



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO PROFISSIONAL EM DEFESA SANITÁRIA
ANIMAL – CURSO DE DOUTORADO

ALANNA RAISSA DE ARAÚJO SILVA

CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS DO COMPLEXO *Aeromonas* ISOLADAS DE *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1816) E RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS:
impacto em sanidade animal, saúde pública e meio ambiente

São Luís

2024

ALANNA RAISSA DE ARAÚJO SILVA

CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS DO COMPLEXO *Aeromonas* ISOLADAS DE *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1816) E RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS:
impacto em sanidade animal, saúde pública e meio ambiente

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação Profissional em Defesa Sanitária Animal (Curso de Doutorado) da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Defesa Sanitária Animal.

Orientadora: Profa Dr^a. Nancyleni Pinto Chaves Bezerra

Co-orientadora: Profa Dr^a. Amanda Mara Teles

São Luís

2024

Silva, Alanna Raissa de Araújo

Caracterização de bactérias do complexo *Aeromonas* isoladas de *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1816) e resistência a antimicrobianos: impacto em sanidade animal, saúde pública e meio ambiente. / Alanna Raissa de Araújo Silva. – São Luis, MA, 2024.

139 f

Tese (Doutorado em Profissional em Defesa Sanitária Animal) – Universidade Estadual do Maranhão, 2024.

Orientadora: Profa. Dra. Nancyleni Pinto Chaves Bezerra

ALANNA RAISSA DE ARAÚJO SILVA

CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS DO COMPLEXO *Aeromonas* ISOLADAS DE *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1816) E RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS:
impacto em sanidade animal, saúde pública e meio ambiente

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação Profissional em Defesa Sanitária Animal (Curso de Doutorado) da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Defesa Sanitária Animal.

Aprovada em: 16/05/2024

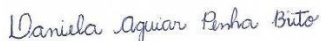


Profa. Dra. Nancyleni Pinto Chaves Bezerra
Orientadora
Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)

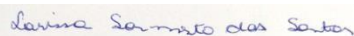
Profa. Dra. Amanda Mara Teles
Co-orientadora
Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)



Profa. Dra. Feliciana Clara Fonsêca Machado
1º Avaliador (Externo)
Universidade Federal do Piauí (UFPI)



Profa. Dra. Daniela Aguiar Penha Brito
2º Avaliador (Externo)
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)



Profa. Dra. Larissa Sarmento dos Santos Ribeiro
3º Avaliador (Interno)
Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)



Profa. Dra. Viviane Correa Silva Coimbra
4º Avaliador (Interno)
Universidade Estadual do Maranhão

À Deus, meu SENHOR. Louvado e engrandecido seja Deus!

À minha família, meu bem precioso.

Com amor dedico!

AGRADECIMENTOS

À Deus, meu SENHOR e meu Pastor, pois me guia nessa jornada da vida e me protege sempre de todos os males.

Aos meus pais, Antônio Cardoso da Silva Segundo e Flordeliz de Araújo Silva, meus amores genuínos e verdadeiros, pelos seus ensinamentos morais, contribuindo para minha formação pessoal. Amo vocês!

A minha amada e saudosa avó, Severa Pereira Araujo (*in memorian*), pelo seu amor, companheirismo, amizade e dedicação conferidos a mim. O meu amor eterno!

Aos meus amados irmãos, Andreia De Liz da Silva Oliveira, Antônio Cardoso da Silva Segundo Júnior e Albert de Araújo Silva, pela amizade, carinho e torcida pelas minhas conquistas. Amo vocês!

Aos meus lindos e amados sobrinhos, Allan Aguiar Silva, Tiago da Silva Oliveira e Andreza Tainá Aguiar Silva. Amo vocês!

Aos meus amados cunhados pela amizade e força para realização das minhas conquistas.

À minha querida e competente orientadora, professora Dr^a. Nancyleni Pinto Chaves Bezerra, pela parceria firmada revestida com amizade, respeito e comprometimento e pelos ensinamentos com excelência.

À minha coorientadora, professora Dr^a Amanda Teles, pela parceria eficaz e ensinamentos com maestria.

À Universidade Estadual do Maranhão-UEMA; à Coordenadora do Programa de Pós-Graduação Profissional em Defesa Sanitária Animal, professora Dr^a. Viviane Correa Silva Coimbra, pela sua competência, dedicação e comprometimento com excelência, que juntamente com os demais professores e colaboradores que participaram e contribuíram com a minha jornada de estudos durante o doutoramento, em especial à professora Débora Martins Silva Santos, pela seus ensinamentos e colaboração com excelência.

Aos demais profissionais da Coordenação do Doutorado, em especial a Maria da Coceição da Silva Nascimento, profissional responsável e atuante na secretaria do PPG, que a todos conquista com a seu brilho interior e simpatia.

Aos queridos colegas da minha turma do doutorado, composta por: Analy Castro Lustosa Cavalcante, Clidileni Nogueira de Alencar, Cleide Selma Alves Santana, Daniela Póvoas Rios e Paull Andrews Carvalho dos Santos, pelo apoio mútuo e parceria firmada durante o doutoramento.

A Agência Estadual de Defesa Agropecuária do Maranhão, em especial ao Dr, Cauê Ávila Aragão, presidente da agência, a Juciely Campos Oliveira, diretora de defesa e inspeção animal, Rejane Valéria Costa, diretora de defesa e inspeção vegetal e Camila Vidigal, coordenadora de defesa animal, pelo comprometimento, seriedade e profissionalismo com excelência.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para conclusão deste estudo, em especial, Izabela Alves Paiva, Greiciene dos Santos de Jesus, Joyce Caroline Campos Mendes Braga, Ana Letícia Pinto Silva, Vanielly Viana Rodrigues Vieira, Tirza de Almeida e Nathã Costa de Sousa.

*“O Senhor é o meu pastor e nada me
faltará.”*

Salmos 23:1

RESUMO

Objetivou-se caracterizar bactérias do complexo *Aeromonas* isoladas de *Colossoma macropomum*, avaliar a resistência a antimicrobianos e promover a discussão da temática no âmbito da sanidade animal, saúde pública e do impacto ao meio ambiente. Para a realização do estudo, foram avaliados 40 exemplares de tambaquis, entre machos e fêmeas, em fase de engorda, oriundos da Ilha do Maranhão. Em ambiente laboratorial, foram removidos fragmentos de rim caudal e fígado para a pesquisa de *Aeromonas* spp. com a utilização de técnicas microbiológicas padronizadas e de referência (cultivo, isolamento, identificação fenotípica) e da reação em cadeia da polimerase para a caracterização genotípica dos isolados. Na sequência, os testes de sensibilidade foram realizados pelo método de difusão em disco com a utilização de 10 antimicrobianos representativos das classes das penicilinas (penicilina G – 10 µg; oxacilina – 1 µg; ampicilina com sulbactam sódico – 20 µg); cefalosporinas (cefepime – 30 µg; cefoxitina – 30 µg; cefadroxil – 30 µg; e, ceftriaxona – 30 µg); quinolonas (ofloxacina – 5 µg); aminoglicosídeos (neomicina – 300 µg); e, macrolídios (azitromicina – 15 µg). Os isolados foram classificados como sensível, sensível com exposição aumentada e resistente aos princípios antimicrobianos avaliados e classificados os fenótipos com resistência múltipla a três ou mais antimicrobianos testados, de classes diferentes. No total foram isolados, no ágar gelatina fosfato sal, 132 isolados de 25 peixes (82,5%; n= 25/40), sendo confirmadas para o gênero *Aeromonas* sp. a totalidade desse isolados, mediante a realização da coloração de gram (cocobastonetes gram negativos) e testes de catalase (100 % positivas) e oxidase (100 % positivas). Desses isolados, 56,81% (n= 75) foram oriundos de fígado e 43,19 % (n= 57) de rim caudal. Para confirmação fenotípica dessas cepas, foram realizadas 25 provas bioquímicas com a identificação de 114 isolados a nível de espécie, o que evidencia elevada taxa de identificação (86,37 %). Foram identificadas sete espécies de *Aeromonas* com perfil bioquímico compatível ao citado em literaturas especializadas nas seguintes frequências: *A. veronii by veronii* (60,53 %), *A. caviae* (18,42 %), *A. sobria* (5,56 %), *A. schubertii* (5,56 %), *A. veronii by sobria* (5,56 %), *A. media* (2,63 %) e *A. hydrophyla* (2,63 %). Os primers desenhados para a detecção de *Aeromonas* spp. apresentaram resultados satisfatórios na amplificação da PCR, sendo confirmados 47,37 % (n= 54) dos isolados como pertencentes ao gênero *Aeromonas*. As espécies de *Aeromonas* spp. identificadas fenotipicamente apresentaram resistência generalizada à penicilina; elevados percentuais de resistência a oxacilina, cefepime, cefadroxil e azitromicina. Os antimicrobianos em que as bactérias apresentaram maior sensibilidade, foram a ampicilina associada ao sulbactam, neomicina e ofloxacina. Em avaliação a resistência

múltipla a drogas, 34,21 % (n= 39) dos isolados foram considerados fenótipos com resistência múltipla. As classes antimicrobianas e antimicrobianos que os isolados apresentaram maiores percentuais de resistência, respectivamente, foram penicilinas e cefalosporinas e, penicilina, oxacilina e cefadroxil. Para colaborar com o Programa de Sanidade de Animais Aquáticos no estado do Maranhão no contexto da sanidade animal, saúde pública e meio ambiente, focando nos resultados obtidos, foram elaborados dois materiais técnicos: (i) um guia orientativo “*Aeromonas* em Peixes: o que é? como prevenir” - com a finalidade de levar informações ilustradas a diferentes públicos interessados na temática; e, (ii) um manual orientativo “Ações do serviço veterinário oficial na cadeia produtiva de animais aquáticos de cultivo” – com a finalidade principal de nortear as atividades de servidores vinculados à órgão executores de sanidade agropecuária no tocante a sanidade de animais aquáticos. Conclui-se que a totalidade das espécies identificadas no estudo são consideradas patógenos de animais aquáticos com potencial zoonótico para seres humanos e que a vigilância correta das instalações de água, alimentos e saneamento, com a implementação de procedimentos diagnósticos e detecção desses agentes é essencial para a prevenção de infecções e surtos. Embora não existam antimicrobianos registrados no Brasil para uso no cultivo de *C. macropomum*, a resistência antimicrobiana está presente em isolados de *Aeromonas* spp. oriundos dos tambaquis da área amostrada. A multirresistência em elevada frequência dos isolados de *Aeromonas* spp. suscita preocupação quanto aos cultivos dos peixes amostrados, bem como a saúde humana dada a possibilidade de infecções humanas por bactérias multirresistentes. Com, os materiais técnicos elaborados espera-se que as vigilâncias ativa e passiva sejam mais efetivas e célere, o que, invariavelmente, converge para a redução de casos e surtos de doenças nas criações, contribuindo com a sanidade animal e salvaguardando a saúde de peixes, de consumidores e do meio ambiente.

PALAVRAS-CHAVE: Aeromonadaceae. Piscicultura. Antimicrobianos. Saúde única. Vigilância epidemiológica.

ABSTRACT

The objective was to characterize bacteria from the *Aeromonas* complex isolated from *Colossoma macropomum*, evaluate resistance to antimicrobials and promote discussion of the topic within the scope of animal health, public health and the impact on the environment. To carry out the study, 40 tambaqui specimens were evaluated, including males and females, in the fattening phase, from Maranhão Island. In a laboratory environment, fragments of the caudal kidney and liver were removed to search for *Aeromonas* spp. using standardized and reference microbiological techniques (cultivation, isolation, phenotypic identification) and polymerase chain reaction for the genotypic characterization of isolates. Subsequently, sensitivity tests were carried out using the disk diffusion method using 10 antimicrobials representing the penicillin classes (penicillin G – 10 µg; oxacillin – 1 µg; ampicillin with sulbactam sodium – 20 µg); cephalosporins (cefepime – 30 µg; cefoxitin – 30 µg; cefadroxil – 30 µg; and ceftriaxone – 30 µg); quinolones (ofloxacin – 5 µg); aminoglycosides (neomycin – 300 µg); and, macrolides (azithromycin – 15 µg). The isolates were classified as sensitive, sensitive with increased exposure and resistant to the evaluated antimicrobial principles and the phenotypes were classified as having multiple resistance to three or more antimicrobials tested, from different classes. In total, 132 isolates from 25 fish (82.5%; n= 25/40) were isolated on gelatin phosphate salt agar, being confirmed for the genus *Aeromonas* sp. the totality of these isolates, by performing gram staining (gram negative cocorods) and catalase tests (100% positive) and oxidase (100% positive). Of these isolates, 56.81% (n= 75) came from the liver and 43.19% (n= 57) from the caudal kidney. For phenotypic confirmation of these strains, 25 biochemical tests were carried out with the identification of 114 isolates to species level, which shows a high identification rate (86.37%). Seven species of *Aeromonas* were identified with a biochemical profile compatible with that cited in specialized literature at the following frequencies: *A. veronii* by *veronii* (60.53%), *A. caviae* (18.42%), *A. sobria* (5.56%), *A. schubertii* (5.56 %), *A. veronii* by *sobria* (5.56 %), *A. media* (2.63 %) and *A. hydrophyla* (2.63 %). Primers designed for the detection of *Aeromonas* spp. presented satisfactory results in PCR amplification, with 47.37% (n= 54) of the isolates confirmed as belonging to the genus *Aeromonas*. *Aeromonas* spp. identified phenotypically showed widespread resistance to penicillin; high percentages of resistance to oxacillin, cefepime, cefadroxil and azithromycin. The antimicrobials to which the bacteria showed greater sensitivity were ampicillin associated with sulbactam, neomycin and ofloxacin. When evaluating multiple drug resistance, 34.21% (n= 39) of the isolates were considered multiple drug resistance phenotypes. The antimicrobial and antimicrobial classes in which the isolates showed the highest percentages of resistance, respectively, were penicillins

and cephalosporins and penicillin, oxacillin and cefadroxil. To collaborate with the Aquatic Animal Health Program in the state of Maranhão in the context of animal health, public health and the environment, focusing on the results obtained, two technical materials were prepared: (i) an advisory guide “*Aeromonas* in Fish: what It is? how to prevent” - with the aim of providing illustrated information to different audiences interested in the topic; and, (ii) a guidance manual “Actions of the official veterinary service in the production chain of farmed aquatic animals” – with the main purpose of guiding the activities of employees linked to the agricultural health executing body with regard to the health of aquatic animals. It is concluded that all species identified in the study are considered pathogens of aquatic animals with zoonotic potential for humans and that correct surveillance of water, food and sanitation facilities, with the implementation of diagnostic procedures and detection of these agents is essential to the prevention of infections and outbreaks. Although there are no antimicrobials registered in Brazil for use in the cultivation of *C. macropomum*, antimicrobial resistance is present in isolates of *Aeromonas* spp. originating from tambaquis in the sampled area. The high frequency of multidrug resistance of *Aeromonas* spp. raises concern regarding the cultivation of the fish sampled, as well as human health given the possibility of human infections by multi-resistant bacteria. With the technical materials prepared, it is expected that active and passive surveillance will be more effective and faster, which, invariably, converges to the reduction of cases and outbreaks of diseases in farms, contributing to animal health and safeguarding the health of fish, consumers and the environment

KEY-WORDS: Aeromonadaceae. Pisciculture. Antimicrobials. One Health. Epidemiological monitoring.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO III

Capítulo III

Tabela 1.	Location of <i>Aeromonas</i> sp. isolation in tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>) and the frequency of bacterial isolates.....	60
Tabela 2.	Biochemical profile of 114 <i>Aeromonas</i> sp. isolates from tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>) coming from fish farms in Maranhão State's Metropolitan region.....	60
Tabela 3.	<i>Aeromonas</i> species isolated from tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>) coming from fish farms in Maranhão State's Metropolitan Region.....	61
Tabela 4.	Biochemical features of species belonging to genus <i>Aeromonas</i> isolated from black tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>) coming from fish farms in Maranhão State's Metropolitan Region.....	62

Capítulo IV

Tabela 1.	Interpretation pattern of disk diffusion test based on halo measurements, and results observed for sensitivity, sensitivity upon increased exposure and resistance of <i>Aeromonas</i> spp. isolates tested against 10 antimicrobials.....	68
Tabela 2.	Action of antimicrobials against <i>Aeromonas</i> spp. isolated from tambaqui fish (<i>Colossoma macropomum</i>), deriving from São Luís Metropolitan Region (Maranhão State).....	69
Tabela 3.	Multidrug-resistance profile of <i>Aeromonas</i> spp. species isolated from tambaqui fish (<i>Colossoma macropomum</i>) grown in São Luís Metropolitan Region – Maranhão State.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AF	Agricultura Familiar
ATER	Assistência Técnica Rural
AGED	Agência Estadual de Defesa Agropecuária
AGERP	Agência Estadual de Extensão Rural e Pesquisa Agropecuária
ATER	Assistência Técnica e Extensão Rural
BHIB	Caldo Infusão Cérebro Coração
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CNA	Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil
DOI	Document Object Identification
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IMESC	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública
MAPA	Ministério da Agricultura e Pecuária
MDR	Resistência Múltipla a Drogas
NB	Caldo Nutriente
ODS	Objetivos de Desenvolvimento Sustentável
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEIXE BR	Associação Brasileira de Piscicultura
pH	Potencial Hidrogeniônico
POAs	Produtos de origem animal
PNSAA	Programa Nacional de Sanidade dos Animais Aquáticos
SAGRIMA	Secretaria de Estado da Agricultura e Pecuária
SAA	Agar de Ampicilina de Amido
TSB	Caldo de soja e tripticaseína

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	18
1.1 Justificativa e Importância do Trabalho.....	20
1.2 Hipótese Científica do Trabalho.....	22
1.3 Objetivos.....	22
1.3.1 Geral.....	22
1.3.2 Específicos.....	23
1.4 Estrutura do Trabalho de Qualificação de Doutorado.....	23
REFERÊNCIAS.....	24

CAPÍTULO II

2. REVISÃO DE LITERATURA.....	27
2.1 Piscicultura no Brasil e no Maranhão.....	27
2.2 Aspectos Gerais de Doenças em Peixes.....	28
2.3 Características do Gênero <i>Aeromonas</i>.....	29
2.3.1 Taxonomia.....	31
2.3.2 Fatores que interferem no crescimento de <i>Aeromonas</i> spp.....	32
2.3.3 Fatores de virulência.....	33
2.3.3.1 Enzimas extracelulares.....	34
2.3.3.2 Enterotoxinas.....	35
2.4 Isolamento de <i>Aeromonas</i> sp.....	35
2.5 <i>Aeromonas</i> em Tambaquis (<i>Colossoma macropomum</i>) de Cultivo.....	37
2.6 Antimicrobianos na Aquicultura.....	39
REFERÊNCIAS.....	40

CAPÍTULO III

Featuring of <i>Aeromonas</i> spp. isolated from tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>) grown under semi-intensive production system.....	47
ABSTRACT.....	48
INTRODUCTION.....	49
MATERIALS AND METHODS.....	51
Ethical aspects.....	51
Sample collection.....	51
Isolation and phenotypic identification of <i>Aeromonas</i> sp.....	51
Ghenotypic identification of <i>Aeromonas</i> sp.....	52
Data analysis.....	53
RESULTS.....	53
DISCUSSION.....	54
ACKNOWLEDGEMENT.....	57
REFERENCES.....	57

CAPÍTULO IV

ANTIMICROBIAL RESISTANCE PROFILE OF <i>Aeromonas</i> spp. ISOLATED FROM TAMBAQUI FISH (<i>Colossoma macropomum</i>).....	68
---	-----------

ABSTRACT.....	68
RESUMO.....	68
1. INTRODUCTION.....	69
2. MATERIALS AND METHODS.....	70
Ethical aspects.....	70
<i>Aeromonas</i> spp. Bacterial Isolates.....	70
Antimicrobial Resistance Test.....	70
3. RESULTS AND DISCUSSION.....	71
4. CONCLUSIONS.....	74
ACKNOWLEDGEMENT.....	75
REFERENCES.....	75
CAPÍTULO V	
5. GUIA ORIENTATIVO.....	80
5.1 <i>Aeromonas</i> em Peixes: o que é? como prevenir.....	80
CAPÍTULO VI	
6. MANUAL ORIENTATIVO.....	110
6.1 Ações do Serviço Veterinário Oficial na Cadeia Produtiva de Animais Aquáticos de Cultivo.....	110
CAPÍTULO VII	
7. CONCLUSÃO GERAL.....	138
CAPÍTULO VIII	
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	141

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO GERAL

O estado do Maranhão é o segundo maior da federação brasileira em extensão litorânea com 640 km de linha de costa, sendo considerado tradicionalmente o principal produtor de peixes na região Nordeste, o que lhe confere importante representatividade no cenário nacional aquícola (Isaac *et al.*, 2006). Em termos produtivos, o Maranhão é o quarto maior produtor de peixes nativos do Brasil, com produção de 40.800 toneladas, segundo relatório da Associação Brasileira de Piscicultura do ano de 2021 (Peixe BR, 2022).

Contrariamente a situação brasileira que tem a *Oreochromis niloticus* (tilápia do Nilo) como a espécie mais produzida, os peixes nativos¹ no Maranhão confirmam a característica peculiar da piscicultura maranhense e a aceitabilidade deles no mercado interno do Estado, com destaque para o tambaqui (*Colossoma macropomum*) e seus híbridos (Souza *et al.*, 2022).

Apesar do potencial maranhense para o desenvolvimento da piscicultura², muitos gargalos dificultam que a atividade se desenvolva e se torne mais competitiva, como: (i) aspectos regulatórios - licenças ambientais; (ii) aspectos econômicos - ciclo de produção longo; e, (iii) aspectos técnicos - métodos artesanais e rudimentares de produção, gestão inadequada da atividade, falta de assistência técnica e qualificação da mão-de-obra e problemas recorrentes de manejo, este último envolve, sobretudo o manejo sanitário. Logo, o compromisso em desenvolver a piscicultura no Maranhão perpassa, fundamentalmente pelo envolvimento do piscicultor (elo da cadeia produtiva normalmente esquecido), incentivo a novos investimentos, estímulo à produção de conhecimentos, respeitando, sempre, o meio ambiente e as populações já inseridas nessa atividade.

No contexto sanitário, surtos de bacterioses constituem um fator limitante para a piscicultura quando as medidas de biossegurança³ encontram-se comprometidas, afetando a produção com consequente queda na produtividade (Tavares-Dias e Martins, 2017; Watts *et al.*, 2017), desencadeando perdas econômicas (Figueiredo; Leal, 2008; Turker; Yildirim; Karakas, 2009; Zamri-Saad *et al.*, 2014), estimadas em em 84 milhões de dólares/ano (Tavares-Dias e Martins, 2017).

¹ Tambaqui (*Colossoma macropomum*), tambatinga (cruzamento de fêmea de *C. macropomum* e macho de *Piaractus brachypomus*), curimatã (*Prochilodus lineatus*), piaui (*Leporinus freiderici*) e pacu (*Piaractus mesopotamicus*).

² Clima propício para a produção de organismos cultivados, diversidade de espécies, disponibilidade de mão-de-obra e localização estratégica para o escoamento da produção.

³ Conjunto de procedimentos técnicos que têm o objetivo de prevenir, diminuir e controlar, direta ou indiretamente, os desafios que surgem na produção animal frente aos agentes patogênicos.

As bactérias de interesse para a piscicultura são consideradas oportunistas e estão presentes na água e no microbioma⁴ dos peixes, podendo desencadear infecções e doenças em um hospedeiro debilitado (Leira *et al.*, 2016). Embora exista uma diversidade de bactérias com potencial patogênico para essa classe de vertebrados, *Aeromonas* spp. adquiriram importância pelas altas frequências relatadas nos estudos (Suhet *et al.*, 2011; Sebastião *et al.*, 2015).

Bactérias do gênero *Aeromonas* são bastante numerosas e reconhecidas por sua capacidade hemolítica e de formação de biofilmes, características que interferem na patogenicidade da cepa (Sebastião *et al.*, 2015; Pessoa *et al.*, 2019). São reconhecidas 36 espécies de *Aeromonas* spp., em que pelo menos 19 delas são consideradas patógenos emergentes (PESSOA *et al.*, 2019; Fernández-Bravo; Figuera, 2020). Entre as espécies, *A. hydrophila* se destaca por ser a mais isolada na piscicultura mundial, com capacidade de infectar diversos hospedeiros (Pessoa *et al.*, 2019). No Brasil, há registros de ocorrência dessa bactéria em tambaquis (*C. macropomum*) (Gallani *et al.*, 2020; Leão *et al.*, 2020; Pessoa *et al.*, 2020).

Para o tratamento de infecções bacterianas são utilizados antimicrobianos⁵. No Brasil para a utilização em peixes, apenas dois fármacos estão liberados pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA), o florfenicol e a oxitetraciclina, porém nenhum deles é permitido para uso em espécies nativas (Brasil, 2011). Mas, é comum o relato de uso de antimicrobianos não liberados, o que contribui para o desenvolvimento de resistência das cepas bacterianas, que afetam a saúde e segurança da população e do meio ambiente (Pessoa *et al.*, 2019).

Um dos principais agravantes da ameaça representada pelas bactérias é a crescente resistência aos métodos convencionalmente utilizados para seu controle, sendo estes em sua grande parte antimicrobianos. Comprovadamente, a resistência a antimicrobianos (RAM) tem se mostrado um grande problema em diversos setores de saúde humana e animal, sendo os usos indevido e exacerbado os seus principais determinantes (Martin; Thottathil; Newman, 2015).

No ano de 2001, a Organização Mundial de Saúde (OMS) publicou a Estratégia Global para contenção de RAM (WHO, 2001), apresentando um conjunto de intervenções para retardar o surgimento e reduzir a disseminação de micro-organismos resistentes a antimicrobianos. Quanto à produção animal, o documento abordou a relação entre o sistema de produção de alimentos e a disseminação de resistência a antimicrobianos (Silva *et al.*, 2020).

⁴Conjunto de todos os micro-organismos naturalmente presentes no corpo (ex.: pele, intestino, cavidades oral e nasal).

⁵ Substâncias de ocorrência natural, semisintética ou sintética que em concentração in vivo exibem atividade antimicrobiana (matam ou inibem o crescimento de micro-organismos) (Brasil, 2015).

O crescimento da população mundial⁶ invariavelmente gerou maior demanda por produtos de origem animal (POAs) e, para suprir tal necessidade, transformações ocorreram no modo de produção animal com a intensificação dos sistemas produtivos, criando um ambiente propício à disseminação de agentes e doenças infecciosas entre os animais, sendo, então, os antimicrobianos utilizados no tratamento, na prevenção de doenças e, também na promoção do crescimento animal (WHO, 2001). Para Silva *et al.* (2020), ao considerar a complexidade e a multicausalidade da RAM, várias são as implicações para os setores econômicos, incluindo a agropecuária. E, as respostas para seu enfrentamento devem integrar os diferentes elos da cadeia produtiva, bem como a utilização e comercialização dos antimicrobianos de forma racional.

1.1 Justificativa e Importância do Trabalho

A piscicultura é uma das principais atividades aquícolas do Maranhão, apresenta grande representatividade no processo de desenvolvimento econômico e social do Estado, principalmente na renda do pequeno produtor rural. Essa atividade produtiva movimenta a economia de pequenos municípios, com a geração de renda e empregos, especialmente na esfera rural.

Dois aspectos relevantes caracterizam as pisciculturas maranhenses: (i) ocorre em todo o território maranhense; e, (ii) inexistente um padrão sanitário de produção. Pelos aspectos supracitados, fica evidente que essa atividade aquícola cria oportunidades, mas também há de se pontuar que se reveste de grandes desafios, que perpassam pela necessidade de qualificação dos pequenos produtores (base da produção maranhense), adequação dos serviços de assistência técnica e extensão rural (ATER), aumento da eficiência dos sistemas de produção, além da melhoria da sanidade nas criações. A melhoria desses elementos é essencial para garantir o crescimento da produção, produtividade e competitividade da piscicultura nacionalmente.

