

Foto: Marcos Tavares-Dias



Bacterioses em Alevinos de Pirarucu de Cultivo, com Ênfase em Edwardsielose e Aeromonose

Aldo Aparecido Proietti Junior¹
Luciana Sampaio Lima²
Francy Mendes Nogueira Cardoso³
Dália dos Prazeres Rodrigues⁴
Marcos Tavares-Dias⁵

Introdução

Na aquicultura, diversos fatores contribuem para alterar a imunidade dos peixes, tais como: variações ambientais bruscas, alimentação inadequada, desnutrição, elevada densidade de cultivo, transporte, traumas mecânicos, tratamentos com drogas, variações repentinas e abruptas de temperatura e pH, má qualidade da água e/ou poluição do ambiente aquático. Esses fatores de forma isolada ou associados podem causar estresse, afetando os mecanismos homeostáticos dos peixes, tornando-os suscetíveis a uma grande variedade de agentes patogênicos. Nessas condições, as doenças não ocorrem como um único evento, mas representam o resultado da interação entre o agente etiológico, o peixe e as variações ambientais. A ocorrência de doenças é um dos grandes problemas para o cultivo de peixes; parte delas podem ser ocasionadas

por parasitos, fungos, bactérias ou vírus. Particularmente, as infecções por bactérias representam um problema para o sucesso da atividade piscícola em todo o mundo (NOGA, 2004; SUHET et al., 2011).

Nos sistemas de produção aquícola deve ser dada prioridade a uma avaliação detalhada e usual sobre os possíveis impactos de doenças infecciosas, pois podem levar à desistência da atividade por parte dos produtores. No Brasil, as bactérias são responsáveis por perdas econômicas na piscicultura (DIAS et al., 2016; MURATORI et al., 2001; SUHET et al., 2011). Porém, não há informações sobre bactérias que causam doenças em pirarucu (*Arapaima gigas*), um peixe de grande importância para a piscicultura brasileira. O pirarucu vem sendo cultivado na região Nordeste do Brasil e Amazônia, por possuir boas características zootécnicas, tais como: fácil adaptação à alimentação artificial

¹ Farmacêutico Bioquímico, mestre em Microbiologia, professor adjunto da Universidade Federal do Amapá, Macapá, AP.

² Bióloga, doutoranda em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários na Universidade do Estado do Pará, técnica em laboratório da Unifap, Macapá, AP.

³ Biomédica no Hospital Universitário João de Barros Barreto, Belém, PA.

⁴ Médica Veterinária, doutora em Bacteriologia, pesquisadora da Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ.

⁵ Biólogo, doutor em Aquicultura, pesquisador da Embrapa Amapá, Macapá, AP.

(ração balanceada), bom desempenho zootécnico, alta taxa de crescimento, relativa rusticidade no manuseio, não apresentar canibalismo quando confinado em altas densidades populacionais e por apresentar carne magra e livre de espinhas intramusculares (ONO et al., 2004; PEREIRA-FILHO; ROUBACH, 2005). Em 2014, 11.762,8 toneladas de pirarucu foram produzidas no Brasil (IBGE, 2014). Entretanto, um dos problemas na produção, além da falta de alevinos, é a elevada mortalidade durante as primeiras fases do cultivo.

Devido à grande importância do cultivo do pirarucu, a identificação e caracterização de doenças causadas por bactérias são de relevância para a sustentabilidade de sua cadeia produtiva. A primeira etapa desse processo é o isolamento das bactérias que infectam esse peixe. Assim, este estudo relata a primeira ocorrência de doenças bacterianas e mortalidade em pirarucus cultivados no Brasil, após um surto de doenças em pirarucus recém-adquiridos de uma piscicultura comercial. Para tal, procedimentos de isolamento e identificação foram adotados e aqui descritos detalhadamente.

Bacterioses em alevinos de pirarucu de cultivo: relato de caso

Com a mortalidade de 1.400 alevinos de pirarucus ($8,2 \pm 2,3$ cm e $11,5 \pm 3,8$ g) adquiridos de uma

piscicultura comercial de Rio Branco, AC, mantidos em tanque de 1.000 L de água ($1,4$ peixes/m²), foram coletados tanto peixes aparentemente saudáveis, quanto peixes com sinais externos de bacteriose, para análises bacteriológicas. Os peixes estavam sendo alimentados seis vezes ao dia, com ração contendo 45% de proteína bruta. A mortalidade teve início sete dias após a chegada dos peixes. As bactérias foram identificadas como *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas jandaei* e *Edwardsiella tarda*.

