

FERNANDA SILVA DE MEIRELLES

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DAS INFECÇÕES BACTERIANAS EM TILÁPIAS
Oreochromis niloticus (Linnaeus, 1758), CULTIVADAS EM PERNAMBUCO.**

RECIFE, 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

FERNANDA SILVA DE MEIRELLES

ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DAS INFECÇÕES BACTERIANAS EM TILÁPIAS
***Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758), CULTIVADAS EM PERNAMBUCO**

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Veterinária.

Orientadora:

Profª. Dra. Emiko Shinozaki Mendes

Co-orientadores:

Prof. Dr. Paulo de Paula Mendes

Prof. Dr. Fernando Leandro dos Santos

RECIFE

2010

Ficha catalográfica

M514e Meirelles, Fernanda Silva de
Estudo epidemiológico das infecções bacterianas em
tilápias *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758), cultivadas
em Pernambuco / Fernanda Silva de Meirelles – 2010.
77 f. : il.

Orientadora: Emiko Shinozaki Mendes
Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Medicina
Veterinária, Recife, 2010.
Inclui referências e anexo.

1. Doenças 2. Tilápias 3. Bactérias 4. Aeromonas
5. Bacterioses de tilápias 6. Vibrios I. Mendes, Emiko
Shinozaki, orientador II. Título

CDD 636.089607

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DAS INFECÇÕES BACTERIANAS EM TILÁPIAS
Oreochromis niloticus (Linnaeus, 1758), CULTIVADAS EM PERNAMBUCO**

Tese de Doutorado elaborada por
FERNANDA SILVA DE MEIRELLES

Aprovada em 26 de fevereiro de 2010.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. EMIKO SHINOZAKI MENDES

Orientadora – Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE

Prof^ª. Dra. LÍLIAN MARIA NERY DE BARROS GÓES
Autônoma

Prof. Dr. EUDES DE SOUZA CORREIA
Departamento de Pesca e Aquicultura - UFRPE

Prof. Dr. PAULO DE PAULA MENDES
Co-orientador - Departamento de Pesca e Aquicultura - UFRPE

Prof. Dr. FERNANDO LEANDRO DOS SANTOS
Co-orientador - Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE

Prof^ª. Dra. MÁRCIA FIGUEIREDO PEREIRA
Membro Suplente - Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE

Prof. Dr. LEONILDO BENTO GALIZA DA SILVA
Membro Suplente - Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE

DEDICATÓRIA

A minha mãe, **Creusa Carolina Silva de Meirelles** (*in memorian*), por tudo que ela fez e pela falta que ela faz....

A minha avó materna, **Joana Carolina Bonfim da Silva** (*in memorian*), que me ensinou as primeiras letras.

Ao meu avô **Pedro Gonçalves da Silva** (*in memorian*), que encheu de carinho minha infância.

Ao meu pai, **Everaldo Moreira de Meirelles** (*in memorian*), que me ensinou o amor aos livros e me propôs desafios....

As minhas irmãs, **Sílvia Silva de Meirelles** e **Márcia Meirelles do Rêgo Barros**, que são e sempre serão companheiras no caminhar de minha vida.

Ao meu marido, **Márcio José Vasconcelos da Silva**, com quem escolhi trilhar os caminhos já vividos e os que ainda estão por vir.

Agradeço infinitamente ao longo de todos os dias percorridos.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) – Departamento de Medicina Veterinária, ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária, pela ascensão profissional;

À Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco – Campus Vitória de Santo Antão, pela concessão do afastamento que facilitou a realização desta pesquisa;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pelo auxílio financeiro ao projeto de pesquisa;

Aos piscicultores participantes desta pesquisa, Gustavo Jardim Pedrosa Silveira Barros, Modesto Guedes, Douglas Oliveira Lima, Ricardo Gomes, Clóvis Antonio Pereira, Silvana Pontual, e a Netuno Alimentos S.A., que generosamente nos permitiram acesso as suas propriedades, as informações pertinentes e pela doação dos animais;

Ao Laboratório de Sanidade de Animais Aquáticos (LASAq) do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE, na pessoa da professora Dra. Emiko Shinozaki Mendes, pelo uso de suas instalações para a realização da parte experimental deste trabalho;

A Universidade do Estado da Bahia – UNEB, Campus Paulo Afonso, CDTA - Centro de Desenvolvimento e Difusão de Tecnologia em Aqüicultura, especialmente aos professores Ticiano Rodrigo Almeida de Oliveira e Fátima Lúcia de Brito dos Santos, por sua cooperação na execução de algumas coletas;

Ao professor Dr. Paulo de Paula Mendes por sua ajuda inestimável na elaboração da estatística deste trabalho;

A Médica Veterinária Dra. Lílian Maria Nery de Barros Góes pelo companheirismo, atenção e ajuda inestimável na condução do experimento, neste trabalho;

As Médicas Veterinárias e Médicos Veterinários: Msc. Verônica Arns da Silva, Msc. Virginia Fonseca Pedrosa, Msc. Andréa Christianne Barretto, Msc. Joana Dourado, Msc. Héliida Maria Gomes de Melo, Rejane de Oliveira Luna, Roberta Dourado, Ducilene Lacerda Nascimento, João Menezes Guimarães, Danilo Mendes da Silva, Eduardo Melo, Marluce Souza, Carolina Nottaro de Barros, Sarah Michele Rodrigues Galvão, Renata Valença Vaz, Vitor Dantas, José Givanildo da Silva e Júlio César Conserva pela dedicação, apoio e incondicional ajuda para realização deste experimento;

A todos os professores e funcionários que fazem o Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE, pelo apoio e colaboração durante todo o curso, em especial as

funcionárias terceirizadas Dona Márcia e Cleide, pelo auxílio na lavagem e descontaminação de materiais e limpeza do laboratório;

A minha amiga Cosinha, pelo desafio inovador proposto para minha vida profissional e pela aceitação de uma discípula, há tanto tempo afastada da academia;

Finalmente, a todos que por culpa de minha memória falha, não foram citados como deveriam neste agradecimento, mas que não foram de forma alguma menos importantes na realização deste trabalho.

Obrigada!

"Confie no Senhor de todo o coração e não se apóie na sua própria inteligência. Lembre-se de Deus em tudo o que fizer, e Ele lhe mostrará o caminho certo".

Provérbios 3.5-6

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
3	REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1	O cultivo de tilápias	16
3.2	Doenças bacterianas em tilápias	17
3.2.1	Vibrioses	21
3.2.2	Aeromonoses	22
3.2.3	Pseudomonose	24
3.2.4	Edwardsielse	24
3.2.5	Estreptococose	25
3.2.6	Columnariose	26
4	REFERÊNCIAS.....	28
5	ARTIGO I	34
6	ARTIGO II	59

LISTA DE TABELAS

	Páginas	
TABELA 1	Percentual de lesões encontradas em órgãos externos de tilápias enfermas	
Artigo I	em cultivos comerciais, Pernambuco, Brasil.....	50
TABELA 2	Percentual de anormalidades encontradas em órgãos internos de tilápias	
Artigo I	enfermas em cultivos comerciais, Pernambuco, Brasil.....	51
TABELA 1	Percentual de lesões encontradas em órgãos externos de tilápias enfermas	
Artigo II	em cultivos comerciais, Pernambuco, Brasil.....	73
TABELA 2	Percentual de anormalidades encontradas em órgãos internos de tilápias	
Artigo II	enfermas em cultivos comerciais, Pernambuco, Brasil.....	74

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
FIGURA 1 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos testados para espécies de Artigo I vibrios isolados de tilápias enfermas em cultivos comerciais, Pernambuco, Brasil.....	52
FIGURA 1 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos testados para espécies de Artigo II aeromonas isolados de tilápias enfermas em cultivos comerciais, Pernambuco, Brasil.....	75

RESUMO

No Brasil, estima-se que a produção anual de tilápias supere 100 mil toneladas, principalmente devido ao potencial produtivo da região Nordeste que em 2004 respondeu por 41 % da produção total de 70.000 toneladas, gerando renda de US\$ 200.000.000,00, decorrente de suas condições climáticas, disponibilidade de tecnologia e mercado de consumo, regional e nacional em expansão. A intensificação de cultivos tem como consequência o aumento de matéria orgânica, que favorece a multiplicação de microrganismos, possibilitando o surto de doenças na ocorrência de situações adversas aos peixes. Tilápias (*Oerochromis niloticus*) de cultivos do estado de Pernambuco foram avaliadas com objetivo de determinar a frequência de doenças bacterianas. Para tanto, analisaram-se amostras de diversas fazendas, nos diversos aspectos, com relevância para os agentes bacterianos. As tilápias foram examinadas quanto à presença de estreptococos, vibrios, coliformes, pseudomonas e aeromonas. Foram realizados exames clínicos e necropsias, para análise microscópica das lesões e melhor definição do provável agente etiológico. As análises foram realizadas no Laboratório de Sanidade de Animais Aquáticos (LASAq) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e no Centro de Desenvolvimento e Difusão de Tecnologia em Aqüicultura da Universidade Estadual da Bahia (UNEB). Os principais agentes patológicos foram vibrios e aeromonas, que são patógenos oportunistas responsáveis por perdas significantes, sendo identificadas as seguintes espécies em 46 isolados: *Vibrio natriegens* (1/46), *V. metschnikovii* (2/46), *V. haliotocoli* (1/46), *V. fischeri* (2/46), *V. mimicus* (23/46), *V. diabolicus* (1/46), *V. furnissi* (1/46), *V. cholerae* O1 (1/46), *V. scophthalmi* (4/46), *V. proteolyticus* (3/46), *V. argarivorans* (1/46), *V. ordalii* (2/46) e *Vibrio* spp.(3/46). Os vibrios isolados apresentaram maior sensibilidade aos antimicrobianos enrofloxacina (100%) e florfenicol (98,18%) e em ordem decrescente, gentamicina (90,91%), cotrimoxazol (sulfametoxazol+trimetoprima) (76,36%), tetraciclina (67,27%), eritromicina (30,91%) e amoxicilina (3,64%). Os isolados testados apresentaram-se 100% resistentes a penicilina. Neste estudo, 96,4% (53/55) dos vibrios apresentaram índice múltipla resistência a antibióticos (MAR), superior a 0,22, caracterizando múltipla resistência. Em 35 isolados as aeromonas identificadas foram: *Aeromonas caviae* (1/35), *A. shubertii* (11/35), *A. media* (4/35), *A. popoffii* (1/35), *A. sobria* (3/35), *A. encheleia* (4/35), *A. veronii* (4/35) e *A. jandaei* (4/35). Foram testados 40 isolados de aeromonas quanto à sensibilidade a oito antimicrobianos, tendo mostrado maior sensibilidade a florfenicol (100,0%), enrofloxacina (95,0%), gentamicina (95,0%), cotrimoxazol (sulfametoxazol+trimetoprima) (67,5%), tetraciclina (65,0%). Houve menor sensibilidade a eritromicina (20,0%), penicilina (5,0%) e a amoxicilina (2,5%), confirmando a existência de resistência. O índice MAR para os isolados de aeromonas variou de 0,12 a 0,62, dos quais 95% (38/40) apresentaram índices superiores a 0,22, caracterizando multiresistência. A maioria das espécies de vibrios isoladas não é considerada patogênica para os peixes (ambientais), mas ainda assim podem representar risco para a saúde das tilápias por questão de oportunismo e do consumidor, principalmente se consumido cru. As aeromonas móveis isoladas e identificadas neste estudo são comumente consideradas como ambientais, porém muitos dos peixes analisados apresentaram sintomatologia compatível com a enfermidade causada por estes agentes oportunistas.

