



<http://dx.doi.org/>

<http://www.higieneanimal.ufc.br>

Artigo Científico

Medicina Veterinária

Patogenicidade e resistência a antibióticos de *Aeromonas* spp. em ambiente de criação de tilápia no nordeste do Brasil

*Pathogenicity and antibiotic resistance of *Aeromonas* spp. in a tilapia farming environment in northeastern Brazil*

Deborah Oliveira Amarante^{1*}, Sara Andrade dos Santos², Lucas Daniel Borges³, Rafael Santos Rocha⁴, Oscarina Viana de Sousa⁵, Francisca Gleire Rodrigues de Menezes⁵

Resumo: A tilápia é o peixe de água doce mais cultivado no mundo. Durante o confinamento, doenças podem ocorrer, principalmente de origem bacteriana. Dentre os microrganismos patogênicos, destacam-se bactérias do gênero *Aeromonas*, estando associadas à alta mortalidade em tilápias, principalmente quando os patógenos são resistentes aos agentes antimicrobianos disponíveis de escolha para tratamento. Portanto, o objetivo desta pesquisa foi analisar a resistência aos antimicrobianos e a presença de enzimas relacionadas à patogenicidade em *Aeromonas* spp. de tilápias cultivadas em sistemas de gaiolas no nordeste do Brasil. Foram utilizadas cepas de amostras de água e muco de superfície de peixes com sinais de infecção. A patogenicidade foi avaliada pela determinação de perfis de resistência antimicrobiana e expressão de enzimas extracelulares. Os perfis de resistência a antibióticos detectados. As cepas foram capazes de produzir todas as enzimas extracelulares testadas. Concluindo, as cepas encontradas neste trabalho podem causar danos ao cultivo de tilápia, o que pode levar ao desencadeamento de um processo patogênico.

Palavras-chave: Doenças, peixes, *Oreochromis niloticus*, virulência.

Abstract: Tilapia is the most widely cultivated freshwater fish in the world. During confinement, illnesses can occur, especially of bacterial origin. Among the microorganisms that are pathogenic, bacteria of the genus *Aeromonas* can be highlighted, being associated with high mortality in tilapia, especially when the pathogens are resistant to available antimicrobial agents

of choice for treatment. Therefore, the aim of this research was to analyze resistance to antimicrobials and the presence of enzymes related to pathogenicity in *Aeromonas* spp. from tilapia in cage systems culture in northeastern Brazil. Strains from water samples and surface mucus from fish with signs of infection were used. The pathogenicity was assessed by determining antimicrobial resistance profiles and extracellular enzymes expression. The antibiotic resistance profiles detected. The strains were capable of producing all extracellular enzymes tested. In conclusion, the strains found in this work can cause harm to tilapia cultivation, which could lead to the triggering of a pathogenic process.

Keywords: Diseases, fish, *Oreochromis niloticus*, virulence.

Parte da tese de doutorado da primeira autora, financiada pela CAPES.

^{1*,2}Doutoranda em Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil, email: deborahamarante98@gmail.com

³Doutorando em Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil.

⁴Técnico do Instituto de Ciências do Mar, Fortaleza, Ceará.

⁵Professora da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil.

Introdução

No Brasil, o cultivo da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) ocorre de forma significativa nos estados da região Nordeste. Atenção especial tem sido dada ao cultivo em gaiolas, estes ocorrem em reservatórios de água doce, nos quais os peixes são cultivados em alta densidade e podem estar sujeitos à abrasão mecânica com as paredes das gaiolas ou entre si, causando lesões superficiais. Essas características tornam o ambiente propício à infecção por bactérias do gênero *Aeromonas*, que são altamente patogênicas para peixes e seres humanos (DONG *et al.*, 2017).

Os antibióticos são comumente usados para combater doenças causadas por bactérias. O uso corriqueiro dessas substâncias promove a seleção de cepas resistentes. Esse grupo emergente de contaminantes está sendo cada vez mais encontrado no meio ambiente (MCCORQUODALE-BAUER *et al.*, 2023).

Considerando a importância da piscicultura para o Brasil, o objetivo desta pesquisa foi avaliar o perfil de resistência antimicrobiana e a expressão de enzimas extracelulares associadas à patogenicidade de bactérias do gênero *Aeromonas*, isoladas

do muco do peixe *Oreochromis niloticus* e da água de cultivo.

Material e Métodos

Foram utilizadas 28 cepas de bactérias do gênero *Aeromonas*, originárias do muco do peixe *Oreochromis niloticus* e da água do reservatório em que esses peixes eram criados.