E tão importante quanto o volume de peixes produzidos é a análise permanente dos sistemas de criação, sobretudo em pequenas propriedades, não só por sua relevância na

⁶ A humanidade ultrapassou a marca de sete bilhões de pessoas no ano 2011 de acordo com a Organização das Nações Unidas (ONU). Ainda segundo essa Organização, a população humana pode chegar a 8,5 bilhões em 2030, 9,7 bilhões em 2050 e atingir um pico de aproximadamente 10,4 bilhões durante a década de 2080 e permanecer nesse nível até 2100 (FORBES, 2022).

produção, mas também, pelo impacto social da atividade, de modo que estas informações possam subsidiar a tomada de decisões adequadas às realidades social e econômica locais.

Com o aumento da população maranhense⁷, comprovado por estatísticas de órgãos oficiais, a demanda por proteína de origem animal seguiu a mesma vertente e, para suprir tal necessidade, a intensificação dos sistemas produtivos aconteceu o que pode convergir para um ambiente propício à disseminação de agentes infecciosos entre os animais, principalmente quando o manejo sanitário é negligenciado. Nesse sentido, o presente estudo vem contribuir com informações científicas para a sanidade de animais aquáticos, especialmente peixes, no estado do Maranhão, mas, também nacional e internacionalmente. Mas, também com a saúde pública e com o meio ambiente.

Nesse cenário, destaca-se o alinhamento do trabalho ao Programa de Sanidade de Animais Aquáticos (PNSAA)⁸ nacional em que se destaca a finalidade do referido Programa: garantir a sustentabilidade dos sistemas de produção de animais aquáticos e a sanidade da matéria-prima obtida a partir dos cultivos nacionais; assegurar a prevenção, o controle e a erradicação de doenças nos sistemas de produção de animais aquáticos, contribuir para o aumento da produtividade e, conseqüentemente, da oferta de pescado para o abastecimento do mercado interno e externo. E, também o alinhamento direto ao Programa Nacional de Monitoramento de Resistência a Antimicrobianos em Recursos Pesqueiros⁹ por meio do monitoramento epidemiológico da resistência a antibióticos nas explorações pecuárias que cultivam animais aquáticos em território nacional.

Adicionalmente, busca-se destacar com este trabalho, a importância de incorporar a identificação genotípica (teste mais específico) às metodologias microbiológicas tradicionais (isolamento e identificação fenotípica). A reação em cadeia da polimerase (PCR), apesar de já utilizada vastamente em estudos, ainda é incipiente no estado do Maranhão, sobretudo em estudos que versam sobre bacterioses em peixes. Adicionalmente, estimular o uso de fragmentos renais e hepáticos como uma opção viável em substituição a fragmentos musculares

⁷População residente no estado do Maranhão é de 6.776.699 pessoas, segundo informações do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (Ibge, 2022).

⁸Instrução Normativa MPA nº 04, de 04 de fevereiro de 2015 (<https://www.cidasc.sc.gov.br/defesasanimais/files/2020/02/IN-nº-04-de-fevereiro-de-2015-Aquicultura-com-Sanidade.pdf>)

⁹Instrução Normativa Nº 30, de 30 de dezembro de 2014 (<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/arquivos-programas-sanitarios/INMPAn30de30.12.2014InstituioPNdeMonitoramentodeResistnciaaAntimicrobianosemRecursosPesqueiros.pdf>)

e água de lavagem de peixes – materiais normalmente utilizados para isolamento e identificação de bactérias nesses organismos.

Nesse sentido, destaca-se que a tese está alinhada às políticas públicas do estado do Maranhão, tendo como diretriz o fortalecimento da implementação da Agenda 2030, que instituiu os Objetivos do Desenvolvimento Sustentável – ODS, com destaque aos objetivos 1 e 2: acabar com a fome, alcançar a segurança alimentar e melhoria da nutrição e promover a agricultura sustentável e, e vem subsidiar a publicação de informações que possam colaborar com a sanidade de peixes e a saúde pública que poderão ser utilizadas mundialmente, contribuindo assim com o desenvolvimento sustentável do Estado, a geração de emprego e renda aos produtores.

1.2 Hipótese Científica do Trabalho

O crescimento da piscicultura intensiva maranhense, aliado à incipiência de medidas de biossegurança nos cultivos, fundamentam a hipótese de que os peixes cultivados, podem albergar bactérias do complexo *Aeromonas* spp. multirresistentes, o que converge para a necessidade de estudos com vistas a mitigação de surtos e a implementação de programas de monitoramento preventivo.

1.3 Objetivos

1.3.1 Geral

- Caracterizar bactérias do complexo *Aeromonas* isoladas de *Colossoma macropomum*, avaliar a resistência a antimicrobianos e promover a discussão da temática no âmbito da sanidade animal, saúde pública e do impacto ao meio ambiente.

1.3.2 Específicos

- Avaliar a presença de *Aeromonas* sp. em *C. macropomum* oriundos de cultivos da Ilha do Maranhão.
- Identificar, por meio de testes genotípicos e fenotípicos, espécies de *Aeromonas* sp. em tambaquis, potencialmente patogênicas ao homem e aos peixes.
- Avaliar a suscetibilidade de isolados de *Aeromonas* em *C. macropomum*, oriundos de cultivos da Ilha do Maranhão.
- Determinar o quantitativo de *Aeromonas* spp. com resistência múltipla a drogas (MDR).
- Propor dois materiais técnicos como ação extensionista, no sentido de produzir conhecimento intra e extramuros da academia.
- Promover a discussão do impacto dos resultados a serem obtidos (identificação fenotípica e genotípica e, resistência antimicrobiana) no âmbito da sanidade de peixes, saúde pública e do impacto ao meio ambiente.

1.4 Estrutura do Trabalho de Qualificação de Doutorado

Este documento de qualificação encontra-se estruturado em oito (08) capítulos:

- **Capítulo I:** refere-se à introdução geral do trabalho, na qual está incluída a justificativa e importância do trabalho, a hipótese científica do trabalho, além dos objetivos geral e específicos.
- **Capítulo II:** Encontra-se a revisão de literatura do trabalho fundamentada nos pontos centrais da tese: (i) piscicultura no Brasil e no Maranhão; (ii) aspectos gerais de doenças em peixes; (iii) gênero *Aeromonas*; e, (iv) antimicrobianos na aquicultura.
- **Capítulo III:** é apresentado um artigo intitulado “**Featuring of *Aeromonas* spp. isolated from tambaqui (*Colossoma macropomum*) grown under semi-intensive production system**”, submetido à Revista Latin American Journal of Aquatic Research¹⁰, ISSN 0718-560X, Qualis Capes no quadriênio (2017-2020) B2 – área Medicina Veterinária – e, Fator de Impacto JCR 1,00.

¹⁰<https://www.lajar.cl/index.php/rlajar>

- **Capítulo IV:** encontra-se o artigo publicado na revista Ambiente & Água (ISSN: 1980-993X, Qualis Capes no quadriênio [2017-2020] A4 – área Medicina Veterinária) com o título “**Antimicrobial resistance profile of *Aeromonas* spp. isolated from tambaqui fish (*Colossoma macropomum*)**”¹¹.
- **Capítulo V:** é apresentado o guia orientativo “***Aeromonas* em Peixes: o que é? como prevenir?**” publicado pela Editora Eduema, com ISBN digital (978-85-8227-437-8).
- **Capítulo VI:** consta o manual orientativo “**Ações do Serviço Veterinário Oficial na Cadeia Produtiva de Animais de Aquáticos de Cultivo**” produção técnica conjunta com a Agência Estadual de Defesa Agropecuária do estado do Maranhão (Aged-MA).
- **Capítulo VII:** a apresentadas a conclusão geral da tese.
- **Capítulo VIII:** constam as considerações finais do trabalho de doutoramento.

REFERÊNCIAS¹²

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários**, Brasília- DF, 2011.

FERNÁNDEZ-BRAVO, A; FIGUERA, M. J. An Update on the Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Epidemiology, and Pathogenicity. **Microorganisms**, v. 8, n. 1, p. 1-39, 2020.

FIGUEIREDO, H. C. P.; LEAL, C. A. G. Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 8-14, 2008.

GALLANI, S. U. *et al.* Motile *Aeromonas* septicemia in tambaqui *Colossoma macropomum*: Pathogenicity, lethality and new insights for control and disinfection in aquaculture. **Microbial Pathogenesis**, v. 149, e104512, 2020.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Cidades e Estados**. 2022. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/ma.html>. Acesso: 15 març. De 2024

ISAAC. V. J. *et al.* **Síntese do estado de conhecimento sobre a pesca marinha e estuarina do Brasil**. In: ISAAC. V. J. *et al.* (Org.) **A pesca marinha e estuarina do Brasil no início do século XXI: recursos, tecnologias, aspectos socioeconômicos e institucionais**. Belém. Pará. 2006. p. 181- 186.

¹¹Link da publicação:

<mailto:https://www.scielo.br/j/ambiagua/a/ZG4jSy54BpHWjBBdYpvCY3q/?format=pdf&lang=en?subject=http://www.scielo.br/j/ambiagua/a/ZG4jSy54BpHWjBBdYpvCY3q/?format=pdf&lang=en>

¹² Capítulo formatado de acordo com as Normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), Normas Brasileiras (NBRs) 105520/2023 (citações), 14724/2011 (trabalhos acadêmicos), 6023/2018 (referências).

MARTIN, M. J.; THOTTATHIL, S. E.; NEWMAN, T. B. Antibiotics overuse in animal agriculture: A call to action for health care providers. **American Journal of Public Health**, v. 105, n. 12, p. 2409-2410, 2015.

LEÃO, S.O.A. *et al.* Ocorrência de *Aeromonas* multirresistentes em tambaquis cultivados em tanques escavados. **Scientia Amazonia**, v. 9, n. 4, p. 17-24, 2020.

LEIRA, M. H. *et al.* Principais infecções bacterianas na criação de peixes de água doce do Brasil - uma revisão. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v. 3, p. 44-59, 2016. **Microbial Pathogenesis**, v. 149, e104512, 2020.

PEIXE BR. Associação Brasileira da Piscicultura. **Anuário 2022 - PeixeBR da Piscicultura**. São Paulo (SP): Edição Texto Comunicação Corporativa; 2022. 79 p.

PESSOA, R. B. G. *et al.* The genus *Aeromonas*: a general approach. **Microbial pathogenesis**, v. 130, p. 81-94, 2019.

PESSOA, R. B. G. *et al.* Molecular characterization and evaluation of virulence traits of *Aeromonas* spp. isolated from the tambaqui fish (*Colossoma macropomum*). **Microbial Pathogenesis**, v. 147, e104273, 2020.

SEBASTIÃO, F. A. *et al.* Identification of bacterial fish pathogens in Brazil by direct colony PCR and 16S rRNA gene sequencing. **Advances in Microbiology**, v. 5, n. 6, p. 409-424, 2015.

SILVA, R. A. da. *et al.* Resistência a Antimicrobianos: a formulação da resposta no âmbito da saúde global. **Saúde Debate**, v. 44, n. 126, p. 607-623, 2020.

SOUZA, A. C. F. *et al.* Piscicultura no estado do Maranhão: perspectivas para aceleração da produção de peixes nativos. **Scientia Plena**, v. 18, p. 027401, 2022.

SUHET, M.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.; AMARAL, L. Atividade hemolítica e resistência a antimicrobianos por *Aeromonas* spp. isoladas de criação intensiva de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*). **Ars Vet.**, v.27, p.36-44, 2011.

TURKER, H.; YILDIRIM, A. B.; KARAKAŞ, F. P. Sensitivity of Bacteria Isolated from Fish to Some Medicinal Plants. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic**, v. 9, n. 2, p. 181-186, 2009.

WATTS, J. E. M. *et al.* The Rising Tide of Antimicrobial Resistance in Aquaculture: Sources, Sinks and Solutions. **Marine Drugs**, v. 15, n. 6, p. 158, 2017.

WHO. World Health Organization. **Global strategy for containment of antimicrobial resistance**. 2001. Disponível em: <http://apps.who.int/gb/archive/>. 15 mar. de 2023.

ZAMRI-SAAD, M. *et al.* Control and Prevention of Streptococcosis in Cultured Tilapia in Malaysia: A Review. **Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science**, v. 37, n. 4, p,389-410, 2014.

CAPÍTULO II

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Piscicultura no Brasil e no Maranhão

A aquicultura, dentre as cadeias de produção de proteína animal, vem se destacando com crescimento rápido nos últimos anos, contribuindo de forma relevante para a geração de emprego e renda, o que resultou na redução dos índices de pobreza e fome em diversas partes do mundo. De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO, 2020), dentre as diversas atividades aquícolas, a piscicultura é uma prática milenar e, na atualidade considerada uma atividade produtiva em franco desenvolvimento.

A piscicultura no Brasil é desenvolvida, principalmente em águas interiores e tem se expandido conforme evidenciam estatísticas oficiais. No ano de 2020, por exemplo, o cultivo nesse ambiente, cresceu 16 % em relação a 2019, passando de 61.371 toneladas para 71.512 toneladas. Quase toda a produção vem de reservatórios de hidrelétricas (UHE) nas bacias do Tocantins-Araguaia, Paraná e do São Francisco (Brasil, 2021). Segundo dados do Estado Mundial da Pesca e Aquicultura (FAO, 2016), 60 % dos peixes para o consumo humano virão da piscicultura (produção em cativeiro) até 2030, uma produção que vem superando a pesca em 54 %.

Quanto ao cultivo, *Oreochromis niloticus* (tilápia do Nilo) é a espécie mais importante entre os peixes cultivados no Brasil. De acordo com a Associação Brasileira da Piscicultura - (Peixe BR, 2020), a produção dessa espécie apresentou crescimento de 12,5 % em relação a 2019, com 486.155 toneladas produzidas em 2020, representando 66,6 % da produção brasileira de peixes cultivados. Com relação às espécies de peixes nativos, a produção em 2020 foi de 34,7 % com destaque para o *Colossoma macropomum* (tambaqui).

No cenário de crescimento nos últimos anos da piscicultura no País, o estado do Maranhão merece destaque, pois, nos últimos cinco anos, acumulou crescimento de 97,5 %, partindo de uma produção de 24.150 toneladas no ano de 2016 para alcançar 47.700 toneladas em 2020, ganhando posição de destaque na cadeia produtiva nacional (Peixe BR, 2020-2021).

Dados apresentados pela Peixe BR em 2018 mostraram que o Maranhão é o maior produtor de peixes nativos da região Nordeste. A produção de peixe vindo da piscicultura maranhense atende, principalmente os estados vizinhos, como Pará, Tocantins e Piauí. Quanto à produtividade, Senador La Rocque é responsável pela maior quantidade de peixes produzidos,

com 32 % dos peixes comercializados pelo Maranhão. A posição de destaque desse Município se deve ao número de propriedade de piscicultura. Em cidades vizinhas como Imperatriz, o cultivo e comércio de muitas espécies da piscicultura apresentam representatividade no comércio dentre eles estão o *C. macropomum* - espécie não nativa na região – e, *Colossoma brachypomum* (caranha) - espécie nativa (Barbosa; Viana; Queiroz, 2020).

Segundo a Secretaria de Agricultura, Pecuária e Pesca do Maranhão (Sagrima), alguns municípios como Estreito, Balsas, Imperatriz estão entre os maiores produtores de peixes em cativeiro do Estado. Em relação a valores da produção na piscicultura maranhense, o predomínio dos Municípios da Baixada Maranhense e do noroeste do Estado, como Igarapé do Meio e Matinha, representaram 15,2 % da produção estadual com valores de aproximadamente 30,5 milhões de reais no ano de 2018 (Maranhão, 2019).

Devido ao crescimento da atividade, a piscicultura tem garantido espaço como alternativa de renda na zona rural, tal fato se deve às disponibilidades edafoclimáticas propícias que a região do estado do Maranhão possui o que leva a prospectar que a criação de peixes possa dar importante contribuição para alavancar a geração de emprego e renda na Região (Barros; Martins; Souza, 2018).

2.2 Aspectos Gerais de Doenças em Peixes

A produção de peixes vem aumentando, e de igual forma, o número de casos de doenças também tende a elevar. Dessa forma, o produtor se depara com entreaes para encontrar diagnósticos precisos para as doenças que acarretam a mortalidade de praticamente toda a produção. Ademais, o uso desordenado de antibióticos e outras drogas causa o aparecimento de espécies mais resistentes de micro-organismos e o número de pesquisas sobre vacinas tem apresentado um crescimento significativo nos últimos anos, porém sem grandes sucessos (Leira *et al.*, 2016). Para Danziger (2018), os principais problemas relacionados a patógenos de peixes tropicais estão atrelados, normalmente à falta de medidas profiláticas, falta de conhecimento ao manusear as espécies e suas exigências nutricionais e a má qualidade genética dos peixes reprodutores.

O pescado possui uma microbiota que é influenciada pela natureza de seu *habitat* e variação de temperatura (Cartonilho; Jesus, 2011). Além disso, fatores como tempo de armazenamento e refrigeração inapropriados, manipulação e beneficiamento inadequados podem favorecer a proliferação de micro-organismos (Subasinghe *et al.*, 2012). O pescado

vivo apresenta bactérias, principalmente na pele, brânquias e escamas, que passam aos demais tecidos após a morte em caso de falhas no abate. Esses fatores podem estar presentes em toda a cadeia de processamento, desde a captura ou despesca, passando pelo ponto de venda até a mesa do consumidor, tornando-se um risco para a saúde, principalmente de quem o consome cru (Cartonilho; Jesus, 2011).

As contaminações indesejadas podem ocorrer pela baixa qualidade sanitária no cultivo dos peixes, por condições inadequadas de higiene em fases do abate e pela distribuição incipiente de plantas frigoríficas (Rocha *et al.*, 2013). Diante disso, a legislação vigente impõe limites à presença de micro-organismos, patogênicos ou deterioradores, para garantir a segurança da matéria-prima e a qualidade desse tipo de alimento (Farias; Freitas, 2008).

2.3 Características do Gênero *Aeromonas*

As bactérias do gênero *Aeromonas* são classificadas, quanto a temperatura de multiplicação e a motilidade, em dois grupos. No primeiro grupo, estão incluídas as espécies heterogênicas mesófilas e patogênicas para o ser humano e para peixes, como a *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria*, entre outras. Essas são espécies móveis, com temperatura de multiplicação na faixa entre 5 a 45 °C, com a temperatura ótima de 28 °C. O segundo grupo é formado por bactérias imóveis psicrofílicas que não se multiplicam a 37 °C e composto pelas espécies *A. salmonicida*. Ambas as espécies não se multiplicam em temperaturas menores que 22 e 25 °C. *A. salmonicida* não é patogênica para o homem, porém causa furunculoses em peixes (SILVA *et al.*, 2014).

O gênero *Aeromonas* está associado a ambientes aquáticos. Cepas dessa bactéria são isoladas de rios, lagos, água do mar (estuários), tanques de piscicultura, todos os tipos de água, de potável a subterrâneas. São encontradas também em águas residuais e esgoto (Carnahan; Joseph, 2005; Janda; Abbott, 2010; Martino *et al.*, 2011).

Vários estudos têm relatado a presença de *Aeromonas* sp. em águas potáveis, marinhas, fluviais, tanques de piscicultura e, principalmente em águas de sistemas de distribuição para consumo, configurando-se com um problema grave de saúde pública, visto que essa bactéria é considerada um indicador de qualidade ambiental e patogênicas para o homem. Outros estudos têm indicado que mesmo algumas estirpes de *Aeromonas* podem sobreviver em variações climáticas e diferentes condições físico-químicas da água (Janda; Abbott, 2010; Silva *et al.*, 2014).

Diversos são os fatores relacionados ao desenvolvimento de infecção por *Aeromonas*, sendo a água e o alimento importantes veículos. Estudos têm demonstrado os alimentos de origem animal como um dos principais fatores que contribuem para a infecção por espécies patogênicas para ser humano (Ottaviani *et al.*, 2011).

A primeira vez que o gênero *Aeromonas* foi considerado um patógeno humano foi em 1954, em um ataque fulminante de miosite, a partir do qual foi isolado o agente do sangue, pulmões, fígado, baço, urina, fluido cefaloespinhal (Parker; Shaw, 2010; Von Graevenitz, 2007 apud Teodoro, 2021). Todavia, na contemporaneidade, já foi reportado como causador de gastroinfecções e de infecções extraintestinais (lesões cutâneas, infecções respiratórias, sanguíneas e do trato urogenital, septicemia etc.) (Igbinosa *et al.*, 2012; Janda; Abbott, 2010, apud Teodor, 2021).

As *Aeromonas* spp. são agentes patogênicos para seres humanos, tendo a água como um veículo de contaminação para peixes e seres humanos. Esses micro-organismos são frequentemente isolados de águas tratadas, águas estuarinas e praias, mas, também em águas contaminadas com esgoto bruto e lama (Cantas *et al.*, 2012). Esses organismos são tolerantes a alta salinidade e concentrações de cloro (Ghenghesh *et al.*, 2008),

Dentre as espécies veiculadas por peixes contaminados, *A. hydrophila* pode ser causa de infecções fatais para humanos (Del Castillo *et al.*, 2013). Como doença de transmissão hídrica e alimentar, a infecção por essa espécie, em particular, determina osteomielite, meningite, septicemia e infecções da pele e do trato urinário, especialmente em pacientes imunocomprometidos (Cantasa *et al.*, 2012). *A. caviae*, *A. hydrophila* e *A. sobria* estão associados à diarreia em crianças (Qamar *et al.*, 2016). Portanto, é imperativo a qualidade microbiológica de peixes utilizados na alimentação (Herrera *et al.*, 2006).

Infecções humanas por *Aeromonas* spp. se desenvolvem frequentemente em pessoas imunocomprometidas para as quais a bacteremia pode ser uma ameaça severa à vida (Igbinosa *et al.*, 2012). Em pessoas saudáveis, os sinais clínicos mais comuns da infecção incluem inchaço localizado da ferida e gastroenterite (Sood; Nerurkar, 2014).

As espécies de *Aeromonas* mais citadaa, na microbiologia médica, como sendo causadoras de gastroenterites são: *A. caviae*, *A. dhakensis*, *A. veronii* e *A. hydrophila*, mas essa ocorrência pode variar de acordo com o país (Hoel; Vadstein; Jakobsen, 2019; Fernández-Bravo; Figueras, 2020, apud Teodoro, 2021). Zhou *et al.* (2019), em um estudo epidemiológico realizado, no período de 2015 a 2017, em 115 amostras clínicas provenientes do hospital geral de Pequim na China, descreveram que as espécies mais prevalentes em amostras de infecções intestinais foram: *A. caviae* (43,9%), *A. veronii* (35,7%) e *A. dhakensis*

(12,2%). Já, as mais prevalentes em infecções extraintestinais foram a *A. hydrophila* (29,4%), *A. caviae* (29,4%) e *A. dhakensis* (23,5%).

No Brasil, houve relato do envolvimento de *Aeromonas* em um surto de diarreia aguda, no ano de 2004, na cidade de São Bento do Una - Pernambuco, um município com saneamento básico precário. Foram registrados 2.170 casos de diarreia no período de janeiro a julho; 582 coproculturas foram realizadas no período de março a junho desse ano, nas quais, 145 (25%) 114 eram *Aeromonas*, com a identificação das espécies, *A. caviae*, *A. veronii* biovar *sobria* e *A. veronii* biovar *veronii* (Hofer *et al.*, 2006). Tempos depois, Silva *et al.* (2017) realizaram uma nova classificação das espécies, por meio de análise filogenética pautada no alinhamento dos genes 16S rRNA e *gyrB*, das amostras provenientes deste surto e verificaram a seguinte prevalência: *A. caviae* (64,1%), *A. veronii* (17,5%), *A. aquariorum* (10,7%), *A. trota* (3,9%), *A. hydrophila* (1,9%) e *A. jandaei* (1,9%). Esses últimos resultados foram comparados com os obtidos de amostras de água (também coletadas no mesmo período do surto) que revelaram a identificação de *A. caviae* (81,3%) e *A. hydrophila* (12,5%).

2.3.1 Taxonomia

A taxonomia do gênero é complexa e alvo de constantes alterações, sendo que o número de espécies reconhecidas tem aumentado. O gênero *Aeromonas* era anteriormente dividido de acordo com a 7ª edição do Manual Bergey's (Popoff, 1984) em dois subgrupos e classificados dentro da família Vibrionaceae. As espécies móveis, incluíam *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. sobria* e, as imóveis, formadas pelas espécies *A. salmonicida*, subespécies *salmonicida*, *achromogenes* e *masoucida*.

No entanto, novos estudos evidenciaram a existência de formas atípicas e viu-se então a necessidade de uma nova classificação das espécies (Joseph; Janda; Carnahan, 1988). Então foi proposta a classificação do gênero em cinco espécies: *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria*, *A. veronii* e *A. media* (Janda; Duffley, 1988). Porém, de a classificação anterior considerar, apenas, quatro espécies: *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii* agrupando *A. sobria* e acrescentando a espécie *A. jandaei*.

Subsequentemente novas espécies foram descobertas e incluídas no gênero *Aeromonas* ao longo dos últimos anos. Segundo Galbis *et al.* (2002), havia sido definidos para o gênero *Aeromonas* dezessete grupos de hibridização a partir de estudos DNA-DNA: *A. hydrophila* HG1, *A. hydrophila*-like HG2, *A. salmonicida* HG3, *A. caviae* HG4, *A. media* HG5, *A.*

eucrenophila HG6, *A. sobria* HG7, *A. veronii* biovar *sobria* HG8, *A. jandaei* HG9, *A. veronii* biovar *veronii* HG10, unnamed (*Aeromonas* sp.) HG11, *A. schubertii* HG12, unnamed HG13, (grupo entérico 501), *A. trota* HG14, *A. allosaccharophila* HG15, *A. encheleia* HG16 e *A. popoffii*.

As espécies *A. salmonicida* e *A. media* pertencem a um segundo grupo e são caracterizadas como imóveis e psicrófilas. *A. media* é incapaz de se multiplicar a 37°C e *A. salmonicida* em temperaturas menores que 22 e 25 °C. Esta última não é patogênica para o ser humano, no entanto, causa furunculose em peixes marinhos, é difícil de ser detectada e não é encontrada em águas superficiais (Popoff, 1984; Rodrigues; Ribeiro, 2004; Amador, 2007).

De acordo com o Taxonomic Outline of the Prokaryotes, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, o gênero *Aeromonas* encontra-se classificado na ordem Aeromonadales, família Aeromonadaceae e inclui dezesseis espécies e onze subespécies: *A. allosaccharophila*, *A. bestiarium*, *A. caviae*, *A. culicicola*, *A. encheleia*, *A. enteropelogenes*, *A. eucrenophila*, *A. ichthiosmia*, *A. jandaei*, *A. media*, *A. popoffii*, *A. schubertii*, *A. sobria*, *A. simiae*, *A. trota*, *A. veronii*, *A. hydrophila* subsp. *hydrophila*, *A. hydrophila* subsp. *anaerogenes*, *A. hydrophila* subsp. *dhakensis*, *A. hydrophila* subsp. *ranae*, *A. punctata* subsp. *punctata*, *A. punctata* subsp. *caviae*, *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, *A. salmonicida* subsp. *achromogenes*, *A. salmonicida* subsp. *masoucida*, *A. salmonicida* subsp. *pectinolytica*, *A. salmonicida* subsp. *smithia* (Garrity; Bell; Lilburn, 2004).