No tegumento de *A. gigas* com aeromonose e edwardsielose foram observadas lesões que variaram em forma, extensão e tamanho, localizadas principalmente na nadadeira caudal dos peixes. Foram observadas nos peixes, também, anorexia, perda do equilíbrio com movimentação errática, redução dos movimentos respiratórios e, externamente, despigmentação ao longo do corpo, com focos hemorrágicos. Na necropsia, internamente observou-se hemorragias necróticas em órgãos como rim, fígado e bexiga natatória modificada; além de esplenomegalia (aumento do baço), aumento da vesícula biliar, pequenas áreas de hemorragia no fígado, ascite (acúmulo de líquido) com fluido mucoso amarelado e sanguinolento na cavidade intraperitoneal, hiperemia e cavidade abdominal com edemaciamento (Figuras 1 a 4). Pirarucus doentes apresentaram

Foto: Marcos Tavares-Dias



Figura 1. Deposição de fluido sanguinolento na cavidade abdominal, hiperemia e edemaciamento da parede da bexiga natatória modificada, congestão e áreas de hemorragia no fígado em pirarucus com *A. hydrophila*, *A. jandaei* e *E. tarda*.

Foto: Marcos Tavares-Dias



Figura 2. Congestão e hiperemia da cavidade abdominal em pirarucus com *A. hydrophila*, *A. jandaei* e *E. tarda*.

Foto: Marcos Tavares-Dias



Figura 3. Lesões no tegumento de pirarucus com despigmentação e focos hemorrágicos, devido à infecção por *A. hydrophila*, *A. jandaei* e *E. tarda*.

ainda falta de apetite e brânquias pálidas. Tais sinais clínicos podem ajudar técnicos e piscicultores na identificação de aeromonose e edwardsiellose em pirarucus.

As *Aeromonas* são bactérias que têm como habitat natural ambientes aquáticos, e fazem parte da microbiota da pele, brânquias e intestino dos peixes, atuando como oportunistas quando ocorre

Foto: Marcos Tavares-Dias



Figura 4. Lesão na nadadeira caudal de pirarucu com focos hemorrágicos devido à infecção por *A. hydrophila*, *A. jandaei* e *E. tarda*.

um desequilíbrio na interação parasito-hospedeiro-ambiente (NOGA, 2010; VÁSQUEZ-PIÑEROS et al., 2010). *Edwardsiella tarda* é uma bactéria encontrada frequentemente no intestino dos peixes e ambiente aquático (MURATORI et al., 2001; NOGA, 2010; PARK et al., 2012; VÁSQUEZ-PIÑEROS et al., 2010). Essas bactérias são responsáveis por septicemia hemorrágica em peixes de água doce (VÁSQUEZ-PIÑEROS et al., 2010). Geralmente essas

bacterioses ocorrem nos peixes devido ao estresse causado por manejo inadequado ou decorrente das condições ambientais desequilibradas, tais como: elevação na temperatura, presença de matéria orgânica e má qualidade da água. Assim, a intensificação dos sistemas de produção do pirarucu pode favorecer a proliferação dessas bactérias, principalmente após transporte de longa duração, como ocorreu com os peixes deste estudo.

Tais bacterioses são dependentes da abundância de bactérias, fatores de virulência, via de entrada e temperatura ambiental (DIAS et al., 2016; MURATORI et al., 2001). A contaminação ocorre quando peixes infectados liberam bactérias na água ou a transmitem diretamente a outros peixes, permitindo assim a colonização da pele desses peixes. Portanto, pirarucus mortos, moribundos ou infectados devem ser eliminados dos tanques de cultivo, para evitar a disseminação de *Aeromonas* spp. e *E. tarda*.