O teste de suscetibilidade antimicrobiana foi realizado de acordo com as recomendações do Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI, 2022). Para esse teste, os antimicrobianos: cloranfenicol 30 µg (CHL), eritromicina 15 µg (ERY), trimetoprim/sulfametoxazol 25 µg (STX), tetraciclina 30 µg (TET), gentamicina 10 µg (GEN), amoxicilina 30 µg (AMX), ceftriaxona 30 µg (CRO), imipenem 30 µg (IPM), oxitetraciclina 10 µg (OTC) e florfenicol 30 µg (FLO). Foi utilizado o método de disco-difusão e as cepas foram classificadas com o perfil suscetível (S), intermediário (I) ou resistente para cada antimicrobiano testado.

As cepas de *Aeromonas* relacionadas ao potencial de virulência/patogenicidade foram caracterizadas. As bactérias foram testadas quanto à presença das enzimas elastase (RUST et al., 1994), gelatinase, caseinase, fosfolipase, lipase (RODRIGUES et al., 1993) e β-hemólise. As cepas foram classificadas como positivas (P) ou

negativas (N) para a produção de enzimas extracelulares.

Resultados e Discussão

Os resultados do perfil de suscetibilidade antimicrobiana são apresentados na Figura 1. Todas as cepas testadas foram sensíveis aos antimicrobianos Cloranfenicol (30 µg), Gentamicina (10 µg), Imipenem (30 µg), Florfenicol (30 µg). Duas cepas foram encontradas no muco em um nível intermediário, Eritromicina (15 µg); 5 cepas resistentes à Amoxicilina (30 µg). Três cepas foram encontradas na água do reservatório em um nível intermediário, eritromicina (15 µg); três cepas resistentes à amoxicilina (30 µg), sendo uma dessas cepas multirresistente à oxitetraciclina (10 µg), tetraciclina (30 µg) e amoxicilina (30 µg).

Corroborando com Workagegn *et al.* (2021) encontraram cepas de *Aeromonas* resistentes ao antibiótico amoxicilina, e afirma que o uso de antibióticos é inadequado, pois causam resistência bacteriana, e indica o uso de novos compostos antibacterianos, como extratos de plantas e probióticos. O tratamento mais comum para combater doenças bacterianas em peixes está relacionado ao uso de antimicrobianos (BASTIDAS et al., 2019), mas a escolha desses medicamentos deve ser baseada em testes prévios, para garantir

a eficácia do tratamento e não prejudicar o meio ambiente.

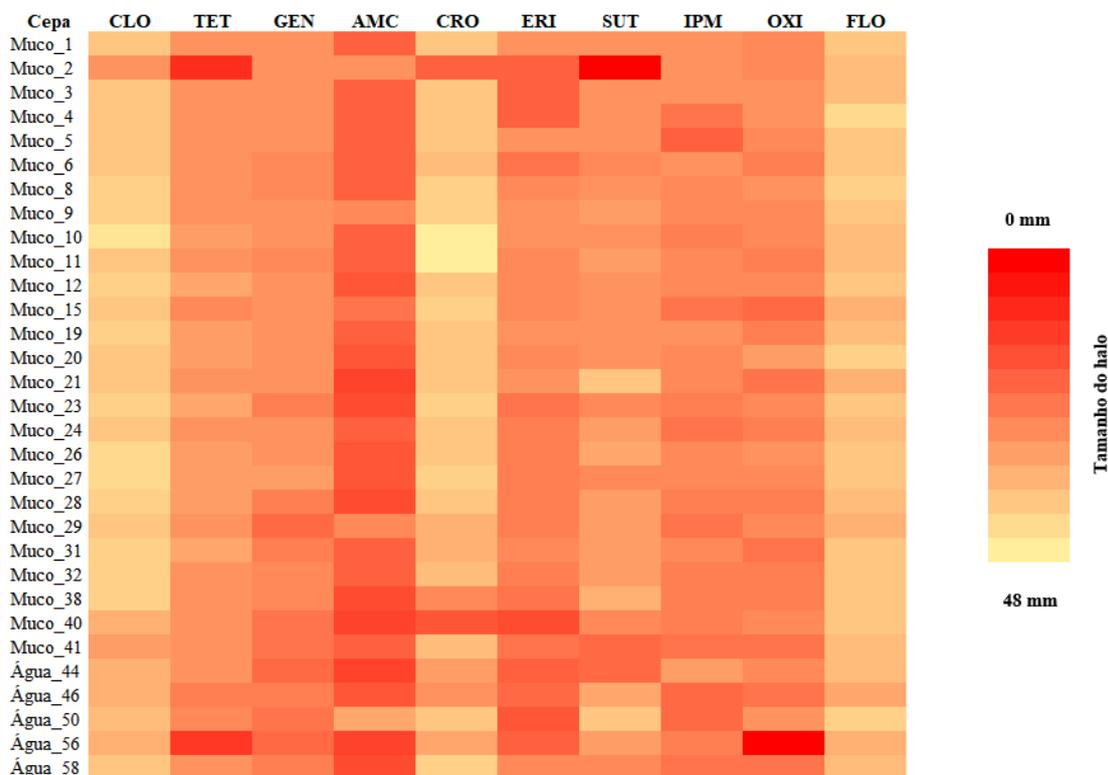
As agências reguladoras devem se comprometer com os critérios de uso de antibióticos e qualidade da água para proteger os organismos vivos dos efeitos negativos do uso indiscriminado de antimicrobianos (BAWA-ALLAH, EHIMIYEIN, 2022).