Mais recentemente foram reconhecidas 31 espécies do gênero *aeromonas* e 12 subespécies. As espécies comumente relacionadas à patologias em humanos são *A. veronii*, *A. caviae* e *A. hydrophila* (Tavares; Cereser; Timm, 2014).

2.3.2 Fatores que interferem no crescimento de *Aeromonas* spp.

A sobrevivência da bactéria no ambiente depende de fatores ambientais, físicos e químicos, como a temperatura, pH e salinidade da água, além da incidência de radiação ultravioleta e disponibilidade de nutrientes. A maioria das espécies cresce bem a 37 °C, mas a temperatura ótima de crescimento variando de 22 °C a 28 °C e pH entre 5,5 e 9,0 (Janda; Abbott, 2010).

O gênero *Aeromonas* inclui espécies capazes de crescer em temperaturas que variam de 0 °C a 45 °C. Algumas linhagens de *Aeromonas* apresentam crescimento em temperaturas entre 0 °C a 5 °C, enquanto outras crescem em temperaturas mais elevadas entre 40 e 45 °C

(Jay, 2005). Espécies deste gênero estão presentes naturalmente em diversos alimentos e são capazes de se multiplicar em um período de 7 a 10 dias quando estocados a 5° C. Cepas isoladas de espécimes clínicos são capazes de crescer a temperatura de refrigeração, sendo também observada a capacidade de produção de enterotoxinas e hemolisinas nessa temperatura. As espécies móveis de *Aeromonas* estão relacionadas a patogênicas no homem e crescem em temperaturas que variam de 10 °C a 42 °C, com ótimo de crescimento a 28 °C (Kirov, 2001; Martins; Marquez, Yano, 2002).

Aeromonas spp. apresentam crescimento em valores de pH entre 5,5 a 9,0, sendo sensíveis a pH inferior a 5,5. Não toleram concentração salina superiores a 5 % de NaCl. A tolerância ao pH e concentração salina varia com a temperatura de crescimento. Alimentos estocados a baixas temperaturas com concentração de 3 a 3,5% de NaCl e valores de pH inferior a 6,0 inibem o seu crescimento. Para a temperatura de crescimento a 28 °C, as bactérias crescem na concentração salina de 4% de NaCl, sendo esta tolerância diminuída quando a temperatura é de 5 °C (Adams; Moss, 1995; Kirov, 2001; Franco; Landgraf, 2005).

Os ácidos acético, tartárico, láctico, sulfúrico e hidrocloreídrico são efetivos para restringir o crescimento de *Aeromonas*. Os polifosfatos também podem controlar seu desenvolvimento em certos alimentos. A utilização de polifosfatos em combinação com outros fatores que restringem o desenvolvimento de *Aeromonas* spp., tais como pH abaixo de 5,0 e concentração de NaCl acima de 3,5 %, tem uma maior eficiência (Kirov, 2001).

2.3.3 Fatores de virulência

O gênero *Aeromonas* apresenta um variado arsenal de fatores de virulência, sendo que esses produtos ou estratégias potencializam a capacidade de causar doença e são de suma importância na colonização, estabelecimento do micro-organismo e posterior desencadeamento da infecção no hospedeiro. As infecções causadas por *Aeromonas* spp., usualmente se iniciam mediante a ingestão de água ou alimentos contaminados ou por exposição à água ou solo contaminados. Entre os grupos mais suscetíveis ao desenvolvimento de infecções causadas por essas bactérias estão as crianças e os indivíduos imunossuprimidos (Fernández-Bravo; Figueras, 2020).

A virulência de *Aeromonas* é complexa e de origem multifatorial, principalmente ligada aos componentes estruturais responsáveis pela adesão, motilidade, colonização bacteriana e escape do sistema imune do hospedeiro; produção de toxinas, citotoxinas e

endotoxinas; proteínas extracelulares como amilase, quitinase, elastase, aerolisina, nuclease, gelatinase, lecitinase, lipase e proteases; sistema de secreção e aquisição de íons metálicos, como por exemplo o Fe^{+3} (Fernández-Bravo; Figueras, 2020).

O mecanismo de patogenicidade de *Aeromonas* sp. é complexo e ainda não foi muito bem esclarecido. A virulência é considerada multifatorial. As aeromonas produzem vários produtos extracelulares biologicamente ativos, tais como: hemolisinas (aerolisinas), citotoxinas, enterotoxinas, proteases, leucocidinas, fosfolipases, elastases, DNases, adesinas e, ainda, colinesterases e endotoxinas. A capacidade de produzir diversos fatores de virulência contribui para a patogênese da doença ocasionada por esse grupo bacteriano (Trabulsi; Alterthum, 2005). Dentre os fatores conhecidos destacam-se as enzimas extracelulares, as exotoxinas, endotoxinas (lipopolissacarídica), sideróforos, hemolisinas, camada-S, invasinas e adesinas (Chopra; Houston, 1999).

2.3.3.1 Enzimas extracelulares

Bactérias são frequentemente produtoras de enzimas extracelulares, como quitinases, lipases, proteases, amilases, nucleases, enolases, collagenases e gelatinases. Tais enzimas têm importante papel não só na adaptação bacteriana ao meio ambiente em que está inserida, mas também contribuem para a virulência (Fernández-Brav; Figueras, 2020). Lipases promovem o dano celular, como a glicerofosfolipídio: colesterol aciltransferase (GCAT), uma enzima que atua nos lipídeos de membrana e levam à lise celular. Essa enzima é considerada um dos fatores de virulência mais letais presentes em *A. salmonicida* (Pessoa *et al.*, 2019; Fernández-Bravo; Figueras, 2020).

Para as várias enzimas extracelulares produzidas por *Aeromonas* destacam-se as proteases, as DNases, as lipases, as elastases, as amilases, as lecitinases e as gelatinases. Ainda não foram determinadas suas funções nos mecanismos de virulência, mas sabe-se que as proteases podem contribuir para a patogenicidade, causando danos diretos aos tecidos ou aumentando a capacidade de invasão. Já as lipases, representadas pela glicerofosfolipídeo-colesterol-aciltransferase (CGAT), têm a propriedade de provocar a lise da membrana celular e de eritrócitos (Merino *et al.*, 1995; Kirov, 2001).

2.3.3.2 Enterotoxinas

A produção de enterotoxinas também é outra característica importante para a virulência e patogenicidade de *Aeromonas*. Resumidamente, as enterotoxinas de *Aeromonas* podem apresentar efeito citotóxico, como o produto dos genes *act*, *hylA* e *aerA*, ou citotônico, como por exemplo, os produtos dos genes *alt* e *ast*. O efeito citotóxico atua promovendo o dano nas células a nível de epitélio intestinal, levando a degradação das microvilosidades intestinais e atividade hemolítica. Por outro lado, as enterotoxinas que produzem um efeito citotônico não geram de fato um dano celular e estão ligadas ao aumento da produção de muco pelo epitélio intestinal (Chopra; Houston, 1999).

As enterotoxinas citotônicas têm peso molecular de aproximadamente 15kDa, estudos demonstraram a capacidade de provocar arredondamento das células da adrenal de camundongos sem provocar sua lise, são inativadas quando aquecidas a 60 °C por 20 minutos e estáveis se o aquecimento for a 56 °C por 10 min. Já as enterotoxinas citotóxicas causam o engurgitamento das células e a morte do tecido celular e podem estar associadas à atividade hemolítica assim com a toxina colérica. Em temperaturas de 4 °C podem ser produzidas por algumas cepas de *Aeromonas* (Eley; Geary; Wilcox, 1993; Franco; Landgraf, 2005).

A maioria das cepas de *Aeromonas* produzem aerolisina, uma enterotoxina termolábil, β -hemolítica e citotóxica com peso molecular de 52kDa (Franco; Landgraf, 2005; Jay, 2005). Dentre as espécies de *Aeromonas* spp., *A. sobria* é considerada mais virulenta que *A. hydrophila*. Esse fato foi comprovado a partir da produção de citotoxinas e outras exoenzimas em camundongos, causando alta letalidade. Essa espécie ainda apresenta maior capacidade de invasão e adesão que *A. hydrophila* (Daily *et al.*, 1981).

2.4 Isolamento de *Aeromonas* sp.

Diferentes meios de cultura têm sido utilizados para o isolamento de *Aeromonas* spp. a partir de alimentos. Muitos meios usam carboidratos como agente diferencial e ampicilina ou penicilina como agentes seletivos. O ágar amido ampicilina (SA) elaborado por Palumbo *et al.* no ano de 1985 tem sido muito utilizado para este fim, pois seleciona uma alta taxa de colônias presuntivas confirmadas para o gênero. Outros meios também têm sido usados, como: ágar xilose-desoxicolato citrato, ágar Maconckey manitol-ampicilina, ágar Maconckey xilose-ampicilina, ágar sangue com ampicilina, ágar peptona extrato de carne glicogênio, o meio

Rimler-Shotts, o meio Rimler-Shotts modificado, o ágar verde brilhante com sais biliares, o ágar Maconckey e ágar Wagatsuma modificado (Krovacek *et al.*, 1992).

Em um estudo comparativo nenhum meio de cultura empregado unicamente resultou em um crescimento efetivo de *Aeromonas*. Em função disso, combinações de diferentes meios e métodos de isolamento, são frequentemente empregados. As combinações são realizadas por meio de revestimento direto, filtração por membrana ou testes de tubos múltiplos para determinar os números mais prováveis. O método de filtração por membrana foi autenticado para o isolamento de *A. hydrophila* de amostras de água potável (Abbott; Cheung; Janda, 2003).

Vários meios de cultura de enriquecimento foram avaliados para a recuperação de *Aeromonas* em alimentos. É recomendado utilizar Ágar de Ampicilina de Amido (SAA) e Ágar Verde Brilhante de Inositol e Sais Biliares (BIBG) com enriquecimento inicial em água de peptona alcalina ou caldo de triptose contendo ampicilina (TSB-30, ampicilina 30mg/L), simultaneamente com meios comercialmente disponíveis como meio base de *Aeromonas* (meio Ryan) (Mcmahon; Wilson, 2001).

Tsai *et al.* (1997) testaram meios de cultura de diferentes composições, além de outros fatores como temperatura, pH, concentração salina e oxigênio dissolvido na produção de hemolisinas e citotoxinas por *Aeromonas hydrophila* isoladas de amostras de ostras. Os meios testados foram: caldo infusão cérebro coração (BHIB), caldo extrato de levedura casamina (CAYEB), caldo nutriente (NB) e caldo de soja e tripticaseína (TSB) e foi observado que em todos os meios a taxa de crescimento apresentou-se semelhante, contudo, os níveis na produção de toxinas foram diferentes. O meio BHIB apresentou melhor produção de hemolisinas e citotoxinas e o NB detectou menor produção.

Uma alternativa aos meios de cultura tradicionalmente utilizados são os meios de culturas prontos para uso. No mercado estão disponíveis meios cromogênicos (substratos enzimáticos sintéticos) que imitam um substrato utilizado por bactérias. Estudos têm demonstrado a eficiência destes meios na identificação direta de bactérias isoladas de amostras clínicas, tendo a confirmação de 99,3 % das amostras investigadas posteriormente por provas bioquímicas (Oliveira *et al.*, 2006).

2.5 *Aeromonas* em Peixes

As bactérias do gênero *Aeromonas* são muito comuns no ambiente, predominantemente nos ambientes aquáticos e fazem parte da microbiota normal de organismos aquáticos. São patógenos oportunistas e podem causar enfermidades em animais pecilotérmicos e homeotérmicos, inclusive no homem, sendo consideradas importantes patógenos de peixes (Yu *et al.*, 2005).

Infecções por *A. hydrophila* em peixes no Brasil, está normalmente associada a quadros de septicemia hemorrágica, sendo a manifestação mais comum e importante da enfermidade. Tal infecção está relacionada a um quadro de infecção generalizada acometendo, principalmente rins, fígado, baço, brânquias, musculatura esquelética e cérebro. Ademais, sinais clínicos de letargia, anorexia, brânquias pálidas e melanose são observadas inicialmente e com a evolução do quadro clínico, podendo ser observada hiperemia, petéquias e hemorragia na pele, boca e base das nadadeiras, bem como, ascite, exoftalmia e natação. O quadro de septicemia e a sintomatologia nervosa podem ser confundidos com os sinais clínicos ocasionados por infecções por *Streptococcus* sp., sendo necessário um diagnóstico laboratorial mais preciso para determinar o agente etiológico envolvido no surto (Figueiredo *et al.*, 2014).

Os sinais clínicos observados em peixes acometidos por *Aeromonas spp.* são típicos de uma septicemia bacteriana e, para fechar o diagnóstico, é necessário associar os sinais clínicos e achados laboratoriais. A observação geral revela peixes com natação lenta e posicionando-se nas áreas mais rasas dos viveiros, anorexia (redução na ingestão de ração) e a inspeção nos animais sintomáticos, revela lesões de pele hemorrágicas em diferentes regiões do corpo, especialmente na base das nadadeiras. Lesões ulcerativas sobre o corpo, escamas eriçadas, olhos hemorrágicos e ascite (líquido na cavidade abdominal), palidez de brânquias e mucosas (CNA, 2022).

A transmissão da bactéria *Aeromonas sp.* é horizontal pelo contato direto entre animal infectado e animais saudáveis ou via água ou sedimentos. Para o homem, a principal via de transmissão é a oral (água e alimentos contaminados), ou por via cutânea em aquaristas, piscicultores ou manipuladores de alimentos (CNA, 2022). A transmissão da bactéria *A. hydrophila* em sistemas de cultivo ocorre por via direta por contato direto de peixes infectados e sadios, através da veiculação da bactéria via água. Adicionalmente, a ingestão de ração contaminada tem sido descrita como um potencial fonte de infecção para os peixes (Faria *et al.*, 2013)

A intensificação dos sistemas de criação, tem surgido a necessidade de maiores conhecimentos sobre o manejo adequado para prover melhoria nas condições de saúde dos peixes, principalmente nas fases iniciais da produção, na larvicultura e alevinagem. O ambiente de cultivo aquático proporciona naturalmente o crescimento e a multiplicação de patógenos. A prática de manejo inadequada compromete o equilíbrio entre patógeno, hospedeiro e ambiente, estimulando a transmissão de doenças, que pode ser vertical ou horizontal (Tavares-Dias *et al.*, 2013). Importante ressaltar que nas produções aquícolas, quanto mais eleva-se a densidade do cultivo, mas os animais tornam-se suscetíveis a possíveis enfermidades.

O gênero *Aeromonas* apresenta espécies consideradas importantes patógenos de peixes, com capacidade de sobreviver e se multiplicar, produzindo fatores de virulência a baixas temperaturas. A temperatura de multiplicação bacteriana pode afetar a expressão de vários fatores associados à virulência. Esse fato pode explicar a patogenicidade de isolados de *Aeromonas* em alimentos estocados a baixas temperaturas (Rodrigues; Ribeiro, 2004).

O gênero *Aeromonas* apresenta três espécies que são causadoras de doenças em peixes, que são: *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* e *Aeromonas sobria*. A bactéria *A. hydrophila* é a que mais se destaca como patógeno importante para homens e peixes. É possível encontrar essas bactérias em diversos ambientes, tanto terrestres como aquáticos, e fazem parte da flora intestinal de uma vasta gama de peixes. Esses patógenos são oportunistas e se beneficiam da redução da imunidade dos peixes para causar a doença (SNA, 2018).

Rall *et al.* (1998) isolaram as espécies *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. sobria* de 50 amostras de peixes Pintado comercializados em supermercados do estado de São Paulo e verificaram que 88 % eram cepas de *A. hydrophila*, 27 % *A. sobria* e 13 % de *A. caviae*; essas espécies produziram enterotoxinas *in vitro*.

A pesquisa realizada na Baixada Maranhense, abrangendo os municípios de Palmeirândia, Pinheiro, São Bento, São João Batista e São Vicente Ferrer, com espécies nativas da região como a traíra (*Hoplias malabaricus*), bagrinho (*Trachelyopterus galeatus*) e curimatá (*Prochilodus lacustris*), demonstrou que das 120 amostras de peixes oriundas de feiras e pontos de pesca dos municípios supracitados, 56,66 % estavam contaminadas por bactérias do gênero *Aeromonas*, apresentado a seguinte estratificação por espécie: *A. hydrophila* (95,5 %), *A. caviae* (1,5 %), *A. veroni* biovar *veroni* (1,5 %) e *A. trota* (1,5 %) (Silva, 2013).

Pesquisa sobre a qualidade higiênico-sanitária de tambaqui (*Colossoma macropomum*) comercializado na cidade de São Luís - MA, quantificou populações de coliformes totais e termotolerantes elevadas, com a identificação da *E. coli* em 43,3 % das 30 amostras analisadas provenientes de feiras, além de bactérias patogênicas, como *Aeromonas* spp. em 93,3% (n=

56/60) das amostras, o que segundo os pesquisadores pode estar relacionada à origem dos exemplares avaliados (criadores locais e regionais) e ao local de comercialização (feiras livres e supermercados) (Santos *et al.*, 2019).

Araújo *et al.* (2020) relatam a necessidade do desenvolvimento de pesquisas mais aprofundadas para identificação de *Aeromonas* em âmbito de espécie, testagem para fatores de virulência das cepas para melhor conhecimento das estirpes endógenas às pisciculturas, bem como realização de testes para profilaxia e tratamentos alternativos de fácil acesso e implementação pelos piscicultores de pequeno porte.

É necessária vigilância frente aos problemas sanitários que podem acometer as pisciculturas e que são capazes de impactar negativamente a produtividade dos peixes, com destaque para os problemas ocasionados por bacterioses (Leira *et al.*, 2016).

Os principais problemas vinculados a patógenos de peixes tropicais, se remetem, normalmente, à falta de medidas profiláticas, falta de conhecimento ao manusear as espécies e suas exigências nutricionais e a má qualidade genética dos peixes reprodutores (Danziger, 2018). Para debelar a carga de patógenos, antibióticos têm sido utilizados, principalmente no que se refere aos patógenos oportunistas. Considerada um dos principais patógenos oportunistas que causam doenças em tambaqui, *A. hydrophila* está associada a frequentes registros de mortalidade na aquicultura (Figueiredo; Leal, 2008).

2.6 Antibióticos na Aquicultura

A aquicultura, assim definida como atividade relacionada com o cultivo de animais aquáticos, marinhos ou de água doce, como peixes, moluscos, crustáceos, reptéis e anfíbios, incluindo técnicas de criação e de manejo que sofrem interferência humana, bem como a utilização de ração controlada, aplicação de medicação e reprodução para melhor obtenção de resultados na produção, resulta na produção e disponibilização de fonte proteica animal para consumo humano (Gastalho *et al.*, 2014; FAO, 2016; Santos, 2019).

O crescimento da produção brasileira de peixes resulta em preocupações acerca da qualidade e segurança dos peixes e a saúde dos consumidores (Gaspar, 2018; ABP, 2019). Em meio a essa produtividade, também se tornam prementes preocupações com as doenças que acometem os peixes, impulsionando o uso de antibióticos, todavia essa prática requer prudência quanto para não ocasionar problemas maiores, a exemplo de resistência microbiana pelos usos exacerbado e indiscriminado. Não só a resistência bacteriana é resultado da utilização excessiva

de antibióticos para combater infecções que acometem os animais aquáticos e, consequentemente, controlar a mortalidade de peixes atingidos por micro-organismos, como também a proliferação e aumento de infecções zoonóticas ocasionadas por bactérias (Read *et al.*, 2003; ECDC-EFSA-EMA, 2017; Santos, 2019).

De maneira geral, *Aeromonas* spp. isoladas de amostras clínicas, ambientais e alimentos são sensíveis aos seguintes agentes antimicrobianos: cloranfenicol, colistina, gentamicina, tetraciclina e sulfametoxazol-trimetoprim. Porém resistentes a ampicilina, carbenicilina, cefazolim, cefalotim e ticarcilina (Murray *et al.*, 2006).

Estudos têm demonstrado que existem alternativas capazes de inibir ação de agentes microbianos em peixes, a exemplo do uso de fitoterápicos. Assim, o uso de produtos feito com extrato de vegetais é capaz de controlar o desenvolvimento de patógenos e tem sido estimulado em diferentes setores em produção animal. Cardoso *et al.* (2020) ressaltam que os fitoterápicos, são factíveis, economicamente viáveis e ambientalmente corretos.

REFERÊNCIAS¹³

ABP. Associação Brasileira de Piscicultura. **Anuário Brasileiro da Piscicultura Peixe BR 2019**. São Paulo; Disponível em: <https://www.peixebr.com.br/anuario-2020/>. Acesso em 09 set. de 2023.

ABBOTT S. L.; CHEUNG, W. K.; JANDA, J. M. The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 6, p. 2348-2357, 2003.

ADAMS, M. R.; MOSS, M. O. **Microbiologia de los alimentos**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1995. 278p.

AMADOR, L. V. **Estudio taxonômico de aeromonas móviles y salicilina naegativas**. 2007. Tese (Doutorado). Facultad de Ciencias Biológicas da Universitat de Valencia, Valência, 2007.

ARAÚJO, R. L. *et. al.* Qualidade microbiológica da água em sistemas de cultivo de tambaqui na região metropolitana de Manaus e sua relação com as práticas de manejo. **Igapó**, v. 14, n. 1, p. 112-128, 2020.

BARBOSA, L. A.; VIANA, D. C.; QUEIROZ, C. Characterization of art is anal fishing and commercialization of fish in open airmarkets. **Revista Eletrônica Científica de Ensino Interdisciplinar**, v. 6, p. 156-162, 2020.

¹³ Capítulo formatado de acordo com as Normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), Normas Brasileiras (NBRs) 105520/2023 (citações), 14724/2011 (trabalhos acadêmicos), 6023/2018 (referências).

BARROS, A. F., MARTINS, M. I. E. G.; de SOUZA, O. M. Caracterização da piscicultura na microrregião da baixada cuiabana, Mato Grosso, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 37, n. 3, p. 261-273, 2018.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Boletim aquicultura em águas da União 2020**: relatório anual de produção – RAP/Secretaria de Aquicultura e Pesca – Brasília: MAPA/SAP, 2021.

CANTAS, L.; MIDTLYNG, P. J.; SORUM, H. Impact of antibiotic treatments on the expression of the R plasmid tra genes and on the host innate immune activity during pRAS1 bearing *Aeromonas hydrophila* infection in zebrafish (*Danio rerio*). **BMC Microbiology**, v. 12, n. 37, 2012.

CARTONILHO, M. M.; JESUS, R.S. Qualidade de cortes congelados de tambaqui cultivado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 4, p. 344-350, 2011.

CHOPRA, A. K.; HOUSTON, C. W. Enterotoxins in *Aeromonas*-associated gastroenteritis. **Microbes and Infection**, v. 1, n. 13, p. 1129-1137, 1999.

CNA. Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil. Doenças de Animais Aquáticos Importância para o Brasil. **Manual de identificação no campo**. Brasília: CNA, 2022. Disponível em: <https://www.cnabrazil.org.br>. Acesso em: 25 abr. de 2024.

DAILY, O. P. *et al.* Association of *Aeromonas sobria* with human infection. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, n.13, p. 769-767, 1981.

DANZIGER, A. **Principais doenças na aquicultura**. 2018. Disponível em: <https://www.grupoaguasclaras.com.br/principais-doencas-na-aquicultura> Acesso em: 15 fev. de 2023.

DEL CASTILLO, C. S. *et al.* Comparative sequence analysis of a multidrug-resistant plasmid from *Aeromonas hydrophila*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p.120-129, 2013.

ECDC/EFSA/EMA. European Centre for Disease Prevention and Control/European Food Safety Authority/European Medicines Agency. Second joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals. Joint Interagency Antimicrobial Consumption and Resistance Analysis (JIACRA) Report. **EFSA Journal**, v. 15, n. 7, p.135, 2017.

ELEY, A.; GEARY, I.; WILCOX, M. H.; Growth of *Aeromonas* spp. at 4 °C and related toxin production. **Letters applied Microbiology**, v. 16, p. 36-39, 1993.

FAO. Food and Agriculture Organization. **The state of world fisheries and aquaculture: opportunities and challenges**. Rome: FAO, p. 243, 2016.

FAO. Food and Agriculture Organization. The state of world fisheries and aquaculture 2020 – Meeting the sustainable development goals. Rome (IT): FAO [Internet]; 2020 [citado em

16 jul 2021]. Disponível em: <http://www.fao.org/state-of-fisheries-aquaculture>. Acesso em: 15 fev. de 2023.

FARIAS, M. C. A.; FREITAS, J. A. Microbiologic quality of fish processed in industries of northern region of Brazil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 67, n. 2, p. 113-117. 2008.

FARIA, F. C. *et al.* Carrier state induced by oxytetracycline therapy against streptococcosis in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). **Journal of Fish Diseases**, v. 37, n. 9, p. 853-857, 2014.

FERNÁNDEZ-BRAVO, A; FIGUERA, M. J. An Update on the Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Epidemiology, and Pathogenicity. **Microorganisms**, v. 8, n. 1, p. 1-39, 2020.

FERREIRA, F.A.G; CARVALHO, C.M; COSTA, J.C; FERREIRA, J.M.R. **Comprovação do potencial medicinal de *Arrabidaea chica* (BIGNONIACEAE)**. Associação Brasileira de Incentivo à Ciência – ABRIC, v. 01, n. 01 – setembro, 2013.

FIGUEIREDO, H. C. P.; LEAL, C. A. G. Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 8-14, 2008.

FIGUEIREDO, H. C. P. *et al.* Septicemia por *Aeromonas* em peixes. **Cadernos técnicos de Veterinária e Zootecnia**, n. 73, p. 33-44, jun. 2014.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2005. 182p.

GALBIS, D. M.; FARFÁN, M.; LORÉN, J. G.; FUSTÉ, M. C. Biochemical identification and numerical taxonomy of *Aeromonas* spp. isolated from environmental and clinical samples in Spain. **Journal of Applied Microbiology**, Barcelona, v. 93, p. 420–430, maio, 2002.

GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. Taxonomic Outline of the Prokaryotes Bergey's **Manual® of Systematic Bacteriology**, 2nd Edition. Release 5.0 , May 2004.

GASPAR, A. F. B. **Deteção e quantificação de resíduos de antibióticos em Salmão do Atlântico (*Salmo salar*) proveniente de aquacultura**. 2018. 70 f. Dissertação do Mestrado em Segurança Alimentar. Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, 2018.

GASTALHO, S. *et al.* Uso de antibióticos em aquacultura e resistência bacteriana: Impacto em saúde pública. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, v. 3, n.1, p. 29-45, 2014

GHENGHESH, K. S. *et al.* *Aeromonas*: Associated infections in developing countries. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 2, n. 2, p.81-98, 2008.

HERRERA, F. C. *et al.* Occurrence of foodborne pathogenic bacteria in retail prepackaged portions of marine fish in Spain. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, n. 3, p. 527-536, 2006.

HOEL, S.; VADSTEIN, O.; JAKOBSEN, A. N. The significance of mesophilic *Aeromonas*

spp. In minimally processed ready-to-eat seafood. *Microorganisms*, v. 7, n. 3, p. 1-25, 2019.

HOFER, E. *et al.* *Aeromonas* associated with an acute diarrhea outbreak in São Bento do Una, Pernambuco. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 39, n. 2, p. 217-220, 2006.

IGBINOSA, I. H. *et al.* Emerging *Aeromonas* species infections and their significance in public health. **The Scientific World Journal**, v. 1, n. 13, p.1-13, 2012.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. **Clinical microbiology reviews**, v. 23, n. 1, p. 35-73, 2010.

JANDA, J.; DUFFLEY, P. Mesophilic aeromonads in human disease: current taxonomy, laboratory identification, and infectious disease spectrum. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 105, p. 980-987, 1988.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 712 p.