ABSTRACT

In Brazil, it is considered that the annual production of tilapias overcomes 100 thousand tons, mainly due to the productive potential of the Northeast area that answered for 41% of the total production of 70.000 tons in 2004, generating income of US\$ 200.000.000,00, due to your climatic conditions, technology readiness and consumption market, regional and national in expansion. The intensification of cultivations has as consequence the increase of organic matter, that it favors the multiplication of microorganisms, making possible him/it supplies of diseases in the occurrence of adverse situations to the fish. Tilapia (*Oerochromis niloticus*) of cultivations of the state of Pernambuco they were appraised with objective of determining the frequency of bacterial diseases. For so much, samples of several farms were analyzed, in the several aspects, with relevance for the bacterial agents. The tilapia were examined with relationship to the streptococcus presence, vibrios, coliform, pseudomonas and aeromonas. Clinical exams and autopsy were accomplished, for microscopic analysis of the lesions and better definition of the probable agent etiological. The analyses were accomplished at the Laboratory of Sanity of Aquatic Animals (LASAq) of the Rural Federal University of Pernambuco (UFRPE) and in the Center of Development and Diffusion of Technology in Aquaculture of the State University of Bahia (UNEB). The principal pathological agents were vibrios and aeromonas, that are pathogens responsible opportunists for significant losses, being identified the following species in 46 isolated: *V. natrigens* (1/46), *V. metschnikovii* (2/46), *V. halioticoli* (1/46), *V. fischeri* (2/46), *V. mimicus* (23/46), *V. diabolicus* (1/46), *V. furnissi* (1/46), *V. cholerae o1* (1/46), *V. scophthalmi* (4/46), *V. proteolyticus* (3/46), *V. argarivorans* (1/46), *V. ordalii* (2/46) and *Vibrio* spp. (3/46). The isolated vibrios presented larger sensibility to the antimicrobianos enrofloxacin (100%) and florfenicol (98,18%) and in decreasing order, gentamicina (90,91%), cotrimoxazol (sulfametoxazol+trimetoprim) (76,36%), tetraciclina (67,27%), eritromicina (30,91%) and amoxicilina (3,64%). The isolated ones tested they came 100% resistant the penicillin. In this study, 96,4% (53/55) of the vibrios they presented index multiple resistance to antibiotics (MAR), superior to 0,22, characterizing multiple resistance. In 35 isolated the identified aeromonas were: *A. caviae* (1/35), *A. shubertii* (11/35), *A. media* (4/35), *A. popoffii* (1/35), *A. sobria* (3/35), *A. encheleia* (4/35), *A. veronii* (4/35) e *A. jandaei* (4/35) Forty were tested isolated of aeromonas with relationship to the sensibility to 08 antimicrobial, of these they showed larger sensibility the florfenicol (100,0%), enrofloxacin (95,0%), gentamicina (95,0%) and in decreasing order, cotrimoxazol (sulfametoxazol+trimetoprima) (67,5%), tetraciclina (65,0%). There was smaller sensibility the eritromicina (20,0%), penicillin (5,0%) and the amoxicilina (2,5%), confirming the resistance existence. The index of multiple resistance to antibiotics (MAR) for the isolated of aeromonas it varied in an interval from 0,12 to 0,62, of these 95% (38/40) they came superior to 0,22 characterizing multiple resistance. Most of the species of isolated vibrios is not considered pathogenic for the fish (environmental), but nevertheless they can represent risk for the health of the tilapia for subject of opportunism and of the consumer, mainly if consumed raw. The isolated and identified movable aeromonas in this study are commonly considered as environmental, however many of the analyzed fish presented compatible symptomatology with the illness caused by these agents opportunists.

1. INTRODUÇÃO

A aquicultura cresce no mundo com uma taxa de 6,7% ao ano, mais rapidamente que qualquer outro setor produtor de alimentos de origem animal e em maior ritmo que o crescimento da população. Este setor produtivo forneceu em 2006, 47% do total de pescado usado para alimentação, em valores de 5,7 milhões de toneladas, equivalendo a 78.800 milhões de dólares (FAO, 2009).

No Brasil o cultivo de organismos aquáticos é restrito a um número limitado de espécies de camarão, ostra, mexilhões em água salgada e tilápia, carpa, tambaqui e truta em água doce (IGARASHI et al., 2009).

As tilápias e outros ciclídeos são o segundo grupo de peixes mais cultivados no mundo, só perdendo para as carpas, com a produção de 723 milhões de toneladas (FAO, 2009). O cultivo de tilápias no mundo iniciou no Quênia em 1924, e no Congo em 1937, no Brasil, data de 1971, através do DNOCS – Departamento Nacional de Obras contra as Secas. Há mais de 70 espécies de tilápias no mundo, mais apenas quatro são responsáveis pelo patrimônio genético das tilápias hoje cultivadas comercialmente: a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), a tilápia azul (*Oreochromis aureus*), a tilápia de Moçambique (*Oreochromis mossambicus*) e a tilápia de Zanzibar (*Oreochromis uroleps hornorum*) (KUBITZA, 2005).

Apesar de não haver estatísticas oficiais, Kubitza (2005) afirmou que a produção brasileira de tilápias supera 100.000 toneladas/ano e é destinada grande parte ao mercado interno, o que pode significar quase 9% do consumo de pescado brasileiro. Em 2003, o Brasil despontou como o maior produtor de tilápias da América do Sul, com mais de 60.000 toneladas, segundo circular da FAO (2006) que alertou para perdas significativas referentes a enfermidades causadas por deficiências na qualidade dos alimentos balanceados e qualidade da água, com perdas de 30 a 40% da produção intensiva, com valores superiores aos 2,5 milhões de dólares americanos em países como Colômbia e Costa Rica.

Os cultivos de tilápias foram objeto de diversas tecnologias, o que possibilitou ao exemplar alcançar de 400 a 500 gramas em 05 meses, e ao consumidor produtos como o peixe vivo, abatido, inteiro, eviscerado, resfriado, filetado e congelado (IGARASHI et al., 2009). A tilápia (*Oreochromis niloticus*) tem características como resistência ao manuseio e transporte, facilidade no arraçoamento, crescimento rápido, resistência a baixas concentrações de oxigênio dissolvido, além de apresentar carne de sabor agradável e com poucas espinhas (OETTERER, 2002; KUBITZA, 2003).

A tilápia passou a ser a espécie de peixe mais cultivada no Brasil a partir do ano de 2002. Sua produção representou 26% do total produzido pela aquicultura nacional no ano de 2004. O país respondeu por 64% da produção total da espécie e 67% em receitas geradas pelo seu cultivo na América do Sul no referido ano (BOSCARDIN, 2008).

A intensificação dos cultivos traz como consequência elevação de matéria orgânica, que por sua vez, favorece a multiplicação de microrganismos. Dentre eles, destacam-se as bactérias, por se proliferarem rapidamente em ambientes aquáticos e persistirem em hospedeiros, sem provocar a doença, até que ocorra alguma alteração (estresse) capaz de causar danos ao sistema imune do animal. Nestas circunstâncias, é importante uma rápida intervenção, tanto na erradicação do fator alterador (estressante), como no rápido diagnóstico e tratamento eficaz, para que as perdas não sejam elevadas.

O surgimento de enfermidades nos diferentes sistemas de cultivo de tilápias representa um importante fator de impacto na sanidade afetando, sobretudo no rendimento na produção e a qualidade do pescado que chega à mesa do consumidor.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

- Relacionar bactérias e lesões observadas em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) cultivadas em Pernambuco.

2.2. ESPECÍFICOS

- Identificar as principais alterações clínicas e lesões macroscópicas;
- Isolar e identificar os estreptococos, víbrios, coliformes, pseudomonas e aeromonas e outros agentes bacterianos patogênicos;
- Identificar as lesões anatomopatológicas das tilápias cultivadas e seu provável agente etiológico;
- Relacionar as lesões anatomopatológicas encontradas nas tilápias aos resultados dos agentes microbiológicos dos animais;
- Quantificar a frequência dos agentes causadores de bacterioses piscícolas identificados.
- Associar a ocorrência de bactérias isoladas com as enfermidades encontradas;
- Avaliar a ação de drogas antimicrobianas em bactérias isoladas.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O Cultivo de tilápias

A tilápia teve uma produção de 2.025.560 toneladas em 2005, num percentual de 6.7% da produção global. No último decênio (1995-2005) a tilapicultura mostrou um crescimento na produção de 11,2 %, sendo o Brasil o 7º produtor, com 3,3% do total produzido, o que totaliza 68.843,48 toneladas (FAO, 2007).

No Brasil, em 2007, a produção de peixes em aquicultura continental, foi de 209.812 toneladas, o que correspondeu a U\$ 438.874.261,4, em valores atuais. Deste total, a produção de tilápias representou 45,3%, o equivalente a 95.091 toneladas comercializadas, destas 105.632 kg foram exportados sob forma de filé congelado e 111.613 kg como peixes frescos ou resfriados (IBAMA, 2007).

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.), introduzida no Brasil em 1971, é uma espécie popular na maioria das regiões brasileiras e representa metade da produção brasileira de peixe cultivado, estimando-se 40 a 50 mil toneladas anuais (OETTERER, 2002; KUBITZA, 1999).

A produção de tilápias em cultivos semi-intensivos e intensivos chega a 35 mil toneladas, sendo a espécie de água doce mais cultivada no Brasil, segundo dados do Ministério da Agricultura - Setor Pesqueiro, para o ano de 2002. Além disto, o potencial piscícola da tilápia para pequenos criadores se deve ao fato dessa espécie ser resistente ao manuseio e transporte, de arraçoamento fácil e econômico, crescimento rápido e resistente à baixa concentração de oxigênio dissolvido, além de apresentar a carne de sabor apreciado e com poucos espinhos. O Brasil tem potencial para se tornar o maior produtor de pescado cultivado no mundo, estando o Nordeste com produções de até 15.000 t de peixes, nos mais de 100 reservatórios do Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS), sendo a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) a espécie não nativa mais popular e cerca de 4.500 toneladas são capturadas nesta região, anualmente (OETTERER, 2002).

No Brasil, a piscicultura continental concentra-se principalmente na produção de tilápias, principalmente no Nordeste, Sul e Sudeste. No Nordeste em 2004, a produção de peixes, um total de 39,1 toneladas, ocupou o segundo lugar no ranking brasileiro, com um incremento de 21 % na produção. A tilápia, a partir de 2002, ocupa o primeiro lugar na produção piscícola nacional, seguida pelas carpas e tambaquis. Em 2004, as tilápias responderam por quase 70.000 toneladas produzidas, gerando uma receita de mais de US\$

200.000.000,00 sendo que a região Nordeste respondeu por 41% desta produção, indicando uma tendência ancorada nas condições climáticas, disponibilidade de tecnologia e mercado de consumo, regional e nacional em expansão (BOSCARDIN, 2008).

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), introduzida no Brasil em 1971, é uma espécie popular na maioria das regiões brasileiras, e tem possibilitado a obtenção de resultados técnicos e econômicos bastante consistentes no que se refere ao cultivo em tanques-rede, dentre os quais se destacam: produtividade de 150-200 kg/m³/ano; taxas de conversão alimentar médias de 1,6:1; 130 dias de cultivo para atingir o peso de abate de 750g e margem líquida de lucro variando de 10 a 25%. (OETTTERER, 2002; KUBITZA, 2003; OSTRENSKY et al., 2008).

3.2 Doenças bacterianas em tilápias

A intensificação em cultivos de peixes resulta em relevante crescimento produtivo, de grande importância econômica. Este crescimento leva ao uso de altas densidades de estocagem, o que propicia também o aumento da população bacteriana, que se dissemina facilmente, podendo ser responsáveis por infecções. A água é um ambiente extremamente favorável para a proliferação de patógenos, com rapidez e eficiência. Os peixes podem ser hospedeiros de moléstias sem apresentarem sintomatologia clínica, dificultando seu cultivo, pois podem proliferar se houverem alteração nas condições ambientais ou do hospedeiro (PAVANELLI et al., 1998).

A maioria das bactérias causadoras de doenças são saprófitos do peixe e do meio ambiente, encontradas na superfície ou no intestino dos animais, podendo causar sinais clínicos quando estes sofrerem estresse ou na presença de outra doença. Diversos gêneros de bactérias patogênicas para o cultivo de piscícola são relacionados, como: *Aeromonas*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Yersinia*, *Edwardsiella*, *Pasteurella* e *Cytophaga*. Os peixes podem ser importantes substratos para as diversas espécies bacterianas presentes no meio aquático, associando-se de forma oportunista ou mesmo como patógeno (SOUTHGATE, 1993; PADRÕS, 2007).

São bacterioses já conhecidas na atividade piscícola, a columnariose (*Flexibacter columnaris*); a septicemia hemorrágica (*Aeromonas hydrophila*); outras septicemias com hemorragia visceral e cutânea (*Pseudomonas fluorescens*) e a causada pelo *Streptococcus faecalis*. Também o *Mycobacterium* spp., causador de tuberculose no homem, bovinos e aves estão presentes nas patologias piscícolas de origem bacteriana (MARTINS, 1998).

As infecções bacterianas podem causar grande mortalidade de peixes em curto espaço de tempo e por ocasião da diminuição de suas defesas orgânicas, as bactérias presentes no meio aquático se manifestam colonizando seus órgãos iniciando o processo infeccioso. Cecarelli et al. (2001) citaram como agentes etiológicos bacterianos: *Flexibacter columnaris*, causador da columnariose e *Aeromonas punctata*, responsável pela Septicemia Hemorrágica Bacteriana.

Jiménez (2007) afirmou que embora as tilápias sejam resistentes as condições do meio ambiente, o aumento das densidades de cultivo, o policultivo e condições adversas na qualidade da água, as expõem ao desenvolvimento de patógenos e condições de estresse, que determina o surgimento de enfermidades.