Métodos de isolamento bacteriano

Os cuidados listados abaixo são necessários antes e durante a execução dos métodos de isolamento bacteriano:

- 1) Lavar as mãos antes e após a manipulação da amostra e após a retirada das luvas.
- 2) Redobrar o cuidado ao fazer a inoculação. Usar o bico de Bunsen com área de segurança em 15 cm de diâmetro, com a utilização de óculos de segurança.
- 3) Realizar a limpeza e desinfecção da superfície de trabalho utilizando álcool 70%, antes e após o procedimento.
- 4) Na utilização de Cabine de Segurança Biológica (CSB) realizar a desinfecção interna da mesma através da aplicação de radiação ultravioleta por 30 minutos, antes e após o uso.
- 5) Registrar o tempo de uso da lâmpada ultravioleta visando seu controle, tendo em vista que a duração da lâmpada é de 1.200 horas.
- 6) Realizar a limpeza e desinfecção da superfície de trabalho da CSB utilizando álcool 70%, antes e após o procedimento.

7) Descartar as pipetas em frascos contendo hipoclorito de sódio (5 g/L de cloro ativo). Essas devem ser mantidas nessa solução por um período de 24 horas para desinfecção.

8) O material descartável deve ser depositado, no laboratório, em recipiente de descarte próprio para transporte (resistente a vazamentos e danos físicos) e levado ao setor de esterilização e descontaminação.

9) Após o procedimento, o material biológico acondicionado em vidrarias reutilizáveis, deverá ser depositado em cestas de inox disponíveis no laboratório, para transporte até o setor de esterilização e descontaminação.

Método de identificação de *Aeromonas* spp. em pirarucu

Coleta, conservação e transporte de amostras para identificação de *Aeromonas* spp.

Os animais com características de natação em espiral, com lesões aparentes ou deambulantes devem ser coletados com auxílio de puçá de mão ou tarrafa e crioadestesiados em caixa térmica com gelo. Devem ser embalados em sacos plásticos novos, transparentes, resistentes e acondicionados em caixa térmica contendo gelo reutilizável ou gelo comum contidos em embalagem resistente e sem vazamentos, separados por papel ou papelão para evitar o contato dos peixes diretamente com a fonte de frio e encaminhar o mais breve possível ao laboratório. Caso não seja possível, o animal poderá ser congelado, desde que embalado individualmente em sacos plásticos resistentes e novos. Porém, pode haver diferença na forma de envio de amostras de acordo com cada laboratório de análise.

Pré-enriquecimento seletivo

- 1) Após coleta asséptica do(s) tecido(s), músculo e/ou vísceras, os órgãos devem ser homogeneizados utilizando um homogeneizador tipo blender previamente esterilizado e inoculados na proporção 1:10 (peso: volume/pv) no meio de enriquecimento Água Peptonada Alcalina (APA 1% de NaCl) e incubados em estufa bacteriológica a 37 °C por 18 a 24 horas.
- 2) Para o isolamento a partir do conteúdo intestinal, coletar o material somente após a remoção das

vísceras. Nesse caso, não se faz necessário guardar a proporção 1:10 p/v e a homogeneização pode ser realizada em agitador orbital e, em seguida, incubar em estufa bacteriológica a 37 °C por 18 a 24 horas.

Semeadura direta em meios seletivos

Preparar uma suspensão usando o material removido assepticamente, em APA 1% de NaCl. Semear a suspensão homogeneizada em superfície com auxílio de alça pela técnica de esgotamento em ágar GSP ("Glutamate Starch Phenol Red Agar").

Isolamento em meio seletivo diferencial ágar GSP

Após incubação em aerobiose a 37 °C executa-se a semeadura dos caldos de enriquecimento seletivo pela técnica de esgotamento em meio seletivo indicador (ágar GSP) e incuba-se novamente a 37 °C por 18 a 24 horas.

