 5, p. 3183-3187, 2004.
 34. GLAZUNOVA, O. O.; RAOULT, D.; ROUX, V. Partial sequence comparison of the *rpoB*, *soda*, *groEL*, and *gyrB* genes within the genus *Streptococcus*. *Int. J. Syst. Evol. Bacteriol.*, v. 59, n. 9, p. 2317-2322, 2009.
 35. GAUNT, P. S.; ENDRIS, R.; MCGINNIS, A. et al. Determination of florfenicol dose rate in feed for control of mortality in Nile tilapia infected with *Streptococcus iniae*. *J. Aquat. Anim. Health*, v. 22, n. 3, p. 158-166, 2010.
 36. PADUA, S. B.; MENEZES FILHO, R. N.; CRUZ, C. Alevinos saudáveis: o ponto de partida para uma produção estável. *Panorama da Aquicultura*, v. 22, n. 134, p. 30-37, 2012.
 37. SHOEMAKER, C. A.; LAFRENTZ, B. R.; KLESIOUS, P. H. et al. Protection against heterologous *Streptococcus iniae* isolates using a modified bacterin vaccine in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *J. Fish Dis.*, v. 33, n. 7, p. 537-544, 2010.

5. Infecção por *Weissella ceti* em peixes



Frederico Augusto de Alcântara Costa¹

Carlos Augusto Gomes Leal² (CRMV-MG 9014)

Henrique César Pereira Figueiredo^{2*} (CRMV-MG 5839)

¹Professor Adjunto, Médico Veterinário, Doutor, Faculdade de Medicina Veterinária/UFU

²Professor Adjunto, Médico Veterinário, Doutor, DMVP, Escola de Veterinária/UFMG

*autor para correspondência:

figueiredoh@yahoo.com

[bigstockphoto.com](https://www.bigstockphoto.com)

Introdução

Pertencente à família dos salmonídeos, a truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) é originária de regiões de clima temperado e possui conforto térmico abaixo de 20°C. Por esse motivo, as truticulturas nacionais estão localizadas em regiões restritas do país, onde o clima e a temperatura da água são mais frios. A truta-arco-íris é uma das espécies de peixe mais cultivadas comercialmente em todo o mundo, principalmente em países da Europa. No

entanto, os problemas sanitários estão entre os principais entraves na cadeia produtiva dessa espécie, sendo a maioria de seus patógenos e doenças já bem descrita pela literatura.

Recentemente a bactéria *Weissella ceti* foi identificada como patógeno emergente da piscicultura mundial causador de uma doença septicêmica em trutas-arco-íris. O primeiro caso dessa enfermidade em peixes ocorreu no ano de 2007, em uma truticultura na China. O surto acometeu animais

*A bactéria *Weissella ceti* foi identificada como patógeno emergente da piscicultura mundial causador de uma doença septicêmica em trutas-arco-íris.*

adultos em fase final de abate, causando um quadro clínico de hemorragia generalizada e alta taxa de mortalidade nos lotes cultivados.

O primeiro surto da doença no Brasil foi observado no verão de 2008, em uma fazenda de trutas-arco-íris no Estado do Rio de Janeiro. Os sinais clínicos desse surto foram semelhantes àqueles descritos na China. No entanto, a doença neste caso acometia todas as faixas etárias do ciclo de produção, desde alevinos até reprodutores. Altas taxas de mortalidade também foram constatadas. Em 2013, surtos causados pela bactéria *Weissella ceti* foram descritos nos EUA, e os animais acometidos apresentavam sinais clínicos semelhantes aos observados na China e no Brasil.

O cultivo de trutas-arco-íris no Brasil está restrito às regiões de clima mais frio do Sul e Sudeste do país. Embora a escala de produção de trutas-arco-íris no Brasil não seja elevada, o alto valor de mercado desse peixe se tornou um atrativo econômico nas cidades onde é produzido. Nos últimos anos, surtos causados pela bactéria *Weissella ceti* têm sido responsáveis por perdas econômicas significativas nessas regiões, principalmente no período de verão, nos meses mais quentes do ano.

Etiologia

As espécies pertencentes ao gênero *Weissella* fazem parte do grupo de bactérias do ácido láctico. São fenoti-

picamente classificadas como cocos ovalados gram-positivos, catalase negativos, heterofermentativos e não móveis. Bactérias do gênero *Weissella* são comumente isoladas do solo, alimentos fermentados e do intestino de animais saudáveis, incluindo peixes (barramundi, *Lates calcarifer*)^{1,2}.

A primeira descrição de uma bactéria do gênero *Weissella* como causadora de doença em peixes ocorreu em uma truticultura na China, em 2007³. Em seguida, foram acompanhados surtos da doença em fazendas de truta-arco-íris no Brasil, e os isolados obtidos tinham uma alta similaridade genética (pela análise da sequência do gene 16S rRNA) com as amostras chinesas^{4,5}. No entanto, essas amostras não possuíam identidade genética similar a nenhuma outra espécie do gênero, sendo, portanto, denominadas *Weissella* sp.

Recentemente, durante um estudo sobre a microbiota de baleias (*Mesoplodon bidens*), pesquisadores isolaram e identificaram amostras de uma nova espécie do gênero *Weissella* que foram nomeadas como *Weissella ceti* sp. nov⁶. A análise das sequências do gene 16S rRNA dos isolados de *W. ceti* de baleias apresentaram alta similaridade genética (> 99%) com as amostras da China, Brasil e EUA, isoladas de surtos em fazendas de truta-arco-íris, sugerindo que todas pertencem a essa nova espécie⁷.

Espécies suscetíveis e distribuição da doença

A infecção natural por *Weissella ceti* foi descrita, até o momento, apenas em trutas-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). O diagnóstico da doença ocorreu em três países: China, Brasil e Estados Unidos^{3,4,7,8}. Aparentemente não existe nenhuma relação epidemiológica entre os surtos ocorridos nos três países, uma vez que não existe histórico de transferência de material biológico (ovos embrionados, larvas e adultos de trutas-arco-íris) entre os países. No Brasil, os surtos causados pelo patógeno foram observados nos Estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais⁷.

Infecções experimentais, utilizando altas doses de células de *W. ceti*, foram capazes de causar doença e mortalidade em peixes da espécie tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e carpa (*Carassius carassius*)^{3,4}. Esses estudos demonstram que existe potencial da bactéria para causar doenças em ou-

No Brasil, os surtos causados pelo patógeno foram observados nos Estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais.

A infecção por Weissella ceti em trutas-arco-íris causa uma doença septicêmica com hemorragia generalizada, acometendo animais na fase de alevino, juvenil e adulto.

À necropsia, o quadro de hemorragia fica mais evidente, com a presença de petéquias e sufusões na musculatura da parede da cavidade celomática e vísceras.

tras espécies de peixe de importância econômica, embora os relatos de infecção natural tenham ocorrido até o momento somente em trutas-arco-íris.

Doença clínica

A infecção por *Weissella ceti* em trutas-arco-íris causa uma doença septicêmica com hemorragia generalizada, acometendo animais na fase de alevino, juvenil e adulto (Figura 1). Os animais

acometidos apresentam exoftalmia, ascite, prolapso retal e hemorragia, principalmente na região da base das nadadeiras, pele, boca, cavidade bucal, língua e olhos (Figuras 2-5). Além disso, os peixes infectados apresentam anorexia, letargia e, em alguns casos, pode ser observada natação errática, por acometimento do sistema nervoso central^{3,4,7}.

À necropsia, o quadro de hemorragia fica mais evidente, com a presença de petéquias e sufusões na musculatura da parede da cavidade celomática e vísceras (fígado, intestino, estômago

Figura 1. Trutas-arco-íris de diferentes faixas etárias acometidas por *Weissella ceti*.

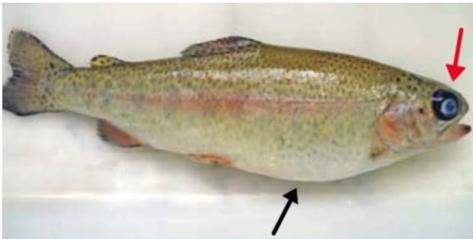


Figura 2. Truta-arco-íris apresentando ascite (seta preta), exoftalmia e hemorragia na região periorcular (seta vermelha).



Figura 3. Em maior aumento: hemorragia na região periorcular (seta vermelha) e boca (seta preta).



Figura 4. Juvenil de truta-arco-íris apresentando hemorragia na base da nadadeira peitoral e na pele (setas).



Figura 5. Foto ventral de uma truta-arco-íris com prolapso retal (elipse).



Figura 6. Petéquias e sufusões na musculatura da parede da cavidade celomática (elipse).

e coração), além de espleno e nefromegalia (Figuras 6 e 7). Em casos de ascite, pode ser observado um líquido serossanguinolento na cavidade celomática^{4,9}.

As alterações microscópicas causadas pela infecção estão associadas com o quadro de septicemia, podendo ser observados infiltrados inflamatórios de células mononucleares no cérebro, coração e região retrobulbar dos olhos. Em casos crônicos da doença, necrose multifocal no cérebro e coração pode ser constatada⁴.

Patogênese da doença

O conhecimento da patogenia da infecção por *Weissella ceti* em peixes ainda é muito restrito por ser uma doença recente na piscicultura mundial.

A bactéria *W. ceti* causa uma doença severa e com altas taxas de mortalidade nas truticulturas, demonstrando

A capacidade desse patógeno de infectar, proliferar, sobreviver e transmitir de animais doentes para saudáveis pela água.