Prata (1997) relatou que as bactérias são consideradas agentes patógenos importantes, localizando-se sobre a superfície corpórea das brânquias e intestinos dos peixes, amplamente presente no ambiente aquático, sendo vários os microrganismos deteriorantes e patogênicos presentes. Segundo Martins (1998), as populações bacterianas podem estar presentes na água ou no muco de peixe (reservatório natural).

Ranzani-Paiva et al. (2004) citaram diversos agentes etiológicos associados à síndrome da septicemia hemorrágica bacteriana em tilápia, tendo identificados *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, *Pasteurella multocida*, *Proteus* spp., *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas* spp., *Vibrio parahaemolyticus*, *V. vulnificus* e *Vibrio* spp., além do *Flexibacter columnaris*, em águas doces continentais tropicais, sub tropicais e temperadas, com temperaturas que variam de 12,6 a 30 °C.

A grande frequência das bacterioses na piscicultura intensiva foi destacada por Kubitzka (2004), sendo os gêneros mais comuns *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium columnaris* e *Streptococcus* spp., este último mais frequente em tilápias e responsável por perdas significativas em sistemas de cultivo intensivo nos Estados Unidos. Assinala ainda que a presença de *Streptococcus* spp. foi observada em muitas espécies de peixes, embora tenha sido mais comum em tilápias.

A flora bacteriana presente em guelras e intestinos de tilápias, aparentemente sãs, pode ser influenciada pela microflora no meio ambiente, incluindo patógenos facultativos, os quais sob condições de estresse podem causar epizootias nos peixes (AL-HARBI E UDDIN, 2005). Estes autores relataram que as espécies bacterianas dominantes presentes nas guelras foram *Vibrio carchariae*, *Chryseomonas* spp., *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *Streptococcus* spp. e *V. parahaemolyticus* e nos intestinos foram *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *Streptococcus* spp., *Chryseomonas* spp., *V. vulnificus* e *V. carchariae*.

Em outro estudo, Al-Harbi e Uddin (2003), analisaram quantitativa e qualitativamente, a microbiota bacteriana de tilápias híbridas (*Oreochromis niloticus x O. aureus*), relataram a predominância de *Corynebacterium urealyticum*, *Shewanella putrefaciens* e *Aeromonas hydrophila*. Na água dos viveiros predominaram *C. urealyticum*, *S. putrefaciens*, *A. hydrophila*, *Flavobacterium* spp. e *Pseudomonas* spp.

A microbiota varia de acordo com a estação do ano e os bacilos Gram-negativos foram os principais achados bacteriológicos, sendo as espécies *Aeromonas hydrophila*, *Shewanella putrefaciens*, *Corynebacterium urealyticum*, *Escherichia coli* e *Vibrio cholerae* as mais abundantes, com prevalência maior que 10%, exceto para *Vibrio cholerae*. *Pseudomonas* spp. foi achada apenas no inverno e *Photobacterium damsela*, *Pasteurella* spp., *Cellulomonas* spp. e *Bacillus* spp. em outras estações do ano (AL-HARBI E UDIN, 2004).

Molinari et al., (2003) verificaram no estado do Paraná, que as espécies mais comuns encontradas no trato gastrintestinal de tilápias, foram as Gram-negativas: *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veronii*, *Burkholderia cepacia*, *Chromobacterium violaceum*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Flavimonas oryzihabitans*, e *Plesiomonas shigelloides*.

Edwardsiella tarda foi avaliada por Muratori et al. (2001), em tilapicultura consorciada com suínos, onde foi observado sinais clínicos como opacidade da córnea, dificuldade respiratória, nado desordenado, nódulos nas brânquias e lesões hemorrágicas na pele e nadadeiras, com maiores índices de mortalidade no inverno e na primavera. Os autores alertaram para o potencial patogênico deste agente em tilápias e no humano através da ingestão de carne crua de peixes.

Tilápias infectadas pela bactéria *Edwardsiella tarda* apresentaram os seguintes sinais clínicos: hemorragias na pele e na boca e presença de alterações cutâneas. A mortalidade deste cultivo alcançou 83% em quatro dias, sendo relacionada à má qualidade da água e a presença deste agente (BENLI e YILDIZ, 2004).

Uma doença, com achados clínicos compatíveis com meningo-encefalite, surgiu em peixes cultivados em Israel. Tilápias apresentaram mortalidade de 30%, destas foram isoladas duas novas espécies de estreptococos (*Streptococcus shiloi* e *Streptococcus difficile*), confirmadas experimentalmente com inoculação em tilápias sãs que reproduziram os mesmos sintomas (ELDAR et al., 1995).

Salvador (2002) ressaltou que a septicemia causada por *Streptococcus* spp corresponde ao maior problema sanitário de origem bacteriana em sistemas de cultivo intensivo de

tilápias (*Oreochromis* spp). Dentre os estreptococos, destacou o *Streptococcus iniae* e o *Streptococcus difficile* como os mais importantes patógenos de tilápias na atualidade.

Avaliando os efeitos da dose infectante e da densidade de cultivo em tilápias expostas ao *Streptococcus iniae*, quanto à mortalidade, Shoemaker et al. (2000) encontraram significância, quanto à densidade e quanto à dose, apenas quando esta estava relacionada a altas densidades de cultivo, sugerindo a importância de estratégias de manejo para diminuir a densidade nos cultivos, controlando assim a mortalidade por este patógeno.

Evans et al. (2000) avaliaram como possíveis vias de infecção por *Streptococcus* spp., as narinas e olhos de tilápias, usando como agente o *Streptococcus iniae*, para inoculações experimentais. Peixes inoculados pelas narinas apresentaram sinais clínicos e mortalidade, e aqueles inoculados pelos olhos, não apresentaram tais sinais, o que sugere que as narinas são sítios de infecção em potencial para tilápias.

No Brasil, Figueiredo et al. (2005) relataram o primeiro isolamento e caracterização de espécies de *Flavobacterium columnare* em tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus* (L.) jovens e adultas e as principais lesões observadas foram necrose nas barbatanas e ulcerações na pele, com significativos índices de mortalidade. Em seus resultados experimentais observaram o potencial patogênico deste microrganismo em tilapiocultivos no Brasil.

Em criatórios contaminados com dejetos, a qualidade microbiológica da água e de tilápias foi avaliada e indicou que todas as amostras de tecidos, exceto tecido muscular, foram contaminadas com coliformes fecais, mostrando diminuição de contaminação na seguinte ordem: intestinos > guelras > pele > fígado. O pré-tratamento destes dejetos foi recomendado antes de seu uso nos criatórios e os autores concluíram que parâmetros de qualidade da água afetam os índices de contaminação bacteriana nos órgãos dos peixes. (EL-SHAFAI et al., 2004).

A resistência de bactérias a antimicrobianos foi determinada por Lima et al. (2006) em bactérias isoladas de uma piscicultura de tilápias (*Oreochromis niloticus*), sendo a maioria pertencente às famílias Enterobacteriaceae e Vibrionaceae, e apresentaram-se resistentes principalmente a ampicilina e eritromicina. Estes autores identificaram quatro famílias bacterianas distintas no ambiente da piscicultura de água doce, sendo elas: *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae* e *Micrococcaceae*. Destaca-se que no ambiente de criação de tilápia do Nilo, as famílias bacterianas resistentes aos antibióticos testados (tetraciclina, cloranfenicol, ampicilina, norfloxacina) foram *Enterobacteriaceae* (25%), *Vibrionaceae* (19%), *Pseudomonadaceae* (6%), *Micrococcaceae* (4%) e não identificadas (46%).

3.2.1 Vibrioses

Vírios são patógenos facultativos que podem perfeitamente sobreviver e multiplicar no meio ambiente. Comumente isolados de superfícies mucosas e de órgãos internos de peixes clinicamente sadios, como também de invertebrados, sedimentos e coluna d'água. Altamente adaptado ao meio, está presente em águas poluídas e com salinidade alta. A vibriose é comum no verão em virtude de suas temperaturas altas, o que pode ocasionar surtos. O *Vibrio anguillarum* é o mais comum víbrio patogênico de peixes. Os sinais clínicos apresentados são similares aos causados por *Aeromonas*, ambos causam ulcerações na pele e infecções sistêmicas podem ocorrer localizando-se em órgãos ricos em ferro, como baço e rim. Na forma hiper aguda anorexia, escurecimento e morte súbita em peixes jovens estão presentes e na forma aguda escurecimento, oscilação e úlceras com cavidades subdermais com fluido sero-sanguinolento. Há distensão abdominal, anemia e hemorragia na derme (NOGA, 1996).

Vírios são bacilos Gram negativos, oxidase positiva, anaeróbios facultativos, halofílicos e podem estar presentes em águas marinhas, estuarinas e continentais. Holt et al. (1994) descreveram 20 espécies do gênero vírios e em torno de 70 espécies são consideradas atualmente. As espécies *Vibrio parahaemolyticus* e *V. anguillarum* são reconhecidamente patogênicas para peixes (SHÄPERCLAUS, 1992). Outras espécies de vírios fazem parte da microbiota da água, porém são considerados patógenos oportunistas, contaminando os peixes e causando enfermidade.

Shäperclaus (1992) citou duas formas de vibrioses nos peixes: a aguda que está associada a infecção generalizada e a crônica com infecções localizadas principalmente na pele, musculatura e intestino. Infecções por *Vibrio parahaemolyticus* podem causar septicemia aguda ou de curso imperceptível. Os seguintes sinais foram observados na forma aguda: peixes susceptíveis (resistência diminuída) podem morrer sem sinais clínicos evidentes, com convulsões espasmódicas repentinas. Mas geralmente se observam o desenvolvimento de eritema e hemorragias nas nadadeiras e em outras partes do corpo.

A Comissão do Codex Alimentarius (FAO, 2003) discutiu o problema causado pelo *Vibrio* spp. e o *V. parahaemolyticus* presentes em peixes e moluscos. No homem, o *V. parahaemolyticus* comumente causa gastroenterite aguda autolimitante, porém alguns casos requerem hospitalização e em casos mais raros, septicemia pode ocorrer. As infecções por este microrganismo têm sido associadas ao consumo de lagosta, camarão, molusco, cavala,

mexilhões, atum, polvo, lula, ouriço-do-mar, sardinha, salada de frutos do mar e carne de caranguejo.

Ao avaliar as condições sanitárias de peixes comercializados em feiras livres da cidade de São Paulo, Silva (2007) isolou vibrios de 30% das amostras, inclusive *Vibrio cholerae* não O1/não O139, além de *V. alginolyticus*, o que sugere que estes peixes podem representar risco para a saúde pública.

Como resultado de manipulação inadequada de peixes, 50 pescadores do município de Raposa – Maranhão, apresentaram feridas cutâneas com processo infeccioso de onde foram isolados e identificados as seguintes espécies do gênero *Vibrio*: *V. alginolyticus* (66,6%), *V. parahaemolyticus* (42,8%) e de *V. cholerae* não O1 (9,5%) (RODRIGUES et al.,2001).

A multiplicação do *Vibrio harveyi*, responsável pela luminescência nos viveiros e possível agente patogênico, foi inibido nos viveiros de camarões (biomassa-80g/m³) quando cultivados junto com machos de tilápia (*Oreochromis hornorum*) com uma biomassa de 300g/m³ em tanques-rede, afirmaram Tendencia et al. (2004) com resultado de seu estudo.

Lima (2002) relatou como resultado de seu experimento de dissertação, a frequência de 19% para a família Vibrionaceae em famílias bacterianas resistentes a antibióticos em ambiente de criação de tilápias do Nilo.

Fouz et al. (2002) verificaram a susceptibilidade da tilápia do Nilo à vibriose experimental causada pelo *Vibrio vulnificus*, biótipo 2, e obtiveram resultados indicativos de que água e ração pode agir como veículo para a transmissão de vibriose, sendo ameaça à saúde destas, principalmente se criadas junto a enguias.

3.2.2 Aeromonoses

Southgate (1993) definiu a aeromonas como sendo uma bactéria móvel, responsável por significantes surtos de septicemia hemorrágica em aquiculturas. Um típico patógeno oportunista, ubíquo no meio aquático, particularmente em águas com depósitos orgânicos, porém só causa doenças quando o peixe é submetido a estresses, danos ou infecções primárias. O seu controle envolve práticas de manejo adequado, incluindo qualidade da água, ausência de estresse e antibioticoterapia.