Identificação bioquímica

Colônias suspeitas do gênero *Aeromonas* (colônias amarelas) em ágar GSP, isoladas com características fenotípicas de comportamento bioquímico compatível com o gênero, devem prosseguir para a identificação bioquímica após triagem nos meios de ágar ferro de Kligler (KIA), ágar lisina-ferro (LIA) e ágar nutriente a 1% de NaCl:

1) As colônias isoladas devem ser tocadas com a agulha de níquel cromo e, em seguida, inoculadas nos meios de triagem (Kligler e LIA) e no ágar nutriente a 1% de NaCl e incubadas a 37 °C por 18 a 24 horas. O ágar ferro de Kligler, além da caseína e das peptonas de carne, contém lactose e glicose que permitem diferenciar as espécies de bacilos entéricos, devido às alterações de cor do indicador de pH vermelho de fenol em resposta ao ácido produzido durante a fermentação desses açúcares. A concentração da glicose corresponde a apenas 10% da concentração de lactose. A combinação do citrato férrico de amônia com tiosulfato de sódio permite detectar a produção de ácido sulfídrico.

2) O ágar lisina-ferro é um meio de triagem onde a dextrose serve como uma fonte de hidratos de carbono fermentáveis. O indicador de pH, púrpura de bromocresol, muda para cor amarela em um pH inferior ou igual a 5,2 e tem cor púrpura em um pH igual ou superior a 6,8. O citrato de amônio férrico e o tiosulfato de sódio são indicadores da formação de

ácido sulfídrico. A lisina é o substrato utilizado para detectar as enzimas lisina descarboxilase e lisina desaminase. Os microrganismos que produzem ácido sulfídrico causam o escurecimento do meio devido à produção de sulfuretos férricos. As culturas que produzem lisina descarboxilase originam uma reação alcalina (cor púrpura) ou neutra no fundo do meio. Os microrganismos que causam a desaminação da lisina originam o desenvolvimento de uma superfície inclinada vermelha sobre um fundo ácido. Poderá ocorrer a formação de gás, que é muitas vezes irregular ou suprimida. Tubos de KIA (acidez em profundidade e usualmente alcalinidade em superfície) e LIA (ausência de descarboxilação da lisina e de sulfeto de hidrogênio, H₂S), compatíveis com o gênero *Aeromonas* spp., prosseguirão com a identificação através de provas bioquímicas complementares.

3) A partir do ágar nutriente a 1% de NaCl deverá ser realizada a prova da oxidase. Em uma placa de Petri, coloca-se uma fita de papel de filtro esterilizada, pinga-se uma gota da reagente oxidase. Para o teste da oxidase utiliza-se como cepa-controle positivo (*Vibrio cholerae* ou *Pseudomonas aeruginosa*) e negativo (*Proteus mirabilis*). Com a alça de platina ou descartável esterilizada retira-se um inóculo do ágar nutriente 1% (com crescimento de 18 a 24 horas a 37 °C) e fricciona-se sob a fita embebida com o reagente. A formação da cor rosa indica a positividade do teste. É necessário que se faça o teste da oxidase a partir de ágar nutriente 1% de NaCl com crescimento de, no máximo 24 horas, pois se o tempo for excedido podemos ter um falso positivo. O teste da oxidase deve ser realizado com alça de platina ou descartável esterilizada e com tempo de espera para positividade ou não do teste de 10 a 30 segundos, pois a espera de um tempo prolongado na presença de oxigênio pode dar um resultado falso positivo.

4) Teste de resistência do agente vibriostático O/129 deverá ser realizado nos casos de positividade da prova da oxidase. Para tal, deve-se inocular o crescimento em ágar nutriente 1% NaCl em caldo Müller Hinton (MH) e deixar sob agitação por, aproximadamente, 3 horas a 37 °C. Após o crescimento da cepa no caldo MH deve-se fazer a semeadura no ágar MH e incubar a 37 °C por 18 a 24 horas. Para o preparo da solução do agente vibriostático O/129 a 150 g/mL: pesar 0,075 g de 2,4 diamino-6,7 diisopropil pteridine para 10 mL de água deionizada.

Dividir em alíquotas de 2 mL. Já para diluição na concentração 10 µg/mL, retirar 0,2 µL da solução acima e acrescentar 2,8 mL de água. Dividir em alíquotas de 2 mL. Distribuir 20 µL da solução em cada disco em sua devida concentração. Deixar secar em estufa a 50 °C o disco impregnado na concentração adequada.