Considerando que a maioria das cepas de *Aeromonas* é encontrada em ambientes aquáticos, é necessário e de grande importância que haja controle e

gerenciamento eficazes do uso de antibióticos e uma abordagem para o uso excessivo na aquicultura (ROH E KANNIMUTHU, 2023).

Estudos indicam que as *Aeromonas* podem ser resistentes a antibióticos, resultando em dificuldades no tratamento de infecções. Esse gênero possui genes de resistência a vários antibióticos, incluindo sulfazotrim, cloramfericol, ampicilina, amoxicilina, cefepime, ceftoxitina, gentamicina, levofloxacin, ciprofloxacina e tetraciclina (SILVA *et al.*, 2023).

Figura 1. Tamanho do halo de cepas de *Aeromonas* para testes antimicrobianos.



CHL: cloranfenicol; TET: tetraciclina; GEN: gentamicina; AMX: amoxicilina; CRO: ceftriaxona; ERY: eritromicina; STX: trimetoprima/sulfametoxazol; IPM: imipenem; OTC: oxitetraciclina; FLO: florfenicol.

Todas as 28 cepas testadas foram positivas para a presença das enzimas caseinase, elastase, fosfolipase e lipase. Apenas uma cepa foi negativa para a produção de gelatinase (Muco_31) e a cepa Água_58 foi negativa para a presença de β -hemólise. As bactérias testadas neste trabalho mostraram ter várias enzimas relacionadas à patogenicidade, capazes de produzir substâncias tóxicas que interferem nas células e nos tecidos dos animais

(SAYUTI et al., 2021). Algumas classes enzimáticas, como lipases e proteases, causam lise celular ou alteram a permissividade das células, facilitando a invasão e a multiplicação de patógenos (CARUSI et al., 2024).

A enzima β -hemólise atua na destruição dos glóbulos vermelhos, facilitando a invasão e a multiplicação dos microrganismos no hospedeiro. Esse é um importante fator de virulência para bactérias do gênero *Aeromonas* (SHUANG, et al., 2021).

Em um estudo realizado no Peru, no qual 19 cepas de *Aeromonas* foram isoladas do peixe *Piaractus brachypomus*, observou-se que a enzima elastase estava presente em 7 cepas e que todas as cepas possuíam as enzimas lipase, caseinase, gelatinase e hemolisina (MEDINA-

infectados (AZZAM-AZZAM-SAYUTI et al. (2021) mostraram em seu estudo que havia resistência das cepas de *Aeromonas* aos antibióticos amicacina, ampicilina, amoxicilina, cefotaxima, cloranfenicol e tetraciclina; e suscetíveis à levofloxacina e à gentamicina. Esses resultados corroboram com esta pesquisa, na qual a maior resistência foi encontrada na amoxicilina e, para a gentamicina, todas as cepas foram suscetíveis.

(MORILLO et al., 2023).

Outro estudo, realizado com *A. veronii*, indicou que 50% dos isolados tinham pelo menos quatro genes de virulência, e 25% dos isolados tinham pelo menos cinco genes de virulência. O peixe que carrega essa bactéria representa uma ameaça potencial à saúde humana (LI et al., 2020).

Conclusões

Pode-se concluir que algumas cepas apresentaram resistência a antibióticos e que medidas precisam ser tomadas para garantir que esses genes de resistência não sejam disseminados no ambiente aquático.

E as cepas desta pesquisa são muito virulentas, elas têm pelo menos cinco enzimas relacionadas à patogenicidade, esse fato pode causar danos à saúde tanto dos peixes cultivados quanto da saúde

humana.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo financiamento.

Literatura citada

AZZAM-SAYUTI, M.; INA-SALWANY, M.Y.; ZAMRI-SAAD, M.; YUSOF, M.T.; ANNAS, S.; NAJIHAH, M.Y.; LILES, M.R.; MONIR, M.S.; ZAIDI, Z.; AMAL, M.N.A. The prevalence, putative virulence genes and antibiotic resistance profiles of *Aeromonas* spp. isolated from cultured freshwater fishes in peninsular Malaysia. **Aquaculture**, v. 540, article 736719, 2021. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736719>.

