

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 30/12/2016.

**Perfil de resistência à antimicrobianos de
Aeromonas sp. e *Streptococcus* sp. isolados de
tilápia-do-Nilo e detecção dos genes envolvidos na
resistência à tetraciclina**

Katia Suemi Gozi

Médica veterinária

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Perfil de resistência à antimicrobianos de
Aeromonas sp. e *Streptococcus* sp. isolados de
tilápia-do-Nilo e detecção dos genes envolvidos na
resistência à tetraciclina**

Katia Suemi Gozi

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Pilarski

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Aquicultura do Centro de Aquicultura
da UNESP – CAUNESP, como parte
dos requisitos para obtenção do título
de Mestre em Aquicultura.

Jaboticabal, SP
2016

Gozi, Katia Suemi
G725 p Perfil de resistência à antimicrobianos de *Aeromonas*
sp. e *Streptococcus* sp. isolados de tilápia-do-Nilo e
detecção dos genes envolvidos na resistência à
tetraciclina / Katia Suemi Gozi. – – Jaboticabal, 2016
vii, 52 f. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual
Paulista, Centro de Aquicultura, 2016
Orientadora: Fabiana Pilarski
Banca examinadora: Manoel Victor Franco Lemos,
Diogo Teruo Hashimoto
Bibliografia

1. Antimicrobiano. 2. Resistência. 3. Bactéria. I. Título.
II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3.09

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Perfil de resistência à antimicrobianos de *Aeromonas sp.* e *Streptococcus sp.* isolados de tilápia-do-Nilo e detecção dos genes envolvidos na resistência à tetraciclina

AUTORA: KATIA SUEMI GOZI

ORIENTADORA: FABIANA PILARSKI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em AQUICULTURA, pela Comissão Examinadora:



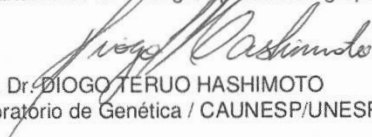
Profa. Dra. FABIANA PILARSKI

Laboratório de Parasitologia e Microbiologia de Organismos Aquáticos / CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP - CAUNESP



Prof. Dr. MANOEL VICTOR FRANCO LEMOS

Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. DIOGO TERUO HASHIMOTO

Laboratório de Genética / CAUNESP/UNESP

Jaboticabal, 30 de junho de 2016

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida!

Aos meus pais, a quem devo a pessoa que sou.

Ao Tiago, pelo seu amor, e todos os seus familiares pelo apoio nos meus momentos de fraqueza.

À minha orientadora, Profa. Dra. Fabiana Pilarski, pela oportunidade, orientação e confiança.

À pesquisadora científica Dra. Fabiana Garcia pelas orientações extras, confiança e pelas amostras cedidas.

À Dra. Fernanda de Alexandre Sebastião pela paciência e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Diogo T. Hashimoto e a todos do Laboratório de Genética Aplicada a Animais Aquáticos pelo apoio e atenção prestada.

Ao Prof. Dr. Luiz do Amaral e a todos do Laboratório de Alimentos de Origem Animal e Água, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva pela atenção prestada.

A todos do Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos pelo companheirismo, paciência e ajuda.

A todos do Centro de Aquicultura da Unesp – Caunesp: professores, alunos de outros laboratórios e funcionários pelo companheirismo.

Aos membros da banca pelas orientações e correções concedidas.

Às velhas amigas e aos novos amigos que conheci nessa jornada.

À CAPES e ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura da Unesp pela oportunidade para a realização deste projeto.

Muito, muito, muito Obrigada!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE FIGURAS	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	8
2. REVISÃO DE LITERATURA	9
2.1 A produção aquícola	9
2.2 Doenças em tilápias.....	10
2.3 Antimicrobianos na produção aquícola	13
2.4 Resistência bacteriana à antimicrobianos.....	15
2.4.1 Genes de resistência a oxitetraciclina	16
2.4.2 Verificação da resistência bacteriana	17
3. OBJETIVOS	18
3.1 Objetivo geral.....	18
3.1 Objetivos específicos	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1 Bactérias.....	19
4.2 Meios de cultura.....	21
4.3 Cultivo bacteriano para formação de réplicas	21
4.4 Identificação dos isolados bacterianos	22
4.5 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos oxitetraciclina e florfenicol.....	23
4.5.1 Solução estoque	24
4.5.2 Inóculo	24
4.5.3 Determinação da concentração mínima inibitória (MIC)	24
4.6 Genes de resistência	25
4.6.1 Extração e purificação do DNA total	26
4.6.2 Avaliação da qualidade do DNA	26
4.6.3 A PCR para detecção dos genes procurados.....	27
5. ANÁLISE DOS RESULTADOS	27
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28