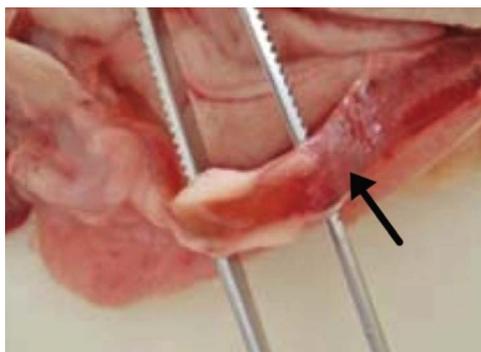


Figura 7. Hemorragia no terço final do intestino (seta).

ser um patógeno com alta virulência. Além disso, infecções experimentais em trutas-arco-íris demonstraram que a bactéria é capaz de causar a doença mesmo por vias não invasivas, como a branquial. A enfermidade foi reproduzida também em um ensaio de co-habitação em que os peixes infectados não tinham contato direto com outros saudáveis, mas, por estarem no mesmo ambiente, a transmissão ocorreu pela água e ocasionou a infecção desse último grupo⁴. Demonstrou-se assim a capacidade desse patógeno de infectar, proliferar, sobreviver e transmitir de animais doentes para saudáveis pela água.

Recentemente foi realizado o sequenciamento do genoma de uma amostra de *W. ceti* isolada de truta-arco-

íris nos EUA. A análise desse genoma mostrou que essa bactéria possui grupos de genes associados a fatores de virulência que não apresentam homologia com o geno-

ma de nenhuma outra amostra do gênero *Weissella*. Isso sugere que, ao longo da evolução, essa bactéria desenvolveu alguns mecanismos que a tornam capaz de causar o quadro de infecção severo em trutas-arco-íris. Dentre os fatores de virulência encontrados, destacam-se aqueles associados à adesão do patógeno no hospedeiro, como adesinas e proteínas muco-ligantes¹⁰. Contudo, a participação de cada um desses fatores na patogênese da doença ainda precisa ser demonstrada.

Fatores predisponentes da doença

A truta-arco-íris é uma espécie de peixe originária de regiões de clima temperado e por isso possui uma faixa de conforto térmico entre 10 a 15°C. O principal fator que predispõe à doença causada pela bactéria *W. ceti* é o aumento da temperatura da água. Os surtos da doença são observados principalmente no período de verão, nos meses mais quentes do ano, quando a temperatura da água está acima dos 17°C^{3,4,8}. Outros fatores que favorecem a doença são as altas densidades de estocagem que, por consequência, levam a uma baixa qualidade da água, com baixas concentrações de oxigênio dissolvido. Esses fatores acarretam

O principal fator que predispõe à doença causada pela bactéria W. ceti é o aumento da temperatura da água.

um maior nível de estresse dos peixes e parecem aumentar a transmissão do patógeno¹¹.

Diagnóstico

Em trutas-arco-íris, infecções causadas por outros agentes bacterianos, além da *Weissella ceti*, e até mesmo algumas infecções virais, podem causar doença com quadro clínico de hemorragia generalizada. Por isso, análises laboratoriais criteriosas, utilizando ferramentas de diagnóstico bacteriológico e virológico, são indispensáveis.

Dentre as enfermidades virais que devem ser consideradas no diagnóstico diferencial, temos a Septicemia Hemorrágica Viral e a Necrose Hematopoiética Infeciosa, ambas causadas por vírus da família Rhabdoviridae, sendo obrigatória a notificação de sua ocorrência à

Organização Mundial de Saúde Animal¹⁴. Entre as doenças de etiologia bacteriana que cursam com quadro de septicemia hemorrágica em trutas-arco-íris, as

de maior relevância são: a Doença da Boca Vermelha, causada pela bactéria *Yersinia ruckeri*; as Streptococoses, cujo principal agente causador de doenças, nas truticulturas, pertencente ao grupo, é o *Lactococcus garvieae*; e a Doença Renal Bacteriana, causada pela bactéria *Renibacterium salmoninarum*^{15,16,17}.

Os peixes a serem enviados para exame laboratorial devem ser animais vivos que apresentem os sinais clínicos da doença. Os peixes devem ser transportados refrigerados em uma caixa de isopor e separados em sacos plásticos individuais, devidamente identificados. Para o exame bacteriológico, o material a ser coletado são fragmentos ou “swab” de rim e cérebro, além de fígado, olhos e fluido ascítico em alguns casos⁴.

O isolamento bacteriano é realizado em ágar MRS (Man, Rogosa e Sharpe) ou ágar bacteriológico suplementado com sangue (5%), e cultivado a 25°C por 48-72 horas. Nos testes de triagem, os isolados são gram-positivos, catalase negativos e oxidase negativos. A confirmação do diagnóstico é realizada com PCR *Weissella* gênero específica¹².

Tratamento

O tratamento de escolha frente a um caso de infecção por *W. ceti* é a antibioticoterapia oral. Testes *in vitro* demonstraram que a bactéria é sensível ao antibiótico florfenicol, e algum perfil de resistência frente à oxitetraciclina foi observado em alguns isolados de *W. ceti*⁴. Esses são os dois únicos

Os peixes a serem enviados para exame laboratorial devem ser animais vivos que apresentem os sinais clínicos da doença.

*O tratamento de escolha frente a um caso de infecção por *W. ceti* é a antibioticoterapia oral.*

antimicrobianos aprovados pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento para serem utilizados em fazendas de trutas-arco-íris^{4,13}.

A eficiência do tratamento com antibiótico durante um surto ocasionado por *W. ceti*, no entanto, pode não ser muito alta, mesmo no caso de uso de antimicrobianos a que o patógeno seja sensível *in vitro*, como o florfenicol. Isso porque o quadro de anorexia é uma alteração que ocorre desde o estágio inicial da doença. Sendo assim, os animais acometidos não ingerem a ração medicada em doses suficientes. A dosagem recomendada, de 10 mg de florfenicol por quilograma de peixe vivo, tem demonstrado resultados eficientes, embora não tenha sido realizado nenhum estudo de antibioticoterapia *in vivo* contra *W. ceti* em trutas-arco-íris.

Controle e prevenção

As perdas econômicas causadas pela bactéria *Weissella ceti* nas truticulturas são de grande impacto para os produtores, e algumas medidas podem prevenir sua ocorrência e/ou impedir que a infecção se dissemine no caso de surtos. Devido a maior predisposição de ocorrência da doença nos meses mais quentes do ano, algumas medidas

devem ser tomadas nesse período, como: evitar o manejo dos animais; planejamento de produção visando reduzir a densidade de estocagem no verão; evitar o trânsito e a introdução de novos animais na propriedade nesse período. Além disso, o manejo sanitário

Evitar o manejo dos animais; planejamento de produção visando reduzir a densidade de estocagem no verão; evitar o trânsito e a introdução de novos animais na propriedade nesse período.

durante todo o cultivo, levando em consideração as boas práticas de produção, devem ser observadas para prevenir a ocorrência tanto dessa como de outras doenças. Adequar as densidades de estocagem de cada tanque, respeitando a capacidade suporte de acordo com a taxa de renovação de água e oxigenação, é uma medida primordial para a prevenção da infecção por *W. cети*.

Quando o produtor se deparar com surtos da doença, marcados pelas altas taxas de mortalidade e animais apresentando os sinais clínicos descritos, uma amostragem de peixes do lote deve ser encaminhada para exame laboratorial, para o diagnóstico correto e, em seguida, iniciar a antibioticoterapia. No entanto, como vimos anteriormente, esse tratamento pode não ter a eficácia esperada. Além, disso existe uma preocupação quanto ao desenvolvimento da resistência ao antibiótico pela bactéria e o risco da presença do medicamento na carne do peixe destinada ao consumo humano. Por isso, estudos vêm sendo

realizados para o desenvolvimento de uma vacina frente a esse patógeno para trutas-arco-íris com o intuito de prevenir a doença.

Nos EUA, uma bacterina foi testada em trutas-arco-íris juvenis em laboratório. A bacterina foi desenvolvida com cé-

lulas de amostra da bactéria *W. cети* isolada no país e inativada com formalina. Durante o desafio, com a mesma amostra, essa bacterina proporcionou uma taxa de sobrevivência significativamente maior no grupo vacinado em relação ao grupo controle, que não recebeu a vacina⁸.

Recentemente, resultados ainda mais satisfatórios foram obtidos com uma vacina contendo células inativadas de *W. cети* emulsificadas em adjuvante oleoso. Essa vacina também foi testada em trutas juvenis em laboratório e valores de sobrevivência ainda mais elevados foram obtidos no grupo vacinado^{7,11}. A vacina foi desenvolvida com uma amostra isolada no Brasil e está sendo patenteada pela Universidade Federal de Minas Gerais com o intuito de disponibilizá-la comercialmente para uso na truticultura nacional^{7,11}.

