

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**CARACTERIZAÇÃO DA SEGURANÇA E DAS ATIVIDADES
TERAPÊUTICA E IMUNOMODULADORA DA LINCOMICINA
NO TRATAMENTO DE INFECÇÕES POR *Streptococcus*
agalactiae E *Aeromonas hydrophila* EM TILÁPIAS
(*Oreochromis niloticus*)**

Camila Carlino da Costa
Médica Veterinária

2023

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO DA SEGURANÇA E DAS ATIVIDADES
TERAPÊUTICA E IMUNOMODULADORA DA LINCOMICINA
NO TRATAMENTO DE INFECÇÕES POR *Streptococcus*
agalactiae E *Aeromonas hydrophila* EM TILÁPIAS
(*Oreochromis niloticus*)**

Discente: Camila Carlino da Costa

Orientador: Prof. Dr. Hélio José Montassier

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinária (Área: Saúde Única).

2023

C837c

Costa, Camila Carlino da

Caracterização da segurança e das atividades terapêutica e imunomoduladora da Lincomicina no tratamento de infecções por *Streptococcus agalactiae* e *Aeromonas hydrophila* em tilápias (*Oreochromis niloticus*) / Camila Carlino da Costa. -- Jaboticabal, 2023

94 p. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Hélio José Montassier

1. Aeromonose. 2. Ciclídeos. 3. Estreptococose. 4. Lincosamidas. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

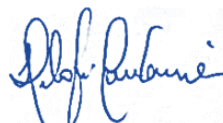
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: CARACTERIZAÇÃO DA SEGURANÇA E DAS ATIVIDADES TERAPÊUTICA E IMUNOMODULADORA DA LINCOMICINA NO TRATAMENTO DE INFECÇÕES POR *Streptococcus agalactiae* E *Aeromonas hydrophila* EM TILÁPIAS (*Oreochromis niloticus*)

AUTORA: CAMILA CARLINO DA COSTA

ORIENTADOR: HÉLIO JOSÉ MONTASSIER

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciências Veterinárias, área: Saúde Única pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. HÉLIO JOSÉ MONTASSIER (Participação Virtual)
Departamento de Patologia Reprodutiva e Saúde Única / FCAV UNESP Jaboticabal



Dra. PATRICIA BIANCA CLISSA (Participação Virtual)
São Paulo/SP / Instituto de Pesquisa Científica São Paulo SP - Butantan



Prof. Dr. MARCO ANTONIO DE ANDRADE BELO (Participação Virtual)
Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única / FCAV UNESP Jaboticabal



Jaboticabal, 17 de fevereiro de 2023

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Camila Carlino da Costa – nascida em 19 de maio de 1998, na cidade de Descalvado-SP. Formação em Medicina Veterinária pela Universidade Brasil em 2021. Durante a graduação foi bolsista de iniciação científica da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil (Processo: 2018/08058-1) durante 3 anos. Foi membro do grupo de medicina em grandes animais (MEGA) e também membro discente da Liga Acadêmica da Saúde Preventiva (LASP). Foi estagiária do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Animal, além de colaboradora no desenvolvimento de projetos do Grupo de Pesquisas GAP (Group of Animal Pharmacology, credenciado no Diretório do CNPq) na área de fisiopatologia do processo inflamatório em peixes teleósteos. Atualmente é Mestranda na Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" campus Jaboticabal (FCAV) no departamento de Medicina Veterinária Preventiva e bolsista Capes (Processo: 88887.641211/2021-00).

“Aprender é a única coisa que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende”.

Leonardo da Vinci

Dedico este trabalho primeiramente a Deus que sempre iluminou o meu caminho, e a todos que sempre me ampararam, em especial aos meus pais, pois sem eles nada seria possível.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, gostaria de agradecer a Deus e a Nossa Senhora Aparecida por terem guiado o meu caminho, por não terem me desamparado em momentos de dificuldades e por me dar muitas vezes a confiança e a coragem que precisava.

A vida dos animais cedidas a este estudo. Espero que estejam muito bem onde quer que estejam.

Aos meus pais Vanda e Airton, meus irmãos Fernanda e Junior, minha família que estão sempre ao meu lado, me enchendo de conselhos, amor e exemplos, vocês são meu alicerce, minha fonte de inspiração. A vocês, dedico a minha vida.

Ao meu noivo Victor por esses quase 8 anos juntos, por estar ao meu lado, por todo o amor, companheirismo, incentivo, por sempre me ouvir, aconselhar e por ser meu parceiro da vida.

Ao professor e amigo Marco Belo, pelos ensinamentos, puxões de orelhas, por acreditar no meu trabalho e sempre me incentivar. Obrigada por contribuir com meu crescimento pessoal e profissional. Obrigada por toda confiança, paciência e por nunca nos abandonar, por mais difícil que esteja a situação.

Ao meu orientador, professor Hélio Montassier, por todo apoio, ajuda e disponibilidade, estando prontamente disposto a me ajudar sempre que precisei. Obrigada por abrir as portas da pós-graduação e desta forma tornando esse processo realidade.

As minhas parceiras de laboratório, Susana, Mayumi e Letícia, sem vocês esse trabalho não seria possível e juntas, estamos conseguindo alcançar os nossos objetivos e superar os desafios.

Ao Gabriel, Daiane, Romário e Fernando, muito obrigada pela ajuda e ensinamentos.

Aos professores e funcionários Unesp/FCAV e do Instituto Butantan (SP), em especial a professora Patrícia Clissa pela disponibilidade, apoio e paciência em nos ajudar.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. (Processo: 88887.641211/2021-00).

E, por fim, a quem eu não mencionei, mas que esteve junto comigo de alguma forma, deixo a todos vocês meu agradecimento eterno.

SUMÁRIO

CERTIFICADOS DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	v
RESUMO.....	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
CAPÍTULO 1 - Considerações gerais.....	1
1. Introdução.....	1
2. Revisão de literatura	3
2.1. Tilapicultura no Brasil	3
2.2. Lincomicina	4
3. Principais bacterioses na tilapicultura	7
3.1. <i>Streptococcus agalactiae</i>	7
3.2. <i>Aeromonas hydrophila</i>	8
4. Objetivos	9
4.1. Objetivos gerais.....	9
4.2. Objetivos específicos.....	9
5. Referências bibliográficas.....	10
 CAPÍTULO 2 - Segurança clínica do tratamento com lincomicina, administrada via oral em tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	 16
1. Introdução.....	17
2. Material e Métodos	18
2.1. Peixes e Acondicionamento	18
2.2. Design Experimental	18
2.3. Padronização da Ração com Adição da Lincomicina	19

2.4. Anestesia dos Peixes.....	19
2.5. Análise hematológica.....	20
2.6. Avaliação bioquímica sérica	20
2.7. Avaliação do Índice Somático Hepático, Renal e Esplênico.....	20
2.8. Análises estatísticas.....	21
3. Resultados	21
3.1. Análises Hematológicas	21
3.2. Análise bioquímica sérica.....	24
3.3. Análise do Índice Somático Hepático, Renal e Esplênico.....	27
4. Discussão	28
5. Referências	30

CAPÍTULO 3 - Avaliação da eficácia terapêutica da Lincomicina em tilápias do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) tratadas via oral	34
1. Introdução.....	35
2. Material e métodos	36
2.1. Peixes e acondicionamento	36
2.2. Design experimental	37
2.3. Dieta experimental	39
2.4. Anestesia dos peixes.....	39
2.5. Produção dos inóculos de <i>S. agalactiae</i> e <i>A. hydrophila</i>	40
2.6. Determinação das concentrações bacterianas 50% letais de <i>S. agalactiae</i> e de <i>A. hydrophila</i> em tilápias do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	40
2.7. Infecção experimental	41
2.8. Concentração Inibitória Mínima (MIC).....	41
2.9. Teste de sensibilidade à lincomicina (Disco de difusão)	42
2.10. Avaliação clínica e comportamental	42

2.11. Avaliação hematológica.....	43
2.12. Determinação da concentração de anticorpos por método de ELISA indireto ..	43
2.13. Análise estatística.....	44
3. Resultados.....	45
3.1. <i>Streptococcus agalactiae</i>	45
3.1.1. Concentração Inibitória Mínima (MIC).....	45
3.1.2. Teste antibiograma.....	45
3.1.3. Avaliação de alterações clínicas e comportamentais nos peixes infectados com <i>S. agalactiae</i>	46
3.1.4. Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier nos peixes infectados com <i>S. agalactiae</i>	46
3.1.5. Análise hematológica nos peixes infectados com <i>S. agalactiae</i>	48
3.1.6. Burst respiratório leucocitário nos peixes infectados com <i>S. agalactiae</i>	52
3.1.7. Mensuração de anticorpos por métodos Elisa indireto nos peixes infectados com <i>S. agalactiae</i>	52
3.2. <i>Aeromonas hydrophila</i>	53
3.2.1. Concentração Inibitória Mínima (MIC).....	53
3.2.2. Teste de sensibilidade à lincomicina.....	53
3.2.3 Avaliação comportamental e de sinais clínicos em peixes infectados com <i>A. hydrophila</i>	54
3.2.4 Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier em peixes infectados com <i>A. hydrophila</i>	54
3.2.5. Análise hematológica em peixes infectados com <i>A. hydrophila</i>	56
3.2.6. Burst respiratório leucocitário em peixes infectados com <i>A. hydrophila</i>	59
3.2.7. Mensuração de anticorpos por métodos Elisa indireto em peixes infectados com <i>A. hydrophila</i>	59
4. Discussão	60

4.1. <i>Streptococcus agalactiae</i>	60
4.2. <i>Aeromonas hydrophila</i>	64
5. Conclusão.....	66
6. Referências	66

CERTIFICADOS DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Caracterização da segurança e das atividades terapêutica e imunomoduladora da lincomicina no tratamento de infecções por *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae* em tilápias (*Oreochromis niloticus*)**", protocolo nº 5639/22, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Hélio José Montassier, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 17 de agosto de 2022.

Vigência do Projeto	29/08/2022 a 30/06/2023
Espécie / Linhagem	<i>Oreochromis niloticus</i> (Tilápia do Nilo)
Nº de animais	456
Peso / Idade	100g
Sexo	Macho
Origem	Piscicultura Aquabel

Jaboticabal, 17 de agosto de 2022.


Profª Drª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

**CARACTERIZAÇÃO DA SEGURANÇA E DAS ATIVIDADES TERAPÊUTICA E
IMUNOMODULADORA DA LINCOMICINA NO TRATAMENTO DE INFECÇÕES
POR *Streptococcus agalactiae* E *Aeromonas hydrophila* EM TILÁPIAS
(*Oreochromis niloticus*)**

RESUMO – objetivou-se avaliar o potencial imunofarmacológico da lincomicina, administrada via oral, em tilápias do Nilo, *O. niloticus*, através dos estudos de: segurança clínica e eficácia terapêutica. Para estudo da segurança clínica, foram utilizadas 136 tilápias ($\pm 100\text{g}$), distribuídas aleatoriamente em 17 tanques (100L de água, $n=8$) para constituir as repetições dos diferentes tratamentos: T0 (grupo controle, não tratado com lincomicina); T1, T2, T3 (tratados com 10, 20 e 40mg/kg^{-1} de p.v. de lincomicina, respectivamente) e T4 padrão fisiológico (valores de referência). Oito animais foram amostrados por tratamento em 4 períodos: 2, 4 e 8 dias pós-tratamento com lincomicina e um grupo que foi tratado por 8 dias com o fármaco e após isso tratado apenas com ração comercial até o 12º dia para avaliação da recuperação clínica, foram coletados amostras de sangue para determinação do hemograma e bioquímico, além de órgãos como baço, fígado e rins para avaliação somática. Para estudo da eficácia terapêutica foram utilizadas 360 tilápias, acondicionadas em 36 tanques de 100L ($n=10$), sendo 100 tilápias submetidas a testes para estabelecimento da DL_{50} , em que 50 tilápias (5 tanques, $n=10$) foram infectadas com diferentes concentrações de *S. agalactiae* e 50 tilápias para *A. hydrophila*. Para os ensaios experimentais da eficácia terapêutica, foram utilizadas 260 animais, sendo 130 tilápias para cada desafio experimental, constituindo os tratamentos: S0/A0 (controle, infecção e não tratado com lincomicina); S1/A1, S2/A2 e S3/A3 (infecção e tratados com 40, 20 e 10mg/kg^{-1} de p.v. de lincomicina, respectivamente) e PF (padrão fisiológico, $n=10$). Animais que sobreviveram ao estímulo infeccioso foram amostrados no 8º dia pós-infecção (dpi) e 4 dias após o término do tratamento (12º dpi) para avaliação da recuperação clínica. Foram coletadas amostras de sangue para hemograma, leucograma, *burst* oxidativo e mensuração de anticorpos anti-*S. agalactiae* e anti-*A. hydrophila*. Tilápias tratadas com lincomicina apresentaram um aumento transitório nos valores de ALT, AST, colesterol, triglicérides e creatinina, que retornaram aos níveis normais após o período de recuperação. Tilápias tratadas com lincomicina e desafiadas com *S. agalactiae* apresentaram diminuição de leucócitos totais, associada a diminuição do *burst* oxidativo e aumento dos anticorpos anti-*S. agalactiae*, além de não revelarem sinais clínicos característicos de estreptococose. Tilápias desafiadas com *A. hydrophila* tratadas com lincomicina apresentaram diminuição do *burst* oxidativo, entretanto, animais do grupo controle apresentaram alta taxa de mortalidade associadas aos sinais característicos de aeromonose e os poucos animais sobreviventes apresentaram aumento de anticorpos Anti-*A. hydrophila*. Os estudos da eficácia terapêutica da lincomicina revelaram o seu potencial contra a *S. agalactiae*, mas os achados para *A. hydrophila*, sugerem que a lincomicina não seja um antibacteriano de predileção para o controle desta infecção em tilápias do Nilo.