São sinais clínicos presentes nas infecções por *Aeromonas hydrophilla* e *Pseudomonas fluorescens*, perda de apetite, redução da atividade (natação vagarosa), erosão e hemorragia nas bordas das nadadeiras, lesões ulcerativas sobre o corpo, exoftalmia, abdômen distendido. À necropsia observou-se presença de líquido sanguinolento, fígado

pálido com petéquias, que podem ainda estar presentes na parede da cavidade abdominal (Kubitza, 1999).

A doença ocorre comumente em águas com grande quantidade de matéria orgânica, associado com estresse tais como manuseio, parasitismo e pouca oxigenação. Os sintomas são de septicemia hemorrágica, incluindo hemorragias nos flancos e aberturas. A liquefação do rim é uma característica frequente. Em casos sub agudos ou crônicos, erosões necróticas e ulcerações são evidentes externamente. Há necrose no tecido hematopoético do rim e baço e pontos necróticos no coração, fígado, pâncreas e músculos (HOLLIMAN, 1993).

Noga (1996) descreveu como manifestações clínicas causadas por *Aeromonas* em peixes de água doce: áreas de hemorragia e necrose na base das nadadeiras e pele, que podem progredir de úlceras vermelhas a cinzas, com necrose, aprofundando-se até o músculo. Estas úlceras podem resultar em septicemia hemorrágica, com exoftalmia, abdômen distendido com fluido seroso sanguinolento, petéquias viscerais, hemorragia e edema no intestino e aberturas naturais. Anorexia e coloração escura do peixe são muito comuns na doença sistêmica. Histopatologicamente as lesões de pele incluem dermatite aguda a crônica, em septicemias há depressão e necrose do tecido hematopoético esplênico e renal; necrose da mucosa intestinal e focos necróticos no coração, fígado, pâncreas e gônadas.

A aeromonose é provavelmente a mais comum das infecções de peixes de água doce, todos os organismos cultivados são susceptíveis a esta enfermidade, podendo desenvolver-se também em peixes cultivados com o uso de águas salobras. As espécies que causam doenças são várias, entre outras *A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. caviae* e *A. veronii* tem sido isoladas de órgãos internos e mucosas, com maior incidência em águas contaminadas. Além da bactéria, outros fatores tais como os ambientais, densidade de população elevada, qualidade química da água, são os que desencadeiam a enfermidade. Alevinos de tilápia podem apresentar necrose na base das nadadeiras, que se iniciam com processos hemorrágicos, laceração e perda parcial (JIMÉNEZ, 2007).

No Brasil, segundo Hirsch (2004), não se conhece o perfil de espécies de *Aeromonas* em pisciculturas comerciais e na sua pesquisa foram encontradas nove espécies, *A. jandaei*, *A. hydrophila*, *A. trota*, *A. caviae*, *A. sobria*, *A. eucrenophila*, *A. veronii* bt *veronii*, *A. schubertii* e *A. media*, em oito tilapiocultivos no estado de Minas Gerais. Das espécies achadas, 40% apresentaram resistência a duas ou mais drogas antimicrobianas testadas (gentamicina, teraciclina, eritromicina, sulfonamidas, ácido nalidíxico, cloranfenicol, nitrofurantoína, canamicina e norfloxacina) caracterizando um quadro de multiresistência.

3.2.3 Pseudomonose

Pseudomonas são patógenos oportunistas, secundários ou associados a condições inadequadas de cultivo, isoladas de lesões externas ou de processos septicêmicos de peixes (PADRÓS e FURONES, 2007). Segundo Holliman (1993) são comuns em todo o mundo e todas as espécies de peixe são suscetíveis, principalmente os de água doce, e nos cultivos com excesso de matéria orgânica. A doença é relacionada ao estresse e manifesta-se como uma septicemia hemorrágica com sinais clínicos similares aquela causada por *Aeromonas* móveis.

3.2.4 Edwardsielse

Edwardsiella tarda são bacilos Gram-negativos, pertencentes a família Enterobacteriaceae, anaeróbios facultativos e mesófilos, e foi relatada sua ocorrência (6,6%) em tilápias cultivadas em consórcio com suínos em Minas Gerais, Brasil (MURATORI et al., 2001). Estas bactérias são encontradas particularmente em águas poluídas e responsabilizados por doença severa em tilápias (SOUTHGATE, 1993).

Clinicamente o peixe apresenta pequenas lesões de pele que penetram até o músculo subjacente. A rápida necrose afeta o tecido muscular formando cavidades cheias de gás. Internamente há necrose das vísceras acompanhadas por peritonite grave (SOUTHGATE, 1993).

Benli e Yildiz (2004) verificaram que as tilápias infectadas pela bactéria *Edwardsiella tarda* apresentaram os seguintes sinais clínicos: hemorragias na pele e na boca e presença de alterações cutâneas. A mortalidade neste cultivo alcançou 83% em quatro dias, sendo relacionada à má qualidade da água e a presença deste agente.

Em tilápias, as lesões incluem despigmentação da pele, abdômen edemaciado e opacidade córnea, segundo Noga (1996).

3.2.5 Estreptococose

Streptococcus spp. são cocos Gram-positivos, considerados agentes patógenos de diversos peixes de água continentais e marinhas, causam septicemia com sinais clínicos como: escurecimento da pele, exoftalmia, áreas hemorrágicas e lesões na pele e nadadeiras com mortalidade de até 40 % (PADRÓS et al., 2007).

O *Streptococcus* spp. tem sido responsabilizado por perdas significativas em aquiculturas de truta arco-íris e enguias, e o aspecto clínico assemelha-se as infecções por bactérias Gram-negativas (SOUTHGATE, 1993), com septicemia hemorrágica, assim como nas tilápias nilóticas.

Embora ainda não tenha sido diagnosticado no Brasil, mas por causar graves prejuízos econômicos na aquicultura mundial, o *Streptococcus iniae* será contemplado nesta revisão. Shoemaker et al. (2000) demonstraram que densidade do cultivo é fator significativo para tilápias submetidas a banhos de imersão, onde foram expostas a esse agente. Como resultados desta pesquisa observaram-se sinais típicos da doença: nado errático, escurecimento do peixe, exoftalmia e opacidade da córnea.

A sintomatologia clínica foi usada como parâmetro de observação para avaliar a capacidade de imunização conferida pela vacina de *S. iniae* na prevenção da estreptococose. Os sintomas observados foram: localização do peixe na coluna de água do aquário (superfície, meio ou fundo), formas de nado erráticas, aceitação ou recusa do alimento, hiperatividade, letargia ou ausência de respostas e escurecimento da coloração da pele. Como sintomas graves observaram-se inapetência, opacidade dos olhos e curvatura do corpo (SHOEMAKER, 2000).

Em Israel, Eldar et al. (1995) isolaram duas espécies de estreptococos, *Streptococcus shiloi* e *S. difficile* em tilápia, com mortalidade de 30%, os achados clínicos e patológicos indicaram meningite. Sintomas característicos encontrados foram letargia, apetite diminuído e nado errático. Exoftalmia bilateral foi frequente, com hemorragias intra ocular e opacidade das córneas. Fluido ascítico foi observado em tilápias no estado pré-agonico. Fato peculiar indicou comprometimento do sistema nervoso central, pois os peixes apresentavam rigidez dorsal e nado em círculos sobre si mesmo. A morte ocorreu em 2 a 3 semanas.

Evans et al. (2000) usaram o *Streptococcus iniae* em inoculações experimentais e observaram peixes com nado errático, subindo e descendo em círculos (espiral), diminuição e ausência do apetite, letargia e escurecimento da pele. Não observou-se exoftalmia, opacidade nos olhos e curvatura do corpo

Avaliando os efeitos da dose infectante e da densidade de cultivo em tilápias expostas a *Streptococcus iniae*, quanto à mortalidade, Shoemaker et al. (2000) encontraram significância quanto à densidade e quanto à dose apenas quando esta estava relacionada a altas densidades de cultivo, sugerindo a importância de estratégias de manejo para diminuir a densidade nos cultivos, controlando assim a mortalidade por este patógeno.

3.2.6 Columnariose

Columnariose é uma enfermidade que se caracteriza por lesões na pele, nadadeiras e brânquias. Esta infecção dérmica apresenta-se quando fatores como altas temperaturas, excesso de matéria orgânica na água e ações inadequadas de manejo que alterem a produção de muco ou formem ferimentos que propiciem a colonização desse microrganismo (PADRÓS et al., 2007).

Pilarski (2002) isolou e caracterizou *Flavobacterium columnare* de quatro espécies de peixes tropicais (pacus - *Piaractus mesopotamicus*, tambaquis - *Colossoma macropomum*, piracanjubas - *Brycon orbignyanus* e cascudos - *Hypostomus plecostomus*) diagnosticados clinicamente como afetados por columnariose, em Pirassununga, São Paulo. Foi relatado no Brasil, por Figueiredo et al. (2005), o primeiro isolamento e caracterização de espécies de *Flavobacterium columnare* em tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus* (L.) jovens e adultas. As principais lesões observadas foram necroses nas barbatanas e ulcerações na pele, com significativos índices de mortalidade. Nos resultados experimentais deste trabalho, a autora demonstrou o potencial patogênico deste microrganismo em tilapiculturas no Brasil.

O peixe com columnariose tem lesões (feridas) de coloração amarelada ou marrom sobre as brânquias, pele e ou nadadeiras. A bactéria eventualmente forma filamentos sobre as guelras, o que mata as células. As lesões sobre a pele são inicialmente superficiais, opacas, sem o brilho natural da pele e com o progresso da doença estas apresentam coloração amarela e marrom, com úlceras que se formam no centro da lesão (DURBOROW et al., 1988).

4. REFERÊNCIAS

AL-HARBIT, A. H.; UDDIN, N. Quantitative and qualitative studies on bacterial flora of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) cultured in earthen ponds in Saudi Arabia. **Aquaculture Research**, v. 34, p. 43-48, 2003.

AL-HARBIT, A. H.; UDDIN, N. Seasonal variation in the intestinal bacterial flora of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*) cultured in earthen ponds in Saudi Arabia. **Aquaculture**, n.229, p. 37–44, 2004.

AL-HARBIT, A. H.; UDDIN, N. Bacterial diversity of tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in brackish water in Saudi Arabia. **Aquaculture**, n. 250, p. 566– 572, 2005.

BENLI, A. C. L. K.; YILDIZ, H. Y. Blood parameters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) spontaneously infected with *Edwardsiella tarda*. **Aquaculture Research**, v.35, p.1388-1390, 2004.

BOSCARDIN, N. R. Capítulo no livro: **Aquicultura no Brasil: o desafio é crescer**. OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R.; SOTO, D. Brasília, 276 p.: il, 2008.

CECCARELLI, P. S.; ROCHA, R. C. G. A. **Principais Enfermidades de Peixes Tropicais e Respektivos Controles**. LAVRAS: Ed. UFLA/FAEPE. UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS, 2001. v. 01. 91 p.

DURBOROW, R. M.; THUNE, R. L.; HAWKE, J. P.; CAMUS, A. C. Columnaris Disease. A Bacterial Infection Caused by *Flavobacterium columnare* **Southern regional Aquaculture Center**, n.479, September, 1998.

ELDAR, A.; BEJERANO, Y.; LIVOV, A.; HOROVITCZ, A. BERCOVIER, H. Experimental streptococcal meningo-encephalitis in cultured fish. **Veterinary Microbiology**, v. 43, p. 33-40, 1995.

EL-SHAFAI, A. S.; GIJZEN, H. J.; NASR, F. A.; e EL-GOHARY, F. A. Microbial quality of tilapia reared in fecal-contaminated ponds. **Environmental Research**, v.95, p. 231–238, 2004.

EVANS, J. J.; SHOEMAKER, C. A.; KLESIUS, P. H. Experimental *Streptococcus iniae* infection of hybrid striped bass (*Morone chrysops x Morone saxatilis*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*) by nares inoculation. **Aquaculture**, n.189, p. 197–210, 2000.

FAO. Comission Codex Alimentarius. Thirty Fifth Session. Discussion Paper on Risk Management Strategies for *Vibrio* spp in seafood. Orlando – USA. 27 Jan-01 Feb. 2003.

FAO. SÍNTESIS REGIONAL DEL DESARROLLO DE LA ACUICULTURA 1. AMÉRICA LATINA Y EL CARIBE – 2005. FAO Circular de Pesca No 1017/1. Roma, Italia. p.34, 2006.

FAO. **Fisheries and aquaculture information and statistic service**: 2007: aquaculture production: 1950–2006: FISHSTAT Plus: universal software for fishery statistical time series. Disponível em: <<http://www.fao.org/fi/statist/FISOFT/FISHPLUS.asp>> Acesso em: 07 janeiro. 2010.