Referências bibliográficas

1. OUOBA, L.I.I.; NYANGA-KOUMOU, C.A.G.; PARKOUDA, C. et al. Genotypic diversity of lactic acid bacteria isolated from African traditional alkaline-fermented foods. *Journal of Applied*

- Microbiology* 108, 2019–2029, 2010.
2. RENGPIPAT, S.; RUEANGRUKLIKHIT, T.; PIYATRITIVORAKUL, S. Evaluations of lactic acid bacteria as probiotics for juvenile seabass *Lates calcarifer*. *Aquacult. Res.*, v.39, p.134–143, 2008.
 3. LIU, J.Y., LI, A.U., JI, C., YANG, W.M. First description of a novel *Weissella* species as an opportunistic pathogen for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) in China. *Veterinary Microbiology* 136, 314–320, 2009.
 4. FIGUEIREDO, H.C., COSTA, F.A.A., LEAL, C.A., CARVALHO-CASTRO, G.A., LEITE, R.C. *Weissella* sp. outbreaks in commercial rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Brazil. *Veterinary Microbiology* 156, 359–366, 2012.
 5. COSTA, F.A.A. Infecção por *Weissella* sp. em trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*): caracterização da doença, vias de transmissão e perfil de resistência aos antimicrobianos. 2011. 47f. Dissertação (Mestrado, Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Lavras. Lavras, MG.
 6. VELA, A.I., FERNANDEZ, A., DE QUIROS, Y.B. *Weissella ceti* sp. nov., isolated from beaked whales (*Mesoplodon bidens*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61, 2758–2762, 2011.
 7. COSTA, F. A. A.; LEAL, C.A.G.; SCHUENKER, N. D.; LEITE, R.C.; FIGUEIREDO, H.C.P. Characterization of *Weissella ceti* infections in Brazilian rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), farms and development of an oil-adjuvanted vaccine. *Journal of Fish Diseases* (Print), 2014.
 8. WELCH, T.J. e GOOD, C.M. Mortality associated with Weissellosis (*Weissella* sp.) in USA farmed rainbow trout: Potential for control by vaccination. *Aquaculture* 388–391, 122–127, 2013.
 9. FIGUEIREDO, H.C.P.; COSTA, F. A. A.; LEAL, C.A.G.; CARVALHO-CASTRO, G.A.. Aprendendo sobre uma nova doença em trutas: septicemia hemorrágica causada pela bactéria *Weissella* sp. *Panorama da Aquicultura*, Rio de Janeiro, RJ, p. 30 - 37, 01 jul., 2009.
 10. LADNER, J.T., WELCH, J.T., WHITEHOUSE, C.A., PALACIOS, G.F. Genome sequence of *Weissella ceti* NC36, an emerging pathogen of farmed rainbow trout in the United States. *Genome Announcements*, 1, 1, 2013.
 11. COSTA, F.A.A. Molecular epidemiology and development of vaccines against emerging pathogens for Brazilian fish farming: *Streptococcus dysgalactiae* and *Weissella ceti*. 2013. 64f. Tese (Doutorado, Ciência Animal) – Escola de Veterinária/UFMG, Belo Horizonte, MG.
 12. JANG, J., KIM, B., LEE, J., JOENG, G., HAN, H. Identification of *Weissella* species by the genus-specific amplified ribosomal DNA restriction analysis. *FEMS Microbiology Letters*, 212, 29–34, 2002.
 13. MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA. Compêndio de produtos veterinários. (2014). Disponível em: <<http://www.cpvv.com.br/cpvv/index.html>>. Acesso em: 26 fev. 2014.
 14. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. Aquatic animal health code 2010. Disponível em: <<http://www.oie.int/eng/normes/fcode/>>. Acesso em: 20 fev. 2014.
 15. CHAMBERS, E.; GARDINER, R.; PEELER, E. J. An investigation into the prevalence of *Renibacterium salmoninarum* in farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), and wild fish populations in selected river catchments in England and Wales between 1998 and 2000. *Journal of Fish Diseases*, Oxford, v. 31, n. 2, p. 89-96, Feb. 2008.
 16. VENDRELL, D. et al. *Lactococcus garvieae* in fish: a review. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, Oxford, v. 29, n. 6, p. 177-198, July 2006.
 17. FOUZ, B., ZARGA, C., AMARO, C. First description of non-motile *Yersinia ruckeri* serovar I strains causing disease in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), cultured in Spain. *Journal of Fish Diseases*, Oxford, v. 29, n. 6, p. 3339-46, June 2006.

6. Antibioticoterapia em peixes



Guilherme C. Tavares (CRMV-MG: 11340)
Carlos A. G. Leal (CRMV-MG 9014)
Henrique C. P. Figueiredo* (CRMV-MG 5839)
[*figueiredoh@yahoo.com](mailto:figueiredoh@yahoo.com)

[bigstockphoto.com](https://www.bigstockphoto.com)

1. Introdução

A aquicultura é o ramo da produção animal que vem apresentando maiores taxas de crescimento nos últimos anos no Brasil e no mundo. Essa atividade caracterizada pelo cultivo de organismos aquáticos, especialmente peixes, tem sido considerada uma importante e promissora fonte de proteínas de origem animal para o consumo humano¹. Esse crescimento no país tem sido subsidiado pela expansão nas áreas produtivas, bem como a utilização de sistemas de cultivo intensivos. A intensificação do sistema de produção, apesar de aumentar a produtividade, predispõe o aparecimento de doenças infecciosas, principalmente doenças bacterianas. Essas enfermidades causam prejuízos significativos tan-

to diretos (mortalidades) como indiretos (gastos para o controle e prevenção dos surtos). Visando ao controle de infecções bacterianas, a administração de antimicrobianos, como os antibióticos, tem sido realizada em pisciculturas em todo o mundo².

Antibiótico pode ser definido como uma substância de origem natural ou sintética que tem a capacidade de eliminar ou inibir o crescimento bacteriano. São substâncias não tóxicas para o hospedeiro e utilizadas como agentes quimioterápicos no tratamento de doenças bacterianas em plantas e animais³. Na aquicultura, a antibioticoterapia é frequentemente realizada em casos de infecções bacterianas, sendo a principal forma de administração a

via oral. Riscos associados ao uso de antibióticos na aquicultura incluem o desenvolvimento e disseminação de bactérias resistentes aos medicamentos utilizados e genes relacionados a essa resistência. Adicionalmente, a presença de resíduos de antibióticos em *commodities* aquícolas e no meio ambiente são pontos importantes que têm sido discutidos mundialmente⁴. Apesar dos potenciais perigos, o uso de antibióticos de maneira correta e de acordo com critérios técnicos pode apresentar menor risco para o ambiente e para os consumidores. Esses fármacos são ferramentas essenciais para o controle de doenças bacterianas na produção de peixes, principalmente devido à atual ausência de métodos alternativos de prevenção, como vacinas, para a maioria das enfermidades.

2. Principais drogas utilizadas na piscicultura e seus mecanismos de ação

Diversas espécies bacterianas têm sido associadas a doenças em peixes cultivados^{5,6}. Dentre os principais patógenos, temos bactérias gram-negativas dos gêneros *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Edwardsiella*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Photobacterium*, *Francisella*, entre ou-

A seleção do antibiótico a ser utilizado deve levar em consideração: a espécie de peixe acometida; a sensibilidade do patógeno aos diferentes antimicrobianos; e as características farmacocinéticas e farmacodinâmicas da droga.

tros; e também gram-positivas dos gêneros *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Carnobacterium*, *Weissella*, *Mycobacterium* e outros^{6,7}. Conhecer o agente infeccioso envolvido no surto e sua patogênese é um fator importante para escolha do medicamento ideal para o tratamento. Alguns antibióticos atuam melhor

em bactérias gram-positivas, enquanto outros possuem maior eficácia em gram-negativas⁸. Adicionalmente, existem alguns microrganismos que são naturalmente resistentes a alguns antimicrobianos. Por exemplo, as *Aeromonas* móveis são bactérias naturalmente resistentes à ampicilina, assim como *Weissella sp.*, à vancomicina.

A seleção do antibiótico a ser utilizado em um caso de surto de doença bacteriana em uma piscicultura deve levar em consideração: a espécie de peixe acometida; a sensibilidade do patógeno aos diferentes antimicrobianos; e as características farmacocinéticas e farmacodinâmicas da droga, principalmente quanto à sua distribuição tecidual e concentração atingida nos diferentes órgãos. Para patógenos que acometem o sistema nervoso central, a capacidade de transposição da barreira hematoencefálica é uma característica imprescindível⁷. Outra

característica importante é que alguns microrganismos possuem a habilidade de sobreviver de maneira transitória no interior de macrófagos⁹ (Ex. *Francisella noatunensis subsp orientalis*, *Streptococcus spp.*), servindo como sítio de proteção para esse patógeno frente a alguns medicamentos. Além de aspectos técnicos, no caso da existência de drogas com aplicabilidade e eficiência semelhantes para o tratamento de uma mesma enfermidade, aspectos econômicos podem ser levados em conta na opção pelo melhor fármaco a ser utilizado.

Os antibióticos apresentam estruturas químicas diversas e podem ser classificados como bacteriostáticos ou bactericidas, de acordo com os efeitos exercidos contra a bactéria. Agentes bacteriostáticos geralmente inibem processos de síntese na célula bacteriana (normalmente de proteínas e de ácido fólico necessário para síntese de ribonucleotídeos e desoribonucleotídeos em bactérias), bloqueando a multiplicação desses microrganismos. Agentes bactericidas promovem a morte das células bacterianas. Alguns antibióticos bactericidas possuem efeito bacteriolítico, promovendo a ruptura das células bacterianas. No caso de antibióticos bacteriostáticos e bactericidas que não promovem lise,

as células bacterianas (vivas ou mortas), como não são destruídas, deverão ser fagocitadas e eliminadas pelas células do sistema imune do peixe. Assim sendo, mesmo com a administração desses fármacos, a resposta imune do animal é fundamental para eliminação da doença e promoção da cura.

As principais características dos antibióticos utilizados na piscicultura mundial, bem como seus mecanismos de ação nas células bacterianas, são apresentados na Tabela 1.

A utilização de antibióticos na aquicultura teve início em meados da década de 50, quando sulfonamidas foram empregadas no controle de surtos de furunculose (infecção causada pela bactéria *Aeromonas salmonicida*) em alevinos de trutas (*Oncorhynchus mykiss*) nos Estados Unidos. Desde então, vários compostos antimicrobianos foram testados, incluindo cloranfenicol, oxitetraciclina, kanamicina, amoxicilina, quinolonas, ácido oxolínico, flumequina, eritromicina, sulfadimetoxina, sulfamezazina e florfenicol^{6,11}.