Palavras-chave: aeromonose, ciclídeos, estreptococose, lincosamidas

**CHARACTERIZATION OF THE SAFETY AND THERAPEUTIC AND
IMMUNOMODULATORY ACTIVITIES OF LINCOMYCIN IN THE TREATMENT OF
INFECTIONS BY *Streptococcus agalactiae* AND *Aeromonas hydrophila* IN
TILAPIA (*Oreochromis niloticus*)**

ABSTRACT – The objective was to evaluate the immunopharmacological potential of lincomycin, administered orally, in Nile tilapia, *O. niloticus*, through studies of: clinical safety and therapeutic efficacy. For the clinical safety study, 136 tilapia (± 100 g) were used, randomly distributed in 17 tanks (100L of water, $n=8$) constitute the repetitions of the different treatments: T0 (control group, not treated with lincomycin); T1, T2, T3 (treated with 10, 20 and 40mg/kg⁻¹ b.w. of lincomycin, respectively) and T4 physiological standard (reference values). Eight animals were sampled by treatment in 4 periods: 2, 4 and 8 days after treatment with lincomycin and a group that was treated for 8 days with the drug and after that treated only with commercial feed until the 12th day for evaluation of clinical recovery, were collected blood for determination for hemogram and biochemistry, in addition to organs such as the spleen, liver and kidneys for somatic evaluation. To study the therapeutic efficacy, 360 tilapias were used, placed in 36 tanks of 100L ($n=10$), with the following distribution being carried out: 100 tilapias were included in tests to establish the LD₅₀, in which 50 tilapias (5 tanks, $n=10$) were infected with different concentrations of *S. agalactiae* and 50 tilapia for *A. hydrophila*. For the experimental trials of therapeutic efficacy, 260 animals were used, 130 tilapias for each experimental challenge, constituting the treatments: S0/A0 (control, infection and not treated with lincomycin); S1/A1, S2/A2 and S3/A3 (infection and treated with 40, 20 and 10mg/kg⁻¹ b.w. of lincomycin, respectively) and PF (physiological pattern, $n=10$). Animals that survived the infectious challenge were sampled on the 8th post-infection day (dpi) and 4 days after the end of treatment (12th dpi) to assess clinical recovery. Blood samples were collected for hemogram, leukogram, oxidative burst and measurement of antibodies against *S. agalactiae* and anti-*A. hydrophila*. Tilapia treated with lincomycin showed a transient increase in ALT, AST, cholesterol, triglycerides and creatinine values, which returned to normal levels after the recovery period. Tilapia treated with lincomycin and challenged with *S. agalactiae* showed a decrease in total leukocytes, associated with a decrease in oxidative burst and increase in antibodies against *S. agalactiae*, in addition to not revealing characteristic clinical signs of streptococcosis. Tilapias challenged with *A. hydrophila* treated with lincomycin showed a decrease in the oxidative burst, however, animals in the control group showed a high mortality rate associated with the characteristic signs of aeromonosis and the few surviving animals showed increased Anti-*A. hydrophila* antibodies. Studies on the therapeutic efficacy of lincomycin revealed the potential of this antibacterial against *S. agalactiae*, revealing a dose-response effect for the control of this experimental infection, but the findings for *A. hydrophila* suggest that lincomycin is not a predilection antibacterial for the control of this infection in Nile tilapia.

Keywords: aeromonosis, cichlids, streptococcosis, lincosamides

LISTA DE ABREVIATURAS

% - Porcentagem

°C – Graus Celsius

± - Mais ou menos

µg.mL⁻¹ – Microgramas por mililitros.

µL - Microlitro

AST – Aspartato aminotransferase

BHI – Brain Heart Infusion broth/agar

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CHCM – Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média

CLSI – Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais

DL – Dose letal

DPI – Dias pós inoculação

DPT – Dias pós tratamento

D.O. - Densidades ópticas

FA – Fosfatase alcalina

FDA – Food and Drug Administration

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations

g – Gramas

g/L – Gramas por litro

GLM – General Linear Model

H – Horas

H₂SO₄ – Ácido Sulfúrico

HE – Eritrócito

HG – Hemoglobina

HT – Hematócrito

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

Kg - Quilograma

L – Litros.

Mg - Miligrama

mg.kg⁻¹ – Miligramas por quilo grama.

MIC – Concentração inibitória mínima

min - Minutos

mL – Mililitros

n – Número de animais

NaCl – Cloreto de sódio

Nº - número

OIE - Organização Mundial da Saúde Animal

p.v. – peso vivo

PBS – Phosphate buffered saline

pH – Potencial hidrogeniônico.

RPM – rotação por minuto

T – Tonelada.

TSA – Tryptic Soy Agar

TSB – Tryptic Soy Broth

UFC – Unidade formadora de colônia

UNESP/FCAV – Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”/ Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias

VCM – volume corpuscular médio

S0 – Inoculado com *S. agalactiae* mas não tratado com lincomicina (controle)

S1 – Inoculado com *S. agalactiae* e tratado com 40mg lincomicina

S2 – Inoculado com *S. agalactiae* e tratado com 20mg lincomicina

S3 – Inoculado com *S. agalactiae* e tratado com 10mg lincomicina

S4 – não inoculado e não tratado (valores de referência)

A0 – Inoculado com *A. hydrophila* mas não tratado com lincomicina (controle)

A1 – Inoculado com *A. hydrophila* e tratado com 40mg lincomicina

A2 – Inoculado com *A. hydrophila* e tratado com 20mg lincomicina

A3 – Inoculado com *A. hydrophila* e tratado com 10mg lincomicina

A4 – não inoculado e não tratado (valores de referência)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição das tilápias para determinação da dose letal (DL ₅₀).....	38
Tabela 2. Distribuição das tilápias para avaliação da eficácia terapêutica.....	38
Tabela 3. Percentual relativo de sobrevivência das tilápias infectadas com <i>S. agalactiae</i> e tratadas com diferentes doses de lincomicina.....	48
Tabela 4. Percentual relativo de sobrevivência das tilápias infectadas com <i>A. hydrophila</i> e tratadas com diferentes doses de lincomicina.....	56

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

Figura 1. Valores médios ($\pm$ Erro padrão) observados na análise hematológica das tilápias tratadas com lincomicina. Médias (n=8) seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P<0.05$). Letras maiúsculas comparam os diferentes tratamentos dentro de cada dia experimental, letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento entre os diferentes dias experimentais.....22

Figura 2. Valores médios ($\pm$ Erro padrão) observados na análise leucocitária das tilápias tratadas com lincomicina. Médias (n=8) seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P<0.05$). Letras maiúsculas comparam os diferentes tratamentos dentro de cada dia experimental, letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento entre os diferentes dias experimentais.....23

Figura 3. Valores médios ($\pm$ Erro padrão) observados na análise da atividade enzimática sérica de A: alanina aminotransferase (ALT); B: aspartato aminotransferase (AST); C: fosfatase alcalina (FA) de tilápias tratadas com lincomicina. Médias (n=8) seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P<0.05$). Letras maiúsculas comparam os diferentes tratamentos dentro de cada dia experimental, letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento entre os diferentes dias experimentais.....24

Figura 4. Valores médios ($\pm$ Erro padrão) observados na análise de A: creatinina; B: proteína total; C: albumina; D: globulina; E: colesterol; F: triglicérides; G: glicemia de tilápias tratadas com lincomicina. Médias (n=8) seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P<0.05$). Letras maiúsculas comparam os diferentes tratamentos dentro de cada dia experimental, letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento entre os diferentes dias experimentais.....26

Figura 5. Valores médios ($\pm$ Erro padrão) observados na avaliação somática de baço, fígado e rim das tilápias tratadas com lincomicina. Médias (n=8) seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P<0.05$). Letras maiúsculas comparam os diferentes tratamentos dentro de cada dia experimental, letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento entre os diferentes dias experimentais.....27

CAPÍTULO 3

Figura 1. Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier de Tilápia do Nilo tratadas com lincomicina e submetidas a teste de infecção experimental com *S. agalactiae*. Os peixes foram tratados um dia com o fármaco antes da infecção experimental sendo o tratamento continuado por mais 8 dias. Tilápias submetidas (n=120) a desafio experimental com *S. agalactiae*. As mortes foram observadas a cada 24 horas por 14 dias após a inoculação de *S. agalactiae*. Tratamentos: 40 mg (n=30); 20 mg (n=30); 10 mg (n=30); Controle (não tratados; n=30)..... 47

Figura 2. Análise sanguínea de tilápias após tratamento com lincomicina e desafiadas com *S. agalactiae*. Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P<0.05$). Letras maiúsculas comparam os diferentes tratamentos dentro de cada dia experimental, letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento entre os diferentes dias experimentais.....49

Figura 3. Análise leucocitária de tilápias após tratamento com lincomicina e desafiadas com *S. agalactiae*. Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P<0.05$). Letras maiúsculas comparam os diferentes tratamentos dentro de cada dia experimental, letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento entre os diferentes dias experimentais.....51

Figura 4. Valores médios observados na determinação de espécies reativas de oxigênio (EROs) para tilápias inoculadas *S. agalactiae* tratadas com diferentes doses de lincomicina. Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P<0.05$). Letras maiúsculas comparam os diferentes tratamentos.....52

Figura 5. Valores médios de anticorpos contra *S. agalactiae*, mensurados como densidades ópticas determinadas por ELISA indireto em tilápias desafiadas com *S. agalactiae* e tratadas lincomicina. Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P<0.05$). Letras maiúsculas comparam os diferentes tratamentos dentro de cada dia experimental, letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento entre os diferentes dias experimentais.....53

Figura 6. Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier de Tilápia do Nilo tratadas com lincomicina e submetidas a teste de infecção experimental. Os peixes foram tratados um dia com o fármaco antes da infecção experimental sendo o tratamento continuado por mais 8 dias. Tilápias submetidas ($n=120$) a desafio experimental com *A. hydrophila*. Na infecção experimental as mortes foram observadas 6, 12, 18 e 24 após a infecção, seguindo a cada 24 horas durante 14 dias. Tratamentos: 40 mg ($n=30$); 20 mg ($n=30$); 10 mg ($n=30$); Controle (não tratados; $n=30$).....55

Figura 7. Análise sanguínea de tilápias após tratamento com lincomicina e desafiadas com *A. hydrophila*. Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P<0.05$). Letras maiúsculas comparam os diferentes tratamentos dentro de cada dia experimental, letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento entre os diferentes dias experimentais.....57

Figura 8. Análise leucocitária de tilápias após tratamento com lincomicina e desafiadas com *A. hydrophila*. Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P<0.05$). Letras maiúsculas comparam os diferentes tratamentos dentro de cada dia experimental, letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento entre os diferentes dias experimentais.....58

Figura 9. Valores médios observados na determinação de espécies reativas de oxigênio (EROs) para tilápias inoculadas *A. hydrophila* e tratadas com diferentes doses de lincomicina. Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P<0.05$). Letras maiúsculas comparam os diferentes tratamentos.....59

Figura 10. Valores médios da densidade ótica determinada por ELISA indireto da quantidade de anticorpos anti-*A. hydrophila* em tilápias inoculadas com *A. hydrophila* e tratadas com lincomicina. Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). Letras maiúsculas comparam os diferentes tratamentos dentro de cada dia experimental, letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento entre os diferentes dias experimentais.....60

CAPÍTULO 1 - Considerações gerais

1. Introdução

A aquicultura brasileira tem crescido nos últimos anos e se posiciona cada vez mais como um importante setor do agronegócio (Oliveira et al., 2022). O setor de pesca e aquicultura é cada vez mais reconhecido por sua essencial contribuição para a segurança alimentar e nutrição global no século XXI (FAO, 2022). As políticas públicas criadas especificamente para o setor e os investimentos sugerem projeções de que o Brasil seja uma potência na pesca e aquicultura. O país alcançou o posto de quarto maior produtor mundial de tilápias, respondendo por 8,57% da produção mundial (Peixe BR, 2022).

A biomanipulação dos ecossistemas aquáticos com a maximização dos recursos produtivos traz consigo inúmeros desafios, dentre os quais se destaca o controle sanitário das populações de peixes. Em geral, o aumento de espécimes por área, somado às práticas de manejo, resulta na ocorrência do estresse, condição fisiológica responsável por imunossuprimir os sistemas de defesa dos peixes, predispondo-os as mais diversas enfermidades (Belo et al., 2012).

Agentes etiológicos que causam aparentemente poucos danos às populações de peixes em seu habitat natural, podem tornar-se precursores de doenças de grande importância econômica quando submetidos às condições de criação (Belo et al., 2013). Dentre os problemas sanitários mais importantes na criação intensiva de tilápias, destaca-se a meningite causada por *Streptococcus agalactiae*, considerada uma das enfermidades de maior impacto econômico nas criações comerciais (Salvador et al., 2005). Além disso, o manejo sanitário precário propicia o surgimento de doenças causadas por microrganismos aquáticos oportunistas, como a *Aeromonas hydrophila* (Marteninghe et al, 2008), agente primário causador de lesões ulcerativas e septicemias hemorrágicas em peixes de água doce, acarretando em perdas na produção e na qualidade do pescado (Reque et al., 2010).

Na aquicultura, a intensificação da produção e o aumento da incidência de patógenos de animais aquáticos estão impulsionando o uso de antimicrobianos e

nas taxas atuais, estima-se que o consumo global de antimicrobianos na aquicultura aumente 33% entre 2017 e 2030 (Schar et al., 2020).

Poucos antimicrobianos são aprovados para uso na aquicultura, segundo a FDA - Food and Drug Administration, agência reguladora para o uso de medicamentos nos Estados Unidos, apenas oxitetraciclina, florfenicol e sulfadimetoxina associados ao ormetoprim podem ser adicionados à ração e aplicados no controle de doenças bacterianas na aquicultura (FDA, 2018). Nesse contexto, a segurança clínica dos animais e do meio aquático, aliada ao baixo teor de resíduos de carcaça, são propriedades importantes que devem estar atreladas à eficácia no controle de doenças bacterianas em peixes, tornando os procedimentos de aprovação de novos medicamentos extremamente complexos (FDA, 2018).

De acordo com 86ª sessão geral da comissão internacional da OIE (Organização Mundial de Sanidade Animal) em 2018, foi atualizada a lista de antimicrobianos de importância na medicina veterinária, a lincomicina apresenta significativo potencial para uso em peixes, no entanto, necessita de delineamento de protocolos terapêuticos eficazes para seu uso em organismos aquáticos (OIE, 2021).