6.1 Identificação das espécies.....	28
6.2 Perfil de susceptibilidade antimicrobiana	33
6.3 Detecção dos genes de resistência	38
7. CONCLUSÕES.....	41
8. REFERÊNCIAS	41
APÊNDICE A – Meios de cultura.....	55
APÊNDICE B – Aprovação do Comitê de Ética	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Isolados bacterianos de <i>Oreochromis niloticus</i> com sinais clínicos de aeromonose ou estreptococose.....	19
Tabela 2. Cepas obtidas de <i>Oreochromis niloticus</i> com sinais clínicos de aeromonose ou estreptococose, identificadas pelo sequenciamento do gene 16S rRNA por estudo anterior	20
Tabela 3. Sequência de iniciadores para identificação das espécies, produto e temperatura de anelamento	23
Tabela 4. Sequência dos iniciadores utilizados para detecção dos genes de resistência à tetraciclina.....	26
Tabela 5. Relação das bactérias identificadas neste trabalho, provenientes de <i>Oreochromis niloticus</i> com sinais clínicos de aeromonose ou estreptococose...	29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição da concentração mínima inibitória da oxitetraciclina para o grupo de <i>Aeromonas</i>	36
Figura 2. Distribuição da concentração mínima inibitória do florfenicol para o grupo de <i>Aeromonas</i>	36
Figura 3. Distribuição da concentração mínima inibitória da oxitetraciclina para o grupo de <i>Streptococcus</i>	37
Figura 4. Distribuição da concentração mínima inibitória do florfenicol para o grupo de <i>Streptococcus</i>	37
Figura 5. Produto da PCR positivo para o gene tetA e negativo para tetE e tetM	40
Figura 6. Produto da PCR positivo para o gene tetL	40

RESUMO

A intensificação na criação de tilápia tem aumentado gradativamente o número de enfermidades bacterianas nos peixes, com destaque para o *Streptococcus* sp. e *Aeromonas* sp., que provocam um número elevado de morbidade e mortalidade nos peixes. Quando surtos de bacterioses ocorrem, um grande número de antimicrobianos é utilizado, muitas vezes de forma indiscriminada e sem critérios, causando danos à saúde dos peixes, meio ambiente e consumidor. O aparecimento de cepas bacterianas resistentes a uma ou mais drogas, incluindo à oxitetraciclina, já se tornou a maior ameaça à saúde pública da atualidade, e a Organização Mundial de Saúde, já há algum tempo, tenta regulamentar o uso não terapêutico destas substâncias. Assim, este estudo teve como objetivo elucidar o perfil de resistência da *Aeromonas* sp. e do *Streptococcus* sp. aos dois antimicrobianos legalizados para uso na piscicultura brasileira (florfenicol e oxitetraciclina) e detectar os genes envolvidos na resistência à tetraciclina. Para tanto, foram utilizadas 108 bactérias, isoladas de tilápia-do-Nilo com sinais clínicos característicos de aeromonose ou estreptococose, as quais foram submetidas ao teste de susceptibilidade aos antimicrobianos oxitetraciclina e florfenicol, através da concentração mínima inibitória (MIC) pelo método da microdiluição e identificadas como cepas sensíveis ou resistentes. Também foi verificado a presença dos genes de resistência (tetA, tetE, tetL e tetM) à oxitetraciclina através da PCR. No resultado da MIC para os antimicrobianos analisados, pode-se observar uma variação da oxitetraciclina para as cepas de *Aeromonas* entre 0,06 – 32 µg/mL e de 0,125 a 1 µg/mL para o florfenicol. Para o *Streptococcus*, a variação ocorreu de 0,2 a 1 µg/mL para oxitetraciclina e de 1 a 0,125 µg/mL para o florfenicol. Nas amostras não-selvagens de *Aeromonas*, foi detectado o gene tetA nas três espécies de identificadas neste estudo. Para as amostras não-selvagens de *Streptococcus* o gene tetL foi detectado em 6 das 9 cepas estudadas. Este trabalho evidencia a problemática do uso indiscriminado de antimicrobianos na aquicultura, que pode trazer sérias consequências para o meio ambiente e ao homem.

Palavras-chave: Antimicrobiano, resistência, bactéria, peixe

ABSTRACT

The tilapia production has gradually increased the number of fish bacterial diseases, especially for *Streptococcus* sp. and *Aeromonas* sp. which cause a high number of morbidity and mortality in fish. When bacterial diseases outbreaks occur, a large number of antimicrobials are used, often indiscriminate causing damage to fish health, environment and consumer. The appearance of resistant bacterial strains to one or more drugs, including oxytetracycline, has become the greatest threat to public health today, and the World Health Organization, since some time ago, tried to regulate the non-therapeutic use of these substances. This study aimed to elucidate the resistance profile of *Aeromonas* sp. and *Streptococcus* sp. to two antimicrobials florfenicol and oxytetracycline, legalized for the Brazilian fish production and to detect genes involved in resistance to tetracycline. Therefore, we used 108 bacteria isolated from Nile tilapia with clinical characteristic signs of *Aeromonas* or *Streptococcus* infection, which were submitted to the susceptibility test to oxytetracycline and florfenicol antimicrobial by minimum inhibitory concentration (MIC) using the microdilution method and identified as wild or non-wild strains. It was also found the presence of resistance genes (tetA, tetE, tetL and tet M) oxytetracycline by PCR analysis. As a result of MIC for the antimicrobial agents tested, one variation of oxytetracycline for *Aeromonas* between 0,06 to 32 µg/ml and 0,125 to 1 µg/mL to florfenicol. For *Streptococcus*, the variation was from 0,2 to 1 µg/ml for oxytetracycline and 0,125 to 1 µg/ml for florfenicol. In non-wild strains of *Aeromonas*, tetA gene was detected in all three species identified in this study. For *Streptococcus* non-wild strains, the tetL gene was detected in 6 of the 9 strains studied. This study highlights the problem of the indiscriminate use of antimicrobials in aquaculture, which can have serious consequences for the environment and man.

Keywords: Antimicrobial, resistance, bacteria, fish

1. INTRODUÇÃO

. A tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) está entre as espécies de peixes mais cultivadas mundialmente (FAO, 2013), sendo a mais produzida no território nacional (MAPA 2012), de forma intensiva, em tanques-rede situados, principalmente, nos grandes reservatórios hidroelétricos (Scorvo Filho *et al.*, 2010; Garcia *et al.*, 2014a). Em 2011, sua produção nacional ficou em 253 mil toneladas, representando 46,6% do total de pescado produzido, o que elevou a produção de peixe de água doce para 63,6% entre 2010 e 2011 (MAPA, 2012).