No Brasil, apenas antibióticos à base de florfenicol e oxitetraciclina podem ser utilizados para tratamentos terapêuticos em casos de doenças bacterianas em peixes de produção

O uso de antibióticos na aquicultura depende de regulamentos locais, que variam entre os países. No Brasil, apenas antibióticos à base de florfenicol e oxitetraciclina podem ser utilizados para tratamentos terapêuticos em casos

Tabela 1. Principais exemplos dos antibióticos comerciais utilizados na aquicultura e seus mecanismos de ação^{6,8,10}

Antibiótico	Mecanismo de ação
Amoxicilina	Bloqueia a transpeptidação da parede celular
Eritromicina	Inibe a síntese proteica por se ligar a unidade 50S do ribossomo bacteriano
Florfenicol	Inibe a síntese proteica a partir da ligação à subunidade ribossômica 50S, inibindo a atividade tipo peptidil-transferase desta
Oxitetraciclina	Inibe a síntese proteica por ligação à subunidade 30S dos ribossomos, impedindo a ligação do amino-acil tRNA ao sítio A do ribossomo
Quinolonas (Ácidos nalidixico e oxolínico) Fluorquinolonas (Enrofloxacina, Norfloxacina e Sarafloxacina)	Atuam bloqueando a atividade da enzima DNA girase necessária para a replicação do DNA bacteriano
Sulfonamidas	Competem com o PABA pela enzima diidropteroato-sintetase e impedem a síntese de ácido fólico

de doenças bacterianas em peixes de produção¹². O florfenicol (Aquaflor®, MSD; Florfenicol 50%, FAV), derivado fluorado do tianfenicol, é um agente bacteriostático que inibe a síntese proteica a partir da ligação à subunidade ribossomal 50S, inibindo a peptidil-transferase, conseqüentemente, a síntese proteica. Essa droga oferece maior eficácia que seus análogos (tianfenicol e cloranfenicol), e até o momento não existem muitos relatos de desenvolvimento de resistência bacteriana. Uma vantagem adicional desse fármaco é que ele não é utilizado no tratamento de seres humanos. Portanto, em caso de patógenos com mecanismos espe-

cíficos de resistência a essa droga, não seriam risco para os consumidores. O florfenicol apresenta ainda boa estabilidade na água, rápida absorção pelo trato gastrointestinal dos peixes, excelente distribuição tecidual, inclusive cérebro, e é efetivo contra diversos tipos de bactérias, tanto gram-positivas como gram-negativas¹³. Para piscicultura, uma vantagem adicional dessa substância advém de sua resistência térmica. Esse antibiótico pode ser incluído na mistura da ração na fábrica e submetido aos processos térmicos de extrusão e secagem, sem haver degradação significativa de sua molécula.

Antibióticos à base de oxitetraciclina-

na (TM® 700, Phibro) são amplamente utilizados nas pisciculturas brasileiras e possuem eficácia contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. É agente bacteriostático e inibe a síntese proteica ao se ligar à subunidade ribossomal 30S, impedindo a ligação do aminoacil-tRNA ao sítio A do ribossomo. É eficiente contra diversos patógenos de peixes; porém, amostras resistentes a esse medicamento têm sido descritas⁵. Adicionalmente, sabe-se que esse antibiótico não é capaz de promover a cura completa em casos de infecção pela bactéria *Streptococcus agalactiae* em tilápias, o que induz a ocorrência de portadores

assintomáticos e acarreta a persistência do agente bacteriano na fazenda produtiva¹⁴. Além disso, peixes portadores podem propiciar a disseminação da doença entre propriedades. As principais indicações de uso desses antibióticos no Brasil, bem como as espécies que podem ser submetidas à administração desses medicamentos, estão apresentadas na Tabela 2.

3. Vias de administração

Diferentemente do tratamento de espécies terrestres, o uso de antibióticos na aquicultura apresenta características próprias, desde a via de administração

Tabela 2. Antibióticos comerciais utilizados na aquicultura brasileira e as doenças às quais são recomendadas^{15,16}

Antibiótico	Espécie	Doença
AQUAFLO® (Florfenicol)	Tilápias e híbridos	Septicemia Hemorrágica causada por <i>Aeromonas</i> móveis Estreptococose por <i>Streptococcus agalactiae</i>
	Trutas	Doença da boca vermelha (<i>Yersinia ruckeri</i>)
TM® 700 (Oxitetraciclina)	Bagres	Septicemia hemorrágica causada por <i>A. liquefaciens</i> Doenças por <i>Pseudomonas</i>
	Salmonídeos	Doença ulcerosa (<i>Haemophilus piscium</i>) Furunculose (<i>A. salmonicida</i>) Septicemia hemorrágica causada por <i>A. liquefaciens</i> Doenças por <i>Pseudomonas</i>

do medicamento até a resposta dos peixes ao tratamento. A administração de antibiótico aos peixes pode ser conduzida de seis formas diferentes: oral (associada à ração ou com partículas bioencapsuladas), banho, imersão, *spray*, injeção e tópica⁶ (Tabela 3). Porém, na prática, a administração desses produtos por via oral, misturados à ração, é geralmente a forma mais aplicada e realizada no Brasil⁸.

O tratamento via injeção permite a correta administração da dose terapêutica do antibiótico no peixe, porém é uma

Administração conduzida de seis formas diferentes: oral banho, imersão, spray, injeção e tópica.

técnica laboriosa, que necessita de sedação prévia e é impraticável para o tratamento em larga escala. Sua realização é justificável apenas em reprodutores de alto valor

zootécnico, quando a terapia prévia por via oral não apresentar bons resultados. Os principais sítios de injeção incluem a cavidade intraperitoneal e a via intramuscular. A absorção do antibiótico é rápida, alcançando a corrente sanguínea e distribuindo-se pelos tecidos de maneira eficaz. O volume requerido para a administração de antibiótico por essa via é baseado no peso do peixe a ser tra-

Tabela 3. Vias de administração dos antibióticos em peixes⁶

Vias de administração	Características
Oral (incorporado à ração)	Necessita de componentes palatáveis; risco baixo de contaminação ambiental devido à pequena quantidade
Partículas bioencapsuladas	Necessita de componentes palatáveis; risco baixo de contaminação ambiental devido à pequena quantidade
Banho	Necessário longo tempo de exposição ao antibiótico, que deve ser solúvel ou capaz de dispersar adequadamente; quantidades elevadas do antibiótico
Imersão	Curta exposição ao antibiótico, que deve ser solúvel ou capaz de se dispersar adequadamente; problemas com a aquisição do diluente Curta exposição ao antibiótico, que deve ser solúvel ou capaz de se dispersar adequadamente; problemas com a aquisição do diluente
<i>Spray</i>	Medicamento espalhado sobre os peixes a partir de contenção e curta exposição ao ar. Deve ser solúvel ou capaz de se dispersar adequadamente. Pode causar poluição ambiental.
Injeção	Realizado apenas em peixes de alto valor zootécnico; geralmente requer anestesia; é laborioso; insignificante o risco de poluição ambiental
Tópico	Realizado apenas para o tratamento de úlceras em peixes ornamentais

tado, dose recomendada do antibiótico e a concentração fornecida do medicamento. O cálculo pode ser realizado a partir da expressão: $V = (D \times P) / C$, onde V é o volume requerido do antibióti-

A principal via de administração de antibiótico utilizada na prática é a oral, através da incorporação do medicamento à ração..

co; D, dosagem recomendada (mg/kg); P, peso do peixe (kg); e C, concentração fornecida do medicamento (mg/mL)¹⁷. Apesar da existência de tais recomendações da literatura, vale salientar que não existem produtos (antibióticos) licenciados no Brasil para uso injetável em peixes de produção. Adicionalmente, os produtos à base de florfenicol e oxitetraciclina são comercializados na forma de pó, não devendo ser administrados por vias parenterais. No passado, diversos produtores tinham por hábito administrar por via injetável o antibiótico oxitetraciclina em pó, diluído em solução fisiológica (0,9%), principalmente em reprodutores. Esse antibiótico não apresenta boa solubilidade em solução fisiológica com pH próximo à neutralidade (pH=7), devendo ser diluído em soluções levemente ácidas. Assim, não havia uma correta solubilização e após a administração formavam-se cristais de antibiótico na musculatura dos peixes. Devido ao caráter ácido dessa substância, era comum a ocorrência de áreas de necrose na local da aplicação. Essa prática tem se reduzido nos últimos anos.

Na literatura existem recomenda-

ções para realização de tratamentos com antibiótico via banho. Nessa via de administração, a droga pode ser absorvida via brânquias ou trato digestório. Os banhos para serem efetivos devem ser

realizados por períodos mais prolongados e é necessária uma maior quantidade do antibiótico para alcançar o efeito desejado^{5,8,17}. Por esses motivos, sua aplicabilidade é pequena no contexto da piscicultura comercial. No passado, esse tipo de tratamento foi muito realizado durante o transporte de alevinos em sacos plásticos. O principal produto utilizado no transporte era a oxitetraciclina e objetivo era evitar as mortalidades no período pós-transporte, principalmente as causadas pela bactéria *Flavobacterium columnare* (causadora da columnariose). Atualmente, com a adoção de boas práticas de manejo, o uso profilático de antibiótico na água de transporte tem diminuído.