FAO. **The States of World Fisheries and Aquaculture 2008 – SOFIA**: El estado mundial de la pesca y la cuicultura. Roma: FAO, 2009. 196p.

FAO. EL ESTADO MUNDIAL DA PESCA E ACUICULTURA. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. 2009.

FIGUEIREDO, H. C. P.; KLESIUS, P. H.; ARIAS, C. R.; EVANS, J.; SHOEMAKER, C. A.; PEREIRA JR, D. J. e PEIXOTO, M. T. D. Isolation and characterization of strains of *Flavobacterium columnare* from Brazil. **Journal of Fish Diseases**, v.28, p. 199–204, 2005.

FOUZ, B.; ALCAIDE, E.; BARRERA, R.; AMARO, C. Susceptibility of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to vibriosis due to *Vibrio vulnificus*, biotype 2 (serovar E). **Aquaculture**, n. 212, p. 21–30, 2002.

HOLLIMAN, A. Disease in Aquaculture. In: BROWN, L. **Aquaculture for Veterinarians, Fish Husbandry and Medicine**. 1.ed. New York : Pergamon Press Lt d., 1993. p.233-234.

HOLT, J.G., KRIEG, N.R., SNEATH, P.H.A. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9.ed. Maryland: Williams & Wilkins 1994.

HIRSCH, D. **Identificação e resistência antimicrobiana de *Aeromonas* móveis provenientes de peixes e ambientes aquáticos**. 2004. 42p. Dissertação (mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG

IBAMA. **Estatísticas de Pesca**, MMA. Brasília, 2007. 113p.

IGARASHI, M.A., PENAFORT, J.M. E SOUZA, R.A.L. Aspectos básicos do desenvolvimento da aquicultura no Brasil. **PUBVET**, Londrina, V. 3, N. 3, Art#492, Jan 3, 2009.

JIMÉNEZ, R. Enfermedades de Tilapia en Cultivo. Ed. Universidad de Guayaquil. Facultad de Ciencias Naturales. Guayaquil, Equador, 2007. 108p.

KUBITZA, F. A evolução da tilapiocultura no Brasil: produção e mercados. **Panorama da aquicultura**. Rio de Janeiro, v. 13, n.76, p.25-35, Mar-abr; 2003.

KUBITZA, F. Tilápia em água salobra e salgada. Uma boa alternativa de cultivo para estuários e viveiros litorâneos. **Panorama da aquicultura**. Rio de Janeiro, v. 13, n.76, p.14-22, Mar-abr; 2005.

KUBITZA, F.; KUBITZA, L. M. M. **Principais parasitoses e doenças dos peixes cultivados**. Jundiaí: 1999. 118p.

LIMA, R. M. S. **Isolamento e caracterização de *Streptococcus* spp de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) criadas em tanques rede e em viveiros de terra na Região Norte do Estado do Paraná, Brasil**. A possível associação com a qualidade da água, sinais clínicos e lesões macroscópicas. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Lavras – 2002.

LIMA, R. M. S.; FIGUEIREDO, H. C. P.; FARIA, F. C.; PICOLLI, R. H.; BUENO FILHO, J. S. S.; LOGATO, P. V. R. Resistência a antimicrobianos de bactérias oriundas de ambiente de criação e filés de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Ciência Agrotecnica**, v. 30, n. 1, p. 126-132, 2006.

MARTINS, M. L. **Doenças infecciosas e parasitárias de peixes com chave para a identificação de patógenos**. 2.Ed., Jaboticabal: Funep, 1998. 66p.

MOLINARI, L. M.; SCOARIS, D. O.; PEDROSO, R. B.; BITTENCOURT, N. L. R.; NAKAMURA, C. V.; UEDA-NAKAMURA, T.; ABREU FILHO, B. A.; DIAS FILHO, B. P. Bacterial microflora in the gastrointestinal tract of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, cultured in a semi-intensive system. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 25, n.2, p. 267-271, 2003.

MURATORI, M. C. S.; MARTINS, N. E.; PEIXOTO, M. T. D.; OLIVEIRA, A. L.; RIBEIRO, A. P. R.; 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: diagnostic and treatment**. St. Louis: Mosby, 1996. 367p.

OETTERER, M. **Industrialização do pescado cultivado**. Guaíba: Agropecuária, 2002. 200p.

OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R.; SOTO, D. **Aquicultura no Brasil: o desafio é crescer**. Brasília, 276 p.: il, 2008.

PADRÓS F.; FURONES M. D. (2007) Temas de Actualidade. *Patologia bacteriana en piscicultura*. Actualidade. p13-21. http://www.semicro.es/Actualidade/SEM34_13.PDF (4 jun.2007).

PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C., TAKEMOTO, R. M. **Doenças de peixes** : profilaxia, diagnóstico e tratamento. Maringá: Ed. UEM :Nupélia, 1998. 264p

PILARSKI, F. **Estudo da Columnariose de quatro espécies de peixes tropicaisÇ isolamento e caracterização de *Flavobacterium columnare***. São Paulo, 2002. 53p. Dissertação. Mestrado em Zootecnia, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

PRATA, L.F. **Manual de Inspeção higiênico sanitária e tecnológica de carne, pescado e derivados**. São Paulo: FCAV/UNESP, 1997. 125p.

RANZANI-PAIVA, I.; TAKEMOTO, R. M.; LIZAMA, M. A. P. **Sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo:Varela, 2004. 426p.

RODRIGUES, S. M. A.; GONÇALVES, E. G. R., MELLO, D. M.; OLIVEIRA, E. G.; HOFER, E. **Pesquisa de bactérias do gênero *Vibrio* em feridas cutâneas de pescadores do município de Rapôsa – MA**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 34(5): 407-411, set-out, 2001.

SALVADOR, R. **Isolamento e caracterização de *Streptococcus* spp de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) criadas em tanques rede e em viveiros de terra na Região Norte do Estado do Paraná, Brasil.** A possível associação com a qualidade da água, sinais clínicos e lesões macroscópicas. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Centro de Ciências Agrárias – Universidade Estadual de Londrina – 2002. 74p.

SILVA, M. L. Pesquisa de *Aeromonas* spp. e *Vibrio* spp. e da qualidade sanitária de peixes comercializados na cidade de São Paulo. São Paulo: Universidade de São Paulo. Faculdade de Saúde Pública, 2007. 146p. Dissertação de Mestrado.

SHÄPERCLAUS, W. **Fish diseases.** Rotterdam:Balkema, 1992. v. 1. 594p.

SHOEMAKER, C. A.; EVANS, J. J.; KLESZIUS, P. H. Density and dose: factors affecting mortality of *Streptococcus iniae* infected tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, n.188, p.229–235, 2000.

SOUTHGATE, P. 1993. Disease in Aquaculture. Pages 104-105 in L. Brown, editor. *Aquaculture for Veterinarians, Fish Husbandry and Medicine.* Pergamon Press Ltd. New York, New York, USA.

TENDENCIA, E. A.; DELA PENA, M. R.; FERMIN, A. C.; LIO-PO, G. CHORESCA JR, C. H.; INUI, Y. Antibacterial activity of tilapia *Tilapia hornorum* against *Vibrio harveyi* . **Aquaculture**, n.232, p. 145-152, 2004.

5. ARTIGO I

Parte dos resultados obtidos durante o trabalho experimental dessa tese será apresentada no artigo intitulado **“ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DAS INFECÇÕES BACTERIANAS CAUSADAS POR VIBRIOS EM TILÁPIAS *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) CULTIVADAS EM PERNAMBUCO, BRASIL E PERFIL ANTIMICROBIANO DOS ISOLADOS”** (manuscrito), que se encontra doravante anexado.

“ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DAS INFECÇÕES BACTERIANAS CAUSADAS POR VIBRIOS EM TILÁPIAS *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) CULTIVADAS EM PERNAMBUCO, BRASIL E PERFIL ANTIMICROBIANO DOS ISOLADOS”

Manuscrito a ser submetido à
Journal of the World Aquaculture Society
ISSN (ON LINE) 1749-7345- ISSN (IMPRESSO) 0893-8849

1 Estudo epidemiológico das infecções bacterianas causadas por vibrios em tilápias
2 Oreochromis niloticus (Linnaeus, 1758) cultivadas em Pernambuco, Brasil e perfil
3 antimicrobiano dos isolados.

4

5 Fernanda Silva de Meirelles; Virginia Fonseca Pedrosa; Fernando Leandro dos Santos;
6 Emiko Shinozaki Mendes; Danilo Andrade Mendes da Silva; Vitor Dantas Gama.

7 Departamento de Medicina Veterinária/UFRPE. Av. Dom Manoel de Medeiros, S/N. CEP 52171-900, Dois
8 Irmãos, Recife/PE/Brasil, Fone/fax: 081 33206404 E-mail:esmmendes@yahoo.com.br.

9

10 Paulo de Paula Mendes

11 Departamento de Pesca e Aquicultura/UFRPE. Av. Dom Manoel de Medeiros, S/N. CEP 52171-900, Dois
12 Irmãos, Recife/PE/Brasil, Fone/fax: 081 33206507.

13

14 **Resumo**

15 No Brasil, tilápias são cultivadas em 80% dos Estados, mas apesar da intensa criação são
16 desconhecidos os agentes etiológicos bacterianos e os antimicrobianos para seu controle.
17 Dentre as bactérias que causam infecção em peixes, destacam-se os víbrios, patógenos
18 oportunistas, cosmopolitas, responsáveis por prejuízos econômicos e representam risco para
19 a saúde pública. Setenta e três peixes, de oito fazendas, situadas no estado de
20 Pernambuco/Brasil, foram submetidos ao exame clínico e necropsia. Exames bacteriológicos
21 foram realizados de fragmentos de encéfalo, fígado e rim, em Ágar Tiosulfato Citrato Sais
22 de Bile Sacarose e em Água Peptonada Alcalina, incubados a 35-37 C por 24h.
23 Identificaram-se 13 espécies de víbrios: V. natriegens, V. metschnikovii, V. haliotocoli, V.
24 fischeri, V. mimicus, V. diabolicus, V. furnissi, V. cholerae O1, V. scophthalmi, V.
25 proteolyticus, V. argarivorans, V. ordalii e Vibrio spp., que foram testadas para verificação
26 do perfil de sensibilidade microbiana pelo método de difusão de discos de antibióticos em
27 Ágar Mueller Hinton. Os víbrios isolados apresentaram maior sensibilidade em ordem
28 decrescente aos antimicrobianos enrofloxacina, florfenicol, gentamicina, cotrimoxazol,
29 tetraciclina e alta resistência a eritromicina, amoxicilina e penicilina. A maioria dos víbrios
30 isolados é ambiental, mas apresentaram múltipla resistência e representam risco para a saúde
31 das tilápias e consumidor.

32

33 **Palavras-chave:** peixes, doenças, bactérias, vibrio, antibiótico.

34

35 I. INTRODUÇÃO

36 A tilápia é um peixe de grande aceitação pelo mercado consumidor brasileiro, encontra-se
37 presente na grande maioria dos estados brasileiros, gera aproximadamente três empregos por
38 hectare cultivado, além de possuir uma demanda internacional. Seu cultivo é feito na
39 maioria por pequenos e médios produtores, que utilizam viveiros e tanques-rede em sistema
40 semi-intensivo e intensivo. Apresentam índices econômicos relevantes como produtividade
41 de 150-200 kg/m³/ano, taxa de conversão alimentar média de 1,6:1, 130 dias de cultivo para
42 atingir o peso de abate de 750 g, o que gera uma margem líquida que varia de 10 a 25%
43 (Ostrensky et al. 2008).

44 A boa liquidez da atividade é decorrente das condições ambientais favoráveis, como
45 temperaturas elevadas, presente o ano inteiro. Por outro lado, isto também beneficia o
46 desenvolvimento bacteriano no ambiente de cultivo, o que propiciará grande possibilidade
47 de ocorrência de enfermidades bacterianas nos peixes. A vibriose é comum no verão em
48 função das altas temperaturas. O Vibrio anguillarum é o mais comum víbrio patogênico de
49 peixes. Animais contaminados podem apresentar ulcerações, na pele, e infecções sistêmicas
50 nos órgãos ricos em ferro, como baço e rim. Na forma hiper aguda verifica-se anorexia,
51 escurecimento e morte súbita em peixes jovens e na forma aguda escurecimento, oscilação e
52 úlceras com cavidades subdermais com fluido sero-sanguinolento. Há distensão abdominal,
53 anemia e hemorragia na derme (Noga 1996).