5) Aproximadamente quatro colônias (isoladas do ágar MH) com características morfológicas idênticas, devem ser tocadas com agulha e inoculadas em tubo com 1,0 mL de caldo MH e submetidas a agitação a 37 °C por aproximadamente duas horas até atingir a turvação correspondente ao tubo 0,5 da escala de McFarland, que equivale a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. A turvação pode ser medida diretamente com auxílio do cartão de Wickerham ou ser medida em espectrofotômetro ou densitômetro:

5.1) Introduzir um swab (uma haste flexível com ponta de algodão esterilizada) no caldo MH, retirar o excesso de líquido pressionando o swab com movimentos rotatórios na parede do tubo e, em seguida, inocular a superfície do meio (placa de ágar MH) passando o swab sobre a placa, girando a placa e passando novamente por duas vezes. Toda a placa deve ficar coberta com o crescimento bacteriano.

5.2) Em seguida, com o auxílio de uma pinça, coloque sobre a placa os discos nas concentrações de 10 e 150 µg e incubar em estufa 37 °C por 18 a 24 horas. Qualquer halo de inibição é considerado sensível ao agente vibriostático. Em *Aeromonas* spp., podemos observar os seguintes resultados: inibição de halo em ambas as concentrações (resistente/resistente).

6) A partir do ágar nutriente a 1% de NaCl deverão ainda ser realizadas provas de identificação bioquímica complementares.

6.1) Fermentação dos carboidratos: glicose, arabino-se e manose. A formulação dos açúcares é feita com água peptonada, acrescida de indicador de Andrade. Todos os meios utilizados para *Aeromonas* spp. podem ser ou não acrescidos de 1% de NaCl, visto que o gênero resiste tanto em baixas concentrações de NaCl, como na ausência deste.

6.2) Arginina dihidrolase: meio de cultura básico de Moeller contendo arginina para detectar a

produção de arginina dihidrolase (ADH); o microrganismo-teste deve utilizar a glicose, produzindo ácidos, o que torna o meio amarelo. Em uma segunda etapa, se a bactéria produz a enzima ADH esta é ativada e a arginina é hidrolisada formando a ornitina que é descarboxilada para formar putrescina. A produção dessa amina eleva o pH do meio, alterando a cor do indicador de amarelo para púrpura ou violeta.

6.3) Reação da ornitina descarboxilase (ODC): meio de cultura básico de Moeller contendo ornitina para detectar a produção de ODC; o microrganismo-teste deve utilizar a glicose, produzindo ácidos, o que torna o meio amarelo. Em uma segunda etapa, se a bactéria produz a enzima ODC esta é ativada e promove a descarboxilação da ornitina com produção de putrescina e consequente alcalinização do meio, retornando à cor original (púrpura).

6.4) Reação da lisina-descarboxilase: meio de cultura básico de Moeller contendo lisina para detectar a produção de lisina-descarboxilase (LDC); o microrganismo-teste deve utilizar a glicose, produzindo ácidos, o que torna o meio amarelo. Em uma segunda etapa, se a bactéria produz a enzima LDC esta é ativada e promove a descarboxilação da lisina com produção de cadaverina e consequente alcalinização do meio, retornando à cor original (púrpura).

Para os itens 6.2 a 6.4 (descarboxilação de aminoácidos), cada isolado a ser testado deve ser também inoculado em um tubo contendo apenas o meio base, portanto, que não contém o aminoácido. Se esse tubo tornar-se alcalino, o teste é inválido. Para obter as reações apropriadas, os tubos inoculados devem ser protegidos do ar com uma camada de óleo mineral esterilizado. A exposição ao ar pode causar alcalinização na superfície do meio, o que poderia levar a um resultado falso positivo. Quando ocorrerem resultados negativos, esses tubos devem ser mantidos por até dois dias, tendo em vista a variabilidade de comportamento especialmente em isolados de meio ambiente, já que algumas cepas têm atividade metabólica mais lenta.