A lincomicina é um antibiótico lincosamida de amplo espectro que é especificamente ativo contra bactérias gram-positivas (Lee et al., 2022) e inibidor da síntese proteica em bactérias anaeróbias (Spížek & Řezanka, 2017). A lincomicina tem sido amplamente utilizada como antibiótico veterinário de primeira escolha para tratar infecções bacterianas em ovinos, caprinos e bezerros (Collignon et al., 2008; Papich & Riviere, 2001). No entanto, em peixes, apenas dados in-vitro limitados estão disponíveis (Revina et al., 2017) e em tilápia do Nilo pouco se sabe sobre a sua ação, necessitando assim de delineamento de protocolos terapêuticos eficazes para seu uso em organismos aquáticos.

Com base na importância da estreptococose e aeromonose para a tilapicultura, associado à necessidade de desenvolvimento de programas eficazes para manejo sanitário e tratamento destas enfermidades em pisciculturas, o presente estudo tem por objetivos avaliar a eficácia terapêutica, a resposta imune humoral (produção de anticorpos anti-bacterianos), as alterações histopatológicas, a segurança clínica e ecotoxicológica da lincomicina, administrada por via oral, para o

tratamento de infecções experimentalmente induzidas, ou por *S. agalactiae*, ou por *A. hydrophila* em tilápias do Nilo.

2. Revisão de literatura

2.1. Tilapicultura no Brasil

A Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é a espécie de peixe mais importante criada no Brasil. Segundo levantamento da Associação Brasileira da Piscicultura (Peixe BR, 2022), a tilápia representa 65,3% da piscicultura nacional, com produção de 534.005 toneladas em 2021, um crescimento de 9,8% sobre o desempenho do ano anterior (486.155t). Esse resultado posiciona o Brasil entre os quatro maiores produtores do mundo, atrás de China, Indonésia e Egito, entretanto, com a piscicultura brasileira em pleno crescimento, a Peixes BR projeta que o país alcance até o fim desta década o patamar de segundo maior produtor mundial de tilápia. O Paraná é o maior produtor de tilápia do Brasil, com 182.000 toneladas, seguido do estado de São Paulo, equivalentes a 76.140 t. O terceiro maior produtor de tilápia do Brasil é Minas Gerais com 47.000t. Depois vêm Santa Catarina, com 41.700t e Mato Grosso do Sul, com 34.450t, juntos, são os maiores estados produtores de tilápia do Brasil (Peixe BR, 2022).

A tilápia possui características únicas, incluindo taxas de crescimento rápido, tolerância a uma ampla gama de condições ambientais e uma aceitação no mercado mundial que lhes permite superar todas as outras espécies. Por outro lado, a biossegurança é um dos desafios sanitários do setor, ressaltando a importância de ações bem estruturadas para conter a introdução e a disseminação de agentes patogênicos no ambiente de produção aquícola (Peixe BR, 2022).

Segundo estudo realizado pelo extinto Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA), o país se tornará um dos maiores produtores do mundo até 2030, com produção intensiva de espécies amazônicas e da tilápia que cresce 17% ao ano (Brasil, 2014). Isso porque o Brasil possui aspectos naturais que são bastante adequados para a piscicultura, devido à sua capacidade aquícola com um território de aproximadamente 29 milhões de hectares em reservatórios de água doce,

naturais e artificiais com potencial de utilização na produção de organismos aquáticos (Crepaldi et al., 2006). Além disto, a piscicultura brasileira, possui cada vez mais uma maior demanda no mercado consumidor, devido as políticas públicas que colaboraram para o desenvolvimento tecnológico do setor (Fortunato et al., 2020).

Existem 70 espécies de tilápias distribuídas em 4 gêneros: *Oreochromis*, *Sarotherodon*, *Tillapia*, *Danakilia*. Dessas, somente o gênero *Oreochromis* apresenta viabilidade para a aquicultura mundial, em virtude dos índices de produtividade e adaptação a condições de cativeiro. As principais espécies criadas são: *Oreochromis niloticus* (tilápia do Nilo), *Oreochromis mossambicus* (tilápia de Moçambique), *Oreochromis aureus* (tilápia aurea ou azul) e *Oreochromis urolepi shornorum* (tilápia zamzibar) (Sebrae 2015).

A aquicultura desempenha um papel fundamental na produção de alimentos no mundo, fornecendo proteína de alta qualidade. Entretanto, a indústria aquícola está cada vez mais ameaçada por vários patógenos que causam enormes perdas econômicas na produção e representam riscos para a saúde do consumidor, tais como *Streptococcus agalactiae*, *Aeromonas* sp., *Edwardsiella tarda*, entre outros agentes etiológicos de doenças infecciosas, tornaram-se um dos fatores mais importantes que limitam o desenvolvimento sustentável da tilapicultura, ocasionando enormes prejuízos para a indústria piscícola mundial (Naylor et al., 2021).

2.2. Lincomicina

A piscicultura intensiva é acompanhada pelo surgimento de doenças bacterianas, exigindo o uso de antibióticos para seu tratamento (Lulijwa et al., 2020). O termo lincomicina é baseado de Lincoln, Nebraska, e o antibiótico foi originalmente isolado de *Streptomyces lincolnensis* em amostras de solo (Mohr, 2016).

A lincomicina é um tipo de lincosamida que são uma classe relativamente pequena de antibióticos cujas estruturas químicas consistem em aminoácidos e porções de açúcar (De Simeis e Serra, 2021). Sua atividade antimicrobiana é baseada na inibição da síntese proteica pela ligação à subunidade ribossômica 50S (Pyörälä et al., 2014).

A lincomicina é um antibiótico de amplo espectro que é especificamente ativo contra bactérias gram-positivas (Lee et al., 2022) e inibidor da síntese proteica em bactérias anaeróbias (Spížek e Řezanka, 2017). São bacteriostáticos, inibindo a síntese de proteínas em bactérias sensíveis; no entanto, em concentrações mais elevadas, podem ser bactericidas. A lincomicina tem sido amplamente utilizada como antibiótico veterinário de primeira escolha para tratar infecções bacteriana em ovinos, caprinos e bezerros (Collignon et al., 2008; Papich e Riviere, 2001). No entanto, em peixes, apenas dados in-vitro limitados estão disponíveis (Revina et al., 2017) e em tilápia do Nilo pouco se sabe sobre a sua ação, necessitando assim de delineamento de protocolos terapêuticos eficazes para seu uso em organismos aquáticos. A administração oral, para qual os antimicrobianos são misturados na ração é o método de administração mais utilizado para alcançar a eficácia sistêmica de agentes antimicrobianos em criações de peixes (Lee et al., 2022).

Lincomicina consiste em um aminoácido incomum, viz. trans-N-metil-4-n-l-prolina (ácido propilenoglicol) que está ligado ao açúcar 6-amino-6,8-didesoxi-1-tio-d-eritro- α -d-galactopiranosídeo (metiltio –lincosamida) através de uma ligação peptídica (Kagan e Grostic, 1972). As lincosamidas pertencem à classe de antibióticos que bloqueiam a síntese de proteínas microbianas, incluindo muitas etapas desde a ativação da síntese de aminoacil-tRNA de monômeros de aminoácidos até a iniciação, alongamento e terminação da cadeia de polipeptídeos de crescimento ribossômico (Spížek e Řezanka, 2017). Os antibióticos interrompem o tempo e a especificidade dessas etapas, e essa interrupção pode retardar ou ser letal para os microrganismos (Kohanski et al., 2010).

Os inibidores de ribossomo 50S incluem macrolídeos, lincosamidas, estreptograminas, anfenicois e oxazolidinonas (Kohanski et al., 2010). Os inibidores do ribossomo 50S funcionam bloqueando fisicamente o início da tradução da proteína ou translocação de peptidil tRNAs, que serve para inibir a reação de peptidiltransferase que alonga a cadeia peptídica nascente (Tenson et al., 2003). Um modelo para o mecanismo pelo qual essas drogas agem foi formulado por estudos de macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas. O modelo envolve o bloqueio do acesso de peptidil tRNAs ao ribossomo (em graus variados), bloqueio subsequente da reação de alongamento da peptidiltransferase por inibição estérica e,

eventualmente, desencadeando a dissociação do peptidil tRNA (Tenson et al., 2003). Este modelo também explica o fenômeno de que essas classes de drogas perdem sua atividade antibacteriana quando o alongamento progrediu além de um comprimento crucial.

Bactérias resistentes a antibióticos que são difíceis ou impossíveis de tratar estão se tornando cada vez mais comuns e estão causando uma crise de saúde global (Admassie, 2018). A resistência aos antibióticos é codificada por vários genes, muitos dos quais podem ser transferidos entre bactérias. Novos mecanismos de resistência são constantemente descritos e novos genes e vetores de transmissão são identificados regularmente (Jian et al., 2021).

A principal forma de resistência à lincomicina é a modificação do rRNA 23S na subunidade ribossômica 50S, semelhante à resistência contra macrolídeos e estreptogramina B, chamada de resistência MLS_B. É uma monometilação ou dimetilação do grupo amino exocíclico N6 de A₂₀₅₈ por enzimas específicas de modificação da metilação do ribossomo (Spížek & Řezanka, 2017). Este tipo de resistência está associado a genes que codificam metiltransferases modificando o sítio alvo comum de macrolídeos e lincosamidas, ou seja, RNA ribossômico 23S (por exemplo, genes *ermA* e *ermC*). Também foi descrito um gene específico cujo produto proteico modifica e, assim, inativa os antibióticos lincosamida (*linA*) (Spížek & Řezanka, 2017).

Não há muitas publicações sobre a atividade imunomoduladora da lincomicina. Sabe-se que a lincomicina administrada antes e 6h após a ovariectomia cirúrgica preveniu o desenvolvimento de uma infecção (Rizzo et al., 2009). A lincomicina usada na dose de 17 mg/kg/dia mostrou-se eficaz na proteção de camundongos do choque séptico endógeno no modelo β -glucano-indometacina, modulando a flora microbiana intestinal (Sachico et al., 2007). Além disso, a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF- α) foi diminuída pela lincomicina em culturas de células de baço in vitro (Radomska-Leśniewska et al., 2011).

A análise do resíduo muscular demonstra que lincomicina é uma droga apropriada para o tratamento de peixes para alimentação, pois a sua concentração degrada a um nível seguro para consumo humano em 2 semanas (Lee et al., 2022).

O uso frequente de compostos antimicrobianos levou ao desenvolvimento de bactérias resistentes, apresentando sérios desafios tanto para a saúde dos animais aquáticos como para a saúde humana (Bonev, 2019). A utilização adequada de antibióticos é importante para a recuperação de animais enfermos, intensificação da recuperação da população, bem-estar dos animais tratados e evitará a disseminação de infecções bacterianas para outros animais, portanto, o uso prudente e responsável de antimicrobianos para minimizar o risco de resistência é uma tarefa difícil para os profissionais de saúde de animais aquáticos (Kemper, 2008). A administração de antimicrobianos deve ser baseada no diagnóstico correto e realizada de forma que possibilite um tratamento eficaz e, conseqüentemente, leve à redução do uso de antimicrobianos e à prevenção do desenvolvimento de resistência antimicrobiana (Zrnčić, 2020).

A lista de agentes antimicrobianos de importância veterinária da OIE, aborda os agentes antimicrobianos autorizados para uso em animais produtores de alimentos e a lincomicina se enquadra como agentes antimicrobianos veterinários de importância elevada, e apresenta significativo potencial para uso em peixes, no entanto, necessita de delineamento de protocolos terapêuticos eficazes para seu uso em organismos aquáticos (OIE, 2021).

3. Principais bacterioses na tilapicultura

3.1. *Streptococcus agalactiae*

A estreptococose causada por *Streptococcus agalactiae*, também conhecida como Streptococcus do Grupo B (GBS), é considerada mundialmente a doença mais significativa na criação de tilápia do Nilo (Maulu et al., 2021) devido a sua grande capacidade de provocar mortes massivas na fase final da criação (Chideroli et al., 2017), e perdas econômicas expressivas nos sistemas de produção de tilápia (Musa et al., 2009).

Com base em antígenos capsulares, *S. agalactiae* pode ser dividido em dez sorotipos (Ia, Ib, II-IX), todos encontrados em humanos, enquanto apenas três sorotipos são encontrados em peixes (Phuoc et al., 2021), sendo identificados até o momento que sorotipos Ia, Ib e III infectam a tilápia do Nilo (Eto et al., 2020).

A doença é caracterizada por septicemia, meningoencefalite, exoftalmia, anorexia e ascite (Phuoc et al., 2021). A taxa de mortalidade varia de baixa (em infecções crônicas) a alta (doença aguda), ocasionado em perdas maciça de animais, principalmente durante os surtos de verão (Mian et al., 2009) devido a altas temperaturas da água (Phuoc et al., 2021). O aumento na temperatura de 28 para 35°C causa quase duas vezes a mortalidade em tilápia e regula a expressão gênica, como a regulação positiva dos genes pró-inflamatórios para a ciclooxigenase-2, IL-1 β e TNF- α (Chu et al., 2016).

As medidas sanitárias primárias empregadas para diminuir os danos ocasionados por *S. agalactiae* em peixes são as vacinas preventivas e tratamento com antibióticos em caso de surto. A utilização de antimicrobianos é uma prática emergencial e necessária para reduzir e/ou controlar a alta mortalidade de um surto (Yousefian & Amiri, 2009).

3.2. *Aeromonas hydrophila*

Esta bactéria é um patógeno oportunista, que causa sérias perdas econômicas na aquicultura, sendo responsável por surtos de doenças infecciosas graves com alta mortalidade em peixes (Anjur et al., 2021).

A. hydrophila pertence à família Aeromonadaceae e é uma bactéria Gram-negativa, oxidase positiva, aeróbia e anaeróbia facultativa, em forma de bastonete, com cápsula móvel, flagelos polares e não formadora de esporos que normalmente habita o ambiente aquático (Fernandes et al., 2019). A infecção é caracterizada por aderência, invasão, colonização e disseminação sistêmica para os órgãos vitais, que causam o início de uma resposta inflamatória sistêmica, seguida de falência múltipla de órgãos e morte do hospedeiro (Parker & Shaw, 2011).