Entretanto, a intensificação da produção, caracterizada por elevada densidade de estocagem, manejos altamente estressantes e qualidade da água, muitas vezes, inapropriada, provoca estresse exacerbado nos peixes, predispondo-os às doenças (Pavanelli *et al.*, 2008; Oba *et al.*, 2009). Entre as principais causadoras de morbidade e mortalidade na tilapicultura estão as doenças de origem bacteriana, principalmente as provocadas pelos gêneros *Streptococcus*, bactéria Gram-positiva que provoca quadros de septicemia, meningoencefalite e abscessos multifocais na musculatura, e *Aeromonas* móveis, responsável por quadros de septicemia hemorrágica (Figueiredo *et al.*, 2006; Pavanelli *et al.*, 2008; Li & Cai, 2011; Li *et al.*, 2013a; Li *et al.*, 2013b).

Utilizados no tratamento e prevenção de infecções bacterianas, os antimicrobianos são empregados nas pisciculturas, através da sua mistura com a ração a ser ofertada (Mota *et al.*, 2005; Cabello *et al.*, 2013). Contudo, o monitoramento de resíduos de antimicrobianos no meio ambiente vem evidenciando a presença frequente de tais substâncias em águas naturais e sedimentos (Chelossi *et al.*, 2003; Cabello *et al.*, 2013; Moore *et al.*, 2014; Monteiro *et al.*, 2016). Assim, o uso desenfreado de antibióticos implica não somente à contaminação do ambiente aquático e terrestre, mas também em impactos adversos em organismos não-alvo e, principalmente, na seleção de microorganismos resistentes (Billa & Dezotti, 2003; Pilarski & Sakabe, 2009; Cabello *et al.*, 2013).

A resistência bacteriana derivada pelo uso de antimicrobianos na aquicultura tornou uma preocupação mundial, por representar um risco potencial à saúde pública, seja pelo desenvolvimento da resistência bacteriana em ambiente

aquático que pode infectar seres humanos, seja pela transferência de genes de resistência até a sua incorporação à patógenos humanos (LaPatra & MacMillan, 2008), o que resultaria em uma vulnerabilidade em relação às infecções bacterianas, uma vez que determinados antimicrobianos não teriam mais efeito (Caumo *et al.*, 2010; Cantas *et al.*, 2013).

A aquisição de resistência por uma bactéria sensível sempre decorre de uma alteração genética, a qual se expressa bioquimicamente. Essa alteração pode ser decorrente de mutações cromossômicas ou pela aquisição de plasmídios de resistência (Billa & Dezotti, 2003; Mota *et al.*, 2005; Trabulsi & Alterthum, 2008), sendo a última forma a mais preocupante, uma vez que um plasmídio pode conter genes de resistência para vários antimicrobianos distintos, como também uma bactéria pode conter um ou mais plasmídios de resistência distintos (Trabulsi & Alterthum, 2008). Além disso, a transferência gênica entre bactérias permite a passagem de material genético entre espécies e até gêneros diferentes.

Assim sendo, o conhecimento do perfil de resistência bacteriana proveniente de cepas patogênicas de peixes evidenciaria não só o status sanitário da criação, mas também contribuiria para futuros questionamentos sobre as consequências do uso de antimicrobianos nas pisciculturas brasileiras.

A norma de referência deste trabalho segue o padrão proposto pela Brazilian Journal of Microbiology.

7. CONCLUSÕES

As concentrações mínimas inibitórias das cepas de *Aeromonas* para oxitetraciclina variaram de 0,06 a 32 µg/mL e, de 0,125 a 1 µg/mL para o florfenicol. Para a *Aeromonas hydrophila*, o ponto de corte epidemiológico foi 0,5µg/mL para oxitetraciclina e 1µg/mL para florfenicol.

Em relação às cepas de *Streptococcus*, a variação ocorreu de 0,2 a 1 µg/mL para oxitetraciclina, com ponto de corte epidemiológico na concentração 0,06µg/mL. Para florfenicol, a variação ficou entre 0,125 a 1 µg/mL, com prevalência na concentração 0,5µg/mL

Nas cepas resistentes de *Aeromonas* e *Streptococcus*, presumem-se a presença do gene tetA nas 3 cepas de *Aeromonas*, bem como a presença do gene tetL em 6 entre 9 cepas de *Streptococcus*.

8. REFERÊNCIAS

- Akinbowale OL, Peng H, Barton MD (2007) Diversity of tetracycline resistance genes in bacteria from aquaculture sources in Australia. J Appl Microbiol 103:2016-20125.
- Austin B, Austin DA (2007) Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish. Springer-Praxis, Godalming, United Kingdom.
- Balassiano IT, Bastos MCF, Madureira DJ, Silva IG, Freitas-Almeida AC, Oliveira SS (2007) The involvement of tetA and tetE tetracycline resistance genes in plasmid and chromosomal resistance of *Aeromonas* in Brazilian strains. Mem Inst Oswaldo Cruz 102:861-866.
- Barbosa JAR, Sarmiento EO, Barbosa JER, Faraco JC, Fontes, RS (2002) Avaliação de dois sistemas para coleta de sangue de carneiro utilizado no preparo de meios de cultura. Rev Inst Adolfo Lutz 61:127-130.
- Beaz-Hidalgo R, Alperi A, Buján N, Romalde JL, Figueras MJ (2010) Comparison of phenotypical and genetic identification of *Aeromonas* strains isolated from diseased fish. Syst Appl Microbiol 33:149-153.