JOSEPH, S. W.; JANDA, M.; CARNAHAN, A. M. Isolation, enumeration and identification of *Aeromonas* sp. **Journal of Food Safety Westport**, v. 9, p. 23-55, 1988.

KIROV, S.M. *Aeromonas* and *Plesiomonas*. In. Doyle, M.P.; Beuchat, L.R.; Montville, T.J. **Food Microbiology**: Washington: ASM Press, p. 301-327, 2001.

KROVACEK, A. *et al.* Prevalence and characterization of *Aeromonas* spp. isolated from foods in Uppsala, Sweden. **Food Microbiology**. London, v. 9, n. 1, p. 29-36, 1992.

LEIRA, M. H. *et al.* Principais infecções bacterianas na criação de peixes de água doce do Brasil: uma revisão. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v. 3, n. 1, p. 44-59, 2016.

MARANHÃO. **Instituto Maranhenses de Estudos Socioeconômicos e Cartográficos - IMESC**, São Luís - MA, 2019.

MARTINS, L. M.; MARQUEZ, R. F.; YANO, T. Incidence of toxic *Aeromonas* isolated from food and human infection. **Fems Immunology and Medical Microbiology**, v. 32, n. 3, p. 237-242, 2002.

MERINO, S. *et al.* Emerging pathogens: *Aeromonas* spp. **International Journal of Food Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 157-168, 1995.

MURRAY, P. R. *et al.* **Microbiologia Médica**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

OLIVEIRA, B. G. *et al.* A identificação direta pelos meios cromogênicos é confiável a ponto de dispensar as provas bioquímicas?. **Revista Newlab**, v. 75, p. 130-142, 2006.

OTTAVIANI, D. *et al.* Putative virulence properties of *Aeromonas* strains isolated from food environmental and clinical sources in Italy: a comparative study. **International Journal of Food Microbiology**, v.144, p.538-545, 2011.

- PEIXE BR. Associação Brasileira da Piscicultura. **Anuário Brasileiro de Piscicultura**. 2018. 71 p.
- PEIXE BR. Associação Brasileira da Piscicultura. **Anuário Brasileiro de Piscicultura**. 2020. 136 p.
- PEIXE BR. Associação Brasileira da Piscicultura. **Anuário PeixeBR da Piscicultur**. São Paulo (SP): Edição Texto Comunicação Corporativa; 2021. 138 p.
- PESSOA, R. B. G. *et al.* The genus *Aeromonas*: a general approach. **Microbial Pathogenesis**, v. 130, p. 81-94, 2019.
- POPOFF, M. Y. GENUS III. *Aeromonas*. In: BERGEY, D. H. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 9 ed. v. 1, Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. 1388 p., p. 545-548.
- QAMAR, F. N. *et al.* *Aeromonas*-associated diarrhea in children under 5 years: The GEMS experience. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 95, n. 4, p.774-780, 2016.
- RALL, V. L. M. *et al.* *Aeromonas* species isolated from pintado fish (*Pseudoplatystoma* sp.): virulence factors and drug susceptibility. **Revista de Microbiologia**, v. 29, n. 3, p.222-227, 1998.
- READ, P. *et al.* Management of environmental impacts of marine aquaculture in Europe. **Aquaculture**, v. 226, n. 1 - 4, p. 139-63, 2003.
- ROCHA, F. A. G. *et al.* Estafilococos coagulase positivos em filés de tilápia (*Oreochromis niloticus*) comercializados no mercado modelo Nerival Araújo. Currais Novos- RN. **Holos**, Natal, v. 1, p. 84-91, 2013.
- RODRIGUES, D. P.; RIBEIRO, R. V.; *Aeromonas*. In: VIEIRA, R. H. F. **Microbiologia , higiene e qualidade do pescado- teoria e prática**. São Paulo: Varela, 2004, 380 p.
- SANTOS, L. **A contribuição da aquacultura para a emergência, disseminação e transferência de resistência bacteriana aos antibióticos: origem, potenciadores e soluções**. *Acta Farmacêutica Portuguesa*, v. 8, n. 1, p. 69-80, 2019.
- SANTOS, E. J. R. *et al.* **Qualidade higiênico-sanitária de tambaqui (*Colossoma macropomum*) comercializado na cidade de São Luís – MA**. *Ciência Animal Brasileira*, v. 20, v. 1-12, e-46537, 2019.
- SILVA, M. P. M. **Estudo da cadeia produtiva e avaliação higiênico sanitária das principais espécies de peixes nativos da Baixada Maranhense**, Brasil. 2013. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual do Maranhão, São Luís.
- SILVA, A. C. M. de M. *et al.* Characterization of *Aeromonas* spp isolated from water and of oysters samples by microbiological and molecular methods. **Ciência Animal Brasileira**, v. 15, n. 3, p. 362-368, 2014.

SILVA, L. C. A. da *et al.* Genetic diversity and virulence potential of clinical and environmental *Aeromonas* spp. isolates from a diarrhea outbreak. *BMC Microbiology*, v. 17, n. 1, p. 1–9, 2017.

SOOD, S.; NERURKAR, V. Fatal necrotizing soft tissue infection by *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, v. 8, n. 4, p. 06-07, 2014.

SUBASINGHE, R. P. *et al.* (ed.) **Farming the Waters for People and Food**. Proceedings of Global Conference on Aquaculture 2010, the Phuket, Thailand. Roma; Bangkok: FAO/NACA, 2012. 896 p.

TAVARES, A. B.; CERESER, N. D.; TIMM, C. D. Ocorrência de *Aeromonas* spp. em alimentos de origem animal e sua importância em saúde pública. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 82, p. 1-9, 2014.

TAVARES-DIAS, A. B. *et al.* **Sanidade do Tambaqui *Collossoma macropomum* nas fases de larvicultura e alevinagem**. Macapá: Embrapa Amapá; Manaus: Universidade Nilton Lins, Instituto de Pesquisas da Amazônia, 2013.

TEODORO, J. R. **Potencial patogênico e susceptibilidade aos antimicrobianos de aeromonas spp. em alimentos prontos para o consumo**. 2021. 95 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2021.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu. 4 ed., 2005. 718 p.

YU, H. B. *et al.* Identification and Characterization of Putative Virulence Genes and Genes Clusters in *Aeromonas hydrophila* PPD134/91. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, p. 4469-77, 2005.

ZHOU, Y. *et al.* Taxonomy, virulence genes and antimicrobial resistance of *Aeromonas* isolated from extra-intestinal and intestinal infections. *BMC Infectious Diseases*, v. 19, n. 1, p. 1–9, 2019.

CAPÍTULO III

Featuring of *Aeromonas* spp. isolated from tambaqui (*Colossoma macropomum*) grown under semi-intensive production system

Aeromonas spp. isolated from native fish

Alanna Raissa de Araújo Silva ¹, Vanielly Viana Rodrigues Vieira ², Joyce Caroline Campos Mendes Braga ², Izabela Alves Paiva ³, Anna Letícia Pinto Silva³, Greiciene dos Santos de Jesus ¹, Hamilton Pereira Santos ¹, Larissa Sarmento dos Santos Ribeiro^{1,3}, Viviane Correa Silva Coimbra ¹, Danilo Cutrim Bezerra ⁴, Amanda Mara Teles ¹, Nancyleni Pinto Chaves Bezerra ^{1,2,4}

¹Professional Post-graduation program in Animal Sanitary Defense of State University of Maranhão - UEMA. Campus Paulo VI, Av. Lourenço Vieira da Silva, 1000, Jardim São Cristóvão, 65055-310 São Luís, MA, Brazil. (ARAS) raissa.alanna@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6603-8824>; (GSJ) greicy2403@hotmail.com, ORCID <https://orcid.org/0000-0001-8216-2334>; (HPS) hpsluiza@yahoo.com.br, ORCID <https://orcid.org/0000-0002-6775-4056>; (LSSR) lalasarm3nto@hotmail.com, ORCID <https://orcid.org/0000-0001-8237-1988>; (VCSC) vivianecorrea@yahoo.com, ORCID <https://orcid.org/0000-0001-7611-6673>; (AMT) amandatelespesq@gmail.com, ORCID <https://orcid.org/0000-0002-5068-4696>; (NPCB) nancylenichaves@hotmail.com, ORCID <https://orcid.org/0000-0003-3970-7524> (corresponding author).

²Major Degree in Fishing Engineering. Fishing Engineering Department of State University of Maranhão - UEMA. Campus Paulo VI, Av. Lourenço Vieira da Silva, 1000, Jardim São Cristóvão, 65055-310 São Luís, MA, Brazil. (VVRV) vannyviana.vv@gmail.com, ORCID <https://orcid.org/0000-0002-4589-2570>; (JCCMB) joycecomcristo@gmail.com, ORCID <https://orcid.org/0000-0002-1510-9485>.

³Academic Post-Graduation program in Animal Science at State University of Maranhão - UEMA. Campus Paulo VI, Av. Lourenço Vieira da Silva, 1000, Jardim São Cristóvão, 65055-310 São Luís, MA, Brazil. (IAP) paivaisabela27@gmail.com, ORCID <https://orcid.org/0000-0002-0262-797X>; (ALPS) annaleticiaps18@gmail.com, ORCID <https://orcid.org/0000-0001-6781-4883>.

⁴Undergraduate Course in Zootechnics, Zootechnics Department, State University of Maranhão - UEMA. Campus Paulo VI, Av. Lourenço Vieira da Silva, 1000, Jardim São Cristóvão, 65055-

310 São Luís, MA, Brazil. (DCB) danilocbezerra15@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2075-9914>.

ABSTRACT. The aim of the present study is to feature *Aeromonas* spp. isolated from tambaqui (*Colossoma macropomum*) grown under semi-intensive production system. In order to do so, 40 tambaqui specimens, both male and female, at fattening stage, were assessed. Tail kidney and liver fragments were removed in laboratory environment to assess *Aeromonas* spp. based on standardized, reference microbiological techniques (cultivation, isolation and phenotypic and genotypic identification). In total, 132 isolates were obtained, all belonging to genus *Aeromonas* sp. according to gram stain, catalase and oxidase tests. The aliquot of 56.81% (n=75) of the 132 isolates came from the liver and 43.19% (n=57) from the kidney. Twenty-five (25) biochemical proofs were carried out to confirm the 132 bacterial isolates, 114 isolates were detected at species level, and it evidenced high identification rate (86.37%). The study identified seven *Aeromonas* spp. species at the following frequencies: *A. veronii* by *veronii* (60.53%), *A. caviae* (18.42%), *A. sobria* (5.56%), *A. schubertii* (5.56%), *A. veronii* by *sobria* (5.56%), *A. media* (2.63%) and *A. hydrophyla* (2.63%). Primers designed for the detection of *Aeromonas* spp. presented satisfactory results in PCR amplification, with 47.37% (n= 54) of the isolates confirmed as belonging to the genus *Aeromonas*. In conclusion, all the herein identified species are aquatic animals' pathogens with zoonotic potential in humans and the genotypic identification of a high percentage of isolates reinforces the public health problem.

Keywords: *Aeromonas*. Fish Farming. Animal Health. Epidemiological Monitoring. Human health. Environment.

INTRODUCTION

Maranhão State is the second largest Brazilian federation in coastal extension (640 Km of straight coastal line); it is traditionally considered the main fish producer in Northeastern Brazil, and it gives this state important representativeness in the national scene (Isaac et al. 2006). When it comes to yield rates, Maranhão is the fourth biggest native-fish producer in the country: 40,800 tons of it, back in 2020 (Peixe BR 2020).

Different from the Brazilian situation, which has redbreast tilapia as the most produced species, Maranhão native fish confirm the peculiar feature of fish farming in the state, as well as its acceptability in the state's internal market, with emphasis on tambaqui (*Colossoma macropomum*) and on its hybrids (Souza et al. 2022).

Despite Maranhão State's potential to develop fish farming, as aforementioned, several bottlenecks impair this activity to develop and to become more competitive and profitable, such as (i) the activity's regulatory aspects, (ii) economic aspects – long production cycle - and (iii) technical aspects – artisanal and rudimentary production methods, inappropriate activity management, lack of qualified manpower and management issues, mainly sanitation-management issues. Thus, commitment to develop fish farming in Maranhão State is closely linked to fish farmers' engagement, to incentive to new investments, to encouraging the production of new knowledge based on respecting the environment and the populations already living on this activity.

According to Tavares-Dias & Martins (2017), fish farming yield gets limited when biosafety measures are compromised, since it favors the entering and outspread of infectious diseases that lead to losses (in this sector) expected to reach 84 million dollar/year. These outcomes show the relevance of properly monitoring fish's health conditions in order to detect diseases at their early stage and to avoid the outspread of infectious agents in farms and in the environment.

Bacteria of interest for fish farming are considered to be opportunistic. They are found in water and in fish microorganisms; yet, they can trigger diseases in weakened hosts due to stress caused by changes in water quality – this process is often associated with high fish density (Leira et al. 2016). Although there is a whole diversity of etiological agents with pathogenic potential, *Aeromonas* spp. species get very important because of their high frequency observed in previous studies (Suhel et al. 2011, Sebastião et al. 2015).

Bacteria belonging to genus *Aeromonas* are organized into two groups: (i) the first one is featured by psychrophilous and non-motile species represented by *Aeromonas salmonicida*, which is the agent accountable for causing boils in fish, and (ii) the second group, which is featured by being mobile, disease-causing mesophilic found both in humans and animals (Seshadri et al. 2006, Austin & Austin 2007, Janda & Abbott 2010, Suhel et al. 2011, Furmanek 2014; Sebastião et al. 2015).

Although previous studies have proven that other mobile *Aeromonas* can also cause different diseases in fish, such as *Aeromonas caviae* (Kozínska 2007, Martins et al. 2008), *Aeromonas veronii* (Nawaz et al. 2006, Kozínska 2007), *Aeromonas sobria* (Kozínska, 2007, Beaz et al. 2010) and *Aeromonas jandaei* (Kozínska 2007), *Aeromonas hydrophila* is the most referenced one (Joseph & Carnahan 1994, Nielsen et al. 2001, Deng et al. 2014) because it is considered an opportunistic pathogen accountable for hemorrhagic sepsis. This sepsis is featured by small hemorrhagic lesions on body surface that progress to bleeding ulcers and,

consequently, cause exophthalmos, ascites, fins and tail necrosis, loss of scales and gill hemorrhage (Cipriano 2001, Pavanelli et al. 2008). Nowadays, *A. caviae*, *A. hydrophila* and *A. veronii* *bv sobria* are getting closer attention because they are associated with a whole variety of human diseases like skin infections, gastroenteritis and septicemia (WHO 1993, Figueras et al. 2005, Skwor et al. 2014).

By taking into consideration the relevance of *Aeromonas* spp. species for fish and human health, the aim of the present study was to characterize assess the features of *Aeromonas* spp. isolated from tambaqui (*Colossoma macropomum*) grown under semi-intensive production system.

MATERIALS AND METHODS

Ethical aspects

All methodological procedures were carried out in compliance with ethical principles set by the Brazilian Collegiate for Animal Experimentation (*Colégio Brasileiro de Experimentação Animal*) and approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation (CEEA) of State University of Maranhão (UEMA) (Protocol n. 09/2022).

Sample collection

Fish specimens were collected between November and December 2022, in fish farms located in Paço do Lumiar, Raposa, São José de Ribamar and São Luís counties, since they belong to Maranhão State's Metropolitan Region. In total, four fish farms were sampled, one farm in each county, based on the sampling plan adopted by Kim et al. (2019). Farms that have joined the study presented similar features to each other, such as (i) semi-intensive production system, (ii) use of commercial feed and (iii) tambaqui as main farming species. In total, 40 living tambaqui (*Colossoma macropomum*) specimens, both male and female (36.6 ± 4.32 cm and 998 ± 248.30 g), were herein used – 10 per county.

The fish specimens were captured with 2.5-mesh net (25mm). Subsequently, the specimens were taken, still alive, in isothermal boxes (added with water oxygenation gear) filled with water from the cultivation place, to the Laboratory of Food and Water Microbiology of UEMA, right at collection day.

Isolation and phenotypic identification of *Aeromonas* sp.

The living fish were subjected to clinical examination in laboratory environment; likely traces of changes suggesting aeromonosis were registered. Subsequently, the fish specimens were euthanized through perforation of the upper part of the head with the aid of a pointed

instrument (scalpel blade); incision in the ventrolateral portion; reflection of tissues attached to the viscera region was carried out in an aseptic microbiological-flow way; tail kidney and liver fragments were, then, collected (40 fragments) – it totaled 80 tissue fragments for microbiological analysis.

Kidney (1.0g) and liver (1,0g) tissue fragments were immediately inoculated with 9.0mL of alkaline peptone water (APW) added with 30 µg/mL ampicillin. The samples were homogenized and incubated at 28°C for 24 hours. After incubation was over, 100 µL inoculum broth was transferred to gelatin phosphate salt (GSP) added with ampicillin (20 µg/mL), based on the *spread plate* method. They were once more incubated at 28°C for 24 hours after the suggestive colonies had grown (yellowish/ amylase production, 2-5mm width clear halo around the colony); up to three colonies presenting the same morphotype were taken to Tryptic Soy Agar (TSA) medium and incubated at 28°C/24h for colony purity checking purposes.

Bacterial isolates were subjected to Gram stain and to catalase (biochemical proof carried out in hydrogen peroxide) and oxidase (biochemical test carried out with oxidase strands) tests. After the presence of Pure Gram-negative coccobacilli positive for catalase and oxidase was confirmed, the isolates were considered to belong to genus *Aeromonas* sp. (Carnahan et al. 1991).

The phenotypic identification of *Aeromonas* sp. isolates was performed in cultures grown in TSA agar, based on Holt (1994) and on the American Public Health Association (APHA 2001). The biochemical panel composed of 23 proofs was used to identify the species; it was in compliance with standard phenotypical reactions (indole, Voges Proskauer, Simmons citrate, H₂S production, urea hydrolysis, tryptophan deaminase, lysine, arginine and ornithine decarboxylation, malonate, glucose oxidation, lactose fermentation, sucrose, mannitol, adonitol, myoinositol, sorbitol, sorbitol, raffinose, rhamnose, maltose, melobiose, and esculin hydrolysis). DNase and growing biochemical tests were also conducted at growing NaCl concentrations (0%, 1% and 6%).

Ghenotypic identification of *Aeromonas* sp.

From the TSB medium, 1.0 mL of the bacterial culture was centrifuged at 12,000 × g for 1 min, the supernatant was discarded and the pellet was used for DNA extraction using InstaGene Matrix® (BioRA) resin, according to the indications of the manufacturer.

The extracted DNA was quantified in a spectrophotometer by reading the absorbance at 260 nm and the 260/280 nm ratio was used to determine the purity of the samples. Then, the

concentration of the samples was adjusted with TE pH 8.0 to approximately 200 ng/μL and the DNA was stored at -20° C until the polymerase chain reaction (PCR) technique was performed.

The DNA of *Aeromonas* spp. isolates. was characterized by PCR using the GoTaq® Colorless Master Mix Kit (Promega®) according to the manufacturer's recommendations, obtaining a final volume of 25 μL per reaction. The amplification program used was: 95 °C for 10 min, 30 cycles at 95 °C for one minute; specific temperature of 58.1 °C for annealing the primer, for one minute; 72 °C for one minute and 72 °C for 10 min for final extension, according to Kim et al. (2019). The primer was used for the bacterial 16S rRNA gene (F: 5-TGACGTTACTCGCAGAGGA-3; R: 5-GCTTGCAGCCCTCTGTACG-3) which amplifies a fragment of 786 base pairs.

The PCR products were visualized by applying 5 μL of the amplified product to a 2% agarose gel, stained with SYBR Safe®, and subjected to horizontal electrophoresis for 30 minutes at 90V in 1X TBE buffer. The bands were visualized under ultraviolet light and digital images were recorded with the L-PIX Image EX model (Locus Biotechnology, Brazil).

Data analysis

Microbiological results were tabulated, interpreted, stored in a database, ordered and presented in tables to allow a good visualization of the variables' set. Descriptive statistics analysis was also carried out to find absolute and relative frequencies. Fisher's test was carried out in Instat free software to assess whether there were differences in bacterial isolation location at 5% significance level ($P \leq 0.05$).

RESULTS

Bacteria were isolated in 19 and 25 kidney and liver fragments, respectively, of the 40 analyzed tambaqui specimens¹⁴ (Table 1). In total, 132 isolates were obtained in gelatin salt phosphate (GSP); they were confirmed to belong to genus *Aeromonas* sp. after Gram strain (gram-negative coccobacilli), catalase (100% positive) and oxidase (100% positive) tests were performed.

¹⁴ **Clinical aeromonosis signs:** (skin lesions featured by depigmented or ulcerated areas, exophthalmos, ascites, visceral petechiae, hepatomegaly, splenomegaly, renal enlargement, friable kidneys and hemorrhage in the inner wall of the abdominal cavity) (Kim 2019).

Table 1. Location of *Aeromonas* sp. isolation in tambaqui (*Colossoma macropomum*) and the frequency of bacterial isolates.

With respect to bacteria's isolation location in the assessed fish specimens, the number of bacterial isolated in the kidney and liver did not differ from each other ($P=0.26$); in other words, there was no statistically significant difference in it. In total, 56.81% ($n= 75$) of the 132 isolates came from the liver and 43.19% ($n= 57$), from the kidney.

Twenty-five (25) biochemical proofs were carried out to confirm the 132 bacterial isolates (Carnahan et al. 1991, Joseph & Carnahan 1994, Cunha & Silva, 2006, Erden et al. 2011, Murray et al. 2017, Koneman et al. 2018); 114 isolates were identified at species level (Table 2), and it evidenced high phenotypical identification rate (86.37%).

Table 2. Biochemical profile of 114 *Aeromonas* sp. isolates from tambaqui (*Colossoma macropomum*) coming from fish farms in Maranhão State's Metropolitan region.

The study showed 7 *Aeromonas* species identified at the following frequencies: *A. veronii* by *veronii* (60.53%), *A. caviae* (18.42%), *A. sobria* (5.56%), *A. schubertii* (5.56%), *A. veronii* by *sobria* (5.56%), *A. media* (2.63%) and *A. hydrophyla* (2.63%) (Table 3).

Table 3. *Aeromonas* species isolated from tambaqui (*Colossoma macropomum*) coming from fish farms in Maranhão State's Metropolitan Region.

The seven identified species presented biochemical profile in compliance with that shown in the specialized literature (Table 4).

Table 4. Biochemical features of species belonging to genus *Aeromonas* isolated from black tambaqui (*Colossoma macropomum*) coming from fish farms in Maranhão State's Metropolitan Region.

The primer designed for the detection of *Aeromonas* spp. (16S gene - rRNA) presented satisfactory results in PCR amplification, with 47.37% ($n= 54$) of the isolates confirmed as belonging to the genus *Aeromonas* and the species *A. caviae*, *A. media*, *A. veronii* by *sobria* and *A. hydrophyla* confined in phenotypic tests.

DISCUSSION

The presence of bacteria belonging to genus *Aeromonas* in food has been documented in several studies. According to Bizani & Brandelli (2001), contaminated water is the main source of food contamination. A screening carried out in India by Agarwal et al. (2000) about the contamination of animal-origin food by *Aeromonas* sp. showed that these bacteria were isolated from fish (22%), quail eggs (18%), buffalo milk (2.8%) and goat meat (8.9%).

In a study carried out in Southern Brazil, Shama et al. (2000) assessed 100 silver catfish (*Rhamdia quelen*); 43.40% bacteria isolated by them were collected in the kidneys; 35.85%, in external lesions; and 18.87% were simultaneously isolated from these two assessed structures. Dos Santos et al. (2014) performed a study at São Francisco Valley to identify bacteria with pathogenic potential in 100 pac-man catfish (*Lophiosilurus alexandri*); they identified that most bacterial isolates were collected in gills (51.98%) and kidneys (36.72%). Leung et al. (1992) investigated *Aeromonas* spp. in catfish viscera, in water and in fish farms' sediments; they found bacteria in all samples, however, the highest counting of them was observed in fish viscera. Therefore, results in the present study, in addition to the aforementioned ones, highlight the importance of fish organs (gills, kidney and liver), viscera and skin lesions at the time to isolate bacteria from this animal model.

The herein recorded phenotypic results point out that the adopted tests allowed achieving identification at species level; however, it is important highlighting the impairments and the need of having a larger number of proofs in order to get to a more conclusive identification of *Aeromonas* species. It is worth mentioning Sobral (2018), who reported hard time identifying *Aeromonas* species through conventional methods.

Bacteria belonging to genus *Aeromonas* (*A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii*, *A. jandaei*, *A. schubertii*) are the main bacterial agents isolated from fish (Zamri et al. 2014), from a whole variety of environmental samples (different water sources and bivalve molluscs) and from shrimp (Neyts et al. 2000, Galbis et al. 2002). Martins et al. (2009) identified *Aeromonas* spp. in 100% (n=30) of fish assessed in São Luís City, Maranhão State. They isolated 254 bacterial strains, but only 184 of them were classified as belonging to genus *Aeromonas* sp. – the following species received phenotypic identification: *A. caviae* (43.4 %), *A. hydrophila* (28.2 %), *A. veronii* (26.6 %) and *A. sobria* (1.6 %).

If one takes into account the classification proposed by Janda & Abbott (1998), five of the herein identified species are associated with pathogenic infections in humans, and it totals 92.10% (n= 105) of the isolates. Three of these species are involved in more pathogenic infections (*A. caviae*, *A. veronii* by *sobria* and *A. hydrophila*) and two, in less pathogenic ones

(*A. veronii* by *veronii* and *A. schubertii*). *A. media* and *A. sobria*, in their turn, are considered environmental species. However, according to Janda & Abbott (2010) and Fernández-Bravo & Figueras (2020), all herein identified species are aquatic animals' pathogens with zoonotic potential.

Most the herein *Aeromonas* species isolated from fish (92.10%; n=105/114) have been associated with human gastroenteritis, including cases called travelers' diarrhea by Pereira et al. (2008). According to Peixoto et al. (2012) and Grim et al. (2014), species mostly associated with human infections are *A. hydrophila*, *A. caviae* and *A. sobria*. These species can present different virulence factors, such as adhesins, capsule, polar and lateral flagella, proteases, hemolysins, cytotoxins, enterotoxins, leukocidin, elastase, among others.

Aeromonas caviae was the species recording the second highest frequency in the present study, and its importance must be highlighted, since it has high virulence, mainly in cases of sepsis and opportunistic infections in immunocompromised patients, as highlighted by Whang et al. (1996).

Although the frequency of some *Aeromonas* species (*A. sobria*, *A. schubertii*, *A. veronii* by *sobria*, *A. media* and *A. hydrophila*) is low, it is important highlighting the clinical-epidemiological profile of their isolation in the analyzed samples. *Aeromonas sobria*, for example, had been isolated in enteric infections in humans. Previous studies have shown that most isolates belonging to this species have a toxin similar to that of cholera, and that approximately 20% of patients with this disease present dysentery symptoms similar to those caused by species *Shigella* and by invasive *Campylobacter jejuni* strains (Albert et al. 2000). There are reports in the literature about human infections on this species, and about its isolation in the peritoneal fluid of dialysis patients (Song et al. 2019), as well as in blood samples from adult and pediatric patients with hematological disorders (Valcarcel et al. 2021).

A. hydrophila became quite relevant in the last decade since it recorded high frequency in the carried out studies (Suh et al. 2011, Sebastião et al. 2015). This species is considered a food-origin emerging pathogen that can frequently cause gastroenteritis when ingested by humans (Park et al. 2021).

Species *A. hydrophila* has been associated with fish mortality worldwide over the last decade, and it led to significant economic losses. Sanitation episodes of mortality included more than 25,000 carps in St. Lawrence River, in 2001; 820 tons of fish in Indonesia, in 2002 – it resulted in estimated loss of US\$ 37.5 million. In some of these cases, only *Aeromonas* spp. species accounted for causing secondary infection in immunosuppressed fish due to spawning or to environments presenting high temperatures or low water level (Monette et al. 2006).