A doença se manifesta clinicamente com septicemia hemorrágica, caracterizada pela presença de pequenas lesões superficiais, hemorragias focais, principalmente em brânquias e opérculos, úlceras, abscessos, exoftalmia e distensão abdominal. Internamente, pode ocorrer acúmulo de líquido ascítico, anemia e lesões no fígado e nos rins (Stratev & Odeyemi, 2017).

A patogenicidade de *A. hydrophila* é mediada por múltiplos fatores de virulência, incluindo hemolisina, enterotoxina citotóxica, aerolisina, adesinas, camada S, exoprotease, lipase, elastase, flagelo e lipopolissacarídeos (Jin et al., 2020).

As taxas de mortalidade são altas e os aquicultores incorrem em perdas econômicas substanciais, necessitando, portanto, de medidas oportunas para controle, prevenção e tratamento de doenças (Anjur et al., 2021). Apesar da *A. hydrophila* ser uma bactéria gram-negativa, cepas isoladas de carpa foram sensíveis a lincomicina (Daood, 2012), corroborando com os achados de Abu-Elala et al (2015) nas quais cepas de *A. hydrophila* isoladas de peixes doentes também foram sensíveis com lincosamidas.

4. Objetivos

4.1. Objetivos gerais

Objetivou-se avaliar a eficácia terapêutica, incluindo sua possível ação sobre as respostas imunes humorais e a segurança clínica do antibiótico lincomicina, administrada via oral incorporada à ração, para o tratamento de *S. agalactiae* e *A. hydrophila* em tilápias do Nilo, *O. niloticus*.

4.2. Objetivos específicos

-Avaliar a inocuidade do fármaco em estudo de dose-resposta quantal, determinando-se a segurança clínica nas doses de 10, 20 e 40 mg da lincomicina/kg⁻¹ p.v.

-Estudar a eficácia das doses terapêuticas de 10, 20 e 40mg de lincomicina/kg⁻¹ p.v. em tilápias desafiadas experimentalmente com inóculos vivos de *S. agalactiae* e *A. hydrophila*, incluindo o possível efeito sobre as respostas imunes humorais.

5. Referências bibliográficas

Abu-Elala N, Abdelsalam M, Marouf S, Setta, A (2015). Comparative analysis of virulence genes, antibiotic resistance and gyrB-based phylogeny of motile *Aeromonas* species isolates from Nile tilapia and domestic fowl. **Letters in applied microbiology**, v. 61, n. 5, p.429-436.

Admassie M. Current review on molecular and phenotypic mechanism of bacterial resistance to antibiotic (2018). **Sci J Clin Med**, v.7, n.13.

Anjur N, Sabran SF, Daud HM, Othman, NZ (2021). An update on the ornamental fish industry in Malaysia: *Aeromonas hydrophila*-associated disease and its treatment control. **Veterinary World**, v. 14, n.5, p. 1143.

Belo MAA, Souza DGF, Faria VP, Prado EJ, Moraes FR, Onaka EM (2013). Haematological response of curimbas *Prochilodus lineatus*, naturally infected with *Neoechinorhynchus curemai*. **Journal of Fish Biology** v.82, p.1403-1410, 2013.

Belo MAA, Moraes JRED, Soares VE, Martins ML, Brum CD, Moraes FRD (2012). Vitamin C and endogenous cortisol in foreign-body inflammatory response in pacus. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 47, n.7, p. 1015-1021.

Bonev BB, Brown NM (2019). *Bacterial resistance to antibiotics: from molecules to man*. **John Wiley & Sons**.

BRASIL, ASSOCIAÇÃO CULTURAL E EDUCACIONAL (2014). 1º brazilian fishery and aquaculture Yearbook. **Ministério da Pesca e Aquicultura**. 1ed, p. 136. Acesso em: 22 de maio. 2022.

Collignon P, Courvalin P, Aidara-kane A (2008). Clinical importance of antimicrobial drugs in human health. **Guide to antimicrobial use in animals**, p. 44-58.

Crepaldi DV, Teixeira EA, Faria PMC, Ribeiro LP, Melo DC, Carvalho D, Saturnino HM (2006). Sistemas de produção na piscicultura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 30, n. 3/4, p. 86-99.

Chideroli RT, Amoroso N, Mainardi RM, Suphoronski SA, de Padua SB, Alfieri AF, ... Pereira UP (2017). Emergence of a new multidrug-resistant and highly virulent serotype of *Streptococcus agalactiae* in fish farms from Brazil. **Aquaculture**, v. 479, p. 45-51.

Chu C, Huang PY, Chen HM, Wang YH, Tsai IA, Lu CC, Chen CC (2016). Genetic and pathogenic difference between *Streptococcus agalactiae* serotype Ia fish and human isolates. **BMC microbiology**, v. 16, n. 1, p. 1-9.

Daood N (2012). Isolation and antibiotic susceptibility of *Aeromonas* spp. from freshwater fish farm and farmed carp (Dam of 16 Tishreen, Lattakia). **Damascus Univ J Basic Sci**, v. 28, p. 27-39.

De Simeis D, Serra S (2021). Actinomycetes: A never-ending source of bioactive compounds—An overview on antibiotics production. **Antibiotics**, v.10, n.5, p.483.

Eto SF, Fernandes DC, Moraes ACD, Alecrim JVDC, Souza PGD, Carvalho FCAD, ... Pizauro JM (2020). Meningitis caused by *Streptococcus agalactiae* in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*): infection and inflammatory response. **Animals**, v. 10, n. 11, p. 2166

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). O Estado Mundial da Pesca e Aquicultura 2022 (SOFIA).
<https://www.fao.org/3/cc0461en/online/sofia/2022/world-fisheries-aquaculture.html>.
 Acesso em: 25 de maio. 2022.

FDA – Food and Drug Administration. **Animal and Veterinary: Approved Drugs**.
<http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/DevelopmentApprovalProcess/Aquaculture/ucm132954.htm>. Acesso em: 25 de maio. 2022.

Fernandes DC, Eto SF, Funniceilli MI, Fernandes CC, Charlie-Silva I, Belo MA, Pizauro JM (2019). Immunoglobulin Y in the diagnosis of *Aeromonas hydrophila* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v.500, p. 576-585.

Fortunato MHT, Melo CLD, Mendes HF (2020). Piscicultura brasileira e a influência da ordem odonata, uma revisão. **Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR (Online)**, e2310-e2310.

Jian Z, Zeng L, Xu T, Sun S, Yan S, Yang L, Dou T (2021). Antibiotic resistance genes in bacteria: Occurrence, spread, and control. **Journal of Basic Microbiology**, v. 61, n.12, p. 1049-1070.

Jin L, Chen Y, Yang W, Qiao Z, Zhang X (2020). Complete genome sequence of fish-pathogenic *Aeromonas hydrophila* HX-3 and a comparative analysis: insights into virulence factors and quorum sensing. **Scientific reports**, v.10, n.1, p. 1-15.

Kagan F, Grostic MF (1972). Mass spectra of lincomycin, lincomycin analogs and degradation products. **Organic Mass Spectrometry**, v.6, n.11, p.1217-1223.

Kemper N (2008). Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. **Ecological indicators**, v. 8, n.1, p. 1-13.

Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ (2010). How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. **Nature Reviews Microbiology**, v.8, n.6, p. 423-435.

Lee JH, Seo JS, Kim GW, Kwon MG, Kim DH, Park CI, Park J (2022). Effect of lincomycin, an injectable lincosamide antibiotic, against streptococcosis in cultured olive flounder *Paralichthys olivaceus* and its pharmacokinetic-pharmacodynamic profile. **Aquaculture**, 548, 737667.

Lulijwa, R, Rupia EJ, Alfaro, AC (2020). Antibiotic use in aquaculture, policies and regulation, health and environmental risks: a review of the top 15 major producers. **Reviews in Aquaculture**, v.12, n.2, p. 640-663.

MARTENINGHE A et al. Patogenicidade da infecção por *Aeromonas hydrophila* em alevinos de jundiás (*Rhamdia quelen*). **Anais do congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, Gramado, p.108, 2008.

Maulu S, Hasimuna OJ, Mphande J, Munang'andu HM (2021). Prevention and control of streptococcosis in *Tilapia* culture: A systematic review. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 33, n.3, p.162-177.

Mian GF, Godoy DT, Leal CAG, Yuhara TY, Costa GM, Figueiredo HCP (2009). Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia. **Veterinary microbiology**, v. 136, n. 1-2, p. 180-183

MOHR KI (2016). History of antibiotics research. **How to Overcome the Antibiotic Crisis**, p. 237-272.

Musa N, Wei LS, Musa N, Hamdan RH, Leong LK, Wee W, ... Abdullah SZ (2009). Streptococcosis in red hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*) commercial farms in Malaysia. **Aquaculture Research**, v. 40, n. 5, p. 630-632.

Naylor RL, Hardy RW, Buschmann AH, Bush SR, Cao L, Klinger DH, Troell MA (2021). 20-year retrospective review of global aquaculture. **Nature**, v. 591, n.7851, p.551-563.

OIE – World Organization for Animal Health. Lista de agentes antimicrobianos importantes para la medicina veterinária (junio de 2021). <https://www.oie.int/app/uploads/2021/06/e-oie-lista-antimicrobianos-junio2021.pdf>. Acesso em: 06 Abril. 2022.

Oliveira MA, Silva-Filho AS, Andrade SP, De Oliveira WCM, De Castro WJR, Ferraz APF, De Araújo FE (2022). Gestão do Agronegócio Pesqueiro: Importância do setor para o Brasil. **Research, Society and Development**, 11(7), e39511729974-e39511729974.

Papich MG, RIVIERE JE (2001). Chloramphenicol and derivatives, macrolides, lincosamides, and miscellaneous antimicrobials. **Veterinary pharmacology and therapeutics**, 10, 903-952.

Parker JL, Shaw JG (2011) *Aeromonas* spp. clinical microbiology and disease. **Journal of Infection**, v. 62, n.2, p.109-118.

PEIXE BR (Associação Brasileira da Piscicultura). Anuario PeixeBR da piscicultura 2022. <https://www.peixebr.com.br/Anuario2022/.pdf>. Acesso em: 3 de jun. 2022.

Phuoc NN, Linh NTH, Crestani C, Zadoks RN (2021). Effect of strain and enviromental conditions on the virulence of *Streptococcus agalactiae* (Group B *Streptococcus*; GBS) in red tilapia (*Oreochromis* sp.). **Aquaculture**, v. 534, p. 736256.

Pyörälä S, Baptiste KE, Catry B, Van duijkeren E, Greko C, Moreno MA, Törneke, K (2014). Macrolides and lincosamides in cattle and pigs: use and development of antimicrobial resistance. **The Veterinary Journal**, v. 200, n.2, p. 230-239.

Radomska-Leśniewska DM, Skopińska-Różewska E, Malejczyk J (2011). Experimental immunology The effect of clindamycin and lincomycin on angiogenic activity of human blood mononuclear cells. **Central European Journal of Immunology**, v. 35, n.4.

Reque VR, de Moraes JRE, de Andrade Belo MA, de Moraes FR (2010). Inflammation induced by inactivated *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia fed diets supplemented with *Saccharomyces cerevisiae*. **Aquaculture** 300(1-4), 37–42.

Revina O, Avsejenko J, Cirule D, Valdovska A (2017). Antimicrobial resistance of *Aeromonas* spp. isolated from the sea trout (*Salmo trutta* L.) in Latvia. **Res. Rural Dev**, 1, 271-275.

Rizzo A, Pantaleo M, Mutinati M, Trisolini C, Minoia G, Spedicato M, Sciorsci RL (2009). Effects of antibiotics on biochemical parameters, leukocytes and reactive oxygen species (ROS) in bitches after ovariectomy. **Immunopharmacology and immunotoxicology**, v.31, n.4, p. 682-687.

Sachico N, Miura NN, Adachi Y, Ohno N (2007). Lincomycin protects mice from septic shock in β -glucan-indomethacin model. **Biol Pharm Bull**: 2312-2316.:978-984.

Salvador R, Muller EE, Freitas JCD, Leonhardt JH, Pretto-Giordano LG, Dias JA (2005). 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. **Ciência Rural**, 35, 1374-1378.

Schar D, Klein EY, Laxminarayan R, Gilbert M, Van Boeckel TP (2020). Global trends in antimicrobial use in aquaculture. **Scientific reports**, v.10, n. 1, p.1-9.

SEBRAE (Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas). Aquicultura no Brasil, 2015. [http://www.sebrae.com.br/REVISÃO\(tilapicultura\).pdf](http://www.sebrae.com.br/REVISÃO(tilapicultura).pdf). Acesso em: 22 de maio. 2022.

Spížek J, Řezanka T (2017). Lincosamides: Chemical structure, biosynthesis, mechanism of action, resistance, and applications. **Biochemical pharmacology**, v. 133, p. 20-28.

Stratev D, Odeyemi O (2017). A. An overview of motile *Aeromonas septicaemia* management. **Aquaculture international**, v. 25, n.3, p. 1095-1105.

Tenson T, Lovmar M, Ehrenberg M (2003). The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome. **Journal of molecular biology**, v.330, n.5, p. 1005-1014.

Yousefian M, Amiri MS (2009). A review of the use of prebiotic in aquaculture for fish and shrimp. **African Journal of Biotechnology**. v. 8, n. 25, p. 7313-7318, 2009.

Zrnčić S (2020). Correct diagnostics: prerequisite for prudent and responsible antimicrobial administration. **Asian Fisheries Science**, v.33, n.S1, p.27-32.