- Bila DM, Dezotti M (2003) Fármacos no meio ambiente. Quim Nova 26:523-530.
- Björklund H, Bondestam J, Bylund G (1990) Residues of oxytetracycline in wild fish and sediments from fish farms. Aquaculture 86:359-367.
- Borghetti AA, Palma MSA (2014) Tetracycline: production, waste treatment and environmental impact assessment. B J P S 50:25-40.
- Boxall ABA, Johnson P, Smith EJ, Sinclair CJ, Stutt E, Levy LS (2006) Uptake of veterinary medicines from soils in plants. J Agric Food Chem 54:2288-2297.
- Brandi G, Sisti M, Schiavano GF, Salvaggio L, Albano A (2008) Survival of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* and *Aeromonas sobria* in soil. J Appl Bacteriol 81:439-444
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2012) Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2011, Brasília, DF.
- BRASIL, Ministério da Saúde, Portaria nº 10/SNVS de 8 de março de 1985, Brasília, DF
- Bromage ES, Owens L (2002) Infection of barramundi *Lates calcarifer* with *Streptococcus iniae*: effects of different routes of exposure. Dis Aquat Org 52:199-205.
- Buschmann AH, Tomova A, López A, Maldonado MA, Henríquez LA, Ivanova L, Moy F, Godfrey HP, Cabello FC (2012) Salmon aquaculture and antimicrobial resistance in the marine environment. Plos one 7:1-11.
- Butaye P, Cloeckaert A, Scwarz S (2003) Mobile genes coding for efflux-mediated antimicrobial resistance in Gram-positive and Gram-negative bacteria. Int J Antimicrob Ag 22:205-210.
- Cabello FC, Godfrey HP, Tomova A, Ivanova L, Dölz H, Millanao A, Buschmann AH (2013) Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. Environ Microbiol 15:1917-1942.
- Cantas L, Syed QAS, Cavaco LM, Manaia CM, Walsh F, Popowska M, Garelik HB, Sørum H (2013) A brief multi-disciplinary review on antimicrobial resistance in medicine and its linkage to the global environmental microbiota. Front Microbiol 4:1-14.

- Carattoli A (2013) Plasmids and the spread of resistance. *Int J Med Microbiol* 303:298-304.
- Carnahan AM, Behram S, Joseph SW (1991) Aerokey II: a flexible key for identifying clinical *Aeromonas* species. *J Clin Microbiol* 29:2843-2849.
- Caumo K, Duarte M, Cargnin ST, Ribeiro VB, Tasca T, Macedo AJ (2010) Resistência bacteriana no meio ambiente e implicações na clínica hospitalar. *Rev Liberato* 11:183-190.
- Chelossi E, Vezzulli L, Milano A, Branzoni M, Fabiano M, Riccardi G, Banat IB (2003) Antibiotic resistance of benthic bacteria in fish-farm and control sediments of the Western Mediterranean. *Aquaculture* 219: 83-97.
- Chopra I, Roberts M (2001) Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol R* 65:232-260.
- Cipriano RC (2001) *Aeromonas hydrophila* and motile aeromonad septicemias of fish. U.S. Fish and Wildlife Service, Washington, DC.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (2012) Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically – ninth edition. CLSI document M07-A9, Wayne, Pennsylvania.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (2012) Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-second informational supplement. CLSI document M100-S22, Wayne, Pennsylvania.
- Costa AB (2004) Estratégias para o estudo de bactérias potencialmente patogênicas na piscicultura. *In*: Cyrino, JEP, Urbinati EC, Fracalossi DM, Castagnolli N. Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. TecArt, São Paulo, Brasil, 387-403.
- Davison HC, Low JC, Woolhouse, MEJ (2000) What is antibiotic resistance and how can we measure it? *Trends Microbiol* 8:554-559.
- Davison J (1999) Genetic Exchange between bacteria in the environment. *Plasmid* 42:73-91.
- Delannoy CMJ, Crumlish M, Fontaine MC, Pollock J, Foster G, Dagleish MP, Turnbull JF, Zadoks RN (2013) Human *Streptococcus agalactiae* strains in aquatic mammals and fish. *BMC Microbiol* 13:1-9.