A principal via de administração de antibiótico utilizada na prática é a oral, através da incorporação do medicamento à ração. A incorporação pode ser realizada diretamente na fábrica de ração ou na propriedade. No Brasil, a maioria das rações comerciais para peixes são extrusadas. O processo de extrusão (alta temperatura e pressão por um tempo curto) pode promover a degradação parcial ou total dos antibióticos. Como supramen-

cionado, o florfenicol é resistente a esse processo. Quanto à oxitetraciclina, porém, não existem informações seguras. Uma segunda forma de incorporação é após o processo de extrusão. Nesse caso, o antibiótico pode ser pulverizado à ração para sua incorporação aos péletes. No país, apenas uma fábrica de ração está licenciada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para incorporar antibióticos à ração de peixes. Para a incorporação de antibióticos na fábrica de ração, é necessária a receita emitida por um médico veterinário devidamente regularizado nos órgãos de classe.

A incorporação do antibiótico à ração dentro de uma propriedade é um procedimento comumente realizado nas pisciculturas. O procedimento pode ser realizado manualmente em uma superfície limpa (o mais comum é sobre uma lona, o que facilita posteriormente o recolhimento da ração medicada) ou com uso de uma betoneira. O antibiótico deve ser pesado de acordo com a dose a ser administrada; posteriormente, este é misturado à ração. Após a homogeneização, é adicionado óleo de soja comestível à ração. O óleo tem como função evitar que o antibiótico seja solubilizado quando em contato com a água durante o arraçoadamento. Recomenda-se o uso de 1 L de óleo para

cada 100 kg de ração. A quantidade de antibiótico a ser incorporada poderá variar de acordo com o tipo de antibiótico escolhido e o grau de pureza do mesmo. A dose final do antibiótico deverá ser calculada na unidade mg/kg de peso vivo por um período pré-determinado, considerando a taxa de arraçoadamento de cada tanque⁸.

4. Tipos de tratamentos com antibióticos

A fim de se evitar prejuízos econômicos dentro de um sistema de cultivo decorrente de infecções bacterianas, tratamentos terapêuticos podem ser instituídos. Considera-se tratamento terapêutico o uso de antimicrobianos para tratar infecções já estabelecidas na propriedade, ao passo que tratamento profilático corresponde à utilização de antimicrobianos de forma a prevenir o desenvolvimento da infecção⁴.

Na aquicultura, a administração de antibióticos de forma terapêutica é realizada por períodos de 10 dias consecutivos, por via oral, em grupos de peixes alocados em tanques. É a forma

mais coerente para a utilização de antibióticos, devendo ser instituída a partir do diagnóstico do agente etiológico responsável pelas mortalidades (como as doenças de peixes não possuem sinais clínicos patogno-

A administração de antibióticos de forma terapêutica é realizada por períodos de 10 dias consecutivos, por via oral, em grupos de peixes alocados em tanques.

mônicos, exames laboratoriais são necessários). Entretanto, a anorexia é uma das primeiras alterações fisiológicas induzidas por infecções bacterianas em peixes, tornando a antibioticoterapia oral limitada nos animais acometidos. Dessa forma, a administração terapêutica de antibiótico por via oral evita a ocorrência de doenças em peixes não infectados ou em fase inicial da doença, que ainda consomem ração¹⁸. Nesse contexto, é importante que técnicos e produtores sejam orientados de que, nos casos de surto, mesmo após a introdução da antibioticoterapia oral, mortalidades ainda continuarão sendo verificadas. Estas serão oriundas da morte dos peixes sintomáticos e anoréxicos, que não irão ingerir a ração medicada e morrerão. Em geral, as mortalidades começam a diminuir de maneira significativa 4-5 dias após o início do tratamento. A posologia dos principais antibióticos utilizados no Brasil para o combate das infecções bacterianas está apresentada na Tabela 4.

Com a intensificação da produção de peixes, houve a necessidade de se utilizar sistemas de cultivos com altas densidades de estocagem e com emprego de grande quantidade de insumos durante os ciclos de produção. A asso-

ciação desses fatores reduz a eficiência do sistema imune dos peixes, tornando-os mais susceptíveis às doenças. Adicionalmente, falhas no manejo e de biossegurança contribuem para a disseminação do agente infeccioso dentro de um plantel. Esse cenário resulta no aumento da utilização de antibióticos, sendo que alguns, apesar de não recomendado, são administrados de forma profilática. Tratamentos profiláticos são geralmente realizados a partir da administração do antibiótico à ração de forma tática, realizados prévia ou posteriormente a um evento de manejo considerado estressor, como classificação, despesca e transporte^{8,19}. Muitos produtores ainda adotam tais práticas como rotinas em suas pisciculturas. Porém, o uso constante de antibióticos pode selecionar microrganismos resistentes, tornando o tratamento instituído menos eficaz, como descrito⁸.

Como mencionado anteriormente, no Brasil apenas os medicamentos à base de florfenicol e oxitetraciclina podem ser utilizados de forma terapêutica em surtos de doenças bacterianas. Dessa forma, as opções na escolha de antibiótico são limitadas. Mesmo assim, é importante conhecer algumas características do agente infeccioso, como for-

Tabela 4. Posologia comumente utilizada de antibióticos em peixes⁶

Antibiótico	Posologia
Florfenicol	10 mg/peso vivo de peixe/dia durante 10 dias
Oxitetraciclina	50-100 mg/peso vivo de peixe/dia durante 10 dias

mas de transmissão, sítios de infecção e resistência natural a algum antibiótico. Previamente à determinação da droga ideal a ser utilizada, é pertinente a realização de um diagnóstico laboratorial para identificação do patógeno, bem como testes de sensibilidade a antimicrobianos para avaliação da eficiência de diferentes antibióticos. Os principais métodos utilizados para a determinação *in vitro* da sensibilidade dos microrganismos aos antibióticos são o de discos de difusão (antibiograma) e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) por microdiluição^{20,21}. Como os patógenos de peixes possuem características de cultivo peculiares em relação a outros patógenos animais, tais testes devem ser realizados por laboratórios especializados no diagnóstico de doenças de organismos aquáticos. Além disso, todos esses procedimentos devem ser realizados de acordo com normas internacionais, para que os resultados e controles sejam válidos e possam ser comparados com outros resultados nacionais e internacionais. O *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) possui protocolos específicos, padronizados e aceitos internacionalmente para determinação para a realização de antibiograma e determinação da CIM para bactérias isoladas de animais aquáticos^{20,21}. Esses manuais apresentam todas as etapas, insumos e controles de qualidade que devem ser realizados durante os testes. Essa padronização garante a

qualidade e permite a comparação dos dados gerados por diferentes laboratórios, em regiões distintas. Isso é muito importante para o monitoramento epidemiológico das tendências de emergência de microrganismos resistentes no país.^{20,21}.

Apesar da existência de protocolos internacionais, o principal problema para determinação da sensibilidade de patógenos de peixes aos antibióticos é a ausência de valores de referência. Sem esses valores de concentração inibitória mínima e o diâmetro dos halos de inibição, para muitos patógenos não é possível determinar se a amostra é sensível ou resistente. Para sanar esse problema já existem hoje metodologias estatísticas validadas, que permitem, a partir da análise de um conjunto de amostras de um determinado microrganismos, calcular o chamado ponto de corte epidemiológico. Esses valores são utilizados para classificar as amostras como selvagem (sensíveis) ou não-selvagem (resistentes)²². Na Tabela 5, são apresentados alguns pontos de corte epidemiológicos para patógenos isolados no Brasil.

A associação dos resultados obtidos de sensibilidade aos antibióticos e os dados da doença na propriedade permitem a escolha, pelo médico veterinário, do antibiótico mais eficaz a ser utilizado. Para fazendas que façam a utilização rotineira de antibióticos para o controle de mortalidades, é recomendado o monitoramento periódico da sensibilidade

Tabela 5: Pontos de corte epidemiológicos (PCE) provisórios calculados para patógenos bacterianos isolados de casos de infecção em peixes no Brasil

Patógeno	Antibiótico	PCE (CIM ¹)	PCE (Disco de Difusão)	Referência
<i>Aeromonas</i> móveis	Florfenicol	≤ 4 µg/mL	≥ 23 mm	24
<i>Aeromonas</i> móveis	Biciclovamicina	≤ 6,25 µg/mL	-----	24
<i>S. agalactiae</i>	Oxitetraciclina	≤ 1,95 µg/mL	≥ 23 mm	14
<i>Weissella ceti</i>	Florfenicol	-----	≥ 16 mm	25
	Eritromicina	-----	≥ 21 mm	
	Oxitetraciclina	-----	≥ 10 mm	
	Norfloxacina	-----	≥ 7 mm	
	Sulfonamida	-----	Resistente	

¹Concentração Inibitória Mínima

aos antimicrobianos a partir de amostras bacterianas isoladas na propriedade. Esse monitoramento permite determinar de maneira rápida a ocorrência de resistência bacteriana às drogas utilizadas e inferenciar sobre efetividade desses produtos⁸.

5. Impactos decorrentes do uso de antibióticos na aquicultura

O uso de antibióticos na aquicultura causa elevação do custo de produção e, às vezes, o tratamento executado não é capaz de debelar a infecção na propriedade, devido a diversos fatores mencionados anteriormente. Na piscicultura, os antibióticos são geralmente adicionados à ração e posteriormente são fornecidos aos peixes. Esse fornecimento pode ser nocivo ao meio ambiente, pois o antibi-

ótico é disperso na água e pode resultar em uma maior pressão de seleção em uma ampla variedade de bactérias presentes no ambiente aquático. O ambiente aquático é considerado eficiente para a seleção de bactérias resistentes aos antibióticos, bem como para a troca de genes de resistência, por meio de elementos genéticos móveis²³. Parte dos antibióticos incorporados à ração se dissolvem na água, e outra parte passa pelo sistema digestório do peixe sem ser absorvida, sendo esses resíduos eliminados no ambiente aquático. O antibiótico residual presente na água pode se depositar em sedimentos ou ser ingerido por outros animais, modificando o perfil de microrganismos na microbiota desses peixes e induzindo a seleção de bactérias resistentes aos antibióticos^{4,8}. Assim sendo, os

O uso de antibióticos na aquicultura causa elevação do custo de produção e, às vezes, o tratamento executado não é capaz de debelar a infecção na propriedade.

produtos devem ser utilizados com base em critérios técnicos, para o controle de surtos de doenças bacterianas, e nunca profilaticamente ou como promotor de crescimento²³.