CAPÍTULO 2 - Segurança clínica do tratamento com lincomicina, administrada via oral em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

RESUMO - A lincomicina é um antimicrobiano de amplo espectro atuando contra bactérias gram-positivas, amplamente utilizada na medicina veterinária. Em peixes existem apenas dados limitados *in-vitro*, necessitando assim, de delineamento de protocolos terapêuticos eficazes para seu uso em organismos aquáticos. Desse modo, objetivou-se avaliar a segurança clínica do tratamento com lincomicina, administrada por via oral em tilápias, por meio da avaliação hematológica, bioquímica e índice somático hepático, renal e esplênico. Foram utilizadas 136 tilápias ($\pm 100\text{g}$), distribuídas aleatoriamente em 17 tanques (100L de água, $n=8$) para constituir as repetições dos diferentes tratamentos: T0 (grupo controle, não tratado com lincomicina); T1, T2, T3 (tratados com 10, 20 e 40mg/kg^{-1} de p.v. de lincomicina, respectivamente) e T4 padrão fisiológico (valores de referência). Oito animais foram amostrados por tratamento em 4 períodos: 2, 4 e 8 dias pós-tratamento (DPT) com lincomicina, e um grupo que foi tratado por 8 dias com o fármaco e após isso tratado apenas com ração comercial até o 12º dia (período de recuperação). Tilápias tratadas com lincomicina não tiveram diferença na avaliação hematológica e leucocitária, no índice somático hepático, renal e esplênico, entretanto, apresentaram um aumento transitório nos valores de ALT, AST, colesterol, triglicérides e creatinina, que retornaram aos níveis normais após o período de recuperação (12DPT). Ademais, foram observados um incremento nos níveis de proteína total, albumina e globulina nos animais tratados. Conclui-se que embora tenha ocorrido algumas alterações transitórias ao decorrer do experimento, a lincomicina apresenta boa margem de segurança clínica nas doses de 10, 20 e 40mg/Kg^{-1} p.v para tilápia do Nilo.

PALAVRAS-CHAVE: Antimicrobiano, Aquicultura, Ciclídeos, Inocuidade, Peixes Teleósteos

1. Introdução

O setor de pesca e aquicultura é cada vez mais reconhecido por sua essencial contribuição para a segurança alimentar e nutrição global no século XXI (FAO, 2022). A aquicultura brasileira tem crescido nos últimos anos e se posiciona cada vez mais como um importante setor do agronegócio (Oliveira et al., 2022). Porém, as práticas de manejo intensivo com elevado adensamento populacional e manipulação excessiva dos peixes resultam em estresse, responsável por perdas de desempenho, reprodutivas e na resistência aos patógenos (Belo et al., 2005; 2012). As infecções bacterianas são as causas mais significativas e uma das principais razões que contribuem para enormes perdas anuais, avaliadas em bilhões de dólares americanos na indústria de piscicultura. Particularmente, as bactérias oportunistas representam uma grave ameaça para a aquicultura (Farias et al., 2020).

De acordo com 86ª sessão geral da comissão internacional da OIE (Organização Mundial de Sanidade Animal) em 2018, foi atualizada a lista de antimicrobianos de importância na medicina veterinária, a lincomicina apresenta significativo potencial para uso em peixes, no entanto, necessita de delineamento de protocolos terapêuticos eficazes para seu uso em organismos aquáticos (OIE, 2021), associados aos critérios de segurança ecotoxicológica (Moraes et al., 2022) e clínica para a espécie alvo (Oliveira et al., 2022). Estudos de patologia clínica veterinária envolvendo análises bioquímicas séricas de função hepática e renal, bem como estudo hematológicos auxiliam no diagnóstico de condições mórbidas (Aracati et al., 2021b; Oliveira et al., 2021).

A lincomicina é um antibiótico lincosamida de amplo espectro que é especificamente ativo contra bactérias gram-positivas (Spížek e Řezanka, 2017). As lincosamidas inibem a síntese de proteínas bacterianas ligando-se à subunidade 50S do ribossomo, que se liga preferencialmente ao rRNA 23S da subunidade 50S (Pyörälä et al., 2014). O efeito bactericida ou bacteriostático depende da concentração do fármaco no local da infecção e da sensibilidade do organismo infectado (Khan et al., 2022). Porém, em peixes, apenas dados *in-vitro* limitados estão disponíveis (Revina et al., 2017) e em tilápia do Nilo pouco se sabe sobre a sua ação, necessitando assim de delineamento de protocolos terapêuticos eficazes

para seu uso em organismos aquáticos. Desse modo, o objetivo do estudo foi avaliar a segurança clínica da lincomicina, administrada por via oral em tilápias do Nilo (*Oreochromes niloticus*).

2. Material e Métodos

2.1. Peixes e Acondicionamento

Foram utilizadas 136 tilápias (*O. niloticus*), pesando $\pm 100\text{g}$, acondicionados em 17 tanques ($n=8$), com capacidade de 100 L de água cada, abastecidos com água corrente desprovida de cloro, proveniente de poço artesiano com vazão de 1 L/min. Após o transporte para os tanques, os peixes foram aclimatados durante 15 dias, tempo necessário para que a concentração plasmática de cortisol e a osmolaridade retornassem a níveis basais. Nos primeiros três dias de aclimação, foi adicionado NaCl na concentração de 6,0 g/L em cada tanque favorecendo o equilíbrio hidroeletrolítico dos peixes (Carneiro e Urbinati, 2001). A qualidade da água foi determinada duas vezes por dia (no momento de alimentação), temperatura e concentração de oxigênio dissolvido, medido pelo dispositivo YSI, modelo 55, e o pH e condutividade elétrica pelo dispositivo YSI, modelo 63. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Animais da UNESP/FCAV protocolo nº 5639/22.

2.2. Design Experimental

As tilápias foram distribuídas aleatoriamente em 17 tanques (100L de água, $n=8$) para constituir as repetições dos diferentes tratamentos: T0 (grupo controle, não tratado com lincomicina); T1, T2, T3 (tratados com 10, 20 e 40mg/kg^{-1} de p.v. de lincomicina, respectivamente) e T4 padrão fisiológico (valores de referência). As doses foram preconizadas de acordo com Lee et al. (2022), que estudou a lincomicina em *Paralichthys olivaceus* (peixe).

Para avaliar as possíveis alterações fisiológicas dos animais ocasionadas pela lincomicina, 8 animais de todos os grupos (T0, T1, T2, T3), exceto padrão fisiológico, foram tratados por 8 dias com lincomicina, após esse período, foi

administrado por mais 4 dias apenas ração comercial, sem adição de óleo vegetal e lincomicina, denominado período de recuperação, totalizando 12 dias de análise. Foram amostrados 8 animais por tratamento em 4 períodos: 2, 4 e 8 dias pós-tratamento (DPT) e após 12º dia (período de recuperação).

2.3. Padronização da Ração com Adição da Lincomicina

A ração comercial extrusada contendo 32% proteína bruta, 6% extrato etéreo, 5,5% fibra bruta e 12% matéria mineral (Nutripiscis - Empresa Presence) foi utilizada para compor as dietas experimentais das tilápias. A alimentação foi realizada duas vezes ao dia (9h e 17h), com administração de 2% da biomassa dos tanques. Para o preparo das dietas, diariamente a ração foi pesada proporcionalmente ao peso médio das tilápias de cada tanque. Em seguida, foi adicionado a lincomicina (Lincomicin 300: Labyes do Brasil Ltda nas doses de 10, 20 e 40 mg/kg⁻¹ p.v e homogeneizado em 2% de óleo vegetal, compondo as dietas de T1, T2 e T3 respectivamente. Para padronização das dietas e balanço nutricional, foi adicionado 2% de óleo vegetal à dieta do grupo controle (T0).

2.4. Anestesia dos Peixes

As tilápias foram anestesiadas por imersão em solução aquosa de benzocaína na proporção de 1:10.000 para coleta de sangue e 1:500 no momento da eutanásia. A benzocaína foi diluída em álcool 98° (0,1 g/mL), completando o volume para 1L (Wedemeyer, 1970). Inicialmente foi realizado pré-anestesia, em que o nível de água dos tanques foi baixado até um volume de 10L adicionando-se 0,1g de benzocaína já diluída em álcool 98°. Logo após, cada peixe foi transferido para um recipiente contendo 1L de água com 0,1g de benzocaína, ambos os procedimentos foram realizados em aeração para minimizar estresse ocasionado pela manipulação. Após paralização de movimentos do opérculo, o peixe foi retirado e realizado a coleta de sangue. Por fim, o animal foi transferido para outro recipiente contendo 0,5g de benzocaína diluída em 1L de água para eutanásia.

2.5. Análise hematológica

Oito peixes por tratamento (um tanque para cada tratamento), após serem anestesiados, foram coletados cerca dois mL de amostras de sangue pelo vaso caudal de cada animal aos 2, 4, 8 e 12 dias após tratamento (DPT), foram aliquotadas em dois conjuntos: uma seringa revestida de heparina (5000 UI) e outra sem heparina, para obtenção de plasma e soro, respectivamente. Durante a troca de seringas (com e sem heparina), não foi retirado a agulha do vaso, para que não tivesse perda de sangue. O hemograma foi realizado por hemocítômetro (câmara de Neubauer) e solução de Natt e Herrick (1952) na proporção 1:100 v:v). O hematócrito foi determinado pela técnica de centrifugação do microhematócrito. Já a hemoglobina circulante, utilizando-se reagente de Rabkin's para leitura em comprimento de onda de 540nm e os valores de volume corpuscular médio (VCM) foram obtidos pelo cálculo $VCM = (HT/HE) \cdot 100$ e concentração hemoglobina corpuscular média (CHCM) pelo cálculo $CHCM = (HG/HT) \cdot 100$. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em extensões sanguíneas com a contagem de 200 células, estabelecendo o percentual de cada tipo celular de interesse, após coloração prévia das extensões com May-Grünwald Giensa Wright (Farias et al., 2016).

2.6. Avaliação bioquímica sérica

Amostras de sangue de peixes sem anticoagulante foram centrifugadas a 10.000 rpm por 5 minutos a 4°C para obtenção de soro e determinação de proteína total, albumina, globulina (relação proteína total – albumina) fosfatase alcalina (FA), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), creatinina, triglicerídeos e colesterol, usando um analisador bioquímico semiautomático (Model LabQuest® - Bioplus Company) e a glicemia dos peixes foi determinada usando o aparelho Accu-Chek Performa.

2.7. Avaliação do Índice Somático Hepático, Renal e Esplênico

Após 2, 4, 8 e 12 dias de tratamento, as tilápias foram submetidas a eutanásia por imersão em solução aquosa de benzocaína (1:500) até o aprofundamento do plano anestésico e perda completa dos movimentos operculares. Em seguida, pesadas e dissecadas por um corte longitudinal ventral, do ânus ao opérculo; outro do ânus até a cabeça seguindo a linha lateral e um terceiro passando pela nadadeira peitoral. Esta dissecação permitiu ampla visão de todos os órgãos. Para avaliação morfométrica de acordo com Weibel et al. (1969), foram coletados fígado, rim caudal, rim cranial, e baço das tilápias, os quais foram pesados para expressar os índices somático hepático, renal e esplênico, calculado pelo formula: Índice somático = peso do órgão X 100/peso corporal.

2.8. Análises estatísticas

O desenho experimental para avaliação da segurança clínica foi inteiramente randomizado em esquema fatorial 4 x 4 (quatro tratamentos: 10, 20, 40 e controle X e quatro períodos de avaliação: 2, 4, 8 e 12 DPT). As análises de variância para comparar os diferentes grupos experimentais foram realizadas utilizando o procedimento GLM (General Linear Model) do programa SAS, versão 9.3 (Statistical Analysis Software, 2012). Diferenças significativas ($P < 0.05$) foram estimadas com base no teste de Tukey ao nível de confiança de 95%, de acordo com Snedecor e Cochran (1984).

3. Resultados

3.1. Análises Hematológicas

Tilápias tratadas com lincomicina não apresentaram nenhuma alteração significativa ($P > 0,05$) entre as diferentes concentrações administradas do fármaco, assim como, não apresentaram alteração ao longo do tempo quanto ao número de eritrócitos, concentração de hemoglobina, porcentagem de hematócrito bem como os cálculos de VCM, HCM e CHCM (Figura 1).

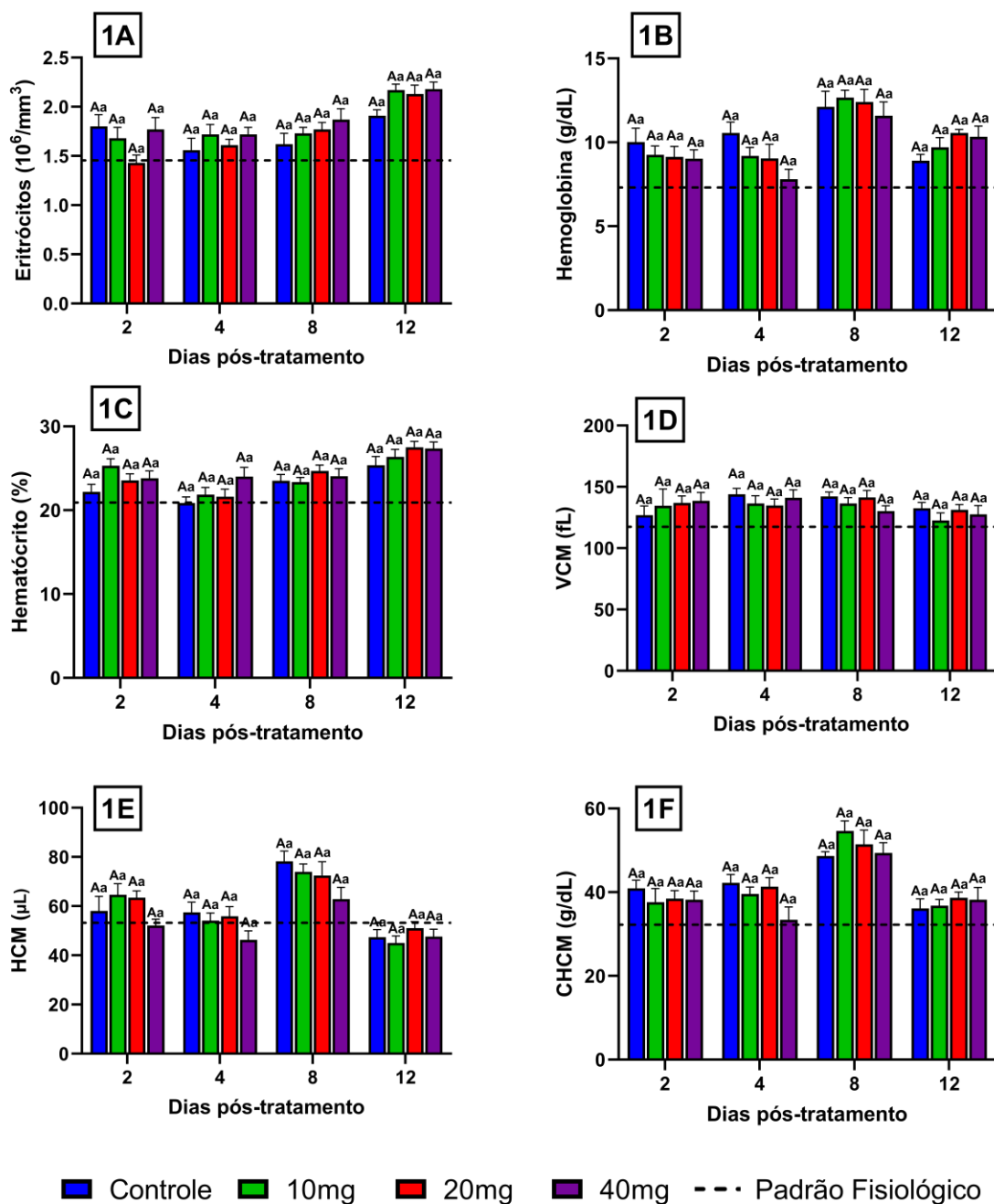


Figura 1. Valores médios ($\pm$ Erro padrão) observados na análise hematológica das tilápias tratadas com lincomicina. Médias ($n=8$) seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P<0.05$). A: Eritrócitos; B: Hemoglobina, C: Hematócrito; D: Volume Corpuscular Médio (VCM), E: Hemoglobina Corpuscular Média (HCM); F: Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM). Letras maiúsculas comparam os diferentes tratamentos dentro de cada dia experimental, letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento entre os diferentes dias experimentais

A avaliação do perfil leucocitário (Figura 2) demonstrou que tilápias tratadas com lincomicina não apresentaram nenhuma alteração significativa ($P > 0,05$) nos leucócitos totais, bem como na contagem diferencial de neutrófilos, monócitos, linfócitos e trombócitos.