6.5) Os componentes do meio sulfito indol motilidade (SIM) permitem a determinação de três características fenotípicas (provas) pelas quais as bactérias podem ser diferenciadas:

a) O meio de cultura contém peptonas (a cisteína é um dos componentes) e tiosulfato de sódio como substratos sulfurados e sulfato ferroso amoniacal ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$), sendo que este atua como indicador da presença de H_2S . Como o H_2S é incolor, o sulfato ferroso amoniacal serve como indicador, pois o ferro combina-se com o H_2S formando sulfureto de ferro que é um precipitado negro insolúvel. A presença desse composto ocorre ao longo da linha de inoculação e indica que houve produção de sulfureto de hidrogênio (reação positiva). A ausência do precipitado negro evidencia uma reação negativa.

b) O indol é resultante da degradação do aminoácido triptofano pela enzima triptofanase. A prova é realizada inoculando-se o meio contendo excesso de triptofano. Após a incubação se adiciona 0,5 mL do reagente de Kovacs ou o reativo de Ehrlich (solução aquosa ou alcoólica de *p*-dimetil aminobenzaldeído, respectivamente) através da parede interna do tubo. A prova é positiva quando na porção superior, isto é, na interface da cultura e o reagente, desenvolve-se um anel de cor rosada dentro de, no máximo, cinco minutos. Esse resultado é devido à complexação do indol com o aldeído, em meio ácido, formando o composto colorido. A prova é negativa com qualquer outra tonalidade de cor (original do meio ou marrom).

c) A prova da motilidade não é uma prova bioquímica e sim fisiológica, porém auxilia na identificação fenotípica de bactérias. A prova é efetuada inoculando-se em linha reta, através da técnica da punctura (com agulha), em aproximadamente 2/3 de profundidade em tubo contendo meio SIM. A prova indica motilidade quando os microrganismos crescem deslocando-se da linha de inoculação, turvando o meio. A prova é negativa quando os microrganismos ficam restritos ao local da inoculação sem, contudo, turvar o meio.

6.6) Deve ser também realizada a prova da esculina, que baseia-se na hidrólise da esculina em presença de bile por determinadas bactérias, portanto, as bactérias bile-esculina positivas crescem em presença de sais biliares. A hidrólise da esculina gera glicose e esculetina. A esculetina reage com íons presentes no citrato férrico, resultando em um complexo marrom-escuro ou negro.

6.7) Outra prova de identificação bioquímica a ser realizada é o teste de Voges Proskauer. O objetivo desse teste é determinar a capacidade dos microrga-

nismos produzirem produtos finais não ácidos ou neutros, como o acetilmetilcarbinol, quando da utilização de meio de cultura tamponado. Esta reação onde se dá a formação do acetilmetilcarbinol ocorre quando o microrganismo é capaz de metabolizar a glicose por meio de via alternada de metabolismo (via de Entner-Doudoroff). Prova feita no meio MR-VP (Methyl Red, Voges-Proskauer). A adição do reagente de Barritt's (0,2 mL de solução 40% KOH e 0,6 mL da solução de α -naftol em etanol absoluto, o qual atua como catalizador) permite detectar a presença de acetilmetilcarbinol (acetoina) que é precursor da síntese de 2,3 butanediol, pois ocorre a formação de um complexo rosa/vermelho que dá essa cor ao meio de cultura. O desenvolvimento de uma cor rosa/vermelha na cultura, 15 minutos após a adição do reagente de Barritt's representa uma prova positiva. A ausência dessa cor é uma prova negativa.

6.8) Outro teste recomendado para identificação bioquímica é sensibilidade a cefalotina. O teste de disco-difusão em ágar foi descrito em 1966, por Bauer e Kirby. O teste fornece resultados qualitativos. É um dos métodos de suscetibilidade mais simples, confiável e mais utilizado pelos laboratórios de microbiologia. O seu princípio básico é a difusão do antimicrobiano na superfície do ágar, a partir de um disco impregnado com o mesmo antimicrobiano. O teste é realizado dispensando os discos de papel-filtro, impregnados com cefalotina, sobre a placa de ágar, após a semeadura do inóculo bacteriano com $1 \text{ a } 2 \times 10^8 \text{ UFC/mL}$. As placas são incubadas por 18 a 24 horas em aerobiose a 35°C , antes dos resultados serem determinados.