Aeromonas schubertii embodied clinical-epidemiological relevance associated with its isolation from skin lesion infection developed after the species exposure to contaminated water or soil (Hofer et al. 2006).

Dong et al. (2015) state that cultivation conditions and the presence of stressors can increase the number of diseases caused by bacteria residing in fish or water, with infections in which *Aeromonas* spp. assume clinical and epidemiological importance.

The contamination of aquaculture production systems, of the environment, water and food, is the potential pathway for infections caused by *Aeromonas* spp. It is essential pointing out that several bacterial virulence and resistance mechanisms still can be transferred to other individuals with pathogenic potential. Therefore, it is of fundamental importance to ensure adequate biosecurity measures. Proper monitoring of water, food and sanitation facilities, based on the implementation of diagnostic procedures and on the detection of these agents, is essential for infection prevention.

According to the herein recorded results, seven *Aeromonas* species were isolated from *C. macropomum*: *A. veronii* by *veronii*, *A. caviae*, *A. sobria*, *A. schubertii*, *A. veronii* by *sobria*, *A. media* and *A. hydrophyla*. All the identified species are considered aquatic animals' pathogens with zoonotic potential in humans. And the genotypic identification of a high percentage of isolates reinforces the public health problem. Infections caused by bacteria belonging to genus *Aeromonas* spp. are seen as emerging issue for unified health.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors are grateful to *Pró-Reitoria de Pesquisa (PPG) da Universidade Estadual do Maranhão* for granting the scientific initiation scholarship to the development of the present investigation. This study was funded by *Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Tecnológico do Maranhão - FAPEMA*.

REFERENCES

- Agarwal, R.K., Kapoor, K.N., Kumar, A. & Bhilegaonkar, K.N. 2000. Aeromonads in foods of animal origin. *Indian Journal of Animal Sciences*, v. 70, n. 9, p. 942-943.
- Albert, M.J., Ansaruzzaman, M., Talukder, K.A., Chopra, A.K., Kuhn, I., Rahman, M., Faruque, A.S., Islam, M.S., Sack, R.B. & Mollby, R. 2000. Prevalence of Enterotoxin Genes in *Aeromonas* spp. isolated from children with diarrhea, healthy controls, and the environment. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, p. 785-3790. doi:10.1128/JCM.38.10.3785-3790.2000

APHA. American Public Health Association. 2001. Compendium of methods for microbiological examination of foods. 3rd ed. Washington: American Public Health Association.

Austin, B. & Austin, D.A. 2007. Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish. Springer-Praxix, Godalming, United Kingdom.

Beaz-Hidalgo, R., Alperi, A., Buján, N., Romalde, J.L. & Figueras, M.J. 2010. Comparison of phenotypical and genetic identification of *Aeromonas* strains isolated from diseased fish. *Systematic and Applied Microbiology*, v.33, n.3, p.149-153. doi:<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2010.02.002>

Bizani, D. & Brandelli, A. 2001. Antimicrobial susceptibility, hemolysis, and hemagglutination among *Aeromonas* spp. isolated from water of a bovine abattoir. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.32, p.334-339. doi: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822001000400016>

Carnahan, A.M., Behram, S. & Joseph, S.W. 1991. Aerokey II: A flexible key for identifying clinical *Aeromonas* species. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 29, n. 12, p. 2843-2849. doi: <https://doi.org/10.1128/jcm.29.12.2843-2849.1991>

Cipriano, R.C. 2001. *Aeromonas hydrophila* and motile aeromonad septicemias of fish. U.S. Fish and Wildlife Service, Washington, DC.

Cunha, M.A. & Silva, M.R. 2006. Métodos de detecção de micro-organismos indicadores. *Saúde & Ambiente em Revista*. v.1, n.1, p. 9-13.

Deng, Y.T., Wu, Y.L., Tan, A.P., Huang, Y.P., Jiang, L., Xue, H.J., Wang, W.L., Luo, L. & Zhao, F. 2014. Analysis of antimicrobial resistance genes in *Aeromonas* spp. isolated from cultured freshwater animals in China. *Microbial Drug Resistance*, v. 20, n. 4, p. 350-356. doi: <https://doi.org/10.1089/mdr.2013.0068>.

Dong, H. T., Nguyen, V. V., Le, H. D., Sangsuriya, P., Jitrakorn, S., Saksmerprom, V., Senapin, S., Rodkhum, C. 2015. Naturally concurrent infections of bacterial and viral pathogens in disease outbreaks in cultured Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) farms. *Aquaculture*, v. 448, p. 427-435. doi: <https://doi.org/10.1089/mdr.2013.0068>. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.06.027>.

Kim, F.J.P. Silva, A.E.M., Silva, R.V.S., Kim, P.C.P., Acosta, A.C., Silva, S.M.B.C., Sena, M.J., Mota, R.A. 2019. Elevada frequência de *Aeromonas* spp. e genes de virulência em cultivos de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) em tanques-rede, na região semiárida de Pernambuco, Brasil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 71, n. 5, p. 1609-1615. doi: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-10747>.

Santos, F.G.B., Gouveia, G.V., França, C.A., Souza, M.G. & Costa, M.M. 2014. Microbiota bacteriana com potencial patogênico em pacamã e perfil de sensibilidade a antimicrobianos. *Revista Caatinga*, v. 27, n. 2, p. 176-183.

Erden, B. *et al.* 2011. Biochemical identification and numerical taxonomy of *Aeromonas* spp. isolated from food samples in Turkey. *Turkish Journal of Biology*, v. 35, p. 463-472.

Fernández-Bravo, A. & Figueras, M.J. 2020. An update on the genus *Aeromonas*: Taxonomy, epidemiology, and pathogenicity. *Microorganisms*, v. 8, n.1, p. 1-39. doi: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010129>.

Figueras, M.J., Suarez-Franquet, A., Chacón, M. R., Soler, L., Navarro, M., Alejandre, C., Grasa, B., Martínez-Murcia, A.J. & Guarro, J. 2005. First Record of the rare species *Aeromonas culicicola* from a drinking water supply. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 1, p. 538-541. doi: <https://doi.org/10.1128/AEM.71.1.538-541.2005>

Furmanek, B.B. 2014. Phenotypic and molecular characteristics of an *Aeromonas hydrophila* strain isolated from the River Nile. *Microbiological Research*, v. 169, n. 7-8, p. 547-552. doi: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.11.001>

Galbis D.M., Farfán M, Lorén J.G. & Fusté M.C. 2002 .Biochemical identification and numerical taxonomy of *Aeromonas* spp. isolated from environmental and clinical samples in Spain. *Journal of Applied Microbiology*, v. 93, p. 420-430, 2002. doi: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01711.x>.

Grim, C.J., Kozlova, E.V., Ponnusamy, D., Fitts, E.C., Sha, J., Kirtley, M.L., van Lier, C.J., Tiner, B.L., Erova, T E., Joseph, S.J., Read, T.D., Shak, J..R., Joseph, S.W., Singletary, E., Felland, T., Baze, W.B., Horneman, A.J. & Chopra, A.K. 2014. Functional genomic characterization of virulence factors from necrotizing fasciitis-causing strains of *Aeromonas hydrophila*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 80, n. 14, p. 4162-4183. doi: <https://doi.org/10.1128/AEM.00486-14>.

Hofer, E., Reis, C.M.F., Teófilo, G.N.D., Cavalcanti, V.O., Lima, N.V. & Henriques M.F.C.M. 2006. Envolvimento de *Aeromonas* em surto de doença diarréica aguda em São Bento do Una, Pernambuco. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 39, n. 2, p. 217- 220. doi: <https://doi.org/10.1590/S0037-86822006000200016>.

Holt, J. G. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9nd ed. New York: The Williams and Wilkins.

Isaac, V.J., Martins, A.S., Haimovici, M., Castello, J.P. & Filho, J.M.A .2006. Síntese do estado de conhecimento sobre a pesca marinha e estuarina do Brasil. In: ISAAC. V. J. et al. (Org.) *A pesca marinha e estuarina do Brasil no início do século XXI: recursos, tecnologias, aspectos socioeconômicos e institucionais*. Belém. Pará. p. 181- 186.

Janda, J.M. & Abbott, S.L. 1998. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease presentations and unanswered questions. *Clinical Infectious Disease*, v. 27, n. 2, p. 332–344. doi: <https://doi.org/10.1086/514652>.

Janda, J.M. & Abbott, S.L. 2010. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 23, n. 1, p. 35-73. doi: <https://doi.org/10.1128/CMR.00039-09>

Joseph, S.W. & Carnahan, A. 1994. The isolation, identification, and systematics of the motile *Aeromonas* species. *Annual Review of Fish Diseases*, v. 4, p. 315-343 .doi: [https://doi.org/10.1016/0959-8030\(94\)90033-7](https://doi.org/10.1016/0959-8030(94)90033-7)

Kim, F.J.P. 2019. Elevada frequência de *Aeromonas* spp. e genes de virulência em cultivos de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) em tanques-rede, na região semiárida de Pernambuco, Brasil. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 71, n. 5, p. 1609-1615.

Koneman, E.W., Gary, W.P., Deirdre, L.C., Geraldine S.H., William, M.J., Paul, C.S. & Gail L. W. 2018. Diagnóstico Microbiológico - Texto e Atlas Colorido. 7 ed. Rio de Janeiro: Medsi.

Kozińska, A. 2007. Dominant pathogenic species of mesophilic aeromonads isolated from diseased and healthy fish cultured in Poland. Journal of Fish Disease, v. 30, n. 5, p. 293- 301. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2007.00813.x>

Leira, M.H., de Assis Lago, A., Botelho, H.A., Melo, C.C.V., Mendonça, F.G., Nascimento, A.F. do. & Freitas, R.T.F. de. 2016. Principais infecções bacterianas na criação de peixes de água doce do Brasil - uma revisão. Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública, v.3, n. 1, p. 44-59. doi: <https://doi.org/10.4025/revcivet.v3i1.32436>

Leung, C.K.; Huang, Y.W. & Pancorbo, O.C. 1992 Bacterial pathogens indicators in catfish and pond environments. Journal of Food Protection, Ames, v. 55, n.6, p. 424-427

Lima, L.D. Gênero *Aeromonas* e sua importância em doenças infecciosas. 2017. Monografia (Graduação) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Minas Gerais.

Martins, M.L., Miyazaki, D.M.Y. & Mouriño, J.L.P. 2008. *Aeromonas caviae* durante surto de mortalidade em tilápia do Nilo e suplementação com vitamina C na dieta. Boletim do Instituto de Pesca, v. 34, n. 4, p. 585-590.

Martins, A.G.L.A., Nascimento, A.R, Dos Silva, R.H, Vieira, F., Serra, J.L,Rolim, M.M. & Rocha. M. 2009. Quantificação e identificação de *Aeromonas* spp. em águas de superfície do estuário do rio Bacanga em São Luís / MA (Brasil). Boletim Ceppa, v. 27, p. 107-18. doi: <https://doi.org/10.5380/cep.v27i1.14957>

Monette, S., Dallaire, A.D., Mingelbier, M., Groman, D., Uhland, C., Richard, J.P., Paillard, G., Johansson, L.M., Chivers, D.P., Ferguson, H.W., Leighton, F.A. & Simko, E. 2006. Massive mortality of common carp (*Cyprinus carpio carpio*) in the St. Lawrence River in 2001: diagnostic investigation and experimental induction of lymphocytic encephalitis. Veterinary Pathology, v. 43, n. 3, p. 302-310.

Morita, M. 2005. Avaliação da qualidade sanitária e ocorrência de *Aeromonas* spp. em lagoas de pesque -pagues da Região Metropolitana de São Paulo. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Saúde Pública da USP. São Paulo.

Murray, P.R., Rosenthal, K.S & Pfaller, M.A. 2017. Manual of Clinical Microbiology. 8 ed. Washington: ASM Press.

Nawaz, M., Sung, K., Khan, S. A., Khan, A.A. & Steele, R. 2006.. Biochemical and molecular characterization of tetracycline resistant *Aeromonas veronii* isolates from catfish. Applied and Environmental Microbiology, v. 72, n. 10, p. 6461-6466. doi: <https://doi.org/10.1128/AEM.00271-06>.

Neyts, K., Huys, G., Uyttendaele, M., Swings, J. & Debevere, J. 2000. Incidence and identification of mesophilic *Aeromonas* spp. From retail foods. Letters in Applied

Microbiology, Bélgica, v. 31, p. 359-363. doi: <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2000.00828.x>

Nielsen, M.E., Hoi, L., Schmidt, A.S., Qian, D., Shimada, T., Shen, J.Y. & Larsen, J.L. 2001. Is *Aeromonas hydrophila* the dominant motile *Aeromonas* species that causes disease outbreaks in aquaculture production in the Zhejiang province of China? Disease of Aquatic Organisms, v. 46, p. 23-29. doi: <https://doi.org/10.3354/dao046023>.

Park, S.M., Kim, H.W., Choi, C. & Rhee, M. S. 2021. Pathogenicity and seasonal variation of *Aeromonas hydrophila* isolated from seafood and ready-to-eat sushi in South Korea. Food Research International, v. 147, p. 1-7. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110484>

Pavanelli, G.C., Eiras, J.C. & Takemoto, R.M. 2008. Bacterioses. In: Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento. Eduem, Maringá, Brasil, 165- 220.

Peixe BR. 2020. Associação Brasileira da Piscicultura. Anuário Brasileiro de Piscicultura. v. 101.

Peixoto, L.J.S., Sá, M.C.A., Gordiano L.A. & Costa MM. 2012. *Aeromonas* spp.: fatores de virulência e perfis de resistência a antimicrobianos e metais pesados. Arquivos do Instituto Biológico, v.79, n.3, p.453-461. doi: <https://doi.org/10.1590/S1808-16572012000300020>.

Pereira, C.S., Amorim, S.D., Santos, A.F.M., Reis, C.M.F., Theophilo, G.N.D. & Rodrigues, D.P. 2008. Caracterização de *Aeromonas* spp isoladas de neonatos hospitalizados. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 41, p. 2, p. 179-182, mar-abr. doi: <https://doi.org/10.1590/S0037-86822008000200009>.

Sebastião, F.A., Furlan L.R., Hashimoto, D. & Pilarski, F. 2015. Identification of bacterial fish pathogens in Brazil by direct colony PCR and 16S rRNA gene Sequencing. Advances in Microbiology, v. 5, n. 6; p. 409-424. doi: <https://doi.org/10.4236/aim.2015.56042>.

Seshadri, R., Joseph, S.W., Chopra, A.K., Sha, J., Shaw, J., Graf, J., Haft, D., Wu, M., Ren, Q., Rosovitz, M.J., Madupu, R., Tallon, L., Kim, M., Jin, S., Vuong, H., Stine, O.C., Ali, A., Horneman, A.J. & Heidelberg, J.F. 2006. Genome sequence of *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966T: jack of all trades. Journal of Bacteriology, v. 188, n. 23, p. 8272-8228. doi: <https://doi.org/10.1128/JB.00621-06>.

Shama, S., Brandão, D.A., Vargas, A.C., Costa, M.M. & Pedrozo, A.F. 2000. Bactérias com potencial patogênico nos rins e lesões externas de jundiás (*Rhamdia quelen*) cultivados em sistema semi-intensivo. Ciência Rural, Santa Maria, v. 30, n.2, p. 293-298, 2000. doi: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782000000200016>.

Silva, C.M. 2009. *Aeromonas* sp. em amostras de água e sedimento do rio Cocó. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará. Fortaleza.

Skwor, T., Shinko, J., Augustyniak, A., Gee, C. & Andraso, G. 2014. *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* predominate among potentially pathogenic ciprofloxacin and tetracycline resistant *Aeromonas* isolates from Late Erie. Applied and Environmental Microbiology, v. 80, n. 3, p. 841-84. doi: <https://doi.org/10.1128/AEM.03645-13>.

Sobral, M.M.R. 2018. Diversidade de *Aeromonas* spp. associadas a perfis de virulência nas águas da Lagoa Rodrigo de Freitas. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

Song, P., Deng, J., Hou, T., Fu, X., Zhang, L., Sun, L. & Liu, Y. 2019. *Aeromonas sobria* peritonitis in a peritoneal dialysis (PD) patient: a case report and review of the literature. BMC nephrology. v. 20, n. 1, p. 1-5. doi: <https://doi.org/10.1186/s12882-019-1361-7>.

souza, A.C.F., Guimarães, E.C., Santos, J.P., Costa, F.N. & Viana, D.C. 2022. Piscicultura no estado do Maranhão: perspectivas para aceleração da produção de peixes nativos. Scientia Plena, v. 18, p. 027401. doi: <https://doi.org/10.14808/sci.plena.2022.027401>.

Suhet, M., Schocken-Iturrino, R. & AmaraL, L. 2011. Atividade hemolítica e resistência a antimicrobianos por *Aeromonas* spp. isoladas de criação intensiva de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*). Ars Vet., v. 27, p.36-44.

Tavares-Dias, M. & Martins, M.L. 2017. An overall estimation of losses caused by diseases in the Brazilian fish farms. Journal of Parasitic Diseases, v. 41, n. 4, p. 913- 918. doi: <https://doi.org/10.1007/s12639-017-0938-y>.

Valcarcel, B., De-la-Cruz-Ku, G., Malpica, L. & Enriquez-Vera, D. 2021. Clinical features and outcome of *Aeromonas sobria* bacteremia in pediatric and adult patients with hematologic malignancies: A single-center retrospective study in Peru. Plos One, v. 16, n. 8, p. e0255910. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255910>.

Wang, G., Tyler, K.D., Munro, C. K. & Johnson, W. M.1996. Characterization of cytotoxic, hemolytic *Aeromonas caviae* clinical isolates and their identification by determining presence of a unique hemolysin gene. Journal of Clinical Microbiology Journal of Clinical Microbiology 34, n. 12, p. 3203-3205. doi: <https://doi.org/10.1128/jcm.34.12.3203-3205.1996>
WHO. World Health Organization. *Aeromonas*. In: World Health Organization Guidelines for Drinking-Water Quality. WHO, Geneva, 193. p. 1-17.

Zacaria, J. 2016. Diversidade, clonagem e caracterização de nucleases extracelulares de *Aeromonas* spp. Tese Doutorado - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Rio Grande do Sul.

Zamri-Saad, M., Amal. M. & Zahrah, S.A., Zulkafli A.R. 2014. Control and Prevention of Streptococcosis in Cultured Tilapia in Malaysia: A Review. Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science, v. 37, n. 4, p. 389-410.

TABLES

Table 1. *Aeromonas* sp. isolation location in tambaqui (*Colossoma macropomum*) and the frequency of bacterial isolates

Isolation locations	Total number of analyzed tissue fragments	Tissue fragments with bacterial isolates	Number of isolates	Rate of (%) isolates
Kidney	40	19	57	43.19
Liver	40	25	75	56.81
Total	80	44	132	100

Table 2. Biochemical profile of the 114 *Aeromonas* sp. isolates from tambaqui (*Colossoma macropomum*) coming from fish farms in Maranhão State's Metropolitan Region

Biochemical proofs	<i>Aeromonas</i> sp. Isolates		Pattern expected for <i>Aeromonas</i> sp.*
	Positive (%)	Negative (%)	
DNase	86.84	13.16	+/_
Growth in 0% NaCL	100.00	0.00	+
Growth in 1% NaCL	100.00	0.00	+
Growth in 6% NaCL	15.70	84.21	-
Indole Production	97.37	2.63	+/_
Voges Proskauer Reaction	71.05	28.95	+/_
Simmons Citrate	97.37	2.63	+/_
H ₂ S Production	97.37	2.63	+/_
Urea hydrolysis	100.00	0.00	-
Tryptophan deaminase	92.11	7.89	+/_
Lysine decarboxylation	100.00	0.00	+/_
Arginine decarboxylation	78.95%	21.05%	+/_
Ornithine decarboxylation	98.20	1.75	+/_
Malonate	100%	0%	
Glucose oxidation	97.37	2.63	+/_
Sucrose fermentation	97.37	2.63	+/_
Mannitol fermentation	100.00	0.00	+/_
Adonitol fermentation	71.05	28.95	
Myoinositol fermentation	81.58	18.42	+/_
Sorbitol fermentation	97.37	2.63	
Raffinose fermentation	89.47	10.53	
Rhamnose Fermentation	97.37	2.63	+/_
Maltose fermentation	100.00	0.00	+/_
Melobiose fermentation	100.00	0.00	
Esculin hydrolysis	94.74	5.26	+/_

According to Carnahan et al. (1991), Joseph & Carnahan (1994), Morita (2005), Cunha & Silva (2006), Silva (2009), Erden et al. (2011), Zacaria (2016), Lima (2017), Murray et al. (2017) and Koneman et al. (2018).

Table 3. *Aeromonas* spp. species isolated from tambaqui (*Colossoma macropomum*) coming from fish farms in Maranhão State's Metropolitan Region

Microorganism	Number of isolates	rate (%)
<i>A. veronii</i> by <i>veronii</i>	69	60.53
<i>A. caviae</i>	21	18.42
<i>A. sóbria</i>	6	5.26
<i>A. veronii</i> by <i>sóbria</i>	6	5.26
<i>A. schubertii</i>	6	5.26
<i>A. hydrophyla</i>	3	2.63
<i>A. media</i>	3	2.63

Table 4. Biochemical features of species belonging to genus *Aeromonas* isolated from tambaqui (*Colossoma macropomum*) coming from fish farms in Maranhão State's metropolitan Region

Biochemical tests	<i>Aeromonas</i> spp. Species						
	<i>A. veronii</i> by <i>veronii</i>	<i>A. sobria</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. schubertii</i>	<i>A. media</i>	<i>A. veronii</i> by <i>sobria</i>
Gram	-	-	-	-	-	-	-
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+
DNase	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
Growth in 0% NaCL	+	+	+	+	+	+	+
Growth in 1% NaCL	+	+	+	+	+	+	+
Growth in 6% NaCL	-	-	-	-	-	-	-
Indole	+	+	+	+	-	+/-	-
Voges Proskauer	+	-	-	+	+/-	-	+
Simmons Citrate	+/-	+	+	+	+	+	+
H ₂ S Production	-	-	-	+	-	-	-
Urea hydrolysis	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
Tryptophan deaminase	+/-	+	+/-	+	+	+	+
Lysine decarboxylation	+	+	+/-	+	+/-	+	+
Arginine decarboxylation	+/-	+/-	+	+	+	+	+
Ornithine decarboxylation	+/-	+/-	+/-	+/-	-	+/-	+/-
Malonate	+	+	+	+	+	+	+
Glucose oxidation	+	+	+	+	+/-	+	+
lactose fermentation	+	+	+	+	+	+	+
Sucrose fermentation	+	+	+	+	+/-	+/-	+
Mannitol fermentation	+	+	+	+	-	+	+
Adonitol fermentation	+/-	+	+/-	-	+	-	-
myoinositol fermentation	+/-	+	+/-	+	+	-	+
sorbitol fermentation	+/-	+	+	+	+	+	+
raffinose fermentation	+/-	+	+	+	+/-	-	+
Rhamnose Fermentation	+	+	+	+	+	-	+

Maltose fermentation	+	+	+	+	+	+	+
Melobiose fermentation	+	+	+	+	+	+	+
Esculin hydrolysis	+	-	+	+	+/-	+	-

CAPÍTULO IV

ANTIMICROBIAL RESISTANCE PROFILE OF *Aeromonas* spp. ISOLATED FROM *TAMBAQUI* FISH (*Colossoma macropomum*)

ABSTRACT

The aim of the current study is to assess the resistance profile of *Aeromonas* spp. individuals isolated from *tambaqui* fish (*Colossoma macropomum*) grown in fish farms located in São Luís Metropolitan Region - MA. In total, 114 bacterial strains belonging to species *Aeromonas* spp. were used in the experiment. Antimicrobial resistance profile was defined based on using the disk diffusion method and 10 antimicrobials. Isolates were classified as susceptible, susceptible upon increased exposure and resistant to the assessed principles; phenotypes showing resistance to multiple tested drugs (MDR) were classified. Bacterial strains presented widespread resistance to penicillin; as well as high oxacillin-, cefepime-, cefadroxil- and azithromycin-resistance rates. Ampicillin associated with sulbactam, neomycin and ofloxacin were the antimicrobials recording the highest sensitivity rate; high frequency of isolates (34.21%) were categorized as MDR phenotypes. Antimicrobial resistance was observed in the herein assessed *Aeromonas* spp. isolates, despite the lack of antimicrobials registered in Brazil to be used for *C. macropomum* fish farming purposes.

Keywords: Aeromonadaceae, bacterial resistance, fish farming.

PERFIL DE RESISTÊNCIA À ANTIMICROBIANOS DE *Aeromonas* spp. ISOLADAS DE TAMBAQUIS (*Colossoma macropomum*)

RESUMO

Objetivou-se avaliar o perfil de resistência de *Aeromonas* spp. isoladas de tambaquis (*Colossoma macropomum*) oriundos de cultivos da Região Metropolitana de São Luís - MA. Foram utilizadas 114 cepas bacterianas pertencentes a espécies de *Aeromonas* spp. e o perfil de resistência aos antimicrobianos foi realizado pelo método de difusão em disco com a utilização de 10 antimicrobianos. Os isolados foram classificados como sensível, sensível com exposição aumentada e resistente aos princípios avaliados e classificados os fenótipos com resistência múltipla as drogas testadas (MDR). As cepas bacterianas apresentaram resistência generalizada à penicilina; elevados percentuais de resistência a oxacilina, cefepime, cefadroxil e azitromicina. Os antimicrobianos com maior sensibilidade foram a ampicilina associada ao sulbactam, neomicina e ofloxacina e elevada frequência dos isolados (34,21%) foram categorizados como fenótipos MDR. Conclui-se que embora não existam antimicrobianos registrados no Brasil para uso no cultivo de *C. macropomum*, a resistência antimicrobiana está presente nos isolados de *Aeromonas* spp. avaliados.

Palavras-Chave: Aeromonadaceae, piscicultura, resistência bacteriana.

1. INTRODUCTION

Synthetic antimicrobials play essential role in preventing and treating bacterial infections, in protecting both human and animal health, as well as aquatic organisms produced in intensive systems. However, the use of non-authorized antimicrobials in aquaculture systems has mainly contributed to drug-resistance development in bacterial strains capable of affecting populations' health and safety, as well as the environmental ones. In addition, these substances can leave residues in animal-origin products (AOP), such as fish, and it can pose risks to human health due to their consumption (Gastalho, Silva and Ramos, 2014; De Sousa *et al.*, 2019; Pessoa *et al.*, 2019).

The emergence of antimicrobial resistance among food-borne pathogens is widely recorded in the literature; such a phenomenon is attributed to indiscriminate use of antimicrobials in animal production systems (Caniça *et al.*, 2018). Bacteria can undergo selective pressure due to antimicrobials' using; consequently, they can function as reservoir of resistance genes and horizontally transfer them to other bacterial species (Hussain *et al.*, 2017). Thus, bacteria presenting multidrug resistance (MDR) phenotypes are a growing concern for One Health, since they can directly transfer resistance genes to humans through AOP intake, and it can make it hard to treat infectious diseases in both humans and animals (Nhung, Chansiripornchai and Carrique-Mas, 2017).

Bacterial infection outbreaks are a limiting factor for aquaculture systems, since they affect production by decreasing its yield (Watts *et al.*, 2017); consequently, they lead to significant economic losses (Figueiredo and Leal, 2008; Turker, Yildirim and Karakas, 2009; Zamri-Saad *et al.*, 2014). Bacteria of interest to fish farming systems are classified as opportunistic; they are found in water and in fish microbiome, as well as can trigger bacterial infections in weakened hosts (Leira *et al.*, 2016). Despite the diversity of bacteria showing potential pathogenicity in fish, *Aeromonas* spp. stands out for its high frequency rates (Suhel *et al.*, 2011; Sebastião *et al.*, 2015).