- Deng YT, Wu YL, Tan AP, Huang YP, Jiang L, Xue HJ, Wang WL, Zhao F (2014) Analysis of antimicrobial resistance genes in *Aeromonas* spp. isolated from cultured freshwater animals in China. *Microb Drug Resist* 4:350-356.
- Ding C, He J (2010) Effect of antibiotics in the environment on microbial populations. *Appl Microbiol Biotechnol* 87:925-941.
- Eede G van den, Aarts H, Buhk HJ, Corthier G, Flinte HJ, Hammes W, Jacobsen B, Midtvedt T, Vossen J van der, Wright A, Wackernabel W, Wilcks A (2004) The relevance of gene transfer to the safety of food and feed derived from genetically modified (GM) plants. *Food Chem Toxicol* 42:1127-1156.
- Evans JJ, Klesius PH, Pasnik D, Bohnsack J.F (2009) Human *Streptococcus agalactiae* isolate in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Emerg Infect Dis* 15:774-776.
- Facklam R (2002) What happened to the *Streptococci*: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin Microbiol Ver* 15:613-630.
- Facklam R, Elliott J, Shewmaker L, Reingold A (2005) Identification and characterization of sporadic isolates of *Streptococcus iniae* isolated from humans. *J Clin Microbiol* 43:933-937.
- Faria FC, Leal CAG, Carvalho-Castro GA, Leite RC, Figueiredo HCP (2014) Carrier state induced by oxytetracycline therapy against streptococcosis in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *J Fish Dis* 37:853-857.
- Figueiras MJ, Suarez-Franquet A, Chacon MR, Soler L, Navarro M, Alejandre C, Grasa B, Martinez-Murcia AJ, Guarro J (2005) First Record of the rare species *Aeromonas culicicola* from a drinking water supply. *Appl Environ Microbiol* 71:538-541.
- Figueiredo HCP, Carneiro DO, Faria FC, Costa GM (2006) *Streptococcus agalactiae* associado à meningoencefalite e infecção sistêmica em tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil. *Arq Bras Med Vet Zootec* 58: 678-680.
- Figueiredo HCP, Leal CAG (2008) Tecnologias aplicadas em sanidades de peixes. *R Bras Zootec* 37:8-14.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO (2013) Fishery and aquaculture statistics 2011 FAO, Rome, Italy.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO (2012) The state of world fisheries and aquaculture 2012 FAO, Rome, Italy.

- Forsberg KJ, Patel S, Wencewicz TA, Dantas G (2015) The tetracycline destructase: a novel family of tetracycline-inactivating enzymes. *Chem Biol* 22:888-897.
- Furmanek-Blaszczak B (2013) Phenotypic and molecular characteristics of an *Aeromonas hydrophila* strain isolated from the River Nile. *Microbiol Res* 169:547-552.
- Gao Y, Li Y, Zhang L, Huang H, Hu J, Shah SM, Su X (2012) Adsorption and removal of tetracycline antibiotics from aqueous solution by graphene oxide. *J Colloid Interface Sci* 368:540-546.
- Garcia F, Romera DM, Gozi KS, Onaka EM, Fonseca FS, Schalch SHC, Candeira PG, Guerra LOM, Carmo FJ, Carneiro DJ, Martins MIEG, Portella MC (2013) Stocking density of Nile tilapia in cages placed in a hydroelectric reservoir. *Aquaculture* 410-411:51-56.
- Garcia F, Kimpara JM, Valenti WC, Ambrosio LA (2014) Emergency assessment of tilapia cage farming in a hydroelectric reservoir. *Ecol Eng* 68:72-79.
- Graham R, Palmer D, Pratt BC, Hart CA (1988) *In vitro* activity of florfenicol. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*: 7:691-694.
- Godoy DT (2006) Eficácia in vitro de florfenicol e biciclomicina para bactérias patogênicas de peixes de água doce. Lavas, Brasil, 47p. (Dissertação de mestrado. UFLA)
- Godoy DT, Mian GF, Zanolo R, Yuhara T, Faria FC, Figueiredo HCP (2008) Patterns of resistance to florfenicol and bicyclomycin in Brazilian strains of motile aeromonads. *Aquaculture* 285:255-259.
- Han JE, Kim JH, Choresca Jr CH, Shin SP, Jun JW, Chai JY, Park SC (2012) Prevalence of tet gene and complete genome sequencing of tet gene-encoded plasmid (pAHH01) isolated from *Aeromonas* species in South Korea. *J Appl Microbiol* 112:631-638.
- Hedayatianfard K, Mostafa A, Sharifiyazdi H (2014) Detection of tetracycline resistance genes in bacteria isolated from fish farms using polymerase chain reaction. *Vet Res Forum* 5:269-275.
- Huang YM, Hsu CC, Chen MM (2014) Antimicrobial susceptibility of fish *Streptococcaeae* and drug resistance determinants of erythromycin and tetracycline-resistant *Lactococcus* isolated in Taiwan. *Taiwan Vet J* 40:131-138.

- Hussain T, Nighat F, Jamal M, Andleeb S (2015) An introduction to tetracycline antibiotic: applications and resistance IJOMAS 1:42-48
- Jacobsen P, Berglind L (1988) Persistence of oxytetracycline in sediments from fish farms. *Aquaculture* 70:365-370.
- Janda JM, Abbott S (2010) The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *C M R* 23:35-73.
- Joseph SW, Carnahan A (1994) The isolation, identification, and systematics of the motile *Aeromonas* species. *Ann Rev Fish Dis* 4:315-343.
- Josupeit H (2005) World market of tilapia. FAO Globefish, Rome, Italy.
- Kahlmeter G, Brown DFJ, Goldstein FW, MacGowan AP, Mouton JW, Österlund A, Rodloff A, Steinbakk M, Urbaskova P, Vatopoulos A (2003) European harmonization of MIC breakpoints for antimicrobial susceptibility testing of bacteria. *J Antimicrob Chemother* 52:145-148.
- Kamble SR, Meshram SU, Shanware AS (2012) Characterization of *Aeromonas* species isolated from diseased fish using ERIC-RAPD markers. *AsPac J Mol Biol Biotechnol* 3:99-106.
- Kozińska A (2007) Dominant pathogenic species of mesophilic aeromonads isolated from diseased and healthy fish cultured in Poland. *J Fish Dis* 30:293-301.
- Krovacek K, Pasquale V, Baloda SB, Soprano V, Conte M, Dumontet S (1994) Comparison of putative virulence factors in *Aeromonas hydrophila* strains isolated from the marine environment and human diarrheal cases in southern Italy. *Appl Environ Microbiol* 90:1379-1382.
- Kubitza, F (2000) Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial. F. Kubitza, Jundiaí.
- L'Abée-Lund TM, Sørum H (2001) Class 1 integrons mediate antibiotic resistance in the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* worldwide. *Microb Drug Resist* 7:263-273.
- Lancefield RC (1933) A serological differentiation of human and other groups of hemolytic *Streptococci*. *J Exp Med* 57:571-595.