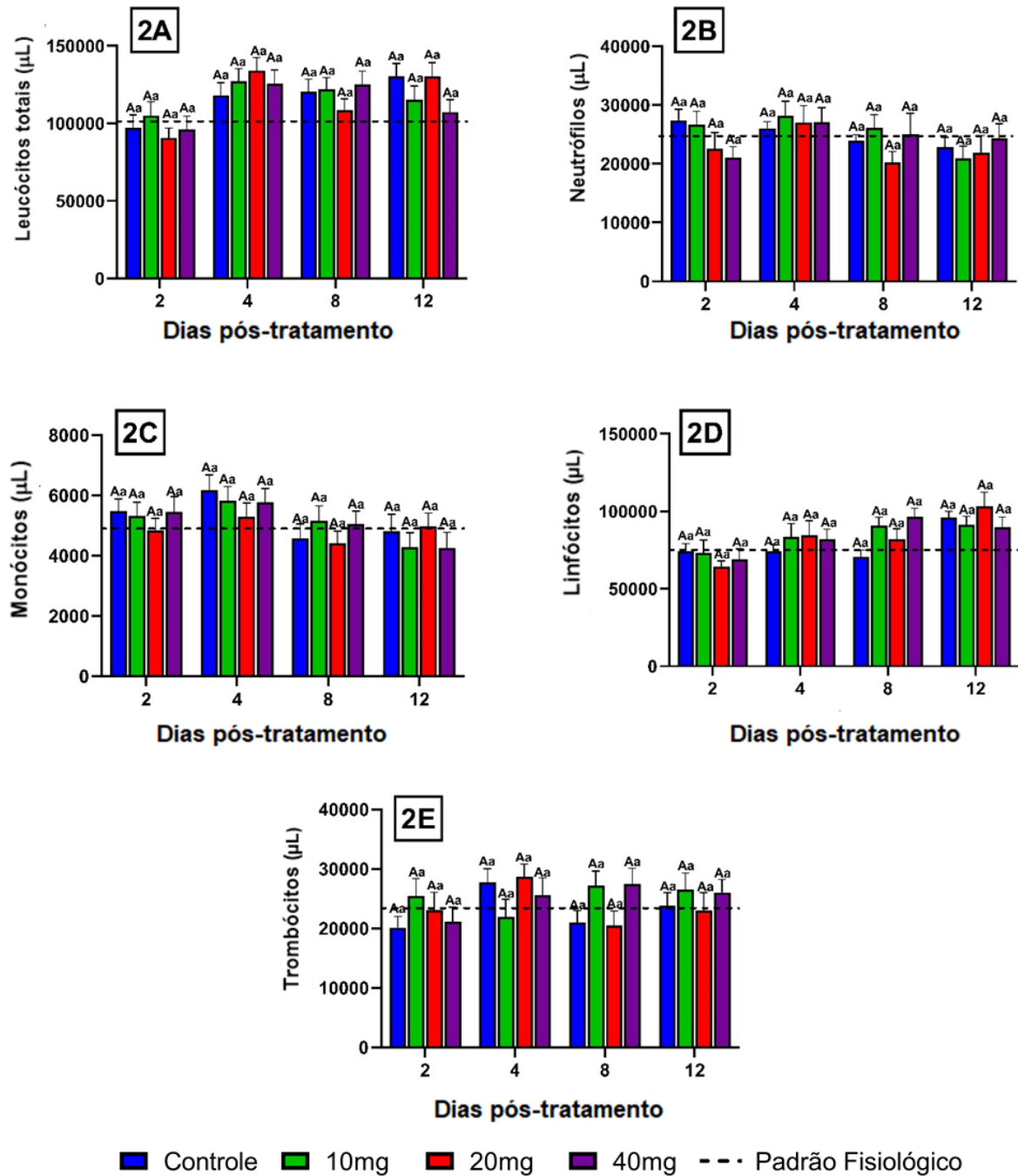


Figura 2. Valores médios ($\pm$ Erro padrão) observados na análise leucocitária das tilápias tratadas com lincomicina. Médias ($n=8$) seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P<0.05$). A: Leucócitos Totais; B: Neutrófilos; C: Monócitos; D: Linfócitos; E: Trombócitos. Letras maiúsculas comparam os diferentes tratamentos dentro de cada dia experimental, letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento entre os diferentes dias experimentais.

3.2. Análise bioquímica sérica

Na avaliação da citotoxicidade hepática, as tilápias tratadas com lincomicina não tiveram alterações significativas de fosfatase alcalina. No entanto, os níveis séricos de ALT e AST foram maiores nos animais tratados com 20 e 40 mg de lincomicina 2DPT, sendo intensificado 4DPT, em comparação aos animais tratados com 10mg e grupo controle (Figura 3). Embora, tenha-se observado que esses valores séricos de ALT e AST foram regredindo ao longo do tempo.

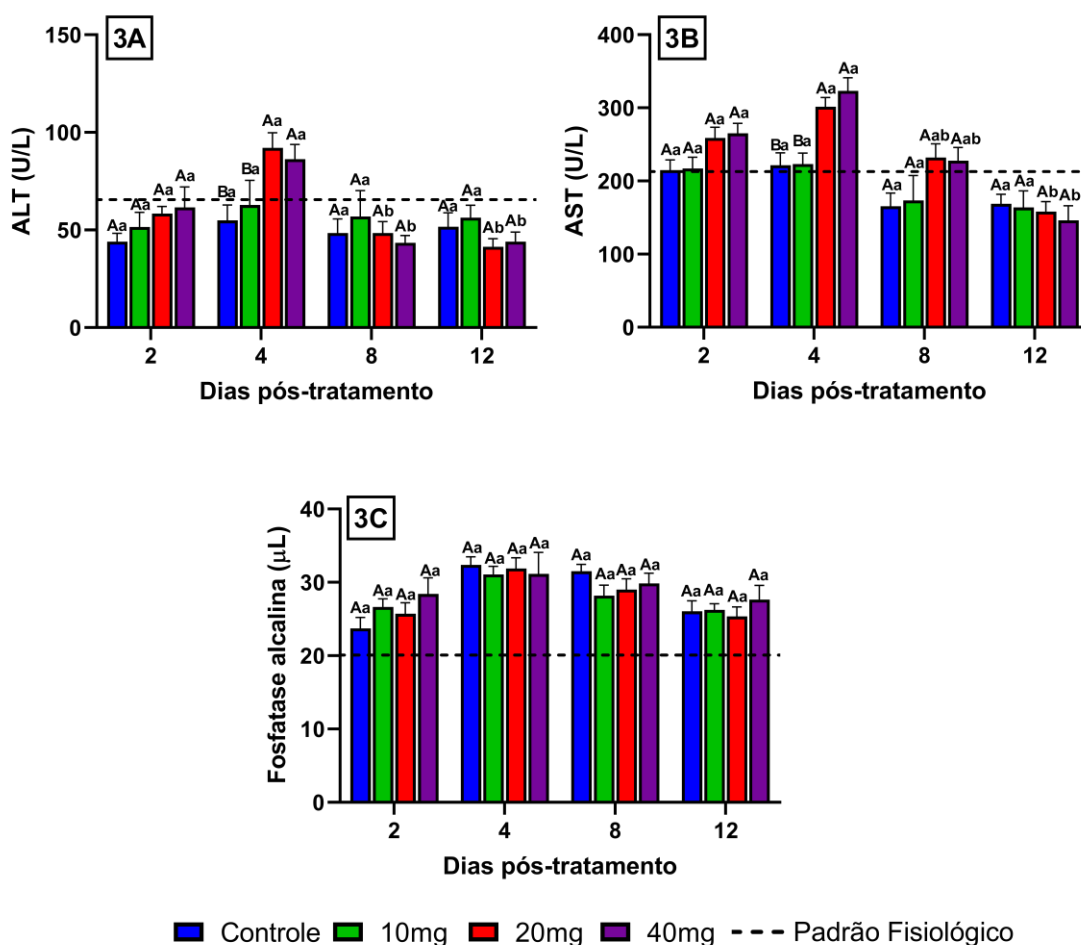


Figura 3. Valores médios ($\pm$ Erro padrão) observados na análise da atividade enzimática sérica de A: alanina aminotransferase (ALT); B: aspartato aminotransferase (AST); C:fosfatase alcalina (FA) de tilápias tratadas com lincomicina. Médias (n=5) seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P<0.05$). Letras maiúsculas comparam os diferentes tratamentos dentro de cada dia experimental, letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento entre os diferentes dias experimentais.

Na avaliação da funcionalidade hepática e renal, verificou-se aumento transitório nos valores séricos de triglicerídeos, colesterol e creatinina em tilápias tratadas com 40 mg de lincomicina 8DPT, porém, após o período de recuperação, os valores retornaram aos níveis normais (Figura 4). Os resultados revelaram que tilápias tratadas com lincomicina apresentaram aumento dos níveis séricos de proteína total, albumina e, conseqüentemente, de globulinas 4DPT, quando comparados ao grupo controle. Na avaliação da glicemia, não foi observado diferença significativa entre os peixes submetidos aos diferentes tratamentos.

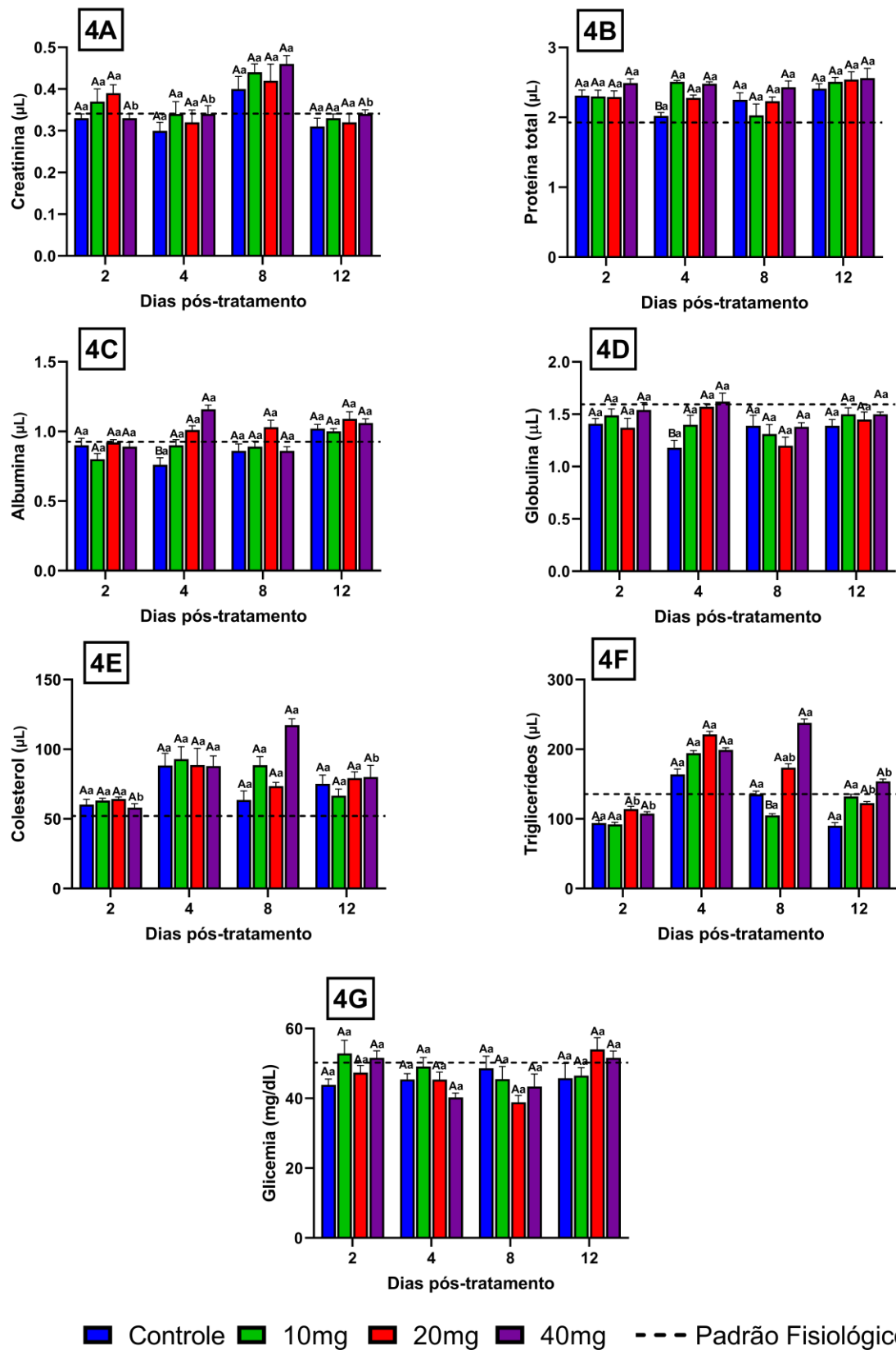


Figura 4. Valores médios ($\pm$ Erro padrão) observados na análise de A: creatinina; B: proteína total; C: albumina; D: globulina; E: colesterol; F: triglicérides; G:

glicemia de tilápias tratadas com lincomicina. Médias (n=8) seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P<0.05$). Letras maiúsculas comparam os diferentes tratamentos dentro de cada dia experimental, letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento entre os diferentes dias experimentais.