54 Víbrios são bacilos curvos, gram-negativos, em sua maioria oxidase e catalase positivos,
55 halotolerantes, presentes no meio aquático e marinho, patógenos facultativos que podem
56 sobreviver e multiplicar no meio ambiente, comumente isolados de superfícies mucosas e de
57 órgãos internos de peixes clinicamente sadios, como também de invertebrados, sedimentos e
58 coluna d'água. O víbrio mais conhecido é o Vibrio cholerae causador da Cólera, mas outros
59 como V. alginolyticus, causador de infecções em feridas contaminadas por água do mar,
60 otites em nadadores, mergulhadores, especialmente em águas tropicais, o
61 V. parahaemolyticus que possui uma toxina termoestável, é contaminante de frutos do mar,
62 como moluscos, ostras, camarão, o V. vulnificus é causador de necrose em feridas
63 contaminadas, e também, se encontra presente nos frutos do mar, além do V. anguillarum,
64 V. ordalii, V. harveyi, são causadoras de enfermidades nomeadas Vibrioses (Padrós 2007;
65 Buller 2004).

66 Shäperclaus (1992) citou duas formas de vibrioses nos peixes: a aguda, que está
67 associada a infecção generalizada, e a crônica, com infecções localizadas, principalmente na
68 pele, musculatura e intestino. Sinais como peixes suscetíveis (resistência diminuída) que

69 podem morrer sem sinais clínicos evidentes, com convulsões espasmódicas repentinas já
70 foram observados na forma aguda,. Mas, geralmente, observam-se o desenvolvimento de
71 eritema e hemorragias nas nadadeiras e em outras partes do corpo.

72 O diagnóstico da vibriose de acordo com Southgate (1993) deve ser baseado nos sinais
73 clínicos da doença, achados histopatológicos da necrose de tecido típica da septicemia e
74 isolamento e identificação da bactéria.

75 Lu e Levin (2008) relataram como gêneros bacterianos predominantes Vibrio (69%),
76 Aeromonas (21,6%), Pseudomonas (2,0%) e Shewanella (9,9%), em amostras de água
77 oriundas de um sistema de cultivo de tilápia, enquanto Mendes (2001) identificou o V.
78 parahaemolyticus e o V. alginolyticus, como predominantes em ostras destinadas a
79 comercialização em Recife/Brasil, representando risco para a saúde pública.

80 Diante do exposto e dada a importância de diagnóstico e terapia efetiva para debelar as
81 vibrioses, objetivou-se identificar vibrios causadores de enfermidades e sua suscetibilidade a
82 antimicrobianos, em tilápias cultivadas no estado de Pernambuco, Brasil.

83

84 II. MATERIAL E MÉTODOS

85 Foram coletadas tilápias do Nilo (Oreochromis niloticus) enfermas e/ou com alguma
86 anormalidade clínica, de oito propriedades, localizadas nas regiões da Zona da Mata
87 (quatro), Agreste (uma) e Sertão (três), do estado de Pernambuco, totalizando 73 animais.
88 As fazendas de criação de tilápias adotavam o sistema semi-intensivo, com uso de ração
89 industrializada, indiferente se para viveiros, tanques-rede em açudes ou em lagos. As
90 pisciculturas que utilizavam viveiros, tinham de 3 a 47 ha de área total, adotavam o tempo
91 de cultivo médio de 170 dias, áreas de viveiros de 2,4 a 7,5 mil m², densidade de estocagem
92 com variação de 1 a 4 peixes/m². Nas propriedades onde eram feitos os cultivos em tanques-
93 rede em açudes, tinham área total de 2 a 50 ha, tempo de cultivo médio de 180 dias, tanques
94 de 4,8 a 6,0 m³, densidade de estocagem com variação de 72,9 peixes/m³. Nas fazendas que
95 usavam tanques-rede em lagos, tinham área total de 0,07 a 22,0 ha de outorga, tempo de
96 cultivo médio de 175 dias, tanques com uma variação de tamanho de 16 a 380 m³, densidade
97 de estocagem com variação de 57 a 180 peixes/m³.

98 Os peixes foram transportados vivos sob aeração constante, ao Laboratório de Sanidade
99 de Animais Aquáticos (LASAq), da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)
100 ou ao Centro de Desenvolvimento e Difusão de Tecnologia em Aquicultura (CDTA), da
101 Universidade do Estado da Bahia (UNEB), Campus Paulo Afonso, onde foram anestesiados
102 com benzocaína (100 mg/L), mensurados, pesados e submetidos ao exame clínico. Em

103 seguida, realizou-se a eutanásia por secção medular (Albinati, 2006). Após a eutanásia, os
104 animais foram necropsiados e retiradas, assepticamente, amostras de encéfalo, fígado e rim,
105 para análises bacteriológicas, sendo estes órgãos citados na literatura como alvos nas
106 bacterioses.

107 Para a detecção de víbrios, as amostras foram inoculadas em Ágar Tiosulfato Citrato
108 Sais de Bile Sacarose e em Água Peptonada Alcalina, incubadas em estufa a 35-37 C por 24
109 horas. As colônias características foram submetidas ao estudo do perfil bioquímico,
110 conforme a orientação de Silva (1996) e Buller (2004).

111 O perfil de sensibilidade microbiana foi analisado utilizando-se o método de difusão de
112 discos de antibióticos em ágar Mueller Hinton, com os seguintes discos de antibióticos:
113 tetraciclina (30µg), amoxicilina (30 µg), penicilina (10 UI), eritromicina (15 µg), gentamicina
114 (10 µg), cotrimoxazol (1,25 µg/ 23,75 µg), enrofloxacina (05 µg) e florfenicol (30 µg)
115 (SENSIFAR-CEFAR). Após a inoculação do microrganismo e deposição equitativa dos
116 discos na placa (Meio Mueller Hinton) e incubação em estufa (35C durante 24 horas),
117 realizou-se a leitura da presença ou não do halo de inibição, medindo-se o seu diâmetro por
118 meio de uma régua específica, confrontando-se o resultado com os valores estabelecidos
119 para definir a sensibilidade ou resistência (NCCLS, 2003).

120 Foi utilizado o índice MAR (múltipla resistência antimicrobiana) para estimar a relação
121 a/b, em que “a” é o número de antibióticos aos quais o isolado foi resistente e “b” o número
122 de antibióticos aos quais o isolado foi exposto. O índice MAR quando superior a 0,2
123 caracteriza uma múltipla resistência (Krumperman 1983).

124 Para análise comparativa das variáveis qualitativas, presença de víbrios, presença de
125 lesões, tipos de cultivo, órgão amostrado, foi utilizado o teste Qui-Quadrado de
126 independência, com correção de Yates, sendo todas as conclusões tomadas ao nível de
127 significância de 5%. Para realizar os cálculos utilizou-se o pacote Estatístico SysEapro
128 versão 2.0.

129

130 **III. RESULTADOS**

131 As pisciculturas que adotavam viveiros obtiveram sobrevivência média de 78,3%, com
132 fator de conversão alimentar em torno de 1,4 e peso final de 0,6 kg. Nos cultivos feitos em
133 tanques-rede em açudes, foram relatados sobrevivência média de 95%, com fator de
134 conversão alimentar em torno de 1,3 e peso final de 0,9 kg. Nas fazendas que usavam
135 tanques-rede em lagos, a sobrevivência média foi de 91,3%, com fator de conversão
136 alimentar em torno de 1,7 e peso final de 0,8 kg.

137 As tilápias amostradas apresentaram variação de peso de 80,3g a 1610,0g, com média de
138 493,47 g \pm 30,8g, e quanto ao comprimento, uma variação de 16,1cm a 42,0cm, com
139 comprimento médio de 28,10 cm \pm 0,5 cm e tempo de cultivo de, aproximadamente, cinco
140 meses.

141 Não houve diferença estatística ($P \geq 0,05$) quanto ao órgão amostrado (encéfalo, fígado e
142 rim) e quanto ao tipo de cultivo (viveiro escavado, tanque-rede em açude tanque – rede em
143 lago), em relação ao isolamento de vibrios. Os peixes foram examinados quanto à presença
144 de lesões nos seguintes órgãos e suas alterações: olhos, pele, brânquias, nadadeiras, opérculo
145 (Tabela 1), baço, intestinos, rim e fígado (Tabela 2). A quantidade de gordura visceral
146 (Tabela 2) dos peixes necropsiados também foi observada de acordo com os seguintes
147 níveis: ausência, menos que 50%, 50% de gordura visceral, mais de 50% e quase que 100%
148 de gordura visceral no celoma.

149 Clinicamente alguns peixes apresentaram lesões de menor gravidade, de leve perda até
150 grave perda de escamas. Lesões mais severas como hemorragia, escoriações e úlceras foram
151 presentes em poucos animais e escurecimento da pele em apenas um dos peixes examinados.
152 Em quase metade das nadadeiras dos peixes examinados foram observadas desde leve
153 erosão, hemorragias até deformação.

154 Das 73 amostras analisadas, 30 apresentaram positividade para vibrio, totalizando 46
155 isolados, sendo identificadas 13 espécies: V. mimicus (50,0%), V. scophthalmi (8,7%),
156 V. proteolyticus (6,5%), Vibrio spp. (6,5%), V. metschnikovii (4,3%), V. fischeri (4,3%),
157 V. ordalii (4,3%), V. natriegens (2,2%), V. halioticoli (2,2%), V. diabolicus (2,2%),
158 V. furnissi (2,2%), V. cholerae O1 (2,2%) e V. argarivorans (2,2%).

159 De acordo com os resultados das análises dos isolados frente aos antimicrobianos, as
160 bactérias foram consideradas sensível, intermediária e resistente. O vibrio apresentou maior
161 sensibilidade aos antimicrobianos enrofloxacina (100%) e florfenicol (98,18%) e em ordem
162 decrescente, gentamicina (90,91%), cotrimoxazol (sulfametoxazol + trimetoprima)
163 (76,36%), tetraciclina (67,27%), eritromicina (30,91%), amoxicilina (3,64%). Todos os
164 isolados testados apresentaram resistência a penicilina (Fig.1).

165 Quanto ao índice de múltipla resistência a antibióticos (MAR), 96,4% (53/55) dos
166 isolados de vibrio identificados apresentaram índice MAR superior a 0,22, caracterizando
167 múltipla resistência, de acordo com as citações de Krumperman (1983).

168
169
170

171 VI. DISCUSSÃO

172 De acordo com o descrito por Noga (1996) as vibrioses quando são crônicas, apresentam
173 inflamação do intestino, como verificado em todas as amostras examinadas.

174 Shäperclaus (1992) citou uma forma crônica de vibriose com infecções localizadas,
175 principalmente, na pele, musculatura e intestino, e na forma aguda, o desenvolvimento de
176 eritema e hemorragias nas nadadeiras e em outras partes do corpo. No presente trabalho, não
177 foi possível estabelecer uma relação de dependência entre as lesões e a presença do vibrio
178 ($P \geq 0,05$). Possivelmente, as lesões tiveram outra etiologia que não o vibrio presente ou
179 podendo ser resultantes de infecções anteriores à coleta ou não foi possível isolar o agente
180 responsável em decorrência de possível uso de antimicrobianos em tratamento prévio.

181 O principal fator predisponente à vibriose, descrito por Noga (1996), é a alta temperatura.
182 Aglomerações, poluição orgânica e outros fatores estressantes podem potencializar o
183 aparecimento desta enfermidade. O cultivo de peixes em sistemas com alta biomassa é uma
184 das causas habituais de problemas patológicos, pois provocam variações nas concentrações
185 de gases dissolvidos devido a respiração dos peixes, trocas no pH, maior quantidade de
186 amônia presente associada à excreção, maior quantidade de matéria orgânica em suspensão,
187 devido a fezes e restos de comida, o que faz com que algumas populações bacterianas
188 diminuam e outras possam proliferar, algumas podem ser patógenos oportunistas ou
189 primários (Padrós, 2007). Os cultivos de onde foram coletadas as amostras eram todos de
190 sistema intensivo, caracterizado pelo uso de altas densidades populacionais. Ressalta-se que
191 o estado de Pernambuco se caracteriza por clima tropical atlântico (litoral) e semi-árido
192 (Agreste e Sertão), suscitando dúvidas quanto à virulência dos vibrios isolados, pois estes
193 foram isolados de órgãos, normalmente, isentos de quaisquer microrganismos, como
194 encéfalo, fígado e rim, além de serem reconhecidamente oportunistas.

195 De acordo com os relatos de Buller (2004), a grande maioria dos isolados neste trabalho,
196 não é patogênica para peixes, reforçando a idéia de que não são agentes primários das lesões
197 (Tabela 3). Apesar da maioria dos vibrios isolados serem considerados ambientais, não os
198 isenta de serem agentes etiológicos responsáveis por manifestações clínicas ainda que de
199 forma secundária, pois foram encontrados em órgãos como cérebro, fígado e rim,
200 demonstrando seu potencial invasor para os peixes. Southgate (1993) citou que a maioria
201 das bactérias causadoras de doenças em peixes são saprófitos e ambientais, sendo
202 encontradas sobre a superfície corpórea ou intestino, com manifestação clínica se o animal
203 sofrer estresse ou na presença de outras doenças, caracterizando sua ação como patogênica e
204 oportunista.