- LaPatra SE, MacMillan JR (2008) Fish health management and the environment. *In: Tucker CS, Hargreaves JA (eds). Environmental best management practices for aquaculture.* Ames, Iowa, USA, 487-518.
- Lau SKP, Woo PCY, Luk W, Fung AMY, Hui W, Fong AHC, Chow C, Wong SSY, Yuen K (2006) Clinical isolates of *Streptococcus iniae* from Asia are more mucoid and beta-hemolytic than those from North America *Diag Micr Infec Dis* 54:177-181
- Lerner PI, Gopalakrishna KV, Wolinsky E, McHenry MC, Tan J, Rosenthal M (1997) Group B *Streptococcus* (*S.agalactiae*) bacteremia in adults: analysis of 32 cases and review of the literature. *Medicine* 56:457-473.
- Li C, Wang R, Su B, Luo Y, Terhune J, Beck B, Peatman E (2013a) Evasion of mucosal defenses during *Aeromonas hydrophila* infection of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) skin. *Dev Comp Immunol* 39:447-455.
- Li Y, Cai SH (2011) Identification and Pathogenicity of *Aeromonas sobria* on tail-rot disease in juvenile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Curr Microbiol* 62:623-627.
- Li YW, Liu L, Huang PR, Fang W, Luo ZP, Peng HL, Wang YX, Li AX (2013b) Chronic streptococcosis in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), caused by *Streptococcus agalactiae* *J Fish Dis* 37:1-7.
- Liu F, Ying GG, Tao R, Zhao JL, Yang JF, Zhao LF (2009) Effects of six selected antibiotics on plant growth and soil microbial and enzymatic activities. *Environ Pollut* 157:1636-1642.
- Livermore DM (2003) Bacterial Resistance: origins, Epidemiology and impact. *Clin Infect Dis* 36:S11-S23.
- Lysnyansky I, Ayling RD (2016) *Mycoplasma bovis*: mechanisms of resistance and trends in antimicrobial susceptibility. *Front Microbiol* 7:1-7.
- Maisak H, Jantrakajorn S, Lukkana M, Wongtavatchai J (2013) Antibacterial activity of Tannin from Seet Chestnut Wood against *Aeromonas* and *Streptococcus* pathogens of tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Thai J Vet Med* 43:105-111.
- Majeed KN, Egan AF, MacRae IC (1990) Production of exotoxins by *Aeromonas* spp at 5°C. *J Appl Bacteriol* 69:332-337.

- Marshall BM, Levy SB (2011) Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clin Microbiol Rev* 24:718-733.
- Martins ML, Miyazaki DMY, Mouriño JLP (2008) *Aeromonas caviae* durante surto de mortalidade em tilápia do Nilo e suplementação com vitamina c na dieta. *B Inst Pesca* 34:585-590.
- Mazel D (2006) Integrons: agents of bacterial evolution *Nat Rev Microbiol* 4:608-620.
- Meays CL, Broersma K, Nordin R, Mazumder A (2004) Source tracking fecal bacteria in water: a critical review of current methods. *J Environ Manage* 73:71-79.
- Mehershahi KS, Hsu LY, Koh TH, Chen SL (2015) Complete Genome Sequence of Kurosh S *Streptococcus agalactiae* Serotype III, Multilocus Sequence Type 283 Strain SG-M1. *Genome Announc* 3:1-2.
- Merighe GKF, Pereira da Silva EM, Negrão JA, Ribeiro S (2002) Efeito da cor do ambiente sobre o estresse social em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *R Bras Zootec* 33:828-837.
- Michalova E, Novotna P, Schlegelova J (2004) Tetracyclines in veterinary medicine and bacterial resistance to them. *Vet Med Czech* 49:79-100.
- Michel C, Kerouault B, Martin C (2003) Chloramphenicol and florfenicol susceptibility of fish-pathogenic bacteria isolated in France: comparison of minimum inhibitory concentration, using recommended provisory standards for fish bacteria. *J. Appl. Microbiol* 95:1008-1015.
- Midlen A, Redding TA (1998) Environmental management for aquaculture. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht: Netherlands.
- Miller RA, Reimschuessel R (2006) Epidemiologic cutoff values for antimicrobial agents against *Aeromonas salmonicida* isolates determined by frequency distributions of minimal inhibitory concentration and diameter of zone of inhibition data. *AJVR* 67:1837-1843.
- Miranda CD, Kehrenberg C, Ulep C, Schwarz S, Roberts MC (2003) Diversity of tetracycline resistance genes in bacteria from Chilean salmon farms. *Antimicrob Agents Chemother* 47:883-888.