3.3. Análise do Índice Somático Hepático, Renal e Esplênico

Na avaliação do peso juntamente com a análise somática do baço, fígado e rim, não foram observadas alterações significativas nos animais dos diferentes tratamentos e no grupo controle (Figura 5).

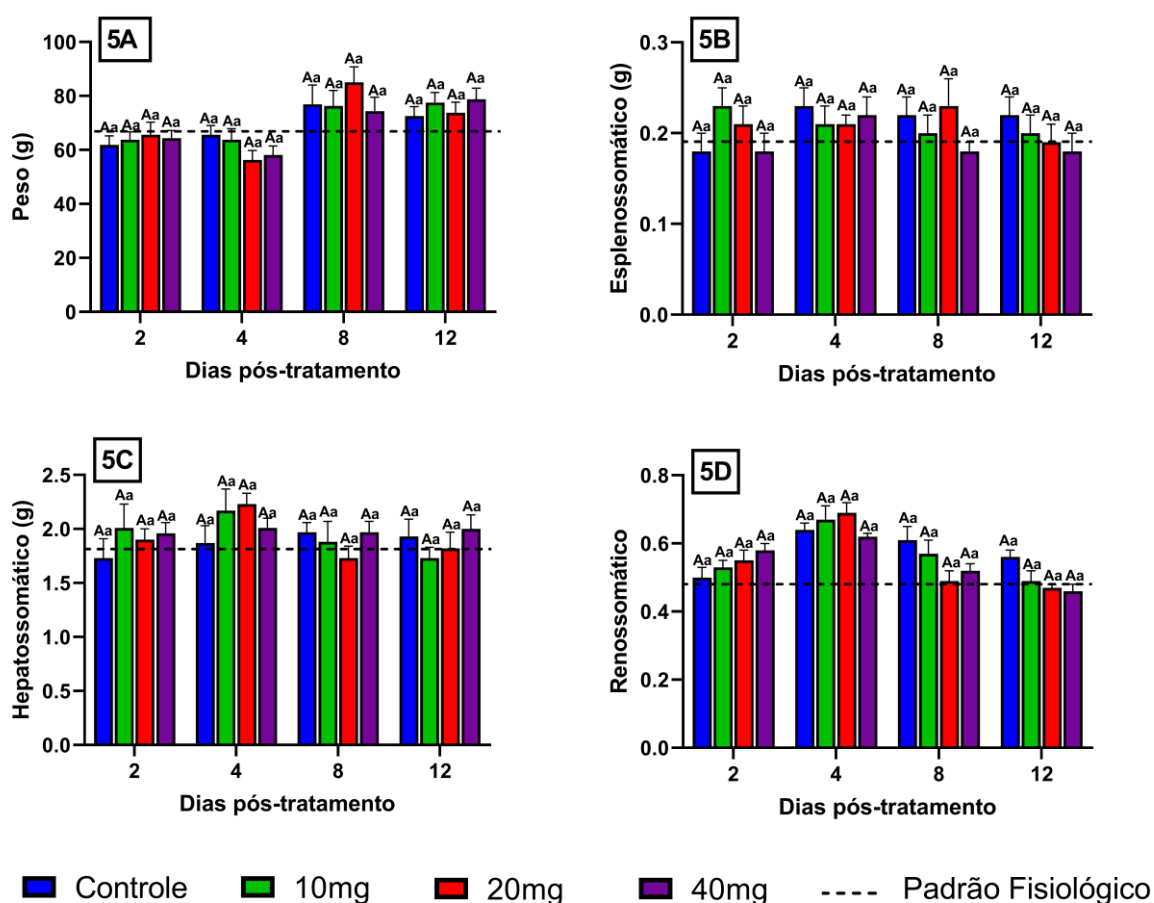


Figura 5. Valores médios ($\pm$ Erro padrão) observados na avaliação somática de baço, fígado e rim das tilápias tratadas com lincomicina. Médias (n=8) seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P<0.05$). Letras maiúsculas comparam os diferentes tratamentos dentro de cada dia experimental, letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento entre os diferentes dias experimentais

4. Discussão

Tilápias tratadas com lincomicina não apresentaram nenhuma alteração na avaliação hematológica e leucocitária, estes resultados estão de acordo com os encontrados no tratamento de suínos em crescimento por Harvey et al., (1995), onde a administração da lincomicina não resultou em alteração significativa nestes parâmetros. Costa et al. (2022) e Oliveira et al. (2022) não observaram diferença entre os parâmetros hematológicos em estudo da segurança clínica com zileuton e doxiciclina, respectivamente, em tilápias do Nilo. Em contrapartida, Amer (2017) em estudos avaliando administração oral de lincomicina em ratos, constatou diminuição significativa no número de eritrócitos, concentração de hemoglobina e porcentual de hematócrito, porém, foi administrado diariamente por 21 dias uma dose de 500 mg/kg. Possivelmente essa diferença observada entre os resultados, ocorre pela diferença de concentração do fármaco e dias de tratamento, onde no presente estudo, a maior dose administrada foi de 40mg/kg⁻¹ e por no máximo 8 dias.

Estudos avaliando administração oral de Lincomicina em ratos (Amer, 2017) e em beagles (Gray et al., 1964), também observaram incremento transitório de ALT e AST, tendo seus valores retornado aos níveis basais. Essa elevação pode ser atribuída ao aumento da degradação metabólica do fármaco nos hepatócitos, tendo à liberação dessas enzimas do citoplasma para a circulação sanguínea após ruptura da membrana plasmática ou dano celular (Oyeniran et al., 2021).

Existem poucos dados sobre a influência dos antimicrobianos nos índices bioquímicos do soro de peixes e os que foram publicados até o momento estão focados principalmente nos efeitos da oxitetraciclina, amoxicilina e doxiciclina (Bojarski et al., 2020; Moraes, 2018; Oliveira et al., 2022) com poucas informações sobre o uso da lincomicina em tilápias.

De acordo com Jwad et al. (2015), a lincomicina pode apresentar efeitos nocivos na hematologia e nas características bioquímicas do sangue, podendo interferir nas funções hepáticas e renais. No estudo houve aumento transitório de triglicérides e colesterol na dose de 40mg, possivelmente devido a função hepática estar prejudicada, afetando temporariamente o metabolismo dessas enzimas, de modo que seus valores retornaram aos níveis normais, estando dentro dos intervalos de referência previamente registrados para tilápias em condições normais

de saúde (Mauel et al., 2007; Hrubec et al., 2000). Estudo avaliando a administração oral de lincomicina em ratos (Amer, 2017) também observou esse aumento.

O nível de creatinina é um indicador da função renal, portanto, o aumento significativo do seu teor no soro após a administração de lincomicina observada no estudo, pode ser atribuída ao comprometimento temporário da capacidade funcional renal, que podem causar danos oxidativos nos túbulos renais, ou provavelmente devido ao efeito deste antibiótico químico na taxa de produção de creatinina, o que leva a aumentar sua biossíntese (Jwad et al., 2015),

Além disso, o tratamento com lincomicina resultou em aumento de proteína total, albumina e de globulinas. Fortuoso et al. (2019) observou variação semelhante, quando avaliou monolaurato de glicerol na dieta de frangos de corte, podendo sugerir que a lincomicina possa ter auxiliado nos mecanismos de defesa das tilápias, podendo ser observado melhora na resposta imune desta espécie avaliada. De acordo com Zhang et al. (2019) proteínas séricas, albumina e globulina desempenham papéis importantes nas respostas imunes. Acredita-se que os aumentos nos níveis séricos de proteína, albumina e globulina estejam associados a uma resposta imune inata mais forte em peixes.

Os índices de órgãos são parâmetros relevantes na análise de avaliação de segurança porque representam o estado de desenvolvimento do órgão em animais (Klan et al., 2022). Tilápias tratadas com lincomicina não apresentaram alterações nos índices somáticos dos órgãos hepático, renal e esplênico, semelhantes aos resultados observados por Oliveira et al. (2022) em que tilápias tratadas não tiveram diferença em relação ao peso do órgão peso do animal em estudo da segurança clínica da doxiciclina. Resultado similar também foi observado por Dobšíková et al. (2013) que avaliou a oxitetraciclina nos índices biométricos em carpa comum (*Cyprinus carpio* L.).

Embora tenham sido observadas alterações transitórias nas enzimas hepática e renais nas doses mais elevadas de lincomicina, tilápias tratadas não apresentaram alterações nos parâmetros hematológico, juntamente, com a não observância de alterações comportamentais e de sinais clínicos, permitindo assim inferir que a lincomicina administrada por via oral em tilápias, nas doses de 10, 20 e 40mg/Kg⁻¹ p.v. demonstrou boa margem de segurança clínica.

5. Referências

Amer SA (2017). ADVERSE EFFECTS OF LINCOMYCIN AND SPECTINOMYCIN IN RATS. **Mansoura Veterinary Medical Journal**, v. 18, n. 1, p. 503-519.

Aracati MF, Rodrigues LF, Oliveira SL, Moraes AC, Prado EJR, Fernandes DC, ETO SF, Silva IC, Belo MAA (2021a). Clinical safety of zafirlukast treatment during acute inflammatory reaction in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Ars Veterinária**, v. 37, p. 67-73.

Aracati MF, Oliveira SL, Rodrigues LF, Costa CC, Conde G, Cavalli BJ, Silva HCP, Ibelli BCC, Scarabel VL, Silva IC, Belo MAA (2021b). Effect of dietary supplementation with astaxanthin on the hematological and biochemical response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Ars Veterinária**, v. 37, p. 285.

Belo MAA, Moraes JRE, Soares VE, Martins ML, Brum CD, Moraes FR (2012). Vitamin C and endogenous cortisol in foreign-body inflammatory response in pacus. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, p. 1015-1021.

Belo MAA, Schalch SHC, Moraes FR, Soares VE, Otoboni AM, Moraes JER (2005). Effect of dietary supplementation with vitamin E and stocking density on macrophage recruitment and giant cell formation in the teleost fish, *Piaractus mesopotamicus*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 133, p. 146-154.

Bojarski B, Kot B, Witeska M (2020). Antibacterials in aquatic environment and their toxicity to fish. **Pharmaceuticals**. v.13, n. 8, p. 189.

Carneiro PCF, Urbinati, EC (2001). Salt as a stress response mitigator of matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther), during transport. **Aquaculture Research**, v. 32, n. 4, p. 297-304.

Costa C, Oliveira S, Aracati M, Rodrigues L, Colturato L, Montassier H, Belo M (2022). Clinical safety of treatment with zileuton, 5-lox inhibitor, during acute inflammatory reaction in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Ars Veterinaria**, v. 38, n.1, p. 23-30.

Dobšíková R, Blahová J, Mikulíková I, Modrá H, Prášková E, Svobodová Z, Siwicki, AK (2003). The effect of oyster mushroom β -1.3/1.6-D-glucan and oxytetracycline antibiotic on biometrical, haematological, biochemical, and immunological indices, and histopathological changes in common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Fish & shellfish immunology**. v. 35, n. 6, p. 1813-1823.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). O Estado Mundial da Pesca e Aquicultura 2022 (SOFIA). <https://www.fao.org/3/cc0461en/online/sofia/2022/world-fisheries-aquaculture.html>. Acesso em: 25 de maio. 2022.

Farias THV, Arijó S, Medina A, Pala G, Prado EJR, Montassier HJ, Pilarski F, Belo MAA (2020). Immune responses induced by inactivated vaccine against *Aeromonas hydrophila* in pacu, *Piaractus mesopotamicus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 101, p. 186-191.

Farias THV, Levy-Pereira N, Padua SB, Alves LO, Sakabe R, Belo MAA, Pilarski F (2016). Na₂EDTA anticoagulant impaired blood samples from the teleost *Piaractus mesopotamicus*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, p. 431-435.

Fortuoso BF, Dos Reis JH, Gebert RR, Barreta M, Griss LG, Casagrande RA, Da Silva AS (2019). Glycerol monolaurate in the diet of broiler chickens replacing conventional antimicrobials: Impact on health, performance and meat quality. **Microbial pathogenesis**. v. 129, p. 161-167.

Gray JE, Purmalis A, Feenstra ES (1964). Animal toxicity studies of a new antibiotic, lincomycin. *Toxicology and Applied Pharmacology*. v. 6, n. 4, p. 476-496.

Harvey RB, Edrington TS, Kubena LF, Corrier DE, Elissalde MH (1995). Influence of the antibiotics lincomycin and tylosin on aflatoxicosis when added to aflatoxin-contaminated diets of growing swine. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, v.7, n.3, p. 374-379.

Hrubec TC, Cardinale JL, Smith SA (2000). Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured tilapia (*Oreochromis hybrid*). **Veterinary clinical pathology**, v. 29, n. 1, p. 7-12.

Jwad SM, Abbas B, Jaffat HS (2015). Study of the protective effect of vitamin C plus E on lincomycin-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, v. 8, n.2, p. 177.