Bacteria belonging to genus *Aeromonas* are quite numerous and acknowledged for their hemolytic and biofilm formation abilities, which can affect strains' virulence (Sebastião *et al.*, 2015; Pessoa *et al.*, 2019). Thirty-six *Aeromonas* spp. species are listed in the literature; at least 19 of them are considered emerging pathogens (Pessoa *et al.*, 2019; Fernández-Bravo and Figuera, 2020). *Aeromonas hydrophila* stands out among the aforementioned species as the most isolated one in fish farming systems, at global level, as well as for its ability to infect several hosts (Pessoa *et al.*, 2019). This bacterial species was recorded in tambaqui fish (*Colossoma macropomum*) grown in Brazil (Leão *et al.*, 2020; Pessoa *et al.*, 2020; Gallani *et al.*, 2020).

Maranhão State is the fourth largest native-fish producer in Brazil. According to report by the Brazilian Fisheries Association (Peixe BR, 2020), the aforementioned state produced 40,800 tons of fish in 2020 and, unlike the Brazilian context, which has tilapia as the most produced species, native fish grown in Maranhão State corroborate the peculiar feature of Maranhão fish farming and its acceptability in the State's internal market, with emphasis on tambaqui fish (*Colossoma macropomum*) and on its hybrids (Souza *et al.*, 2022). Thus, it is necessary implementing biosecurity techniques in fish farms in order to meet the growing demand for fish consumption and production at local, regional, national and international level. The prevention and treatment of bacterial infections, as well as multidrug-resistant bacteria control, stand out among the main biosecurity techniques. Therefore, the aim of the current study was to assess the antimicrobial resistance profile of *Aeromonas* spp. isolated from

tambaqui fish (*Colossoma macropomum*) grown in fish farms located in São Luís Metropolitan Region – MA.

2. MATERIALS AND METHODS

Ethical Aspects

All methodological procedures were carried out in compliance with ethical principles established by the Brazilian College of Animal Experimentation, as well as with the Animal Experimentation Ethics Committee (CEEA - Comitê de Ética em Experimentação Animal) of State University of Maranhão (UEMA - Universidade Estadual do Maranhão) (Protocol n. 09/2022).

Aeromonas spp. Bacterial Isolates

In total, 114 bacterial strains isolated from tambaqui fish (*Colossoma macropomum*) were used in the current study. The aforementioned fish individuals derived from fish farms located in São Luís Metropolitan Region - MA and they did not present clinical signs of aeromonosis. All strains were confirmed as species belonging to genus *Aeromonas*, based on staining (Gram staining) and biochemical tests (oxidase; catalase; indole; Voges Proskauer; Simmons citrate; H₂S production; urea hydrolysis; tryptophan deaminase; lysine, arginine and ornithine decarboxylation; malonate; glucose oxidation; lactose, sucrose, mannitol, adonitol, myoinositol, sorbitol, raffinose, rhamnose, maltose and melobiose fermentation; as well as esculin hydrolysis, DNase and growth at increasing NaCl concentrations [0%, 1% and 6%]), according to Holt, Williams and Wilkins (1994) and to the American Public Health Association (APHA, 2001).

Thus, seven *Aeromonas* species identified through biochemical tests were assessed; they totaled 114 strains, namely: *A. veronii* by *veronii* (n= 69), *A. caviae* (n= 21), *A. sobria* (n= 6), *A. schubertii* (n= 6), *A. veronii* by *sobria* (n= 6), *A. media* (n= 3) and *A. hydrophyla* (n= 3).

Antimicrobial Resistance Test

Resistance-to-antimicrobial-agents tests were carried out based on the disk diffusion method, in compliance with the protocol recommended in the guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2019). The aforementioned tests used disks holding 10 antimicrobial agents that represented the following classes: penicillins (penicillin G - 10µg; oxacillin - 1µg; and ampicillin associated with sodium sulbactam - 20µg); cephalosporins (cefepime - 30µg; cefoxitin - 30µg; cefadroxil - 30µg; and ceftriaxone - 30µg); quinolones (ofloxacin - 5µg); aminoglycosides (neomycin - 300µg); and macrolides (azithromycin - 15µg).

In order to carry out the resistance test, *Aeromonas* spp. isolates were inoculated in brain and heart infusion (BHI) broth and incubated at 37°C, for 24 hours, until they showed turbidity compatible to McFarland standard n. 0.5. Sowing was carried out with the aid of a sterile cotton swab, on plates filled with Müller-Hinton agar; five minutes later, antimicrobial disks were added to the plates, based on using flamed tweezers. Plates were incubated in bacteriological oven at 37°C, for 24 hours. After the incubation procedure was over, inhibition halos - formed around the respective active principles - were measured with millimeter ruler.

Results were compared to the measurement table set by the laboratory accounting for manufacturing the antimicrobial disks. Isolates were classified as susceptible, susceptible upon increased exposure and resistant to the assessed antimicrobial principles (Table 1).

Table 1. Interpretation pattern of disk diffusion test based on halo measurements, and results observed for sensitivity, sensitivity upon increased exposure and resistance of *Aeromonas* spp. isolates tested against 10 antimicrobials.

Antibiotic	Code	Classes	Concentration (μ g)	Diameter zone (mm)		
				S	I	R
Penicillin G	PEN	Penicillin	10	≥ 15	NR	≤ 14
Oxacillin	OXA		1.0	≥ 18	15 to 17	≤ 14
Ampicillin associated with Subactam	ASB		20	≥ 15	12 to 14	≤ 11
Cefepime	FEP	Cephalosporin	30	≥ 25	19 to 24	≤ 18
Cefoxitin	CFO		30	≥ 18	15 to 17	≤ 14
Cefadroxil	CFD		30	≥ 18	15 to 17	≤ 14
Ceftriaxone	CRO		30	≥ 23	20 to 22	≤ 19
Neomycin	NEO	Aminoglycoside	30	≥ 17	13 to 16	≤ 12
Ofloxacin	OFX	Quinolone	5.0	≥ 16	13 to 15	≤ 12
Azithromycin	AZI	Macrolide	15	≥ 13	NR	≤ 12

Wherein: S= susceptible; I= susceptible upon increased exposure; R= resistant; PEN= penicillin; OXA=oxacillin; ASB=ampicillin associated with sulbactam; FEP= cefepime; CFO= cefoxitin; CFD=cefadroxil; CRO= ceftriaxone; NEO=neomycin; OFX=ofloxacin; AZI = azithromycin.

The current study took into consideration multiple-drug resistance (MDR) phenotypes, as well as isolates showing resistance to three, or more, antimicrobial classes many different at the same time, according to Dos Santos *et al.* (2014).

3. RESULTS AND DISCUSSION

Aeromonas spp. isolates, deriving from tambaqui fish (*Colossoma macropomum*), have shown generalized resistance to penicillin, as well as high resistance to oxacillin, cefepime, cefadroxil and azithromycin (Table 2); this finding suggested environmental contamination and/or likely use of these antimicrobials in fish farms. According to Saavedra *et al.* (2004), Costa *et al.* (2008) and Franco *et al.* (2010), *Aeromonas* spp. resistance to beta-lactam antibiotics, such as penicillin, oxacillin, cefepime and cefadroxil has been increasing in aquaculture systems (Miranda, Tello and Keen, 2013). According to Harakaeh, Yassine and El-Fadel (2006), the increased number of antimicrobials-resistant microorganisms is explained by the indiscriminate and excessive use of these drugs in intensive animal production systems.

Table 2. Action of antimicrobials against *Aeromonas* spp. isolated from tambaqui fish (*Colossoma macropomum*), deriving from São Luís Metropolitan Region (Maranhão State).

<i>Aeromonas</i> spp. species	Tested Isolates (n)	Antimicrobial Resistance									
		PEN (%)	OXA (%)	ASB (%)	FEP (%)	CFO (%)	CFD (%)	CRO (%)	NEO (%)	OFX (%)	AZI (%)
<i>A. veronii</i> <i>by veronii</i>	69	100	94.20	4.34	8.70	17.40	78.26	8.70	-	-	34.79
<i>A. caviae</i>	21	100	100	-	14.29	-	71.42	14.29	28.58	-	-
<i>A. sobria</i>	6	100	100	-	50	-	50	50	-	-	50
<i>A.</i> <i>schubertii</i>	6	100	100	-	-	50	100	-	-	-	50
<i>A. veronii</i> <i>by sóbria</i>	6	100	100	-	-	-	50	-	-	-	50
<i>A. media</i>	3	100	100	-	100	-	-	-	-	-	-
<i>A.</i> <i>hydrophyla</i>	3	100	100	-	100	-	-	100	-	-	100

Wherein: PEN= penicillin (10 µg); OXA= oxacillin (1.0 µg); ASB= ampicillin associated with sulbactam (20 µg); FEP= cefepime (30 µg); CFO= ceftiofur (30 µg); CFD= cefadroxil (30 µg); CRO= ceftriaxone (30 µg); NEO= neomycin (30 µg); OFX= ofloxacin (5.0 µg); AZI=azithromycin (15 µg); % resistant isolates' rate.

Bacterial infections are one of the main causes of economic losses in intensive production systems like fish farming (Tavares-Dias and Martins, 2017; Bandeira Junior *et al.*, 2019; Pessoa *et al.*, 2019). According to Pessoa *et al.* (2020), *Aeromonas hydrophila* was the most prevalent bacterial species isolated (41.2%) from tambaqui fish, although other species were also isolated at lower rates, namely: *A. dhakensis*, *A. caviae*, *A. veronii* and *A. jandaei*. These findings have evidenced that tambaqui fish are not free from epizootic outbreaks caused by bacteria belonging to genus *Aeromonas*. Therefore, greater attention should be given to this bacterial genus in native fish species.

Only two antimicrobial drugs have their use approved by the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply (MAPA) to treat bacterial infections in fish, namely: oxytetracycline - used to treat salmonids and catfish, and florfenicol - used to treat trout and tilapia; both drugs are orally administered through fish feed (Sindan, 2018). Among these drugs, florfenicol is the antimicrobial drug most often used in aquaculture systems to treat several bacterial diseases in fish (Zhang *et al.*, 2020). However, according to Miranda *et al.* (2013) and Pessoa *et al.* (2019), antimicrobial drugs are misused as prophylactics and therapeutics in fish farms, a fact that contributes to the selection of resistant bacteria, as well as to the selection and dissemination of their respective antimicrobial resistance-encoding genes.

Ampicillin associated with sulbactam (penicillin), neomycin (aminoglycoside) and ofloxacin (quinolone) were the antibiotics showing the best activity against *Aeromonas* spp. isolates in the present study, i.e., the ones isolates presented the highest sensitivity to (Table 2). High sensitivity to antimicrobial “ampicillin” may be associated with the presence of compound “sulbactam”, which is an irreversible inhibitor of most beta-lactamases found in penicillin-

resistant organisms, such as *Aeromonas* sp., and it indicates synergistic interaction between these components.

Resistance to ampicillin is expected in most *Aeromonas* spp. species, in association with beta-lactamase enzymes' production (Miranda *et al.*, 2013); this antimicrobial drug is used as selective agent in culture media used to grow this bacterium (Jacobs and Chenia, 2007). Costa *et al.* (2008) observed high ampicillin resistance level in bacteria isolated from catfish (*Rhamdia quelen*) grown in Santa Maria County, Rio Grande do Sul State, Brazil. Franco *et al.* (2010) assessed bacterial isolates extracted from shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and recorded 12.5% isolates' sensitivity to ampicillin.

Quinolones are drugs widely used to treat furunculosis, among other infections caused by *Aeromonas* spp., in fish (Smith *et al.*, 2010). However, according to Alcaide, Blasco and Esteve (2010), there is concern about the indiscriminate use of quinolones, since resistance to this antibiotic emerges from the inhibition of nucleic acid synthesis. Akinboale, Peng and Barton (2008) observed sensitivity of bacteria isolated from a wide variety of fish species and aquaculture environments in Australia, in tests conducted with ciprofloxacin, which is a quinolone type. Costa *et al.* (2008) recorded 84.31% (n= 43) sensitivity to nalidixic acid (another quinolone) in 15 *Aeromonas* spp. isolates extracted from catfish (*Rhamdia quelen*). These findings are consistent with those observed for the same class of antimicrobial drugs in the present study.

Franco *et al.* (2010) assessed bacterial isolates extracted from shrimp (*L. itopenaeus vannamei*) and recorded 81.2% isolates' sensitivity to neomycin. Akinboale *et al.* (2008) observed sensitivity to gentamycin in bacteria isolated from a wide variety of fish species and aquaculture environments in Australia; gentamycin belongs to the class of aminoglycosides. The aforementioned findings are similar to the one observed in the present study.

High frequency of isolates (n= 39; 34.21%) were categorized as multidrug resistance (MDR) phenotypes, since they were resistant to three antimicrobials different classes, at the same time (Table 3). Penicillins and cephalosporins, as well as penicillin, oxacillin and cefadroxil, were the antimicrobial classes and antimicrobial drugs recording the highest resistance rates, respectively.

Table 3. Multidrug-resistance profile of *Aeromonas* spp. species isolated from tambaqui fish (*Colossoma macropomum*) grown in São Luís Metropolitan Region – Maranhão State.

<i>Aeromonas</i> spp. species	Number of isolates	Antibiotics
<i>A. veronii</i> by <i>veronii</i>	3	PEN-OXA-CFD-AZI
<i>A. veronii</i> by <i>veronii</i>	3	PEN-OXA-CFD-AZI
<i>A. veronii</i> by <i>veronii</i>	3	PEN-OXA-CFD-AZI
<i>A. veronii</i> by <i>veronii</i>	3	PEN-OXA-CFD-AZI
<i>A. veronii</i> by <i>veronii</i>	3	PEN-OXA-FEP-CFD-AZI
<i>A. veronii</i> by <i>veronii</i>	3	PEN-OXA-CFO-CFD-AZI
<i>A. sóbria</i>	3	PEN-OXA-FEP-CRO-AZI
<i>A. veronii</i> by <i>sóbria</i>	3	PEN-OXA-CFD-AZI

<i>A. caviae</i>	3	PEN-OXA-FEP-NEO-CFO-CFD-CRO
<i>A. caviae</i>	3	PEN-OXA-NEO-CFD
<i>A. hydrophyla</i>	3	PEN-OXA-FEP- CRO-AZI
<i>A. schubertii</i>	3	PEN-OXA-CFO-CFD-AZI
<i>A. schubertii</i>	3	PEN-OXA-CFD-AZI

WHEREIN: PEN= PENICILLIN (10 µG); OXA= OXACILLIN (1.0 µG); FEP= CEFEPIME (30 µG); CFO= CEFOXITIN (30 µG); CFD= CEFADROXIL (30 µG); CRO= CEFTRIAXONE (30 µG); NEO= NEOMYCIN (30 µG); AND AZI= AZITHROMYCIN (15 µG).

Aeromonas spp. species presented different resistance profiles in the antimicrobial susceptibility test (Table 3), with emphasis on the multidrug resistance observed for the following isolates: *A. veronii* by *veronii* (PEN-OXA-FEP-CFD-AZI), *A. sobria* (PEN-OXA-FEP-CRO-AZI), *A. caviae* (PEN-OXA-FEP-NEO-CFO-CFD-CRO), *A. hydrophyla* (PEN-OXA-FEP-CRO-AZI) and *A. schubertii* (PEN-OXA-CFO-CFD-AZI). Resistance profiles observed for fourth-generation cephalosporin (cefepime) in *A. veronii* by *veronii*, *Aeromonas sobria*, *A. caviae* and *A. hydrophyla* is a finding of particular clinical-epidemiological interest.

The high frequency of isolates showing MDR profile in the current study represents the risk of spreading antimicrobial resistance to humans through contaminated fish intake. Food contamination with MDR bacteria can take place at different production chain stages, and it makes it hard to define the antimicrobial resistance origin (Oniciuc *et al.*, 2018). However, according to Khan *et al.* (2018), indiscriminate use of antimicrobial drugs is the main cause of resistant microorganisms' selection in bacterial populations and of resistance induction in certain bacterial species.

According to Hirsch *et al.* (2006), the circulation of multi-resistant *Aeromonas* species in fish can increase the risks of disseminating resistance genes through plasmids or transposons, and it implies the need of continuously monitoring antimicrobial resistance, mainly in intensive production systems.

Antibiotic-resistant bacteria transfer to humans through contaminated food is an emerging public health issue. The literature has fewer studies focused on investigating antibiotic resistance in bacteria isolated from aquatic animals than studies focused on investigating this topic in land-based food-producing animals. The present study provides further support to the hypothesis that there is potential risk of transferring resistant bacteria to humans through fish intake.

4. CONCLUSIONS

Based on findings in the current study, it is possible concluding that:

- Despite the lack of antimicrobial drugs registered in Brazil to be used for *Colossoma macropomum* culture purposes, antimicrobial resistance was observed in *Aeromonas* spp. isolated from tambaqui fish.
- Multiresistance to three or more antimicrobials observed in high frequency of *Aeromonas* spp. evaluated raises concern about fish farming in São Luís Metropolitan Region - MA, as well as about human health, given the likelihood of human infections caused by resistant bacteria due to fish intake.
- Given the clinical and epidemiological implications of *Aeromonas* spp. species investigated in the present study, as well as the identification of antimicrobial drug resistance and multidrug resistance profiles, it is worth emphasizing the urgent need of both warning about and clarifying these pathogens' significance for Public Health. This

knowledge can positively help establishing preventive infection control guidelines in intensive fish farming carried out in Maranhão State and countrywide.

ACKNOWLEDGEMENTS

To the Pro-Rectorate for Research (PPG) of the State University of Maranhão for awarding the scientific initiation bursary for carrying out this investigation (Process BIC-11248/22). This study was funded by the Support Foundation for Research and Scientific and Technological Development of the State of Maranhão (FAPEMA - Process 06453/22).

REFERENCES

- AKINBOWALE, O. L.; PENG, H.; BARTON, M. D. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, n. 5, p.1103-1113, 2006. <https://10.1111/j.1365-2672.2006.02812.x>.
- ALCAIDE, E.; BLASCO, M. D.; ESTEVE, C. Mechanisms of quinolone resistance in *Aeromonas* species isolated from humans, water and eels. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 1, p.40-45, 2010. <https://10.1016/j.resmic.2009.10.006>. Epub 2009 Nov 10.
- APHA. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Compendium of methods for microbiological examination of foods**. 3rd ed. Washington: American Public Health Association, 2001.
- BANDEIRA JUNIOR, G. *et al.* *Aeromonas hydrophila* infection in silver catfish causes hyperlocomotion related to stress. **Microbial Pathogenesis**, v. 132, p. 261-265, 2019. <https://10.1016/j.micpath.2019.05.017>.
- CANIÇA, M. *et al.* Antibiotic resistance in food borne bacteria. **Trends in Food Science & Technology**, v. 84, p. 41-44, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.08.001>.
- CLSI. **Suggested Grouping of US-FDA Approved Antimicrobial Agents That Should Be Considered for Routine Testing and Reporting on Non fastidious Organisms by Clinical Laboratories**. 29ed. CLSI guideline M100-S29. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Institute, 2019.
- COSTA, M. M. *et al.* Sensibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de Jundiá (*Rhamdia quelen*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 10, p. 477-480, 2008.
- DE SOUSA *et al.* Atividade antimicrobiana “*in vitro*” de óleos essenciais contra patógenos de peixes. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 10, p. 17911-17921, 2019. <https://doi.org/10.34117/bjdv5n10-057>.
- DOS SANTOS, F. G. F. Microbiota bacteriana com potencial patogênico em pacamã e perfil de sensibilidade a antimicrobianos. **Revista Caatinga**, v. 27, n. 2, p. 176-183, 2014.
- FERNÁNDEZ-BRAVO, A; FIGUERA, M. J. An Update on the Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Epidemiology, and Pathogenicity. **Microorganisms**, v. 8, n. 1, p. 1-39, 2020. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010129>.

- FIGUEIREDO, H. C. P.; LEAL, C. A. G. Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 8-14, 2008. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982008001300002>.
- FRANCO, I. *et al.* Caracterização molecular e susceptibilidade aos antimicrobianos de isolados bacterianos de camarões (*Litopenaeus vannamei*). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 11, n. 2, p. 527-536, 2010.
- GALLANI, S. U. *et al.* Motile *Aeromonas* septicemia in tambaqui *Colossoma macropomum*: Pathogenicity, lethality and new insights for control and disinfection in aquaculture. **Microbial Pathogenesis**, v. 149, e104512, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104512>.
- GASTALHO, S.; SILVA, G.J. da, RAMOS, F. Uso de antibióticos em aquacultura e resistência bacteriana: Impacto em saúde pública. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, v. 3, n. 1, p. 29-45, 2014.
- HARAKAEH, S.; YASSINE, H.; EL-FADEL, M. Antimicrobial-resistant patterns of *Escherichia coli* and *Salmonella* strains in the aquatic Lebanese environments. **Environmental Pollution**, England, v. 143, p. 269-277, 2006.
- HIRSCH, D. *et al.* Identificação e resistência a antimicrobianos de espécies de *Aeromonas* móveis e isoladas de peixes e ambientes aquáticos. **Ciência Agrotécnica**, v. 30, p. 1211-1217, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.11.027>.
- HOLT, J. G. *et al.* **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9nd ed. New York: The Williams and Wilkins, 1994.
- HUSSAIN, A. *et al.* Risk of transmission of antimicrobial resistant *Escherichia coli* from commercial broiler and free-range retail chicken in India. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 2120, 2017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02120>.
- JACOBS, L.; CHENIA, Y. Characterization of integrons and tetracycline resistance determinants in *Aeromonas* spp. Isolated from South African Aquaculture Systems. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 114, p- 295-306, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.09.030>.
- KHAN, M. I. *et al.* Study on indiscriminate use of antibiotics in poultry feed and residues in broilers of Mymensingh city in Bangladesh. **Progressive Agriculture**, v. 29, n. 4, p. 345-352, 2018. <https://doi.org/10.3329/pa.v29i4.41348>.
- LEÃO, S. O. A. *et al.* Ocorrência de *Aeromonas* multirresistentes em tambaquis cultivados em tanques escavados. **Scientia Amazonia**, v. 9, n. 4, p. 17-24, 2020.
- LEIRA, M. H. *et al.* Principais infecções bacterianas na criação de peixes de água doce do Brasil - uma revisão. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v. 3, p. 44-59, 2016. <https://doi.org/10.4025/revcivet.v3i1.32436>.
- MIRANDA, C. D; TELLO, A.; KEEN, P. Mechanisms of antimicrobial resistance in finfish aquaculture environments. **Frontiers in Microbiology**, Switzerland, v. 22, n. 4, p. 233, 2013. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00233>.

- NHUNG, N T.; CHANSIRIPORNCHAI, N.; CARRIQUE-MAS, J. J. Antimicrobial resistance in bacterial poultry pathogens: a review. **Frontiers in veterinary science**, v. 4, p. 126, 2017. <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00126>.
- ONICIUC, E. *et al.* Food processing as a risk factor for antimicrobial resistance spread along the food chain. **Current Opinion in Food Science**, v. 30, p. 21-26, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.09.002>.
- PEIXE BR. Associação Brasileira da Piscicultura. **Anuário Brasileiro de Piscicultura**. v. 101, 2020.
- PESSOA, R. B. G. *et al.* The genus *Aeromonas*: a general approach. **Microbial Pathogenesis**, v. 130, p. 81-94, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.02.036>.
- PESSOA, R. B. G. *et al.* molecular characterization and evaluation of virulence traits of *Aeromonas* spp. isolated from the tambaqui fish (*Colossoma macropomum*). **Microbial Pathogenesis**, v. 147, e104273, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104273>
- SAAVEDRA, M. J. *et al.* Isolamento de *Pasteurella* spp. e *Vibrio* spp. em robalos (*Dicentrarchus labrax*) susceptibilidade a diferentes grupos de antibióticos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 56, n. 2, p. 277-279, 2004. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352004000200022>.
- SEBASTIÃO, F. A. *et al.* Identification of bacterial fish pathogens in Brazil by direct colony PCR and 16S rRNA gene sequencing. **Advances in Microbiology**, v. 5, n. 6, p. 409-424, 2015. <https://doi.org/10.4236/aim.2015.56042>.
- SINDAN. **Compêndio de Produtos Veterinários**, 2018. Disponível em: <http://www.cpv.com.br/cpv>. Acesso em: 10 fev. de 2023.
- SMITH, P. R. *et al.* **Guidelines for antimicrobial use in aquaculture**. In: GUARDABASSI, L., JENSEN, L. B., KRUSE, H. Guia de Antimicrobianos em Veterinária. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- SOUZA, A. C. F. *et al.* Piscicultura no estado do Maranhão: perspectivas para aceleração da produção de peixes nativos. **Scientia Plena**, v. 18, p. 027401, 2022. <https://doi.org/10.14808/sci.plena.2022.027401>.
- SUHET, M.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.; AMARAL, L. Atividade hemolítica e resistência a antimicrobianos por *Aeromonas* spp. isoladas de criação intensiva de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Ars Veterinária**, v.27, p.36-44, 2011.
- TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M. L. An overall estimation of losses caused by diseases in the Brazilian fish farms. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 41, n. 4, p. 913- 918, 2017. <https://doi.org/10.1007/s12639-017-0938-y>.
- TURKER, H.; YILDIRIM, A. B.; KARAKAŞ, F. P. Sensitivity of Bacteria Isolated from Fish to Some Medicinal Plants. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic**, v. 9, n. 2, p. 181-186, 2009. <https://doi.org/10.4194/trjfas.2009.0209>

- WATTS, J. E. M. *et al.* The Rising Tide of Antimicrobial Resistance in Aquaculture: Sources, Sinks and Solutions. **Marine Drugs**, v. 15, n. 6, p. 158, 2017. <https://doi.org/10.3390/md15060158>.
- ZAMRI-SAAD, M. *et al.* Control and Prevention of Streptococcosis in Cultured Tilapia in Malaysia: A review. **Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science**, v. 37, n. 4, p.389-410, 2014.
- ZHANG, Q. *et al.* Study on florfenicol-contained feeds delivery in *Dicentrarchus labrax* seawater recirculating and flow aquaculture systems. **Aquaculture**, v. 526, n. 12, p. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735326>.

CAPÍTULO V

5. GUIA ORIENTATIVO

5.1 *Aeromonas* em Peixes: o que é? como prevenir.

Este guia orientativo foi elaborado com a finalidade de levar informações a diferentes públicos que se dedicam ao estudo ou ao cultivo de peixes, sejam eles estudantes, pesquisadores, professores, técnicos, produtores e, ao público em geral interessado na temática. De forma ilustrada, em um total de 28 páginas, busca-se orientar, o público já mencionado, sobre *Aeromonas*, uma bactéria que apresenta importância clínica e epidemiológica para peixes, com impactos (sanitário, econômico e social) para os produtores e as criações e, também para a saúde única, já que algumas espécies são zoonóticas.

O guia está organizado em cinco tópicos: (i) Peixes – características gerais; importância dos peixes para o ecossistema; (ii) Doenças bacterianas em peixes; (iii) Gênero *Aeromonas* - – *Aeromonas* em ambientes aquáticos; *Aeromonas* em peixes; espécies de importância clínica; diagnóstico de *Aeromonas*; (iv) Problemática da aeromonose na indústria pesqueira – como prevenir; e, (v) Considerações finais.