- Miranda CD, Rojas R (2007) Occurrence of florfenicol resistance in bacteria associated with two Chilean salmon farms with different history of antibacterial usage. *Aquaculture* 266:39-46.
- Miranda CD, Tello A, Keen PL (2013) Mechanisms of antimicrobial resistance in finfish aquaculture environments. *Front Microbiol* 4:1-6.
- Miranda CD, Zemelman R (2002a) Bacterial resistance to oxytetracycline in Chilean salmon farming. *Aquaculture* 212:31-47.
- Miranda CD, Zemelman R (2002b) Antimicrobial multiresistane in bactéria isolated from freshwater Chilean salmon farms. *Sci Total Environ* 293:207-218.
- Monfort P, Baleux B (1991) Distribution and survival of motile *Aeromonas* spp. in brackish water receiving sewage treatment effluent. *Appl Environ Microbiol* 9:2459-2467.
- Monteiro SH, Francisco JG, Andrade GC, Botelho RG, Figueiredo LA, Tornisielo VL (2016) Study of spatial and temporal distribution of antimicrobial in water and sediments from caging fish farms by on-line SPE-LC-MS/MS. *J Environ SCi Health B* 51:634-643.
- Moore JE, Huang J, Yu P, Ma C, Moore PJA, Millar BC, Goldsmith CE, Xu J (2014) High diversity of bacterial pathogens and antibiotic resistance in salmonid fish farm pond water as determined by molecular identification employing 16S rDNA PCR, gene sequencing and total antibiotic susceptibility techniques. *Ecotoxicol Environ Saf* 108:281-286.
- Mota RA, Silva KPC, Freitas MFL, Porto WJN, Silva, LBG (2005) Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. *Braz J vet Resanim Sci* 42:465-470.
- Nawaz M, Sung K, Khan AS, Khan AA, Steele R (2006) Biochemical and molecular characterization of tetracycline resistant *Aeromonas veronii* isolates from catfish. *Appl Environ Microbiol* 72:6461-6466.
- Nielsen ME, Høi L, Schmidt AS, Qian D, Shimada T, Shen JY, Larsen JL (2001) Is *Aeromonas hydrophila* the dominant motile *Aeromonas* species that causes disease outbreaks in aquaculture production in the Zhejiang province of China? *Dis Aquat Organ* 46:23-29.

- Oba ET, Mariano WS, Santos LRB (2009) Estresse em peixes cultivado: agravantes e atenuantes para o manejo rentável. *In: Tavares-Dias M. Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo*. Embrapa Amapá, Macapá, Brasil, 226-247.
- Palumbo SA, Maxino F, Williams AC, Buchanan RL, Thayer DW (1985) Starch-ampicillin agar for the quantitative detection of *Aeromonas hydrophila*. *Appl Environ Microbiol* 50:1027-1030.
- Pavanelli GC, Eiras JC, Takemoto RM (2008) Bacterioses. *In:_____*. Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento. Eduem, Maringá, Brasil, 165-220.
- Pereira UP, Mian GF, Oliveira ICM, Benchetri LC, Costa GM, Figueiredo HCP (2009) Genotyping of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from fish, human and cattle and their virulence potential in Nile tilapia. *Vet Microbiol* 140:186-192.
- Pereira Júnior DJ, Figueiredo HCP, Carneiro DO, Leal CAG (2006) Concentração inibitória mínima de oxtetraciclina para isolados de *Aeromonas hydrophila* obtidos de diferentes fontes. *Ciênc Agrotec* 30:1190-1195.
- Pereira-Maia EC, Silva PP, Almeida WB, Santos HF, Marcial BL, Ruggiero R, Guerra W (2010) Tetraciclina e gliciliclinas: uma visão geral. *Quím Nova* 33:700-706.
- Pier GB, Madin SH, Al-Nakeeb S (1976) *Streptococcus iniae* sp. nov., a beta-hemolytic *Streptococcus* isolated from an amazon freshwater dolphin, *Inia geoffrensis*. *Int J Syst Bacteriol* 26:545-553
- Pilarski F, Sakabe, R (2009) Principais enfermidades diagnosticadas no Estado de São Paulo: profilaxia ou tratamento? *In: Pezzato LE, Barros MM, Furuya WM, Cyrino JEP, Fernandes Júnior AC* . Anais do 3º s impósio internacional de nutrição e saúde de peixes, Botucatu, São Paulo, 101-130.
- Pretto-Giordano LG, Scarpassa JA, Barbosa AR, Altrão CS, Ribeiro CGG, Vilas-Boas LA (2015) *Sterptococcus iniae*: na unusual important pathogen fish in Brazil. *J Aquac Res Development* 6:1-3.
- Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC (2005) *Microbiologia veterinária e doenças infecciosas*, Artmed, Porto Alegre, Brasil.

- Radu S, Ahmad N, Ling FH, Reezal A (2003) Prevalence and resistance to antibiotics for *Aeromonas* species from retail fish in Malaysia Int J Food Microbiol 81:261-266.
- Resende EK (2009) Pesquisa em rede em aquicultura: bases tecnológicas para o desenvolvimento sustentável da aquicultura no Brasil. Aquabrazil. R Bras Zootec 38:52-57.
- Rhodes G, Huys G, Swings J, McGann P, Hiney M, Smith P (2000) Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between *Aeromonads* in hospital and aquaculture environments: implications of Tn171 I dissemination of the tetracycline resistance determinant tet A. App Environ Microbiol 66:3883-3890.
- Rigos G, Nengas I, Alexis M (2006) Oxytetracycline (OTC) uptake following bath treatment in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Aquaculture 261:1151-1155.
- Roberts Mc (2003) Tetracycline therapy: update. Clin Infect Dis 36:462-467.
- Roberts MC (2005) Update on acquired tetracycline resistance genes FEMS Microbiol Lett 245:195-203.
- Rodríguez-Rojas A, Rodríguez-Beltrán J, Couce A, Blásquez J (2013) Antibiotics and antibiotic resistance: a bitter fight against evolution Int J Med Microbiol 303:293-297.
- Saad SMI, Iaria ST, Furlanetto SMP (1995) Motile *Aeromonas* spp. in retail vegetables from São Paulo, Brazil. Rev Microbiol 26:22-27.
- Salvador R, Muller EE, Freitas JC, Leonhardt JH, Pretto-Giordano LG, Dias J (2005) A isolation and characterization of *Streptococcus* spp. group B in Nile tilapias (*Oreochromis niloticus*) reared in hapas nets and earth nurseries in the northern region of Parana State, Brazil. Cienc Rural 35:1374-1378.
- Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular Cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Samie N, Noghabi KA, Gharegozloo Z, Zahiri HS, Ahmadian G, Sharafi H, Behrozi R, Vali H. Psychrophilic α -amylase from *Aeromonas veronii* NS07 isolated from farm soils. Process Biochemistry, v. 47, p. 1381-1387, 2012.