A formulação dos açucares é feita com água peptonada alcalina com Indicador de Andrade. Todos os meios utilizados para *Aeromonas* spp. podem ser ou não acrescidos de 1% de NaCl, visto que o gênero resiste tanto a baixas concentrações de NaCl, quanto na ausência desse. Os resultados das provas acima citadas deverão ser anotados. Para a identificação do gênero e espécies de *Aeromonas* spp. faz-se necessário consultar a tabela de identificação bioquímica de *Aeromonas* spp. (JANDA ; ABBOTT, 2010).

Método de identificação de *Edwardsiella tarda* em pirarucu

A identificação de *Edwardsiella* sp. pode ser feita das seguintes formas: pelas lesões, pelo conteúdo intestinal ou a partir das vísceras maceradas.

1) Pré-enriquecimento seletivo:

Coletar assepticamente material de lesões dos peixes e homogeneizar em blender esterilizado e/ou semear o conteúdo intestinal em meio de enriquecimento [exemplo, caldo selenito (CS)] e incubar em aerobiose a 37 °C por 24 horas. Após esse período, os tubos de meio de enriquecimento devem ser homogeneizados com auxílio de alça, por esgotamento em meios de baixa seletividade, por exemplo ágar MacConkey (AMC) e de média seletividade, por exemplo, ágar Salmonella-Shigella (ASS).

2) Semeadura direta em meios seletivos:

Preparar uma suspensão a 10% usando o material removido assepticamente, em solução salina tamponada fosfatada (PBS) 0,1 M. Semear a suspensão homogeneizada com auxílio de alça pela técnica de esgotamento em meio seletivo indicadores AMC e ASS.

3) Identificação bioquímica:

Colônias isoladas com características fenotípicas de comportamento bioquímico compatível com o gênero *Edwardsiella* spp. (não fermentadora da lactose e produtora de H₂S) devem prosseguir para a identificação bioquímica após triagem nos meios de ágar tríplice açúcar ferro (TSI) e ágar Lisina Ferro (LIA) e ágar nutriente inclinado. Tubos de TSI e LIA compatíveis com o gênero *Edwardsiella* spp. prosseguirão com a identificação através de provas bioquímicas complementares a partir do ágar nutriente:

3.1) Fermentação de carboidratos: glicose, sacarose, sorbitol, manose, salicina, lactose e manitol.

3.2) Reação de vermelho de metila: fermentação da glicose pela via ácida mista com produção de vários ácidos mantendo o valor do pH do meio abaixo de 4,4, limite de viragem do indicador vermelho de metila.

3.3) Reação da ornitina-descarboxilase: meio de cultura básico de Moeller contendo ornitina para detectar a produção de ornitina-descarboxilase (ODC); o microrganismo-teste deve utilizar a glicose, produzindo ácidos, o que torna o meio amarelo. Em uma segunda etapa, se a bactéria produz a enzima ODC, essa é ativada e promove a descarboxilação da ornitina com produção de putrescina e a consequen-

te alcalinização do meio, retornando à cor original (púrpura).

3.4) Reação da fenilalanina desaminase: o aminoácido aromático fenilalanina é desaminado oxidativamente por um aminoácido-oxidase, a fenilalanina-desaminase, produzindo ácido fenilpirúvico. O cloreto férrico é um agente quelante que se liga ao ácido fenilpirúvico formando uma coloração verde.

4) Isolamento a partir de macerado de vísceras do peixe:

Durante o procedimento de necropsia e antes da remoção do sistema gastroentérico, devem ser removidos assepticamente fragmentos de fígado, rins e baço. Com auxílio de um blender homogeneizador esterilizado é processada a trituração de cada um dos tecidos, que posteriormente devem ser suspensos em solução de tampão PBS em concentração aproximada de 10% (p/v). Anotar todas as alterações macroscópicas dos órgãos removidos.

Considerações finais

Como a aquicultura do pirarucu se esforça para produzir uma grande quantidade de peixes de forma economicamente eficiente, e as doenças bacterianas são fatores limitantes para a produção e produtividade, a prevenção de aeromonose e edwardsiellose é de extrema importância para a indústria dessa espécie. Esse primeiro relato de *A. jandaei*, *A. hydrophila* e *E. tarda* isoladas de pirarucu, mostra a patogenicidade que levou à mortalidade dessa espécie de peixe. Testes de resistência a antibióticos para tais bactérias devem ser realizados, uma vez que indicam o melhor tratamento e melhoria na sanidade desse peixe em cultivo. Além disso, vacinas contra essas bacterioses devem ser desenvolvidas e testadas, bem como a avaliação dos efeitos do uso de probióticos e imunoestimulantes na dieta, para aumentar a resistência do organismo dos peixes, de forma a mitigar os efeitos patogênicos dessas bactérias.