Entende-se que com o compartilhamento de informações, os envolvidos na produção estarão mais capacitados para atuarem nas vigilâncias ativa (investigação imediata de suspeitas pelo serviço oficial) e passiva (notificações feitas por profissionais responsáveis técnicos de pisciculturas, produtores ou por qualquer pessoa que tenha conhecimento da ocorrência de mortalidade repentina de peixes), o que invariavelmente converge para a redução de casos e surtos de aeromonose nas criações, contribuindo com a sanidade e salvaguardando a saúde de peixes, do ser humano e do meio ambiente.

Com o material técnico produzido, infere-se que a tese cumpre uma importante missão das universidades em produzir e difundir conhecimento intramuros e extramuros. E, ainda, promove a interação dialógica, interdisciplinaridade e indissociabilidade entre o ensino-pesquisa-extensão, impactando na formação do estudante e na transformação social. Acredita-se que o público-alvo será beneficiado com obtenção de conhecimento atualizado e gratuito e como forma de promover a saúde única.

AEROMONAS EM PEIXES

O que é? Como prevenir?



Aeromonas em Peixes: o que é? como prevenir? / Izabela Alves Paiva ... [et al.]. – São Luís: EDUEMA, 2024.
28p. :il. color.

O guia orientativo constitui-se em produto bibliográfico elaborado por alunos, professores e pesquisadres da Universidade Estadual do Maranhão.

ISBN: 978-85-8227-437-8

Inclui bibliografia.

1.Aeromonose. 2.Pisciculturas 3.Saúde Única. 4.Extensão universitária. I.Paiva, Izabela Alves. II.Universidade Estadual do Maranhão. III.Título.

CDU: 639.3:579.84

Elaborado por Cássia Diniz – CRB 13/910

AUTORES

Izabela Alves Paiva

Natacha Bianca Araújo Silva

Nayanne França Campos

Rayssa Adryelle Costa Bezerra

Alanna Rayssa de Araújo Silva

Greiciene dos Santos de Jesus

Amanda Mara Teles

Thiago Anchieta de Melo

Ilka Márcia Ribeiro de Souza Serra

Nancyleni Pinto Chaves Bezerra

DIVISÃO DE EDITORAÇÃO

Jeanne Ferreira de Sousa da Silva

EDITOR RESPONSÁVEL

Jeanne Ferreira de Sousa da Silva

CONSELHO EDITORIAL

Alan Kardec Gomes Pachêco Filho

Ana Lucia Abreu Silva

Ana Lúcia Cunha Duarte

Cynthia Carvalho Martins

Eduardo Aurélio Barros Aguiar

Emanoel Cesar Pires de Assis

Emanoel Gomes de Moura

Fabiola Oliveira Aguiar

Helciane de Fátima Abreu Araújo

Helidacy Maria Muniz Corrêa

Jackson Ronie Sá da Silva

José Roberto Pereira de Sousa

José Sampaio de Mattos Jr

Luiz Carlos Araújo dos Santos

Marcos Aurélio Saquet

Maria Medianeira de Souza

Maria Claudene Barros

Rosa Elizabeth Acevedo Marin

Wilma Peres Costa

APRESENTAÇÃO

Olá, leitor!

Este guia orientativo foi elaborado para você! Ele é um material bibliográfico produzido por alunos, professores e pesquisadores da Universidade Estadual do Maranhão - UEMA.

Nesse material você encontrará um conteúdo ilustrado sobre: (i) peixes; (ii) doenças transmitidas por peixes; (iii) *Aeromonas* em peixes; entre outros assuntos.

E para acompanhar você leitor, nessa jornada de aprendizado, apresentamos a Ari, Nat e Dan, três jovens que desenvolvem pesquisas e acreditam que todos merecem ser transformados pela educação.

Portanto, esperamos que este guia orientativo se configure como uma importante ferramenta de atualização e obtenção de conhecimento.

Boa leitura!

Os autores.

SUMÁRIO

PEIXES.....	7
Características Gerais.....	8
Importância dos Peixes para o Ecossistema.....	10
DOENÇAS BACTERIANAS EM PEIXES.....	12
Doenças Bacterianas Transmitidas por Peixes.....	14
GÊNERO <i>Aeromonas</i>.....	14
<i>Aeromonas</i> em Ambientes Aquáticos.....	15
<i>Aeromonas</i> em Peixes.....	20
Espécies de Importância Clínica.....	22
Diagnóstico de <i>Aeromonas</i>	22
PROBLEMÁTICA DA Aeromonose NA INDÚSTRIA PESQUEIRA.....	24
Como Prevenir?.....	25
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	26
REFERÊNCIAS	27

PEIXES



Olá pessoal, prazer!
Me chamo Ari.



Eu, sou a Nat.



Eu, me chamo Dan!



Somos estudantes da Universidade Estadual do Maranhão, onde desenvolvemos pesquisas na área de diagnóstico de doenças em peixes.

PEIXES



Recentemente iniciamos um projeto sobre *Aeromonas* em peixes. A partir disso, resolvemos trazer algumas informações sobre essa bactéria para vocês. Vamos lá?

Estamos trabalhando com peixes. Os peixes, são animais vertebrados que vivem exclusivamente em ambientes aquáticos.

□ Características Gerais

Então! Que tal compreendermos algumas características dos peixes?

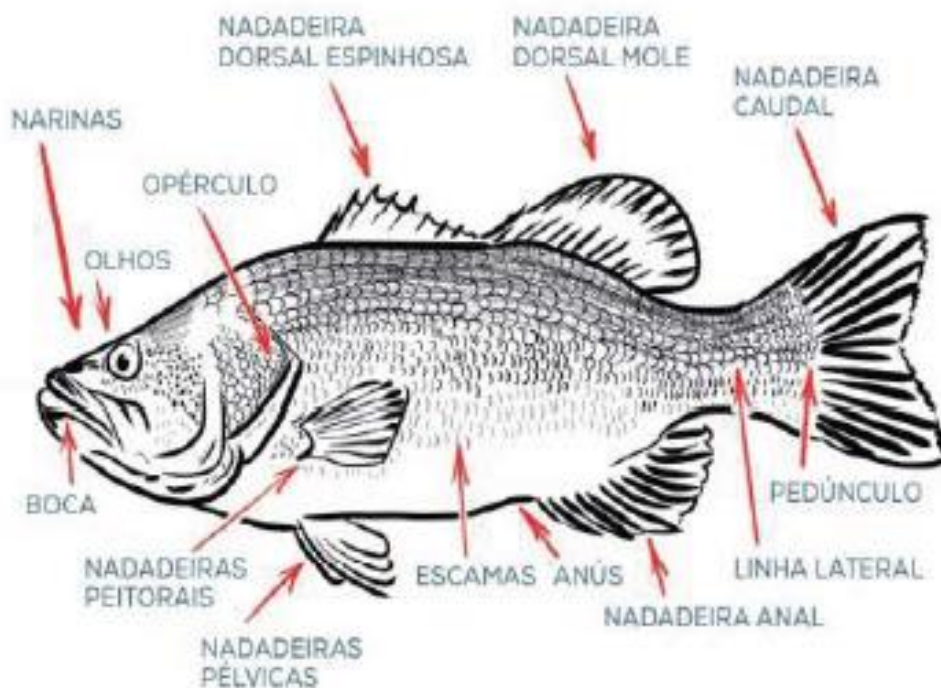
Como o Dan citou, os peixes são animais aquáticos, que respiram pelas brânquias. Existe uma variedade de espécies, com formatos e hábitos de vida diferentes.



PEIXES

Os peixes dominam os ambientes aquáticos desde sua origem há aproximadamente 500 milhões de anos. Para colonizar e ter sucesso em uma diversidade de ambientes, eles desenvolveram fascinantes adaptações anatômicas, fisiológicas, comportamentais e ecológicas (Zuanon *et al.*, 2015).

Figura 01. Características da anatomia externa dos peixes



Fonte: olhapeixe.com.br

PEIXES

Figura 02. Características da anatomia interna dos peixes.



Fonte: Alfonso (2023).

□ Importância dos Peixes para o Ecossistema



Quanta coisa já aprendemos, né pessoal! Mas, vocês já se perguntaram sobre a importância dos peixes para o ecossistema?

PEIXES



VOCÊ SABIA?

A presença de peixes em uma coleção de água depende da associação de inúmeros fatores ambientais, e não apenas da existência de água no estado líquido (Feio; Ferreira, 2019).

Vejamos abaixo a importância dos peixes para o meio ambiente.

❖ São uma fonte de alimento para muitos animais terrestres e aquáticos;

❖ São importantes para a circulação de nutrientes em ecossistemas aquáticos;

❖ Uma importante fonte de alimento para os seres humanos;

❖ Importantes para a saúde dos recifes de corais;

❖ São os principais predadores de insetos e outros animais aquáticos;

❖ Contribuem para a saúde do ecossistema através da remoção de detritos e outros materiais orgânicos da água.

Fonte: Elaborado pelos autores.

DOENÇAS BACTERIANAS EM PEIXES



Pessoal, até aqui, aprendermos sobre os peixes e suas características e importância.

Mas, vocês sabiam que os peixes são muito suscetíveis a ação de agentes zoonóticos que podem colar em risco a saúde dos peixes e do ser humano, à exemplo das bactérias.



Figura 03. Exemplos de agentes que podem infectar os peixes.



Fonte: criapeixe.blogspot.com

DOENÇAS BACTERIANAS EM PEIXES



VOCÊ SABIA?

As bactérias que afetam os peixes são consideradas oportunistas e estão frequentemente presentes na água e na microbiota de animais saudáveis, afetando-os em situações de estresse.

Uma questão importante a ser ressaltada é que a microbiota dos peixes é idêntica a microbiota da água em eles que estão inseridos.

(Orús *et al.*, 2015).



O surgimento de patógenos considerados zoonóticos em peixes está se tornando cada vez mais comum e representa um risco significativo à saúde humana.

DOENÇAS BACTERIANAS EM PEIXES

□ Doenças Bacterianas Transmitidas por Peixes



Olá pessoal, abaixo iremos conhecer algumas bactérias já identificadas em peixes.

Tabela 01. Espécies de bactérias identificadas em peixes.

Espécies de Peixes	Bactérias Identificadas
Tucunaré (<i>Cichla ocellaris</i>)	<i>Kocuria palustris</i> ; <i>Lactococcus raffinolactis</i>
Dourado (<i>Salminus brasiliensis</i>)	<i>Plesiomonas shigelloides</i>
Curimba (<i>Prochilodus lineatus</i>)	<i>Aeromonas hydrophila</i> ; <i>Macrococcus caseolyticus</i>
Mandi (<i>Pimelodus pohli</i>)	<i>Lactococcus lactis</i> ; <i>Agromyces mediolanus</i> ; <i>Moraxella osloensis</i> ; <i>Aeromonas veronii</i>

Fonte: Adaptado de Sales et al. (2022).

Então pessoal, depois de aprendemos sobre os peixes e suas características e importância para o ecossistema, conhecemos também, um pouco, sobre as bactérias que podem acometer os peixes, dentre elas a *Aeromonas*.

Vamos conhecer um pouco sobre o gênero *Aeromonas*?



GÊNERO *Aeromonas*



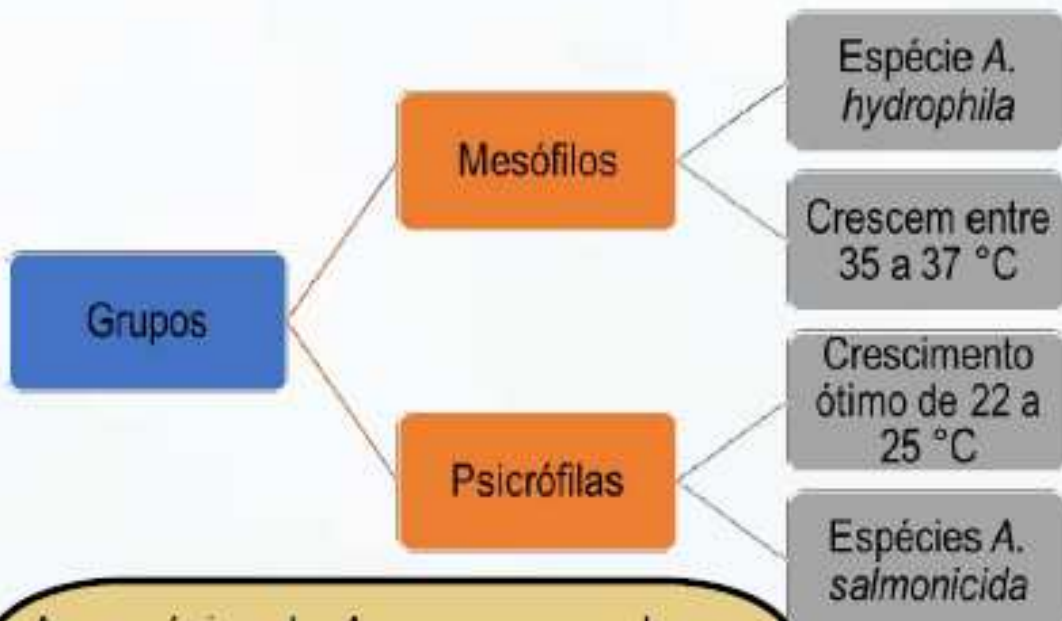
As bactérias do gênero *Aeromonas* são caracterizadas como bastonetes Gram negativos, anaeróbios facultativos e com 1 a 3,5 μm de comprimento.

Martinez-Murcia; Benlloch; Collins (1992)

GÊNERO *Aeromonas*



Vimos até aqui algumas características do gênero *Aeromonas*. Mas, vocês sabiam que as bactérias deste gênero são divididas em dois grupos? Vejamos abaixo essa divisão:



As espécies de *Aeromonas* produzem diversos tipos de enzimas hidrolíticas, tais como arilamidases, esterases, amilases, elastases, desoxirribonucleases, quitinases, peptidases e lipases.



GÊNERO *Aeromonas*

A taxonomia das principais espécies de *Aeromonas* está listada na Tabela 02.



Tabela 02. Classificação das espécies válidas e propostas do gênero *Aeromonas*

Espécie (Ano)	Clinicamente significativa	Distinta espécie *	
		Geneticamente	Bioquimicamente
<i>A. hydrophila</i> (1943)	Sim	Sim	Sim
<i>A. salmonicida</i> (1953)	Sim	Sim	Não
<i>A. sobria</i> (1981)	Não	Sim	Sim
<i>Meios A.</i> (1983)	Sim	Sim	Sim
<i>A. caviae</i> (1984)	Sim	Sim	Sim
<i>A. veronii</i> (1988)	Sim	Sim	Não
<i>A. eucrenophila</i> (1988)	Não	Sim	Sim
<i>A. schuberti</i> (1989)	Sim	Sim	Sim
<i>A. jandaei</i> (1992)	Sim	Sim	Sim
<i>A. trota</i> (1992)	Sim	Sim	Não
<i>A. enchelela</i> (1995)	Não	Sim	Sim
<i>A. bestiarum</i> (1996)	Sim	Sim	Não
<i>A. papaffii</i> (1997)	Sim	Sim	Não
<i>A. simiae</i> (2004)	Não	Sim	Sim
<i>A. molluscorum</i> (2004)	Não	Sim	Sim
<i>A. bivalvium</i> (2007)	Não	Sim	Sim
<i>A. aquariorum</i> (2008)	Não	Sim	Sim
<i>A. tecta</i> (2008)	Sim	Não	Não
<i>A. allonaccharophila</i> (1992)	Não	Não	Não
<i>A. culicicola</i> (2002)	Não	Sim	Não
<i>A. sharmana</i> (2006)	Não	Sim	Sim

Fonte: Lima (2017).

GÊNERO *Aeromonas*

□ *Aeromonas* em Ambientes Aquáticos

As *Aeromonas*, estão presentes em vários nichos e substratos, isso inclui alimentos, animais, aves, solos naturais, peixes e, principalmente ambientes aquáticos.



São bactérias naturais de ambientes aquáticos e apresentam alta capacidade de adaptação a uma grande diversidade desses ecossistemas, sendo observada sua presença em água doce e salgada.

Para saber!

As bactérias do gênero *Aeromonas* em sistemas de distribuição de água potável possui capacidade de colonizar a tubulação do sistema formando biofilmes (Bomo *et al.*, 2004).

GÊNERO *Aeromonas*



O QUE É UM BIOFILME?

É uma membrana pegajosa (matriz polimérica extracelular) que protege a adesão e sobrevivência de uma comunidade estruturada de micro-organismos sésseis em superfícies bióticas e/ou abióticas.

Figura 04. Ciclo de desenvolvimento de um biofilme



Fonte: Lima (2017).

Portanto pessoal, a água é a principal fonte de contaminação e um importante veículo para a disseminação de *Aeromonas* spp.



GÊNERO *Aeromonas*

□ *Aeromonas* em Peixes



Quanta coisa já aprendemos! Mas, não finaliza por aí, vamos entender um pouquinho sobre *Aeromonas* em peixes?

É um dos principais patógenos em peixes.

Figura 05. Peixes diagnosticados com *Aeromonas hydrophi-*



Fonte: abdurrasyidfadila.blogspot.com

GÊNERO *Aeromonas*

Para saber!

Para os peixes, a bactéria *Aeromonas* spp. é considerado oportunista, organismos patogênicos facultativos que se manifestam no hospedeiro enfraquecido e/ou infectado por outros patógenos.



O peixe é o alimento de origem animal que sofre deterioração mais rapidamente, uma vez que uma série de alterações se inicia imediatamente após a despesca.



VOCE SABIA?

A espécie *Aeromonas hydrophila* é a mais frequentemente isolada em peixes doentes.

GÊNERO *Aeromonas*

□ Espécies de Importância Clínica

Tabela 03. Espécies de *Aeromonas* sp. de importância clínica

Espécies	Sinais Clínicos
<i>A. hydrophila</i>	Lesões de pele Necrose Septicemia hemorrágica Abscesso ou ulcerações no pedúnculo caudal
<i>A. caviae</i>	
<i>A. sobria</i>	
<i>A. veronii</i>	
<i>A. schubertii</i>	

Fonte: Elaborado pelos autores.

□ Diagnóstico de *Aeromonas*



Quanta coisa né pessoal, mas ainda não acabou. Depois de todas as informações apresentadas é importante sabermos como é feito o diagnóstico de *Aeromonas*, né?

GÊNERO *Aeromonas*

Métodos convencionais de detecção

Figura 06. Método geral de isolamento de bactérias do gênero *Aeromonas*



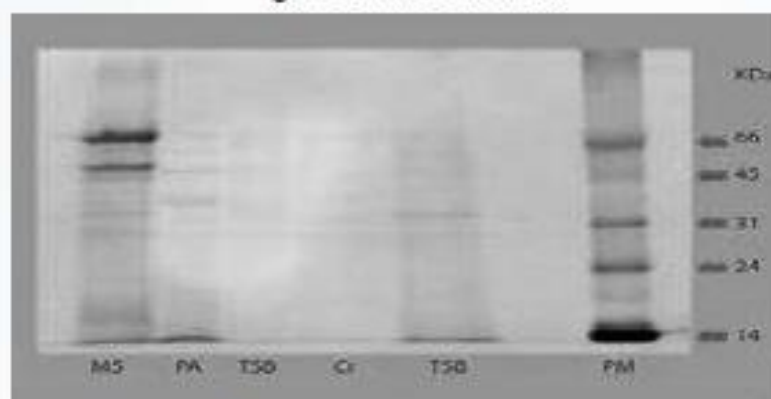
Figura 07. Métodos clínicos e ambientais para isolamento de bactérias do gênero *Aeromonas*



Fonte: McMahon e Wilson (2001), Kelly, Stroh e Jessop (1988).

Detecção Molecular

Figura 08. PCR convencional para identificação de bactérias do gênero *Aeromonas*.



Fonte: www.scielo.org.com

PROBLEMÁTICA DA AEROMONOSE NA INDÚSTRIA PESQUERIA



Pessoal, chegamos ao nosso último tópico. Muita coisa legal vimos até aqui.

Não esqueçam, o aumento na prevalência de enfermidades bacterianas em peixes induz perdas significativas na produção aquícola.

PROBLEMÁTICA DA AEROMONOSE NA INDÚSTRIA PESQUERIA

□ Como Prevenir?

Abaixo, trouxe alguns métodos para prevenção de *Aeromonas* nos peixes, principalmente de cultivo.



SE LIGA NA DICA!

O uso de antibióticos e vacinas, especialmente quando se trata da aquicultura, só podem ser utilizado após liberação pelos órgão competentes.

Desinfecção das estruturas e materiais utilizados durante o ciclo

Boas práticas no manejo alimentar.

A adoção de boas práticas de biossegurança é uma medida preventiva;

Uma nutrição de qualidade.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O aumento da prevalência de doenças bacterianas em peixes induz perdas na produção aquícola que afeta o desenvolvimento do setor em muitos países. As bactérias do gênero *Aeromonas* são um dos principais causadores de perdas na piscicultura. Mas, esse agente pode ser identificado, também em peixes de ambiente natural

Pessoal, chegamos ao final do nosso guia, esperamos que tenha sido uma excelente leitura e que você consiga colocar em prática todo conhecimento adquirido ao longo da sua leitura e que você tenham uma excelente trajetória na busca pelo conhecimento.

Os autores!

REFERÊNCIAS

BOMO, A. M. *et al.* Bacterial removal and protozoan grazing in biological sand filters. **Journal of Environmental Quality**, v. 33, n. 3, p. 1041-1047, 2004.

FEIO, M. J.; FERREIRA, V. Rios de Portugal: comunidades, processos e alterações. Coimbra: **Imprensa da Universidade de Coimbra**, 2019. 447 p.

JOSEPH, S. W.; CARNAHAN, A. F. Update on the Genus *Aeromonas*-Despite progress, many questions about this sometime pathogen remain unanswered. **ASM News-American Society for Microbiology**, v. 66, n. 4, p. 218-223, 2000.

MARTINEZ-MURCIA, A. J.; BENLLOCH, S.; COLLINS, M. D. Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing: lack of congruence with results of DNA-DNA hybridizations. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 412-421, 1992.

ZUANON, J. *et al.* Guia de peixes da Reserva Adolpho Ducke. Manaus: **Editora INPA**, 2015. 155 p.

REALIZAÇÃO



**Programa de
Pós-graduação**
em Ecologia e
Conservação da
Biodiversidade



Programa de pós-graduação profissional
Defesa Sanitária Animal

APOIO



Uema
UNIVERSIDADE ESTADUAL
DO MARANHÃO



CAPÍTULO VI

6. MANUAL ORIENTATIVO

6.1. Ações do Serviço Veterinário Oficial na Cadeia Produtiva de Animais Aquáticos de Cultivo

Este manual orientativo foi elaborado com a finalidade de levar informações a diferentes públicos que se dedicam ao estudo ou ao cultivo de peixes, sejam eles estudantes, pesquisadores, professores, técnicos, produtores e ao público em geral interessado na temática. Mas, sobretudo, pensado para nortear as atividades de servidores vinculados à Órgão Executores de Sanidade Agropecuária (OESA), como a Agência Estadual de Defesa Agropecuária do Maranhão, no tocante a sanidades de animais aquáticos (peixes, moluscos, crustáceos etc.).

De forma ilustrada, em um total de 26 páginas, busca-se orientar, o público já mencionado, sobre as ações do serviço veterinário oficial na cadeia produtiva de animais aquáticos de cultivo, no seguintes quesitos: (i) Ações do SVO na ULSAV; (ii) Ações do SVO na propriedade; (iii) Atividades do SVO no transporte; (iv) Atribuições do SVO na indústria; e, (v) Educação sanitária.

Com o material técnico produzido, espera-se que a vigilância ativa (investigação imediata de suspeitas pelo serviço oficial) e passiva (notificações feitas por profissionais responsáveis técnicos de pisciculturas, produtores ou por qualquer pessoa que tenha conhecimento da ocorrência de mortalidade repentina de peixes) sejam mais efetivas e célere, o que, invariavelmente, converge para a redução de casos e surtos de doenças nas criações, contribuindo com a sanidade e salvaguardando a saúde de peixes, dos consumidores e do meio ambiente.

Infere-se que a tese cumpre uma importante missão das universidades em produzir e difundir conhecimento intramuros e extramuros. E, ainda, a interação dialógica, interdisciplinaridade e indissociabilidade entre o ensino-pesquisa-extensão, impacto na formação do estudante e na transformação social. Acredita-se que o público-alvo será beneficiado com obtenção de conhecimento atualizado e gratuito e como forma de promover o desenvolvimento local.

**AÇÕES DO SERVIÇO
VETERINÁRIO OFICIAL NA
CADEIA PRODUTIVA DOS
ANIMAIS AQUÁTICOS DE
CULTIVO**

GUIA DO SERVIÇO VETERINÁRIO OFICIAL

Orientação para promoção da sanidade dos
animais aquáticos de cultivo no Maranhão

Produção

Agência Estadual de Defesa Agropecuária do Maranhão
Coordenação de Defesa Animal

Governador

Carlos Brandão

Secretário de Agricultura e Pecuária

José Antônio Heluy

Presidente da AGED

Cauê Ávila Aragão

Diretor de Defesa e Inspeção Sanitária Animal

Evandro Lemos

Coordenadora de Defesa Animal

Jucielly Oliveira

Editora de Texto

Alanna Raissa de Araújo Silva
Nancyleni Pinto Chaves Bezerra

Colaboradores

José Ribamar Lopes
Izabela Alves Paiva
Débora Martin Silva Santos

Revisão Textual

Suyane Santos Costa Scanssette

Imagens

Acervo da AGED e imagens públicas da internet

Diagramação

Daniilo Damasceno Rodrigues (Estagiário)

Silva, Alanna Raissa de Araújo.
Ações do serviço veterinário oficial na cadeia produtiva dos animais
aquáticos de cultivo (curso eletrônico) / Alanna Raissa de Araújo Silva,
Nancyleni Pinto Chaves Bezerra; colaboradores, José Ribamar Lopes, Izabela
Alves Paiva, Débora Martin Silva Santos. – São Luís: [s.n.], 2023.
24 p. il. color.

O manual técnico em formato digital constitui-se produto do Doutorado
Profissional em Defesa Sanitária Animal, da Universidade Estadual do
Maranhão.

1. Serviço veterinário oficial. 2. Aquicultura. 3. Animais aquáticos - Controle
de doenças. I. Maranhão. Agência Estadual de Defesa Agropecuária.
II. Bezerra, Nancyleni Pinto Chaves. III. Lopes, José Ribamar. IV. Paiva, Izabela
Alves. V. Silva, Débora Martin. VI. Título.

CDU: 636.09.639.3/.5

SUMÁRIO

1. Introdução	05
2. Ações do SVO na USLAV	06
3. Ações do SVO na Propriedade	10
4. Atividades do SVO no Transporte	15
5. Atribuições do SVO na Indústria	20
6. Educação Sanitária	23
7. Considerações Finais	24

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AGED - Agência Estadual de Defesa Agropecuária do Maranhão

CRAS - Centro de Referência de Assistência Social

FORM-IN - Formulário de Investigação Inicial

GTA - Guia de Trânsito Animal

LFDA - Laboratório Federal de Defesa Agropecuária

NT - Nota Técnica

PeixeBR - Associação Brasileira da Piscicultura

pH - Potencial Hidrogeniônico

RENAQUA - Rede Nacional de Laboratórios do Ministério da Pesca e Aquicultura

SIGAMA - Sistema de Gestão Agropecuária do Maranhão

SISBRAVET - Sistema Brasileiro de Vigilância e Emergências Veterinárias

SVO - Serviço Veterinário Oficial

ULSAV - Unidade Local de Sanidade Animal e Vegetal

01 INTRODUÇÃO

05

O Estado do Maranhão apresenta boas características de clima, solo e potencial aquífero que o coloca em posição de destaque na produção de animais aquáticos de cultivo.

Atualmente, o estado tem se destacado na aquicultura, a exemplo da piscicultura, no ranking nacional e ocupa o 5º lugar com produção de 47.700 toneladas de peixes em 2020, conforme dados da Associação da PeixeBR de 2021. Já de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2019), o estado produziu 363.665 kg de camarão e 21.600kg de moluscos bivalves.