- Schmidt AS, Bruun MS, Dalsgaard I, Larsen JL (2001) Incidence, distribution, and spread of tetracycline resistance determinants and integron-associated antibiotic resistance genes among motile *Aeromonas* from a fish farming environment. *App Environ Microbiol* 67:5675-5682.
- Schrader KK, Harries MD, Darwish AM (2013) *In vitro* comparisons of the inhibitory activity of florfenicol, copper sulphate and potassium permanganate towards *Aeromonas hydrophila* and *Flavobacterium columnare*. *Aqua Res* 44:212-219.
- Scorvo Filho JD, Frascá-Scorvo CMD, Alves JMC, Souza RFA (2010) A tilapicultura e seus insumos, relações econômicas. *R Bras Zootec* 39:112-118.
- Sebastião FA, Furlan LR, Hashimoto DT, Pilarski F (2015) Identification of bacterial fish pathogens in Brazil by direct colony PCR and 16S rRNA gene Sequencing. *Adv Microbiol* 5:409-424.
- Seshardri R, Joseph SW, Chopra AK, Sha J, Shaw J, Graf J, Haft D, Wu M, Ren Q, Rosovitz MJ, Madupu R, Tallon L, Kim M, Jin S, Vuong H, Colin Stine O, Ali A, Horneman AJ, Heidelberg J (2006) Genome sequence of *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966T: jack of all trades. *J Bacteriol* 188:8272-8228.
- Shoemaker CA, Klesius PH, Evans JJ (2001) Prevalence of *Streptococcus iniae* in tilapia, hybrid striped bass, and channel catfish on commercial fish farms in the United States. *A J V R* 62:174-177.
- Silvia ACMM, Nascimento DL, Machado RZ, Costa FN (2014) Caracterização de *Aeromonas* spp isoladas de amostras de ostras e água por métodos microbiológico e molecular. *Cienc Anim Bras* 15:362-368.
- Skwor T, Shinko J, Augustyniak A, Christopher G, Andraso G (2014) *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* predominate among potentially pathogenic ciprofloxacin and tetracycline resistant *Aeromonas* isolates from Late Erie. *App Environ Microbiol* 80:841-848.
- Smith P, Kronval G (2014) How many strains are required to set an epidemiological cut-off value for MIC values determined for bacteria isolated from aquatic animals? *Aquacult Int* 23:465-470.
- Sørum HL, Abeé-Lund TM (2002) Antibiotic resistance in food-related bacteria – a result of interfering with the global web of bacterial genetics. *Int J Food Microbiol* 78:43-56.

- Speer BS, Shoemaker NB, Salyers AA (1992) Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance. *Clin Microbiol Rev* 5:397-399.
- Trabulsi LR, Alterthum F (2008) *Microbiologia*. Atheneu, São Paulo, Brasil.
- Treves-Brown KM (2000) *Anaesthetics in applied fish pharmacology*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Netherlands.
- Trzcinski K, Coope BS, Hryniewicz W, Dowson CG (2000) Expression of resistance to tetracyclines in strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J A C* 45:763-770.
- Turnidge J, Kahlmeter G, Kronvall G (2006) Statistical characterization of bacterial wild-type MIC value distributions and the determination of epidemiological cut-off values. *Clin Microbiol Infect* 12:418-25.
- Turnidge J, Paterson DL (2007) Setting and revising antibacterial susceptibility breakpoints.
- Watanabe WO, Losordo TM, Fitzsimmons K, Hanley F (2002) Tilapia production systems in the Americas: technological advances, trends, and challenges. *Rev Fish Sci* 10:465-498.
- Weinstein MR, Litt M, Kertesz DA, Wyper P, Rose D, Coulter M, McGeer A, Facklam R, Ostach C, Willey BM, Borczyk A, Low DE (1997) Invasive infections due to a fish pathogen, *Streptococcus iniae*. *N Engl J Med* 337:589-594.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (1993) *Aeromonas* In: World Health Organization Guidelines for Drinking-Water Quality. WHO, Geneva, 1-17.
- Yáñez AJ, Valenzuela K, Matzner C, Olavarría V, Figuerosa J, Avendaño-Herrera R, Carcamo FG (2014) Broth microdilution protocol for minimum inhibitory concentration (MIC) determinations of the intracellular salmonid pathogen *Piscirickettsia salmonis* to florfenicol and oxytetracycline 37:505-509.
- Yi T, Li Y, Liu L, Xiao X, Li A. (2014) Protection of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) against *Streptococcus agalactiae* following immunization with recombinant FbsA and α -enolase. *Aquaculture* 428:35-40.
- Zang D, Pridgeon JW, Klesius PH (2014) Vaccination of channel catfish with extracellular products of *Aeromonas hydrophila* provides protection against infection by the pathogen. *Fish Shellfish Immunol* 36:270-275.