6. Considerações finais

A antibioticoterapia deve ser realizada como medida terapêutica de combate de surtos de doenças bacterianas. É uma medida eficiente e segura quando realizada de forma adequada; porém, somente ela não resolve problemas relacionados à sanidade de organismos aquáticos. Para obtenção de uma produção saudável e com lucratividade, deve-se investir na prevenção e controle das enfermidades. Isso é feito através da realização de manejo sanitário dentro do sistema de cultivo. A associação de práticas de prevenção, como quarentena e vacinação, bem como práticas de controle, como descarte de animais doentes, tratamentos com antibióticos e realização de testes laboratoriais de diagnóstico, propiciam uma criação produtiva e livre de doenças.

7. Referências Bibliográficas

1. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. The state of world fisheries and aquaculture. Rome, 2014. 225 p.
2. DEFOIRD T.; SORGELOOS, P.; BOSSIER, P. Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. *Current Opin. Microbiol.*, v. 14, n. 3, p. 251-258, 2011.
3. SERRANO, P. H. Responsible use of antibiotics in aquaculture. In: Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO Fisheries Technical Paper 469. Roma, 2005.
4. ROMERO, J.; FEIJOÓ, C. G.; NAVARRETE, P. Antibiotics in Aquaculture – use, abuse and alternatives. In: CARVALHO, E. D.; DAVID, G. S.; SILVA, R. J. *Health and environment in aquaculture*. Rijeka: InTech, 2012. 414p.
5. NOGA, E. J. *Fish disease: diagnosis and treatment*. 2.ed, Iowa: Blackwell Publishing, 2010, 536p.
6. AUSTIN, B; AUSTIN, D.A. *Bacterial Fish Pathogens*. Diseases of Farmed and Wild Fish, 4. ed. Chichester: Springer/Prazis Publishing, 2007. 553p.
7. FIGUEIREDO, H. C. P.; LEAL, C. A. G.. Infecções por *Streptococcus* spp. em peixes. In: SILVA-SOUZA, A. T.; LIZAMA, M. A. P.; TAKEMOTO, R. M. *Patologia e Sanidade de organismos Aquáticos*. Maringá: Ed. Massoni, 2012, p. 275-292.
8. FIGUEIREDO, H. C. P.; GODOY, D. T.; LEAL, C. A. G. Antibióticos na aquicultura. *Panorama da Aquicultura*, v. 18, n. 105, p. 42-49, 2008.
9. AGNEW, W.; BARNES, A.C. *Streptococcus iniae*: An aquatic pathogen of global veterinary significance and challenging candidate for reliable vaccination. *Vet. Microbiol.*, v. 122, n. 1-2, p. 1-15, 2007.
10. MADIGAN, T.M.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P. V. et al. *Microbiologia de Brock*. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1160p.
11. SHAO, Z. J. Aquaculture pharmaceuticals and biologicals: current perspectives and future possibilities. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 50, n. 3, p. 229-243, 2001.
12. PADUA, S. B.; MENEZES FILHO, R. N.; CRUZ, C. Alevinos saudáveis: o ponto de partida para uma produção estável. *Panorama da Aquicultura*, v. 22, n. 134, p. 30-37, 2012.
13. FIGUEIREDO, H. C. P.; GODOY, D. T.; MIAN, G. F. et al. Estreptocose em tilápia do Nilo - parte 2. *Panorama da Aquicultura*, v. 17, n. 104, p. 42-45, 2007.
14. FARIA, F. C.; LEAL, C. A. G.; CARVALHO-CASTRO, G. A. et al. Carrier state induced by oxytetracycline therapy against streptococcosis in

A antibioticoterapia deve ser realizada como medida terapêutica de combate de surtos de doenças bacterianas.

- Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *J. Fish Dis.* (in print), 2013.
15. SCHERING-PLOUGH. Aquaflor 50% Premix. Disponível em: <http://www.aquatropic.com.br/images/Lamina%20Aquaflor.pdf>. Acesso em: 24 fev. 2014.
 16. PHIBRO. TM 700 Ficha técnica. Disponível em: http://www.phibro.com.br/ft/TM_700.FT.pdf. Acesso em 24 fev. 2014.
 17. RODGERS, C. J.; FURONES, M. D. Antimicrobial agents in aquaculture: practice, needs and issues. In: ROGERS, C.; BASURCO, B. *The use of veterinary drugs and vaccines in Mediterranean aquaculture*. Zaragoza: CIHEAM, 2009, p. 41-59.
 18. HEUER, O. E.; KRUSE, H. GRAVE, K. *et al.* Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture. *Clin. Infect. Dis.*, v. 49, n. 8, p. 1248-1253, 2009.
 19. CABELLO, F. C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ. Microbiol.*, v. 8, n. 7, p. 1137-1144, 2006.
 20. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. *Methods for antimicrobial disk susceptibility testing of bacterial isolated from aquatic animals*: approved guideline VET03-A. Wayne, CLSI, 2006.
 21. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. *Methods for broth dilution susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals*: approved guideline VET04-A. Wayne, CLSI, 2006.
 22. MILLER, A.; REIMSCHUESSEL, R. Epidemiological cutoff values for antimicrobial agents against *Aeromonas salmonicida* isolates determined by frequency distributions of minimal inhibitory concentration and diameter of zone of inhibition data. *Am. J. Vet. Res.*, v. 67, n. 11, p. 1837-1843, 2006.
 23. CARNEIRO, D. O.; FIGUEIREDO, H. C. P.; PEREIRA JUNIOR, D, J. *et al.* Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas em diferentes sistemas de cultivo de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 59, n. 4, p.869-876, 2007.
 24. GODOY, D. T.; MIAN, G. F.; ZANOLO, R.; YUHARA, T.; FARIA, F.; FIGUEIREDO, H. C. P. Patterns of resistance to florfenicol and bicyclomycin in Brazilian strains of motile aeromonads. *Aquaculture*, v 285, p.255-259, 2008.
 25. FIGUEIREDO, H. C. P.; COSTA, F. A. A.; LEAL, C. A. G.; CARVALHO-CASTRO, G. A.; LEITE, R. C. *Weissella* sp. outbreaks in comercial rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Brazil. *Vet. Microbiol.*, v. 156, p. 359-366.

7. Coleta e Remessa de Peixes para Diagnóstico de Doenças Infecciosas

Guilherme C. Tavares (CRMV-MG: 11340)
Henrique C. P. Figueiredo (CRMV-MG 5839)
Carlos A. G. Leal* (CRMV-MG 9014)
[*carlosleal@vet.ufmg.br](mailto:carlosleal@vet.ufmg.br)

[bigstockphoto.com](https://www.bigstockphoto.com)

1. Introdução

As doenças infecciosas de peixes apresentam diversas peculiaridades em relação às enfermidades de animais terrestres, principalmente a ausência de sinais clínicos característicos para a maioria das infecções. Assim sendo, a realização de exames laboratoriais é peça essencial no diagnóstico dessas enfermidades. A coleta e a remessa de peixes para realização

A coleta e a remessa de peixes para realização de exames laboratoriais são etapas fundamentais para a realização de um diagnóstico preciso e acurado.

de exames laboratoriais são etapas fundamentais para a realização de um diagnóstico preciso e acurado¹. Amostras coletadas, acondicionadas e enviadas inadequadamente comprometem a realização dos exames laboratoriais e os resultados obtidos, podendo não refletir o *status* de doença dos animais avaliados^{2,3}.

O presente artigo descreve os principais procedimentos para a coleta e remessa de peixes para o diagnóstico de

doenças infecciosas. Este tem como objetivos fornecer informações para auxiliar técnicos e produtores na seleção dos animais a serem coletados, bem como as formas de acondicionamento e remessa desses materiais para a obtenção de resultados confiáveis.

2. Seleção dos animais e número de peixes coletados

Na piscicultura, a coleta de animais para exames laboratoriais é realizada em duas situações distintas: 1- durante surtos, em que o diagnóstico é realizado para determinação da etiologia da doença; 2- para fins de monitoramento sanitário, em que um delineamento amostral é realizado em função de parâmetros estatísticos e epidemiológicos. Neste último caso, o objetivo é determinar a presença e a prevalência de patógenos na propriedade. Diferentes literaturas e ferramentas *on-line* estão disponíveis para a realização de delineamentos amostrais para monitoramento sanitário na produção animal. Um bom exemplo é o sítio Epitools, desenvolvido pelo AusVet Animal Health Service, que disponibiliza de maneira gratuita ferramentas para a realização de planos amostrais (<http://epitools.ausvet.com.au/content.php?page=home>). No caso de monitoramentos sanitários, a amos-

tagem é baseada na coleta aleatória de um número de animais determinado pelo delineamento amostral⁴. Devido à amplitude e complexidade do tema, o presente artigo irá se ater apenas aos métodos de coleta e remessa de material para diagnóstico em casos de surtos, ou seja, para determinação do agente etiológico durante mortalidades.

A amostra a ser coletada é tão importante quanto o método de diagnóstico a ser empregado, pois, quando realizada sem critérios, pode gerar falsos diagnósticos ou a não identificação de microrganismos envolvidos em surtos

de doenças infecciosas¹.