Com o crescimento da atividade produtiva de animais aquáticos há a necessidade de adoção de medidas preventivas e de controle para minimizar e/ou evitar a ocorrência de doenças nestes organismos. Neste sentido, elaborou-se o presente guia orientativo com o objetivo de disponibilizar informações atualizadas ao Serviço Veterinário Oficial (SVO).



06

02 AÇÕES DO SVO NA ULSAV

Tudo o que você precisa saber sobre as ações do SVO na ULSAV

O que o SVO deverá fazer na ULSAV em relação à aquicultura?

Cadastro da propriedade e dos animais aquáticos, conforme formulário de cadastro único.



Aponte o celular para o QR CODE e acesse o Formulário de Cadastro

O que é preciso para o SVO cadastrar a propriedade na AGED?

- Ter acesso aos documentos pessoais do proprietário ou de outros que estejam com a posse da propriedade (arrendatário, posseiro, meeiro, etc);
- Contato (telefone e e-mail) do proprietário ou daqueles que estejam na posse da propriedade e o endereço residencial destes.

Qual o passo a passo para o SVO cadastrar propriedade nova e animais aquáticos no SIGAMA?

Assista ao vídeo instrutivo nº 001/2022 disponível no canal "Plataforma Aged" no YouTube



Aponte o celular para o QR CODE e acesse os vídeos sobre cadastramento



[DICA]

Tenha acesso aos materiais clicando no QR Code



Elaborado com CamScanner

08

A emissão de GTA para o trânsito de moluscos bivalves para estabelecimentos de processamento somente será permitida se os animais forem provenientes de locais com retirada liberada de moluscos bivalves ou locais com retirada liberada sob condição.

Em se tratando de emissão de GTA, quais as hipóteses de dispensa:

- ✓ É proibida a emissão da GTA para animais aquáticos recolhidos mortos no momento da despesa.



- ✓ Ficará dispensada a emissão da GTA quando o local da despesa for contíguo à área do estabelecimento processador e ambos pertençam à mesma pessoa jurídica, no caso de transporte de animais aquáticos com a finalidade de abate/processamento. Neste caso, o transporte ficará condicionado à emissão de Formulário de Origem do Pescado, conforme **Anexo III da Instrução Normativa do Ministério da Pesca e Aquicultura nº4 de 04/02/2015.**



✓ Ficarà dispensada a emissão da GTA quando se tratar de transporte de animais aquáticos vivos, seu material de multiplicação e matéria-prima, amparados por formulários próprios, com finalidade de diagnóstico pela Rede Federal de Laboratórios de Defesa Agropecuária, nesta incluídos os Laboratórios de Pesca e Aquicultura (RENAQUA) e laboratórios credenciados públicos e privados.

✓ Não deverá ser emitida Guia de Trânsito Animal para respaldar trânsito de animais aquáticos ou sua matéria prima quando a última origem for um estabelecimento com inspeção sanitária oficial, mesmo no caso de animais que saiam vivos do estabelecimento para qualquer destino.

Obs: A única exceção é quando há retorno de animais de estabelecimento de processamento para um estabelecimento de aquicultura.

✓ Não deverá ser emitida Guia de Trânsito Animal para respaldar trânsito de animais aquáticos ou sua matéria prima quando a última origem for a pesca/extrativismo, sendo que para produtos de pesca o documento comprobatório de origem é a Nota Fiscal do pescador profissional.

03 AÇÕES DO SVO NA PROPRIEDADE

10

Tudo o que você precisa saber sobre as ações do SVO na ULSAV



O que é preciso para o SVO concluir o cadastro novo da propriedade?

Realizar a visita na propriedade *in locu* para preenchimento do formulário de cadastro único, para obtenção dos seguintes dados:

Área da propriedade;

Informações sobre instalações e infraestrutura da propriedade;

Dados sobre todas as explorações pecuárias existentes além dos organismos aquáticos;

Os pontos das coordenadas geográficas na propriedade.



11

Tipos de tanques que devem ser apontados no cadastro

TANQUE ESCAVADO



TANQUE ESCAVADO



TANQUE DE GEOMEMBRANA



TANQUE DE GEOMEMBRANA



TANQUE DE FIBROCIMENTO



TANQUE REDE



VIVEIRO



Conhecendo os Sistemas de Produção

Extensivo

O sistema extensivo consiste em colocar os peixes juvenis em lagos ou represas, onde permanecerão até o momento de serem capturados. Esse sistema é mais voltado para a subsistência ou comércio local, pois a produção final é pequena. Ainda nesse sistema, pode-se utilizar a técnica do policultivo, quando várias espécies são cultivadas ao mesmo tempo.



Semi-intensivo

Nesse sistema, amplamente difundido no Brasil, também se usa os viveiros ou barramentos, mas há fornecimento de alimentação para os peixes, sendo esse alimento constituído por rações balanceadas e alimentos vivos. Esse fornecimento deve ser feito desde a fase de alevinos até alcançarem o ponto de comercialização.



Sistema Intensivo

Esse tem a finalidade de obter alta produtividade e, conseqüentemente, precisa de estruturas adequadas, maior atenção à qualidade da água e maior adoção de tecnologias e equipamentos. Ainda deve ser a principal atividade da propriedade haja vista o alto investimento e a necessidade de dedicação a ela.



Sistema Superintensivo

No superintensivo é permitida uma densidade de povoamento ainda maior do que a do sistema intensivo. Para conseguir essa alta concentração de peixes, eles são cultivados em estruturas apropriadas como caixas adaptadas, tanques circulares, tanques-lona ou tanques-rede. Obviamente, apresenta maior custo de implantação, mas também permite produtividade ainda maior.



13

O que o SVO deve verificar durante a vigilância epidemiológica na propriedade?

- ✓ Vistoria do plantel como um todo, caso seja possível, e inspeção dos animais doentes, se houver;
- ✓ Verificar os aspectos higiênicos do ambiente, colaboradores e visitantes, se existe controle de pragas, de animais silvestres e domésticos, como é feito o descarte dos resíduos orgânicos e descarte responsável de lixo e efluentes;
- ✓ verificar o acesso de veículos próprios e de visitantes.

Em se tratando de animais aquáticos, o que deve ser verificado e inspecionado, de acordo com a espécie?

A-Piscicultura:

- 1- Verificar a procedência dos peixes (GTA);
- 2- Verificar os tanques, incluindo: capacidade de adensamento desses e aspectos higiênicos;
- 3- Verificar a qualidade da água dos tanques, incluindo: cor; pH, oxigênio dissolvido, salinidade, temperatura, condutividade (obtidos com a utilização de sonda multiparâmetro ou kits rápidos) e turbidez (disco de secchi); nitrato, amônia, dureza e ferro (Kit colorimétrico);
- 4- Verificar o comportamento dos peixes no tanque, tais como: estão letárgicos (parados), de boca aberta, buscando ar na superfície, em conflito no tanque, com coloração estranha, etc.

B-Carcinicultura:

- 1- Verificar a procedência das pós-larvas de camarão (GTA);
- 2- Verificar os tanques, incluindo: capacidade de adensamento desses e aspectos higiênicos.

C-Malacocultura:

- 1- Verificar a procedência dos moluscos;
- 2- Boas práticas de manejo no cultivo;
- 3- Observar as características de qualidade das ostras, tais como: ostras com conchas fechadas; se as ostras estão perdendo peso; se houve alta taxa de mortalidade.

14

Diante da queixa de animais aquáticos doentes ou mortos, o que fazer?

1- O SVO irá registrar os dados sobre a queixa no formulário de investigação inicial- FORM IN e inserir os dados no SISBRAVET;



Nota: recomenda-se registro fotográfico das ações.

2- O SVO poderá coletar amostras de animais doentes para envio ao laboratório dos LFDA-MG e LFDA-GO para realização de análises microbiológica, físico-química e toxicológica.

Obs: não enviar animais moribundos para serem analisados no laboratório.

3- O SVO irá recomendar o descarte correto (biodigestão) dos animais moribundos;



4- O SVO irá verificar como é feita as boas práticas de manejo, limpeza do ambiente, higienização (tanques, laboratório, depósito de ração, etc); despesca.

04 ATIVIDADES DO SVO NO TRÂNSITO

15

O que o svo deve verificar durante a fiscalização no trânsito dos animais aquáticos?

Verificar se o motorista está com a GTA dos animais aquáticos que estão sendo transportados;



Averiguar as condições higiênicas do transporte;



Avaliar os atributos de frescor, respeitando as particularidades de cada espécie, verificando as características sensoriais que são aplicáveis a pescado fresco, resfriado e congelado.



16

CARACTERÍSTICAS SENSORIAS: Peixes

Superfície do corpo limpa, com relativo brilho metálico e reflexos multicores próprios da espécie, sem qualquer pigmentação estranha

Olhos claros, vivos, brilhantes, luzentes, convexos, transparentes, ocupando toda a cavidade orbitária

Brânquias ou guelras róseas ou vermelhas, úmidas e brilhantes com odor natural, próprio e suave

Abdômen com forma normal, firme, não deixando impressão duradoura à pressão dos dedos

Escamas brilhantes, bem aderentes à pele, e nadadeiras apresentando certa resistência aos movimentos provocados

Carne firme, consistência elástica, da cor própria da espécie

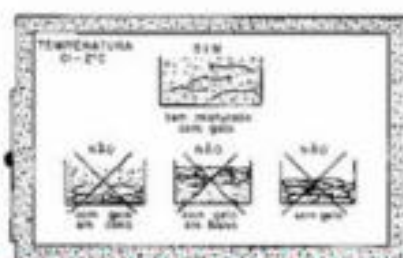
Vísceras íntegras, perfeitamente diferenciadas, peritônio aderente à parede da cavidade celomática

Ânus fechado

Odor próprio, característico da espécie

Nota: O trânsito deve ser feito em condições adequadas de higiene

Formas correta e incorreta de conservação do pescado



>> IMPORTANTE <<

Colocar o pescado no gelo de qualidade e em quantidade adequada é uma das melhores formas de manter sua qualidade.

DICA: O ideal é colocar 1,5 kg de gelo para cada quilo de pescado, sendo que a primeira e a última camadas serão sempre de gelo, com o pescado entre elas.

17

CARACTERÍSTICAS SENSORIAS: Crustáceos

Aspecto geral brilhante, úmido

Corpo em curvatura natural, rígida, artigos firmes e resistentes

Carapaça bem aderente ao corpo

Coloração própria da espécie, sem qualquer pigmentação estranha

Olhos vivos, proeminentes

Odor próprio e suave

Lagostas, siris e caranguejos, estarem vivos e vigorosos

Nota:

O trânsito deve ser feito em condições adequadas de conforto térmico para os animais.

O trânsito deve ser feito em condições adequadas de higiene.

>> IMPORTANTE <<

Transportar os caranguejos em caixas tipo monoblocos (37x54x32cm), com 60 animais/caixa, contendo espumas umedecidas sob e sobre os animais.



18

CARACTERÍSTICAS SENSORIAS: Anfíbios

Odor suave e característico da espécie

Cor rosa pálida na carne, branca e brilhante nas proximidades das articulações

Ausência de lesões e elementos estranhos

Coloração própria da espécie, sem qualquer pigmentação estranha

Textura firme, elástica e tenra

*Nota: O trânsito deve ser feito em condições adequadas de higiene.***CARACTERÍSTICAS SENSORIAS: Moluscos****Bivalves**

Estarem vivos, com valvas fechadas e com retenção de água incolor e límpida nas conchas

Odor próprio e suave

Carne úmida, bem aderente à concha, de aspecto esponjoso, da cor característica de cada espécie

Gastropodes

Carne úmida, aderida à concha, de cor característica de cada espécie

Odor próprio e suave

Estarem vivos e vigorosos

Cefalópodes

Pele lisa e úmida

Olhos vivos, proeminentes nas órbitas

Carne firme e elástica

Ausência de qualquer pigmentação estranha à espécie

Odor próprio

Notas:*O trânsito deve ser feito em condições adequadas de conforto térmico para os animais**O trânsito deve ser feito em condições adequadas de higiene.*

19

CARACTERÍSTICAS SENSORIAS: Répteis

Carne de jacarés	Carne de quelônios
Odor característico da espécie	Odor próprio e suave
cor branca rosada	Cor característica da espécie, livre de manchas escuras
Ausência de lesões e elementos estranhos	Textura firme, elástica e tenra
Textura macia com fibras musculares dispostas uniformemente	
Nota: O trânsito deve ser feito em condições adequadas de higiene.	

Verificar as condições higiênicas do acondicionamento dos peixes inteiros resfriados.



05 ATRIBUIÇÕES DO SVO NA INDÚSTRIA



Aponte o celular para o QR CODE e acesse toda documentação para registro da Agroindústria.



[DICA]
Tenha acesso aos materiais clicando no QR Code

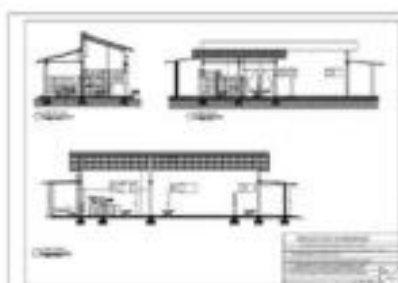
O que é preciso para o SVO registrar a agroindústria e o pescado?

SVO-SEDE:

- ✓ Realizar a vistoria do terreno ou do estabelecimento se já estiver iniciado a construção;



- ✓ Analisar o projeto de construção ou reforma do estabelecimento, após a aprovação do terreno;



21

- ✓ Emitir o parecer de deferimento do projeto, autorizando o início da construção ou reforma;
- ✓ Realizar as vistorias de acompanhamento da obra;
- ✓ Realizar a vistoria final;
- ✓ Emitir certificado de registro e autorização do funcionamento.

Quais as ações fiscais do SVO na agroindústria?

SVO- ULSAV

- ✓ Realizar as inspeções *pós-mortem* de peixes, camarões, caranguejo, ostras na unidade de beneficiamento;
- ✓ Realizar as inspeções (*ante e post-mortem*) de répteis e anfíbios nos abatedouros frigoríficos;
- ✓ Verificar se os planos de autocontrole apresentados pelas empresas e validados pelo SVO estão sendo cumpridos.

O que o SVO deve verificar durante a fiscalização no trânsito do pescado?

- ✓ Verificar se o motorista está com a nota fiscal do pescado;



- ✓ Observar o acondicionamento do pescado (peixe, camarão seco, caranguejo);



- ✓ Verificar as condições higiênicas e de refrigeração do transporte;
- ✓ Verificar as condições de armazenamento do produto (temperatura de refrigeração ou congelamento);
- ✓ No caso do transporte de camarão pré-cozido salgado seco, verificar o acondicionamento em caixas de isopor, em boas condições de uso ou caixa plástica de polipropileno não vazada, e devidamente higienizada;
- ✓ Em ambos os casos, o produto deverá estar embalado em saco plástico transparente grosso de primeiro uso, conforme nota técnica nº 01, de 31 de agosto de 2017.

Fig. 1 - Caixa de isopor, em boas condições de uso.



Fig. 2 - Caixa plástica de polipropileno, não vazada.



Fig. 3 - Saco plástico grosso, ideal para suportar pesos entre 10 e 30 kg.



06 EDUCAÇÃO SANITÁRIA

23

A Educação Sanitária em Defesa Agropecuária é um processo contínuo, que visa promover conhecimento sobre matérias referentes a prevenção, controle e erradicação de doenças dos animais e vegetais com vistas a produção de alimentos seguros para os consumidores, bem como, despertar a população a se reconhecer partícipe nesse processo. Nesse contexto, o Programa Aquicultura com Sanidade utiliza a educação sanitária como ferramenta crucial para promoção da sanidade dos animais aquáticos de cultivo. Assim, diversas são as ações educativas já realizadas pelo SVO desta agência, voltadas para conscientizar todos os atores da cadeia produtiva dos animais aquáticos sobre suas responsabilidades no processo de sanidade desses animais.



Aponte o celular para o QR Code para assistir ao 'Conversando com o produtor'.



Aponte o celular para o QR Code para assistir ao primeiro dia do webinário.



Aponte o celular para o QR CODE e acesse o folder informativo do Programa de Sanidade dos Animais Aquáticos.



[DICA]
Tenha acesso aos materiais clicando no QR Code



Digitado pelo ComCarmem

07 CONSIDERAÇÕES FINAIS

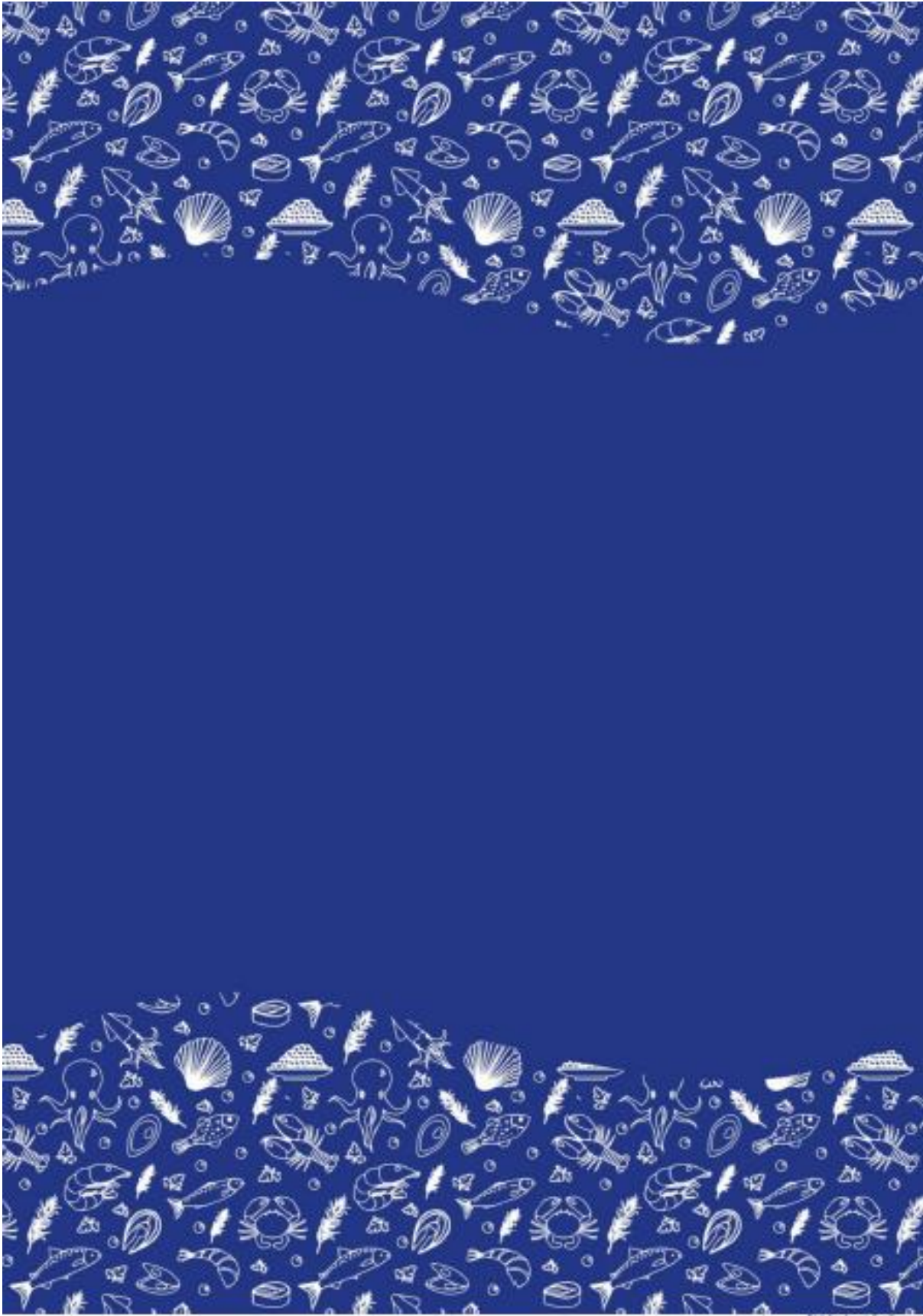
24

Diante do potencial produtivo aquícola que tem o Maranhão, não resta dúvida que a sanidade dos animais aquáticos de cultivo deve se fazer presente para garantia de matéria-prima e pescado com qualidade.

Com as informações do presente guia espera-se que os servidores representantes do serviço veterinário oficial da AGED possam suprir suas dúvidas no que se refere à execução das ações do programa de sanidade dos animais aquáticos de cultivo.

Acreditamos que o guia é um importante instrumento para orientação dos servidores da AGED, que poderá influenciar positivamente nos resultados das ações do serviço veterinário oficial.





CAPÍTULO VII

7. CONCLUSÃO GERAL

Com os resultados obtidos nesse estudo conclui-se que:

- Sete espécies de *Aeromonas* foram identificadas em *C. macropomum*: *A. veronii by veronii*, *A. caviae*, *A. sobria*, *A. schubertii*, *A. veronii by sobria*, *A. media* e *A. hydrophyla*. A totalidade das espécies identificadas no estudo são consideradas patógenos de animais aquáticos com potencial zoonótico para seres humanos.
- Constatou-se o DNA de *Aeromonas* spp. em 47,37 % (n= 54) dos isolados confirmados fenotipicamente como pertencentes a esse gênero.
- Embora não existam antimicrobianos registrados no Brasil para uso no cultivo de *C. macropomum*, a resistência antimicrobiana está presente em isolados de *Aeromonas* spp. oriundos de tambaquis.
- A multirresistência a três antimicrobianos pertencentes a classes de antibióticos diferentes, observada em elevada frequência dos isolados de *Aeromonas* spp., suscita preocupação quanto aos cultivos de peixes da Ilha do Maranhão, bem como a saúde única, dada a possibilidade de infecções humanas por bactérias resistentes.
- Ao se considerar as implicações clínico-epidemiológicas das espécies de *Aeromonas* spp. avaliadas no presente estudo, bem como a identificação de perfis de resistência e multirresistência aos antimicrobianos, ressalta-se a necessidade urgente de alertar e esclarecer a importância destes patógenos para a Saúde Única. Esse conhecimento poderá auxiliar positivamente no estabelecimento de diretrizes de controle preventivo de infecções em criações intensivas de peixes no Maranhão e em todo o território nacional.
- Infecções ocasionadas por bactéria do gênero *Aeromonas* sp. são consideradas problemáticas emergentes para a saúde única. Surto de doenças ocasionadas por essas bactérias determinam perdas pessoais, econômicas e sociais associadas ao impacto da água contaminada no meio ambiente.
- A contaminação de sistemas de produção aquícola, meio ambiente, água e alimentos constitui potencial veículo de infecções causadas por *Aeromonas* sp. Ressalta-se que os diversos mecanismos de virulência e resistência bacteriana podem ainda ser transferidos para outros indivíduos com potencial patogênico.

Portanto, se reveste de fundamental importância garantir medidas sanitárias adequadas, como a preparação de alimentos, higienização das mãos e o sistema eficiente de eliminação de esgoto. A vigilância correta das instalações de água, alimentos e saneamento, com a implementação de procedimentos diagnósticos e detecção desses agentes é essencial para a prevenção de infecções.

CAPÍTULO VIII

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A piscicultura tem apresentado crescimento punjante em todo território maranhense, porém a carência de medidas de biosseguridade nos cultivos de peixes é uma realidade premente em todo o Estado. Assim, não resta dúvida que os peixes podem albergar micro-organismos e impactar a produção e a produtividade, como bactérias *Aeromonas* sp. multirresistentes a diferentes antimicrobianos, conforme comprovado na presente pesquisa o que suscita preocupação por se tratar de uma bactéria que compromete a sanidade dos peixes, saúde do homem e meio ambiente. Outrossim, um ponto importante a destacar é que as bactérias do gênero *Aeromonas* foram isoladas de exemplares de peixes de cultivo sem sintomatologia clínica evidente, o que acende um alerta para a necessidade de monitoramento sanitário dos peixes de cultivo, com uma frequência de pelo menos um monitoramento por ciclo produtivo.

Diante do exposto ora apresentado, destaca-se que a detecção de espécies de *Aeromonas* sp., com potencial zoonótico, em peixes de cultivo oriundos da Ilha do Maranhão, bem como o diagnóstico de bactérias multirresistentes nos exemplares de peixes, objeto do estudo, representa um desequilíbrio entre homem, animal e meio ambiente, o que configura impactos negativos de ordem social e econômica. Nesse sentido, no intuito de dirimir o problema apresentado e contribuir para o desenvolvimento da piscicultura com sustentabilidade no nosso Estado, sugere-se algumas propostas para colaborar com a Agência Estadual de Defesa Agropecuária do Maranhão (AGED-MA), que é a entidade executora do Programa Nacional de Sanidade dos Animais Aquáticos no Maranhão:

- Aquisição de materiais para subsidiar as ações de vigilância ativa do serviço veterinário oficial da AGED-MA, em especial voltadas para monitoramento da água de cultivo e coleta de material de organismos aquáticos para fins de análise.
- Realização de estudos em parcerias com a Academia que versem sobre a caracterização da vigilância ativa do Serviço Veterinário Oficial da Aged no controle sanitário de doenças de peixe de cultivo, com a aplicação de questionários para conhecer a realidade da vigilância ativa, no que se refere ao monitoramento sanitário dos cultivos de peixes oriundos de propriedades cadastradas na Agência. E, como produto, a elaboração de vídeos com instrutivos sobre coleta oficial de material (água e peixe) oriundos de cultivo para fins de diagnóstico laboratorial.

Importante destacar a boa comunicação existente entre a Universidade Estadual do Maranhão – UEMA e a AGED-MA, inclusive, esta universidade é membro do Comitê Estadual de Sanidade dos Animais Aquáticos de Cultivo, órgão colegiado, constituído por várias entidades e órgãos públicos estaduais e federais, que apesar de ter caráter consultivo, tem uma forte característica propositiva, pois discute temas que comprometem a sanidade dos animais aquáticos e apresenta alternativas para dirimir os problemas inerentes à sanidade dos animais aquáticos de cultivo, conforme propostas vigentes a seguir apresentadas:

E como sugestões de trabalhos futuros tem-se:

- Elaboração de norma estadual para institucionalizar o Programa Estadual de Sanidade dos Animais Aquáticos, que irá dispor sobre as diretrizes inerentes à prevenção, controle e erradicação de doenças dos animais aquáticos de cultivo;
- Elaboração de norma estadual que irá dispor sobre a rastreabilidade dos peixes destinados à comercialização nas feiras e supermercados, bem como ao Programa de Aquisição de Alimentos com doação simultânea;
- Termos de cooperação técnica com os laboratórios da Universidade Estadual do Maranhão e Federal do Maranhão para realização das análises oficiais dos animais aquáticos de cultivo oriundos de propriedades cadastradas na Aged;
- Termos de Cooperação técnica com o Laboratório Central de Saúde Pública do Maranhão- LACEN-MA para realização das análises oficiais dos animais aquáticos de cultivo oriundos de propriedades cadastradas na Aged;
- Realização de eventos voltados para aquicultores com foco nas boas práticas para promoção da sanidade dos peixes de cultivo.
- Elaboração com a colaboração da Agência Estadual de Extensão e Pesquisa Agropecuária- AGERP, de uma segunda planta baixa de uma unidade de beneficiamento de peixes com uma dimensão maior e que não ultrapasse o limite de 250 metros quadrados de área útil construída, que será apresentada ao governador e deputados estaduais e federais.

Por fim, ressalta-se que esta tese integra pesquisa e extensão dialogando com diversos setores da sociedade, com vistas a subsidiar os gestores públicos na elaboração das políticas públicas que sejam socialmente relevantes, interdisciplinares e que contribuam para o desenvolvimento sustentável do estado do Maranhão.