205 Ao investigarem a mortalidade de Dicentrarchus labrax em Portugal, através da
206 identificação de agentes bacterianos na pele e na água, Saavedra et al. (2004) encontraram
207 Vibrio spp. em 25% das estirpes, e estas apresentaram 80% de resistência a carbexilina e
208 40% à amoxicilina e ampicilina, além de 100% de resistência a estreptomicina. Os autores
209 sugerem que a morbidade deve-se a elevada carga parasitária e as bactérias presentes nos
210 peixes examinados.

211 Ao avaliarem a resistência múltipla de antibióticos em Vibrio spp. de diferentes
212 ambientes (estuarino e marinho) na costa indiana, Manjusha et al. (2005) constataram que
213 83,19% dos isolados de vibrio foram resistentes, sendo 30,3% resistentes a três diferentes
214 antibióticos e 55,5% foram resistentes de 4-10 antibióticos, 14,14% foram resistentes a mais
215 que 10 dos antibióticos e 54% mostraram ter resistência múltipla. Observaram-se altos
216 índices de resistência aos antibióticos amoxicilina, ampicilina, carbenicilina e cefuroxina,
217 rifampicina e streptomicina, clorafenicol, tetraciclina, clortetraciclina, furazolidina, ácido
218 nalidixico, gentamicina, sulfafurazole, trimetoprim, neomicina e ampicaxina.

219 Ao estabelecer o perfil de resistência aos antimicrobianos de víbrios isolados de água de
220 viveiro e camarão cultivados, Rebouças (2008), no Ceará, observou maior incidência de
221 resistências aos antibióticos: ampicilina (46,15% e 44,44%), cefatoxina (7,69% e 27,78%) e
222 tetraciclina (53,85% e 38,89%) para amostras oriundas de água de viveiro e camarão
223 respectivamente. A maioria (80,64%) das estirpes de Vibrio spp. isoladas apresentaram
224 resistência a pelo menos um dos antibióticos testados e um percentual (44%) significativo de
225 multiresistência.

226 Carneiro et al. (2007) caracterizaram populações microbianas em três distintos sistemas
227 de cultivos de tilápias (tanque de alvenaria + arraçoamento; tanque de terra + arraçoamento
228 e tanque de terra sem arraçoamento) sem uso anterior de antibiótico, obtiveram
229 predominância da família Vibrionaceae nos três sistemas, com elevada resistência a
230 ampicilina e eritromicina, e metade resistentes a tetraciclina. Resistência a norfloxacin e
231 gentamicina não foram frequentes. Do total de amostras, 96% apresentaram resistência
232 simultânea a dois ou mais antimicrobianos. Os antibióticos testados foram: ampicilina,
233 cefuroxina, cloranfenicol, eritromicina, gentamicina, nitrofurantoína, norfloxacin, tetraciclina e sulfonamidas.

235 A resistência de víbrios foi estudada por Saavedra et al. (2004), que encontraram 40% de
236 resistência à amoxicilina, superando os percentuais achados neste trabalho. Manjusha et al.
237 (2005) observaram altos índices de resistência a amoxicilina em víbrios isolados de ambientes
238 estuarino e marinho, assemelhando-se aos resultados observados. Os antimicrobianos

239 enrofloxacin e florfenicol e em ordem decrescente, gentamicina, cotrimoxazol
240 (sulfametoxazol + trimetoprima) se mostraram mais eficazes contra os isolados de *Vibrio*
241 encontrados.

242 A múltipla resistência também foi observada por Rebouças (2008), em que 80,64% das
243 estirpes de *Vibrio* spp. isoladas mostraram resistência ao menos a um dos antibióticos
244 testados e um percentual significativo de multiresistência. Os altos índices de múltipla
245 resistência a antimicrobianos é preocupante, pois os isolados são considerados bactérias
246 ambientais, caracterizando sua prévia exposição a estas drogas ou outros fatores (Lima
247 2004), debilitando sua utilização como recurso terapêutico, para peixes e outros organismos
248 aquáticos.

249 A maioria das espécies de *Vibrios* isoladas não é considerada patogênica para os peixes
250 (ambientais), mas ainda assim podem representar risco para a saúde das tilápias por questão
251 de oportunismo e do consumidor, principalmente se consumido cru.

252 A múltipla resistência apresentada a alguns antibióticos testados é bastante preocupante,
253 uma vez que podem causar prejuízos à produção de tilápias, é nocivo para o ambiente, e
254 podem ser para as populações que os utilizam como fonte alimentar.

255

256 VI. AGRADECIMENTOS

257 Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq - Brasil,
258 pelo apoio financeiro na realização desta pesquisa, concedido no processo nº 475463/2006-
259 4, Edital MCT/CNPq 02/2006 – Universal.

260

261 II. LITERATURA CITADA

262 Albinati, A.C.L. 2006. Biomarcadores histológicos na avaliação de testes de toxicidade com
263 herbicida Roundup® em Piauçu (*Leporinus macrocephalus*). Dissertação de Mestrado.
264 Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil.

265 Al-Harbi, A.H.; Uddin, N. 2005. Bacterial diversity of tilapia (*Oreochromis niloticus*)
266 cultured in brackish water in Saudi Arabia. *Aquaculture* 250:566-572.

267 Buller, N. B. 2004. *Bacteria from Fish and Other Aquatic Animals: A Practical*
268 *Identification Manual*. CABI Publishing; Wallingford, Oxfordshire, Cambridge, USA.

269 Carneiro, D. O.; Figueiredo, H. C. P.; Pereira Junior, D. J.; Leal, C. A. G.; Logato, P. V. R.
270 2007. Perfil de susceptibilidade de bactérias isoladas em diferentes sistemas de cultivo de

- 271 tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e
272 Zootecnia 59 (4):869-876.
- 273 Krumperman, P.H. 1983. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to
274 identify high-risk sources of fecal contamination of foods. Appl. Environ. Microbiol.
275 46:165-170.
- 276 Lima, R. M. S.; Figueiredo, H. C. P.; Faria, F. C.; Picolli, R. H.; Bueno Filho, J. S. S.;
277 Logato, P. V. R. 2006. Resistência a antimicrobianos de bactérias oriundas de ambiente
278 de criação e filés de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Ciência Agrotecnica,
279 30(1):126-132.
- 280 Lu, S.; Levin, R. E. 2008. Dominant Bacterial Genera of a Tilapia Fish Farm and Rapid
281 typing of *Vibrio* Isolates. Journal of Fisheries Sciences.com. 2:183-195.
- 282 Manjusha, S.; Sarita, G.B.; Elyas, K. K.; Chandrasekaran, M. 2005. Multiple Antibiotic
283 Resistences of *Vibrio* isolates from Coastal and Brackish Water Areas. American Journal
284 of Biochemistry and Biotechnology 1(4):201-206.
- 285 Mendes, E. S. 2001. Avaliação Microbiológica de Ostras Consumidas na Grande Recife-PE.
286 Tese de Doutorado. Botucatu: Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- 287 Mendes, P. de P.; Mendes, E.S.; Bezerra, A.M. 2006. Análise estatística dos parâmetros
288 aquícolas, com fins a otimização da produção. Anais de simpósios da 43^a reunião anual
289 da SBZ, v.35, João Pessoa - PB, Brasil.
- 290 NCCLS. 2003. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests;
291 Approved Standard—Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6].
292 NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.
- 293 Ostrensky, A.; Borghetti, J. R.; Soto, D. 2008. Aqüicultura no Brasil: o desafio é crescer.
294 Brasília, Brasil.
- 295 Padrós, F.; Furones, M. D. 2007. Temas de Actualidade. Patologia bacteriana en
296 Piscicultura. Actualidade. http://www.semicro.es/Actualidade/SEM34_13.PDF Acessado
297 em: 4 jun 2009.
- 298 Rebouças, R. H. 2008. Perfil de resistência a antimicrobianos de *Vibrio* isolado de água de
299 viveiro e camarão (*Litopenaeus vannamei*) cultivado em fazendas no estado do Ceará.
300 Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil.

- 301 Saavedra, M. J.; Brito, R. D.; Souza, M.; Alves, A.; Rema, P. 2004. Isolamento de
302 *Pasteurella* spp. e *Vibrio* spp. em robalos (*Dicentrarchus labrax*). Susceptibilidade a
303 diferentes grupos de antibióticos. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia
304 56 (2) 277-279.
- 305 Sakata, T.; Matsuura, M.; Shimokawa, Y. 1984. Characteristics of *Vibrio damsela* Isolated
306 from Diseased Yellowtail – *Seriola quinqueradiata*. Nippon Suisan Gakkaishi. 55(1),
307 135-141.
- 308 Silva, N. 1996. Testes Bioquímicos para Identificação de Bactérias em Alimentos. Informes
309 Técnicos. ITAL – Instituto de Tecnologia de Alimentos. Campinas, São Paulo, Brasil.
- 310 Southgate, P. 1993. Disease in Aquaculture. Pages 104-105 in L. Brown, editor. Aquaculture
311 for Veterinarians, Fish Husbandry and Medicine. Pergamon Press Ltd. New York, New
312 York, USA.
- 313 Tendencia, E. A.; Dela Pena, M. R.; Fermin, A. C.; Lio-Po, G. Choresca Jr, C. H.; Inui, Y.
314 2004. Antibacterial activity of tilapia *Tilapia hornorum* against *Vibrio harveyi*.
315 Aquaculture 232:145-152.
- 316 Noga, E. J. 1996. Fish disease: diagnostic and treatment. Duncan, L. L., editor. 1995.
317 Mosby-Year Book, Inc., St. Louis, Missouri, USA.
- 318 Sakata, T.; Maatsuura, M.; Shimokawa, Y. 1989. Characteristics of *Vibrio damsela* Isolated
319 from Disease Yellowtail *Seriola quinqueradiata*. Nippon Suisan Gakkaishi. 55(1):135-
320 141.
- 321 Shaperclaus, W. 1992. Fish diseases. Schäperclaus, W.; Kulow, H.; Schreckenbach, K.,
322 editor. 1992. Balkema, A. A. Rotterdam, Holanda.
- 323
- 324
- 325
- 326
- 327
- 328

329

VIII. TABELAS

330

Tabela 1. Lesões observadas em órgãos externos de tilápias enfermas, procedentes de cultivos comerciais, Pernambuco, Brasil.

Olhos (%)	Normais 75,3	Opacos 9,6	Exoftalmia 2,7	Hemorrágicos 8,2	Cegos 2,7	Ausentes 1,4	
Pele (%)	Normal 64,4	Grave perda de escamas 11,0	Escoriações 6,8	Leve perda de escamas 5,5	Hemorragias 4,1	Úlceras 5,5	Escurecida 2,7
Brânquias (%)	Normais 71,2	Unidas 12,3	Anêmicas 9,6	Congestas 6,8			
Nadadeiras (%)	Normais 52,1	Erosão grave sem hemorragia 11,0	Erosão com hemorragia 17,8	Leve erosão 17,8	Deformadas 1,4		
Opérculos (%)	Normais 63,0	Congestos 19,2	Escoriações 9,6	Deformados 4,1	Hiperêmicos 4,1		

331

Tabela 2. Anormalidades verificadas em órgãos internos em tilápias enfermas procedentes de cultivos comerciais, Pernambuco, Brasil.