Nos casos de surtos, para o diagnóstico devem ser coletados peixes moribundos com sintomatologia clínica da doença. Nesses animais a possibilidade de sucesso no isolamento e

identificação do agente etiológico é significativamente maior que em animais subclínicos ou assintomáticos, devido à maior quantidade de microrganismos circulantes ou nos tecidos. Na Figura 1, são apresentados exemplos de peixes moribundos, com sinais clínicos de doenças infecciosas durante surtos.

O número de peixes a ser coletado para diagnóstico de uma doença infecciosa varia de acordo com aspectos técnicos (tipo de sistema de cultivo, disponibilidade de peixes para envio, doença

Nos casos de surtos, para o diagnóstico devem ser coletados peixes moribundos com sintomatologia clínica da doença.

em questão, logística de envio etc.) e financeiros (valor dos animais, disponibilidade de recurso para envio e custeio dos exames). Não existe um número

exato que atenda todos os casos. Mas, na experiência de mais de dez anos dos profissionais do AQUAVET-Laboratório de Doenças de Animais Aquáticos (EV-

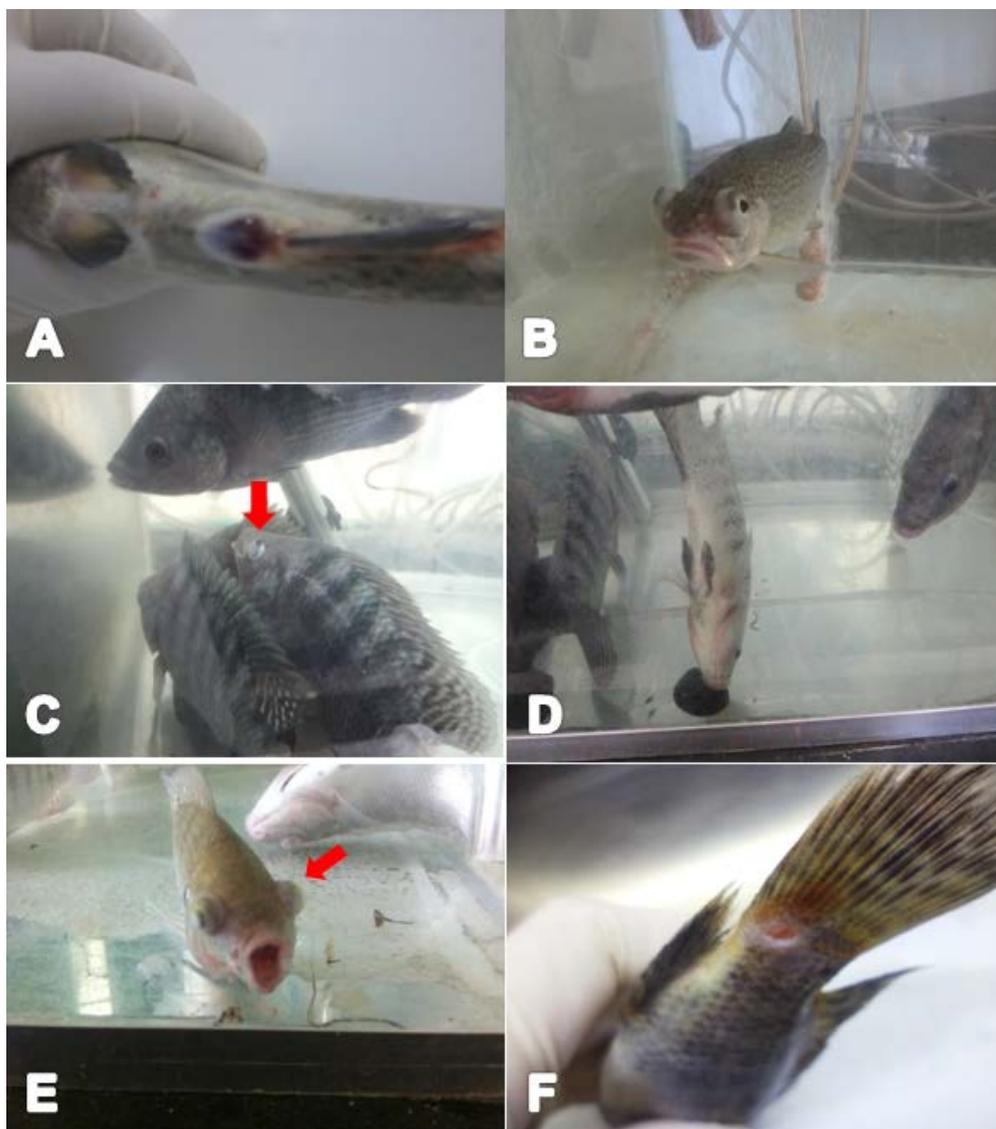


Figura 1: Sinais clínicos observados em peixes acometidos por doenças infecciosas. A— truta-arco-íris com prolapso retal; B- truta-arco-íris com exoftalmia bilateral; C- tilápia do Nilo com opacidade de córnea (seta) junto com outros peixes letárgicos; D- tilápia do Nilo com perda de equilíbrio; E- tilápia do Nilo com exoftalmia bilateral e paralisia bucal (seta), e, no fundo, outro animal com perda de equilíbrio; F- tilápia do Nilo com abscesso ulcerado no pedúnculo caudal.

UFMG), verificou-se que o envio de 5 a 8 peixes (moribundos com sinais clínicos da doença) tem possibilitado um diagnóstico acurado do agente etiológico envolvido na maioria dos casos acompanhados. Em casos em que a doença ocorre em diferentes sistemas de cultivo (ex. tanques de terra, gaiolas), é necessária a coleta de animais em cada uma das unidades.

Após serem coletados, os peixes moribundos podem ser enviados ao laboratório vivos, resfriados ou congelados. Cada uma das formas apresenta pontos positivos e negativos que serão descritos a seguir.

O melhor material para a realização de exame laboratorial é o envio de peixes vivos⁴, possibilitando a equipe do laboratório avaliar os sinais clínicos e realizar todos os tipos de exames (parasitológico, bacteriológico, virológico e histopatológico). Porém, do ponto de vista logístico, essa é a pior forma de envio de material, principalmente para animais adultos. Para chegarem vivos ao laboratório, os peixes devem ser enviados em recipientes com água, de

O envio de 5 a 8 peixes (moribundos com sinais clínicos da doença) tem possibilitado um diagnóstico acurado do agente etiológico envolvido na maioria dos casos acompanhados.

Essa forma de envio é aplicável principalmente para o diagnóstico de doenças em larvas e alevinos.

A forma mais comum de submissão de peixes para o diagnóstico de doenças infecciosas é o envio dos animais resfriados.

preferência com aeração suplementar. Isso dificulta e encarece a remessa, principalmente devido à distância entre os locais de produção e os laboratórios. Além disso, mesmo em situações em que é possível o envio de animais vivos, em muitos casos estes não suportam o transporte. Pelo fato de já estarem acometidos pelo agente infeccioso (moribundos) quando coletados, não resistem ao estresse do transporte. Essa forma de envio é aplicável principalmente para o diagnóstico de doenças em larvas e alevinos. Usualmente o tempo de traslado máximo recomendado para esse tipo de envio é de oito horas.

A forma mais comum de submissão de peixes para o diagnóstico de doenças infecciosas é o envio dos animais resfriados. Os peixes moribundos são colocados em sacos plásticos e acondicionados em caixas isotérmicas com gelo (normal ou reciclável). Esse tipo de envio aumenta a acessibilidade e viabilidade para a realização de exames laboratoriais, permitindo que amostras oriundas de longas distâncias possam chegar ao laboratório.

rio. O tempo de traslado máximo para esse tipo de despacho é de 48 horas, podendo ser realizado via empresas aéreas ou rodoviárias. Apesar da viabilidade, o envio de peixes resfriados não permite a avaliação da sintomatologia clínica dos peixes, e o gelo pode ocasionar alterações cutâneas, gerando dúvidas quanto à gênese *ante* ou *post-mortem* das lesões. Além disso, esse material não permite a realização com segurança de exame parasitológico, pois o gelo pode matar os parasitas, ou a morte dos animais faz com que estes se desprendam da carcaça, e histopatológico, pois em seis horas após a morte dos peixes, mesmo em condições de refrigeração, começa a ocorrer processos de autólise celular, dificultando a diferenciação posterior de sua gênese *ante* ou *post-mortem*. O envio de peixes resfriados é particularmente viável para diagnóstico de doenças bacterianas e virais em peixes.

O envio de peixes congelados para o diagnóstico de doenças não é recomendado, tendo aplicabilidade em situações muito específicas. Essa forma tem como vantagem a possibilidade de armazena-

O envio de peixes resfriados é particularmente viável para diagnóstico de doenças bacterianas e virais em peixes. O envio de peixes congelados para o diagnóstico de doenças não é recomendado.

Não devem ser coletados para o diagnóstico de doenças infecciosas peixes mortos encontrados nos sistemas de cultivo.

mento das amostras para posterior envio ao laboratório. Porém, o congelamento provoca a morte de diversas bactérias patogênicas de peixes, o que pode provocar resultados falso-negativos. Essa forma de envio pode ser utilizada para diagnóstico de doenças virais; contudo, não exist-

tem descrições da ocorrência destas em peixes tropicais no Brasil.

Cabe ressaltar que não devem ser coletados para o diagnóstico de doenças infecciosas peixes mortos encontrados nos sistemas de cultivo. Após a morte, o peixe entra rapidamente em estado de decomposição. Isso permite a contaminação bacteriana *post-mortem* dos tecidos, com colonização por diferentes microrganismos, acelerando sua deterioração e inviabilizando a realização de exames laboratoriais, principalmente bacteriologia⁴.