BASTIDAS, C.Y.; PLESSING, C.; TRONCOSO, J.; SANHUEZA, M.I.; NEIRA, J.Y.; CASTILLO, R.P. Analytical strategies based on near infrared spectroscopy and multivariate calibration for rapid quantification of florfenicol at low-concentrations in medicated-feed pellets. **Microchemical Journal**, v. 147, p. 1068-1074, 2019.

BAWA-ALLAH, K A; EHIMIYEIN, A.O. Ecotoxicological effects of human and veterinary antibiotics on water flea (*Daphnia magna*). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 94, article 103932, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2022.103932>.

CARUSI, J.; KABUKI, D.Y.; PEREIRA, P.M.S.; CABRAL, L. *Aeromonas* spp. in drinking water and food: Occurrence, virulence potential and antimicrobial resistance. **Food Research International**, v. 175, article 113710, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113710>.

CLSI. Clinical and laboratory standards institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 32nd ed. **CLSI supplement M100**. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2022.

DONG, H.T.; TECHATANAKITARNAN, C.; JINDAKITTIKUL, P.; THAI PRAYOON, A.; TAENGPHU, S.; CHAROENSAPSRI, W.; KHUNRAE, P.; RATTANAROJPONG, T.; SENAPIN, S. *Aeromonas jandaei* and *Aeromonas veronii* caused disease and mortality in Nile tilapia, **Oreochromis niloticus (L.)**. **J Fish Dis.**, v. 40, n. 10, p. 1395-1403, 2017. DOI: 10.1111/jfd.12617.

LI, T.; RAZA, S.H.A.; YANG, B.; SUN, Y.; WANG, G.; SUN, W.; QIAN, A.; WANG, C.; KANG, Y.; SHAN, X. *Aeromonas veronii* Infection in Commercial Freshwater Fish: A Potential Threat to Public Health. **Animals**, v. 10, article, 608, 2020. doi:10.3390/ani10040608.

MCCORQUODALE-BAUER, K.; GROSSHANS, R.; ZVOMUYA, F.; CICEK, N. Critical review of phytoremediation for the removal of antibiotics and antibiotic resistance genes in wastewater. **Science of the Total Environment**, v. 870, artigo 161876, Janeiro 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.161876>.

MEDINA-MORILLO, M.; SOTIL, G.; ARTEAGA, C.; CORDERO, G.; MARTINS, M.L.; MURRIETA-MOREY, G.; YUNIS-AGUINAGA, J. Pathogenic *Aeromonas* spp in Amazonian fish: Virulence genes and susceptibility in *Piaractus brachypomus*, the main native aquaculture species in Peru. **Aquaculture Reports**, v. 33, article 101811, 2023. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2023.10181>

1.

RODRIGUES, D. P.; RIBEIRO, R. V.; ALVES, R. M.; HOFER, E. Evaluayion of virulence factors in environmental isolates of *Vibrio* species. **Mem. Int. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 88, n. 4, p. 589-592, Oct-dec 1993.

ROH, H.; KANNIMUTHU, D. Comparative resistome analysis of *Aeromonas* species in aquaculture reveals antibiotic resistance patterns and phylogeographic distribution. **Environmental Research**, v. 239, article 117273, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.117273>.

RUST, L.; MESSING, C. R.; IGLEWSKI, B. H. Elastase assays. **Methods Enzymol**. Washington, v. 235, n. 1, p. 554-562, Feb 1994.

SILVA, A.A.; LEITE, J.N.; WINTER, H.C.L.; FURTADO, T.L.J.; MORAIS, N.M.L.; FARIA, R.A.P.G.; NASCIMENTO, E.; RITTER, D.O.; LANZARIN, M. *Aeromonas* sp. in freshwater fish and antimicrobial resistance: emerging pathogen. **Rural Science**, v. 53, n. 7, article e20220088, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20220088>.

SHUANG, M.; LI, D.X.; LU, W.Y.; TIAN, Q.F.; LIN, X.G.; JIAN, Z.H.; RUI, H.J.; ZHENG, Q.; Yue, W.; BIAO, K.; GANG, C. Z. Comparative study of the genetic diversity, antimicrobial resistance, and pathogenicity of *Aeromonas* isolates from clinical patients and healthy individuals. **Biomed Environ Sci**, v. 34, n. 6, p. 454-464, 2021. DOI:

<https://doi.org/10.3967/bes2021.062>.

WORKAGEGN, K.B.; LEMA, B.; NATARAJAN, P.; PRABADEVI, L. *Aeromonas* spp. infection in farmed Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. **J Aqua Res Dev**, v. 12, n. 4, article1000465, 2021.