Baço	Normal	Preto	Vermelho	Pálido	Atrofiado	Noduloso	Aumentado
(%)	37,0	37,0	17,8	2,7	2,7	1,4	1,4
Intestinos	Leve inflamação			Severa inflamação			
(%)	94,5			5,5			
Rim	Normal		Intumescido		Friável		
(%)	94,52		2,74		2,74		
Fígado	Normal	Friável	Pálido	Noduloso		Descolorido	
(%)	54,8	27,4	9,6	5,5		2,7	
Gordura	Ausência	< 50 %	= 50 %	>50 %	± 100 %		
visceral	12,3	35,6	12,3	30,1	9,6		
(%)							

332

333

334 Tabela 3. Relação entre espécies hospedeiras e organismos. Adaptado de Buller, 2004.

Espécie de vibrio	Organismo	Relação
<u>V. mimicus</u>	Crustáceos e homem	Patógeno oportunista
<u>V. scophthalmi</u>	Rodovalhos jovens	Não patogênico
<u>V. proteolyticus</u>	Artêmias	Patógeno
<u>V. metschnikovii</u>	Peixes	Não patogênico
<u>V. fischeri</u>	Rodovalho	Patogenicidade dúbia
<u>V. ordalii</u>	Truta e salmão	Patogênico
<u>V. natriegens</u>	—	Ambiental
<u>V. halioticoli</u>	Peixes, presente na flora normal de intestinos	
<u>V. diabolicus</u>	—	Ambiental
<u>V. furnissi</u>	Enguias	Patogenicidade duvidosa
<u>V. cholerae O1</u>	Homem	Patógeno
<u>V. argarivorans</u>	Abalone	Patogênica desconhecida

IX. FIGURAS

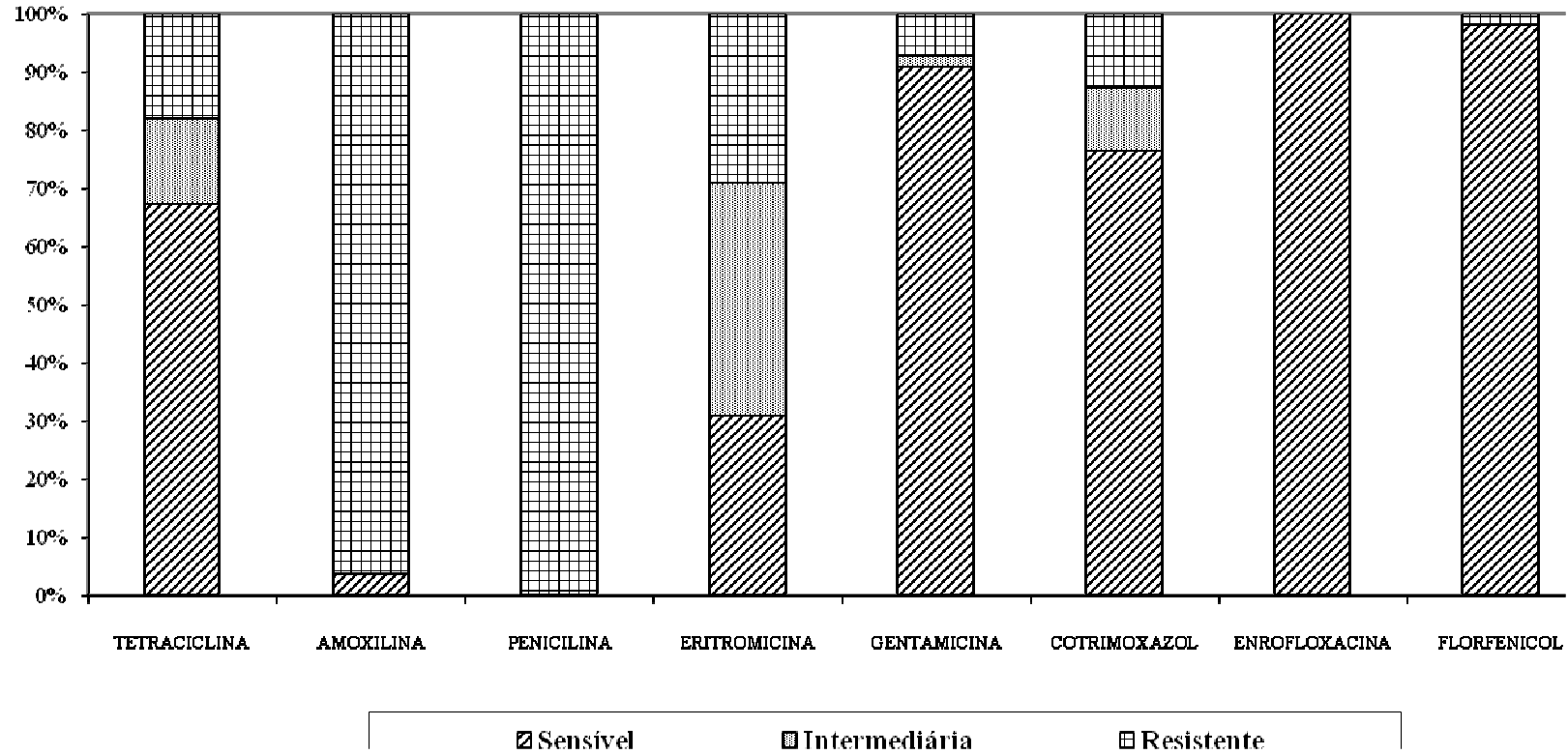


Figura 1. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos testados para espécies de vibrios isolados de tilápias enfermas em cultivos comerciais, Pernambuco, Brasil.

JOURNAL OF THE WORLD AQUACULTURE SOCIETY

Checklist for Manuscript Preparation

I. General Instructions

- Format manuscripts for 22 x 28 cm (8½ x 11 inch) or A4 (21 x 30 cm) paper.
- Number *all* pages sequentially.
- Number *all* lines in the text beginning with the title page
- Use any standard 12 pt font. Do not use italic, bold, or other non-standard type. Underline words to be italicized. Do not justify right margins. Indent the first sentence of all paragraphs.
- Double-space throughout, including title page, abstract, literature cited, tables, and figure legends.
- Leave at least a 2.5-cm (1-inch) margin on all sides.
- Use metric units of measurement. When needed, English equivalents may be given in parentheses.
- Abbreviations accepted without definition are listed on the inside back cover of the *Journal*. Designate temperature as 20 C. Define all other abbreviations the first time they are used.
- Express ratios by using a slant line (e.g., mg/L).
- Scientific names should accompany common names in the title and when they are first mentioned in the abstract and in the text. Authority for scientific names need not accompany the genus and species unless needed for clarity.
- Spell out one to ten unless followed by a unit of measurement (e.g., four fish, 4 kg, 14 fish). Do not begin a sentence with a numeral. Use 1,000 instead of 1000; 0.13 instead of .13; and % instead of percent.
- Use the 24-hour clock for dial time: 0830, not 8:30 a.m. Calendar date should be day month year (7 August 1990).
- Each reference cited in the text must be listed in the Literature Cited section, and vice versa.
- Literature citations in the text follow the name-and-year system.
 1. One author: Jones (1994) or (Jones 1994)
 2. Two authors: Smith and Jones (1994) or (Smith and Jones 1994)
 3. Three or more authors: Smith et al. (1994) or (Smith et al. 1994)
 4. Manuscripts accepted for publication: Jones (in press) or (Jones, in press)

5. Reference to unpublished data or personal communications is strongly discouraged. If necessary, cite as R. Ishihara (Humboldt State University, unpublished data) or R. Ishihara (Humboldt State University, personal communication).
 6. Within parentheses, use a semicolon to separate multiple citations of literature and figures and tables (Smith1991; Jones 1994) (Table 1; Fig. 2). Cite multiple references within parentheses by year, with the oldest first.
- Use “Figure” only to start a sentence; otherwise use “Fig.” or “Figs.” (e.g., Fig. 5; Figs. 5, 6). Spell out “Table” in all usages.
 - Assemble the manuscript in this order: title page, abstract page, text, literature cited, tables, figure legends, figures.

II. Title Page (Page 1)

- Near the middle of the page, type the title of the paper, centered, in capital and lower case letters (e.g., Acute Toxicity of Copper Sulfate to Channel Catfish Ictalurus punctatus).
- Below the title, type the author(s) names, affiliation(s), and unabbreviated complete address (es). If the author is currently at another location, include a superscript number after the name and provide the full present address as a footnote.
- In papers written by authors at different addresses, type the name and address of the first author, the name and address of the second author, and so on.
- In multiauthored papers, type “Corresponding author:” and follow with the full mailing address of the author responsible for correspondence. Type this near the bottom of the page, but above any footnotes.

III. Abstract page (Page 2)

- Type the heading “Abstract,” centered, at the top of the page.
- Abstract must be one paragraph. Do not cite references or use abbreviations other than those listed on the back cover of the *Journal*.
- Be concise (normally not more than 3% of the text length) but include why you did the study, how you did it, the results of the study, and what the results mean.
- “Communications” do not have an abstract.

IV. Text (Beginning on page 3 for full papers; on page 2 for Communications)

- Follow general instructions in Section I.
- Begin with an introduction that concisely establishes the purpose and importance of the work. Do not use a heading for this section.
- Subsequent sections in the text should include centered headings in capital and lower case letters. Typical main headings are Materials and Methods, Results, Discussion, and Acknowledgments. Do not start these sections with a new page.
- Second level headings (if required) are centered, in capital and lower case letters, and underlined. Do not use third level headings.
- Acknowledgments should contain grant and contribution numbers. Acknowledge only those people and institutions that contributed directly to the research or manuscript quality.

V. Literature Cited

- Start this section at the top of a new page.
- Spell out journal names in full.
- Verify all entries against citations in the text.
- Verify the accuracy of all entries against the original sources, especially journal titles, authors, pages, and spelling.
- Start the first line of each entry at the left margin and indent other lines.
- Alphabetize entries first by the surnames of the senior authors and first word or acronym of corporate authors; second by the initials of senior authors with the same surname (e.g., Smith, B. F. precedes Smith, J. W.); and third, by the surnames of the junior authors. Single authored citations precede multiauthored works by the same senior author regardless of date.
- List multiple works by the same authors by date.
- Distinguish papers by the same author in the same year by putting lower case letters after the date (e.g. 1994a, 1994b). Be sure that such date citations within the text correspond to the dates in the Literature Cited.

The following illustrates some common citation formats.

Journal Article:

Xu, D. and W. A. Rogers. 1993. Oxytetracycline residues in hybrid striped bass muscle. *Journal of the World Aquaculture Society* 24:466-472.

Book:

Boyd, C. E. 1982. Water quality management for pond fish culture. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, The Netherlands.

Stickney, R. R., editor. 1986. Culture of nonsalmonid freshwater fishes. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, USA.

Article or chapter in a book:

Ward, P. D. 1982. The development of bacterial vaccines for fish. Pages 47-58 in R. J. Roberts, editor. Microbial diseases of fish. Academic Press, New York, New York, USA.

Dissertation or Thesis:

Hymel, T. M. 1985. Water quality dynamics in commercial crawfish ponds and toxicity of selected water quality variables to *Procambarus clarkii*. Master's thesis. Louisiana State University, Baton Rouge, Louisiana, USA.

VI. Tables (Continue page numbering)

- Start each table on a new sheet.
- Double space everything, including title, column headings, and all entries. Do not reduce type size in an effort to fit the table on one page. Use the same size type as the text. Print tables broadside, if necessary, to allow adequate margins. In extreme instances, continue the table on a second page.
- Type the table caption at the top of the page. Start at the left margin with the table number, which should be in arabic followed by a period (e.g., Table 4.). Follow with the table title using sentence-style capitalization (not title-style).
- Place a single horizontal line beneath the table title.
- Use single horizontal lines to separate column heads.
- Use a single horizontal line to indicate the end of the table.
- Do not use vertical lines in the table. I
- Indicate footnotes by lowercase superscript letters (a, b, c, etc.).

VII. Figure Legend (Continue page numbering)

- Put captions on the same page as the figure.
- Type the first line at the margin for each entry. Indent other lines. Spell out "Figure" followed by an arabic number. Use sentence-style capitalization of the caption:

Figure 1. Growth of Peneaus setiferus over time at various combinations of water exchange and stocking density.

- Do not include symbols (dots, circles, triangles, etc.) in the figure captions. Label them in the figure or refer to them by name in the caption.
- Do not refer to magnification of photomicrographs in the caption: figures will be reduced when printed so they will be wrong if given in the caption. Place a bar scale directly on each photo and give its equivalent length in the caption (e.g., bar = 25 μm).

VIII. Illustrations Line Drawings

- Submit electronic copies of line drawings with the initial manuscript submission. Save files in TIFF or EPS format at 300dpi.resolution or higher.
- Lettering should be clear and large enough to withstand at least 50% reduction without becoming illegible. A clean sans serif typeface (such as Helvetica or Univers) is preferred. Lettering on a figure 20 cm wide should be at least 4.5 mm high (18-point type) to withstand reduction.

Photographs

- Submit electronic copies of photographs with the initial manuscript submission. Save files in TIFF or EPS format at 300dpi.resolution or higher.
- The cost of color reproduction must be paid for by the author.

IX. What and Where to Submit

- Completed manuscripts should be submitted online via the website (<http://mc.manuscriptcentral.com/jwas>). New users should go to the tab in the upper right hand corner to “Create an Account”. A User ID and password will be sent via email within a few minutes. Follow the online directions for submission of your manuscript.

Questions?

Contact Dr. Carl Webster, Editor-in-Chief

Phone: +1 502 597 8109

FAX: +1 502 564 9118

E-mail: cwebster@dcr.net