Agradecimentos

A Capes pelo financiamento de projeto (#230238.00754/2013-61) no edital Pro-Amazônia e ao CNPq/FAPEAP/PPSUS (Programa Pesquisa

para o SUS) pelo financiamento de projeto (#EFP:00007376).

Referências

DIAS, M. K. R.; SAMPAIO, L. S.; PROIETTI-JUNIOR, A. A.; YOSHIOKA, E. T. O.; RODRIGUES, D. P.; RODRIGUEZ, A. F. R.; RIBEIRO, R. A.; FARIA, F. S. E. D. V.; OZÓRIO, R. O. A.; TAVARES-DIAS, M. Lethal dose and clinical signs of *Aeromonas hydrophila* in *Arapaima gigas* (Arapaimidae), the giant fish from Amazon. **Veterinary Microbiology**, v. 188, p. 12–15, 2016.

IBGE. Sistema IBGE de Recuperação Automática. Banco de Dados Agregados. **Tabela 3940** – Produção da aquicultura, por tipo de produto. [Rio de Janeiro, 2014]. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?c=3940&z=t&o=21>>. Acesso em: 12 jul. 2016.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 1, p. 3–5–73, 2010.

MURATORI, M. C. S.; MARTINS, N. E.; PEIXOTO, M. T. D.; OLIVEIRA, A. L.; RIBEIRO, L. P.; COSTA, A. P. R.; SILVA, M. C. C.; LEITE, R. C. Mortalidade por “septicemia dos peixes tropicais” em tilápias criadas em consorciação com suínos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 6, p. 658-662, 2001.

NOGA, E. J. **Fish disease**: diagnosis and treatment. Iowa: Blackwell Publishing, 2010. 367 p.

ONO, E. A.; HALVERSON, M. R.; KUBITZA, F. Pirarucu: o gigante esquecido. **Panorama de Aquicultura**, v. 14, n. 81, p. 14-25, 2004.

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

PEREIRA-FILHO, M.; ROUBACH, R. Pirarucu, *Arapaima gigas*. In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: Editora UFSM, 2005. p. 37-66.

SUHET, M.; ISCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; AMARAL, L. A. Atividade hemolítica e resistência a antimicrobianos por espécies de *Aeromonas* isoladas de criação intensiva de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*). **Ars Veterinaria**, v. 27, n. 1, 36-44, 2011.

VÁSQUEZ-PIÑEROS, M. A.; RONDÓN-BARRAGÁN, I. S.; RESTREPO-BETANCUR, L. F.; ESLAVA-MOCHA, P. R. Estudio clínico y hematológico de una infección experimental con *Aeromonas hydrophila* y *Edwardsiella tarda* en tilapia, *Oreochromis* sp. **Orinoquia**, v. 14, n. 1, p. 33-44, 2010.

Comunicado Técnico, 149

Embrapa Amapá
Rodovia Juscelino Kubitschek, Km-05, Nº 2.600
Caixa postal 10 – Macapá, AP
CEP: 68.903-419
Fone: (96) 3203-0201
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

1ª. edição
Publicação digitalizada (2017)



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



Comitê Local de Publicações

Presidente: Ana Cláudia Lira-Guedes

Secretária-Executiva: Valéria Saldanha Bezerra

Membros: Adelina do Socorro Serrão Belém, Adilson Lopes Lima, Eliane Tie Oba Yoshioka, Elisabete da Silva Ramos, Leandro Fernandes Damasceno, Silas Mochiutti, Valéria Saldanha Bezerra

Expediente:

Supervisão editorial e normalização bibliográfica:
Adelina do Socorro Serrão Belém

Revisão Textual: Elisabete da Silva Ramos

Editoração eletrônica: Fábio Sian Martins