3. Procedimentos para o envio de espécimes

Como supramencionado, os peixes podem ser encaminhados ao laboratório vivos ou resfriados. Para tanto, cada forma de envio deve seguir

procedimentos específicos, a fim de se otimizar os resultados obtidos pelos exames laboratoriais.

Os procedimentos para envio de amostras estão descritos a seguir, de acordo com as recomendações do Laboratório de Doenças de Animais Aquáticos (AQUAVET) da Escola de Veterinária.

A) Envio de peixes vivos

- I. Encher um saco plástico resistente com 1/3 de água limpa;
- II. Devem ser coletados, para diagnóstico de doenças infecciosas, peixes vivos com sintomatologia clínica da doença. Não submeter para exame laboratorial peixes mortos ou peixes sadios misturados com peixes doentes;
- III. Coletar os peixes doentes, acondicioná-los nos sacos plásticos, completar os 2/3 restantes com oxigênio e vedá-los com ligas de borracha ou outros materiais. Identificar individualmente cada grupo de peixes, colocando entre as informações a data da coleta, lote, sistema de cultivo e propriedade de origem;
- IV. Colocar os sacos no interior de uma caixa térmica de isopor e envolvê-los com gelo picado até a altura da água no interior dos sacos plásticos. O objeti-

vo é diminuir a temperatura da água, o metabolismo dos animais e prolongar o tempo de transporte;

- V. Fechar a caixa térmica, vedá-la com fita adesiva e prontamente submeter ao laboratório;
- VI. Identificar no exterior da caixa térmica o nome do remetente, propriedade, local de destino, nome do laboratório de destino e nome do responsável pela recepção do material;
- VII. O laboratório deve estar ciente do envio do material e ser avisado do provável horário de chegada;
- VIII. Informações sobre parâmetros produtivos, manejo, características dos sistemas de cultivo, histórico da propriedade, histórico da ocorrência de doenças, surtos, tratamentos realizados, entre outros, são importantes para o esclarecimento da doença e auxiliam os técnicos do laboratório durante a realização dos exames adequados para cada caso. Portanto, essas devem ser fornecidas. Caso não seja possível o contato direto via e-mail ou telefone, essas informações devem ser manuscritas, colocadas no interior de sacos plásticos, estes poste-

riormente vedados e colados no interior da tampa da caixa térmica. Assim, na chegada ao laboratório os técnicos terão acesso a essas;

- IX. Em caso de dúvidas, os profissionais do laboratório devem ser contatados previamente para o esclarecimento e resolução de possíveis problemas operacionais;
- X. Caso o percurso entre a origem e o laboratório ultrapassar 6 horas, ou caso o responsável tenha dúvidas se o animal chegará vivo, os peixes devem ser submetidos resfriados.

B) Envio de peixes Resfriados:

- I. Devem ser coletados, para diagnóstico, peixes vivos com sintomatologia clínica da doença. Não submeter para exame laboratorial peixes mortos ou misturar peixes sadios e peixes doentes sem identificá-los;
- II. Coletar os peixes doentes, acondicioná-los em sacos plásticos individuais e identificar de maneira que essa informação não se perca caso o material seja molhado;
- III. Colocar os peixes no interior de uma caixa térmica (isopor ou plástico) com uma camada de gelo sob os peixes e, poste-

riormente à coleta de todos os animais, cobrir com gelo picado ou reciclável (transporte aéreo). Camadas intermediárias de gelo podem ser colocadas dependendo da altura da caixa;

- IV. Identificar individualmente cada peixe, colocando entre as informações a data da coleta, lote, sistema de cultivo e propriedade de origem. Peixes de diferentes lotes podem ser acondicionados e submetidos em uma mesma caixa térmica; porém, esses devem ser identificados individualmente;
- V. Fechar a caixa térmica, vedá-la com fita adesiva e prontamente submeter ao laboratório;
- VI. Identificar no exterior da caixa térmica o nome do remetente, propriedade, local de destino, nome do laboratório de destino e nome do responsável pela recepção do material;
- VII. Fazer a reposição do gelo sempre que possível, dependendo do tempo de traslado;
- VIII. Não congelar o material;
- IX. Informações sobre parâmetros produtivos, manejo, características dos sistemas de cultivo, histórico da propriedade, histórico da ocorrência de doenças, surtos, tratamentos realizados, en-

tre outros, são importantes para o esclarecimento da doença e auxiliam os técnicos do laboratório durante a realização dos exames adequados para cada caso. Portanto, essas devem ser fornecidas. Caso não seja possível o contato direto via e-mail ou telefone, essas informações devem ser manuscritas, colocadas no interior de sacos plásticos, estes posteriormente vedados e colados no interior da tampa da caixa térmica;

- X. O laboratório deve estar ciente do envio do material e ser avisado do provável horário de chegada;
- XI. Em caso de dúvidas, os profissionais do laboratório devem ser contatados previamente para o esclarecimento e resolução de possíveis problemas operacionais;
- XII. Caso o percurso entre a fazenda e o laboratório possa ultra-

passar 48 horas, esse material corre o risco de se deteriorar e resultados não fidedignos do problema podem ser obtidos.

Outras formas de coleta e envio de peixes para exames laboratoriais estão descritas no Manual de coleta e remessa de amostras para diagnóstico de enfermidades de animais aquáticos na Rede Nacional de Laboratórios do Ministério da Pesca e Aquicultura, disponível no sítio http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Monitoramento_e_Controlde_sanidade_pesqueira/Manual%20de%20Coleta%20e%20Remessa.pdf.

4. Envio de amostras e principais exames a serem realizados

De acordo com as suspeitas clínicas de um surto dentro de uma piscicultura, diferentes tipos de amostras podem ser enviados para o laboratório e submetidos aos exames parasitológico, bacteriológico, fúngico, viral ou histopatológico. Na Tabela 1, estão apresentadas as

Tabela 1. Amostras a serem coletadas e formas de envio para as diferentes suspeitas clínicas³

Doenças	Tipo de Amostra	Forma de Envio
Doenças Parasitárias	Peixe inteiro (recomendado)	Vivo
Doenças Bacterianas	Peixe inteiro	Vivo ou resfriado
Doenças Fúngicas	Peixe inteiro ou amostras de larvas	Vivo ou resfriado
Doenças virais (suspeitas)	Peixe inteiro ou amostras de larvas	Vivo ou resfriado ou congelado
Surto atípicos com alta mortalidade	Peixe inteiro ou amostras de larvas	Vivo

amostras e a forma de envio para o diagnóstico das diferentes doenças infecciosas e parasitárias em peixes.

5. Recepção dos peixes no laboratório

No laboratório, após o recebimento dos peixes, todos os dados afixados sobre o isopor são conferidos e, caso haja alguma irregularidade ou ausência de dados, o contato imediato com o remetente deve ser realizado. Os peixes são inspecionados para certificação da possibilidade da execução do exame laboratorial (se estão vivos ou em estado de deterioração). Em peixes que chegam vivos, após a inspeção inicial, deve ser realizado o exame parasitológico. Posteriormente, com material e equipamento adequados, os peixes de-

verão ser eutanasiados de acordo com as recomendações da Resolução CFMV nº 1.000, de 11 de maio de 2012⁵, examinados externamente mais uma vez e necropsiados para a coleta asséptica de tecidos (Figura 2). Os tecidos coletados serão submetidos ao exame bacteriológico e fúngico a partir de estriados em meios de cultivos seletivos, seguido por incubação e avaliação da obtenção de possíveis isolados. Cada microrganismo obtido será submetido à identificação fenotípica, bioquímica e molecular de acordo com a suspeita clínica.

6. Considerações finais

O diagnóstico de doenças infecciosas em peixes é uma peça fundamental para o controle das enfermidades em fazendas. Para isso, a coleta e remessa de material devem ser realizadas de maneira



Figura 2: Peixe a ser submetido à necropsia e exame bacteriológico.

criterosa. Diversas formas de coleta e remessa de peixes para exames laboratoriais diferentes das apresentadas no presente artigo estão disponíveis na literatura. Mas, de posse das informações e recomendações básicas apresentadas aqui, técnicos e produtores poderão realizar com sucesso essa etapa crucial para um bom diagnóstico de doenças em peixes.

7. Referências Bibliográficas

1. LIMA, L. C.; LEITE, R. C. Boas coletas garantem bons diagnósticos. *Panorama da Aquicultura*, v. 16, n. 96, p. 24-29, 2006.
2. ZAINATHAN, S. C.; CARSON, J.; CRANE, M. S. J. *et al.* F. Laboratory evaluation of sample collection methods (organs vs swabs) for Tasmanian salmon reovirus detection in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.*, v. 36, n. 4, p. 427-436, 2013.
3. MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. Manual de coleta e remessa de amostras para diagnóstico de enfermidades de animais aquáticos na Rede Nacional de Laboratórios do Ministério da Pesca e Aquicultura – RENAQUA. 1.ed. Brasília, 2013. 67p.
4. SIMON, R. C.; SCHILL, W. B. Tables of sample size requirements for detection of fish infected by pathogens: three confidence levels for different infection prevalence and various population sizes. *Journal of Fish Diseases*, v. 7, n. 6, p. 515-520, 1984.
5. NOGA, E. J. *Fish disease: diagnosis and treatment*. 2.ed, Iowa: Blackwell Publishing, 2010, 536p.
6. CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. Resolução Nº 1.000, de 11 de Maio de 2012. Disponível em: http://www.cfmv.org.br/portal/legislacao/resolucoes/resolucao_1000.pdf. Acesso em: 22 mai. 2014.