Khan EA, Ma J, Xiaobin M, Jie Y, Mengyue L, Hong L, Liu A (2022). Safety evaluation study of lincomycin and spectinomycin hydrochloride intramuscular injection in chickens. **Toxicology Reports**, v.9, p. 204-209

Lee JH, Seo JS, Kim GW, Kwon MG, Kim DH, Park CI, Park J (2022). Effect of lincomycin, an injectable lincosamide antibiotic, against streptococcosis in cultured olive flounder *Paralichthys olivaceus* and its pharmacokinetic-pharmacodynamic profile. **Aquaculture**, 548, 737667, 2022.

Mauel MJ, Miller DL, Merrill AL (2007). Hematologic and plasma biochemical values of healthy hybrid tilapia (*Oreochromis aureus* × *Oreochromis nilotica*) maintained in a recirculating system. **Journal of zoo and wildlife medicine**, v. 38, n. 3, p. 420-424.

Moraes, AC. Eficácia terapêutica, segurança clínica e ecotoxicológica da amoxicilina por via intramuscular para o tratamento de estreptococose em tilápias do Nilo. 2017. 87f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista - FCAV, Jaboticabal, 2017.

Moraes AC, Orlando EA, Prado EJR, Carvalho ACC, Machado-Neto JG, Simionato, AVC, Eberlin MN, Belo MAA (2022). Ecotoxicological assessment of amoxicillin trihydrate: stability, solubility, and acute toxicity for *Oreochromis niloticus*, *Lemna minor*, and *Daphnia magna*. **Cleaner Chemical Engineering**, v. 01, p. 100005.

Natt MP, Herrick, CA (1952). A new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. **Poultry Science**, v. 31, n. 4, p. 735-738.

Oliveira MA, Silva Filho AS, Andrade SP, De Oliveira WCM, De Castro WJR, Ferraz, APF, De Araújo FE (2022). Gestão do Agronegócio Pesqueiro: Importância do setor para o Brasil. **Research, Society and Development**, 11(7), e39511729974-e39511729974.

Oliveira S, Costa C, Conde G, Aracati M, Rodrigues L, Silva I, Belo M (2022). Safety of oral doxycycline treatment in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Ars Veterinaria**, v.38, n.3, p. 127-138.

Oliveira SL, Aracati MF, Rodrigues LF, Costa CC, Conde G, Moraes AC, Manrique WG, Charlie-Silva I, Belo MAA (2021). Clinical safety of zafirlukast treatment during a foreign body inflammatory reaction in Nile tilapias, *Oreochromis niloticus*. **International Journal of Development Research**, p. 47914-47919.

Oyeniran DO, Sogbanmu TO, Adesalu TA (2021). Antibiotics, algal evaluations and subacute effects of abattoir wastewater on liver function enzymes, genetic and

haematologic biomarkers in the freshwater fish, *Clarias gariepinus*. **Ecotoxicology and environmental safety**. v. 212, p. 111982.

Pyörälä S, Baptiste KE, Catry B, Van Duijkeren E, Greko C, Moreno MA, Törneke K (2014). Macrolides and lincosamides in cattle and pigs: use and development of antimicrobial resistance. **The Veterinary Journal**, v.200, n. 2, p. 230-239.

Revina O, Avsejenko J, Cirule D, Valdovska A (2017). Antimicrobial resistance of *Aeromonas* spp. isolated from the sea trout (*Salmo trutta* L.) in Latvia. Res. **Rural Dev**, 1, 271-275.

SAS- Statistical Analysis Software - SAS. System for Microsoft Windows: release 9.3. Cary: 2012.

Snedecor, GW, Cochran WG (1984). **Statistical Methods**. Iowa State University Press. Ames.

Spížek J, Řezanka T (2017). Lincosamides: Chemical structure, biosynthesis, mechanism of action, resistance, and applications. **Biochemical pharmacology**, v. 133, p. 20-28.

Wedemeyer, G (1970). Stress of anesthesia with MS 222 and benzocaine in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Journal of the Fisheries Board of Canada**, v. 27, n. 5, p. 909-914.

Weibel ER, Staubli W, Gnagi HR, Hess FA (1969). Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. **Journal of Cell Biology**, p.68-91.

Zhang D, Gao Y, Ke X, Yi M, Liu Z, Han X, Lu M (2019). *Bacillus velezensis* LF01: in vitro antimicrobial activity against fish pathogens, growth performance enhancement, and disease resistance against streptococcosis in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 103, n. 21. P. 9023-9035.

CAPÍTULO 3 - Avaliação da eficácia terapêutica da Lincomicina em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) tratadas via oral

Resumo - Objetivou-se avaliar a eficácia terapêutica da lincomicina, administrada via oral misturada à ração, para o tratamento de tilápias do Nilo (*O. niloticus*) infectadas experimentalmente com *S. agalactiae* e *A. hydrophila* e também os efeitos desse tratamento sobre parâmetros hematológicos e de respostas imunes desses animais contra essas bactérias. Para tal, foram delineados dois ensaios experimentais e dois testes para estabelecimento da DL₅₀ (*S. agalactiae* e *A. hydrophila*). Ao todo foram utilizadas 360 tilápias, $\pm 100\text{g}$ cada, acondicionadas em 36 tanques de 100L (n=10), sendo realizado a seguinte distribuição: 100 tilápias foram submetidas a testes para estabelecimento da DL₅₀, em que 50 tilápias (5 tanques, n=10) foram infectadas com diferentes concentrações de *S. agalactiae* e 50 tilápias para *A. hydrophila*. Para os ensaios experimentais foi realizado a seguinte distribuição: 130 tilápias para cada desafio experimental, sendo constituídos os seguintes tratamentos: *S. agalactiae*; S0 (controle, infecção e não tratado com lincomicina); S1, S2 e S3 (infecção e tratados com 40, 20 e 10mg/kg⁻¹ de p.v. de lincomicina, respectivamente) e PF (padrão fisiológico, valores de referências, sem tratamento e sem infecção, n=10). O mesmo delineamento experimental foi realizado para o desafio com *A. hydrophila*, entretanto, usando a nomenclatura A0, A1, A2 e A3. Animais que sobreviveram ao estímulo infeccioso foram amostrados no 8º dia pós-infecção (dpi) e 4 dias após o término do tratamento (12º dpi) para avaliação da recuperação clínica. Foram coletadas amostras de sangue para hemograma, leucograma, *burst* oxidativo e mensuração de anticorpos anti-*S. agalactiae* e anti-*A. hydrophila*. Tilápias tratadas com lincomicina e desafiadas com *S. agalactiae* apresentaram diminuição de leucócitos totais, associada a diminuição do *burst* oxidativo e aumento dos anticorpos anti-*S. agalactiae*, além de não revelarem sinais clínicos característicos de estreptococose. Tilápias desafiadas com *A. hydrophila* tratadas com lincomicina apresentaram diminuição do *burst* oxidativo, entretanto, animais do grupo controle apresentaram alta taxa de mortalidade associadas aos sinais característicos de aeromonose e os poucos animais sobreviventes apresentaram aumento de anticorpos Anti-*A. hydrophila*. Os estudos da eficácia terapêutica da lincomicina, revelaram o potencial deste antibacteriano frente *S. agalactiae*, revelando efeito dose-resposta para o controle desta infecção experimental, mas os achados para *A. hydrophila*, sugerem que a lincomicina não seja um antibacteriano de predileção para o controle desta infecção em tilápias.

Palavras-chave: aeromonose, antimicrobiano, Elisa indireto, estreptococose, lincosaminas

1. Introdução

A aquicultura é considerada um setor essencial que contribui para a segurança alimentar e nutrição global, tendo perspectiva de expansão em resposta à crescente necessidade da população por alimentos (FAO, 2022). A Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é a espécie de peixe mais importante criada no Brasil, representando 8,57% da produção mundial e posicionando o país como o quarto maior produtor desta espécie, atrás da China, Indonésia e Egito (Peixe BR, 2022).

Estudos mostram que as doenças bacterianas continuam sendo um grande problema nos sistemas intensivos de criação de peixes em todo o mundo e que abordagens de manejo apropriadas precisam ser aplicadas para reduzir o impacto desses patógenos nas pisciculturas (Manage, 2018). A tilápia é considerada um peixe relativamente resistente, no entanto, várias doenças parasitárias, fúngicas, bacterianas e virais foram relatadas nesta espécie (Syed et., 2022). Em geral, dois patógenos bacterianos se destacam na produção de tilápias, *Streptococcus agalactiae* e *Aeromonas hydrophila*, tendo um impacto econômico negativo anual estimado em um bilhão de dólares na economia global (de Oliveira et al., 2018). Ambos são bactérias patogênicas oportunistas, amplamente distribuídas no ambiente aquático, estando associadas à má qualidade da água, manejo inadequado e condições de criação intensiva, resultando na ocorrência do estresse, condição fisiológica esta responsável por imunossuprimir os sistemas de defesa dos peixes, predispondo-os as mais diversas enfermidades (Belo et al., 2012).

Streptococcus agalactiae (*Streptococcus* do Grupo B de Lancefield, GBS), apresentam células esféricas ou cuboides, é uma bactéria Gram-positiva, catalase negativa e as suas células se unem em forma de pares ou cadeias (Roberts, 2012). Ainda, o *S. agalactiae* é imóvel, não esporulada e anaeróbio facultativo (Hernandez et al., 2009). Por sua vez, *A. hydrophila* é uma bactéria Gram-negativa, catalase e oxidase positiva, aeróbia e anaeróbia facultativa, apresentando-se em forma de bastonete, com cápsula, motilidade conferida por flagelos polares e não formadora de esporos (Fernandes et al., 2019).

Os antibióticos são os compostos mais utilizados em todo o mundo para o tratamento e prevenção de doenças bacterianas em pisciculturas (Assane et al., 2019). Nesse sentido, verifica-se que a Organização Mundial de Saúde Animal

(OIE) desenvolveu o Código Sanitário de Animais Aquáticos (AAHC) o qual contribui para o uso responsável e prudente de agentes antimicrobianos em ambientes aquáticos. Além disso, foi publicada uma lista de antimicrobianos de importância veterinária (OIE, 2015), visando otimizar o equilíbrio entre as necessidades de saúde animal e as questões de saúde pública, incluindo a lincomicina por apresentar significativo potencial para utilização em peixes (OIE, 2021).

A lincomicina é um antibacteriano do grupo das lincosamidas que é principalmente ativo contra bactérias Gram-positivas (Spížek e Řezanka, 2017). As lincosamidas inibem a síntese de proteínas bacterianas ligando-se à subunidade 50S do ribossomo, a qual se liga preferencialmente ao rRNA 23S da subunidade 50S (Pyörälä et al., 2014). O efeito bactericida ou bacteriostático depende da concentração do fármaco no local da infecção e da sensibilidade do organismo infectado (Khan et al., 2022). Porém, apenas experimentos limitados estão disponíveis na piscicultura (Revina et al., 2017), já em tilápia do Nilo pouco é publicado sobre a ação deste fármaco, necessitando assim de delineamento de protocolos terapêuticos eficazes para seu uso em organismos aquáticos.

Tendo em vista a necessidade de se estudar os efeitos de novos antibacterianos para a administração nas pisciculturas, associados a falta de informações sobre o sistema imunológico de peixes, objetivou-se avaliar a eficácia terapêutica da lincomicina contra, *S. agalactiae* e *A. hydrophila*, bem como os possíveis efeitos desse antibacteriano sobre as respostas imunes humorais contra esses patógenos, podendo assim, fornecer informações relevantes para a prevenção e controle destas bactérias.

2. Material e métodos

2.1. Peixes e acondicionamento

Para o estudo de eficácia terapêutica da lincomicina, foram utilizadas 360 tilápias do Nilo pesando ± 100 g, sendo 100 animais para o teste da determinação da dose letal (DL_{50}) e 260 para a eficácia terapêutica. As tilápias foram oriundas da mesma desova, provenientes da fazenda Aquabel (Porto Ferreira, SP, Brasil), sendo distribuídas em 36 tanques (100L de água cada, $n=10$) abastecido com água

corrente, sem cloro, proveniente de poço artesiano com sistema de recirculação com vazão de 1L/min, dos quais dez tanques foram destinados ao estudo de determinação de DL₅₀ (5 tanques para cada bactéria). Após serem transportados aos devidos tanques, os peixes foram aclimatados por 15 dias, tempo necessário para que a concentração plasmática de cortisol e a osmolaridade voltassem aos níveis basais. Nos primeiros três dias de aclimação, os animais foram submetidos a banho com solução de NaCl (6,0g/L) (Carneiro e Urbati, 2001). As tilápias receberam ração comercial extrusada com 32% de proteína bruta (Nutrapiscis® - Empresa Presence), constituindo a dieta basal. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia, às 9h e às 17h, correspondendo a 2% da biomassa dos tanques. Os parâmetros de qualidade da água foram determinados duas vezes ao dia durante todo o período experimental utilizando pHmetro YSI-63 e oxímetro Y-55, e seus valores permaneceram dentro da faixa adequada para o bem-estar de peixes tropicais (Boyd, 1990), (oxigênio dissolvido = $4,07 \pm 0,89$ mg L⁻¹; temperatura = $27,64 \pm 2,05^{\circ}\text{C}$; pH = $7,64 \pm 0,54$; e condutividade = $208,29 \pm 97,57\mu\text{S/cm}$). Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), da UNESP/FCAV sob protocolo nº 5639/22.

2.2.Design experimental

Para o estudo de eficácia terapêutica da lincomicina, foram utilizados ao todo 36 tanques (100L de água cada, n=10), destes, 10 foram utilizados para a determinação da DL₅₀ (Tabela 1) e 26 destinados aos desafios bacterianos experimentais, sendo, 13 tanques utilizados para o estudo de *S. agalactiae* e 13 para *A. hydrophila*, conforme a Tabela 2.

Tabela 1. Distribuição das tilápias para determinação da dose letal (DL₅₀).

Grupos	DL ₅₀ densidade óptica - 625nm (<i>S. agalactiae</i>)	Número de animais avaliados por 15 dias para DL ₅₀
DL ₅₀ 1	0,035	N= 10
DL ₅₀ 2	0,070	N= 10
DL ₅₀ 3	0,140	N= 10
DL ₅₀ 4	0,280	N=10
DL ₅₀ 5	0,560	N=10
Grupos	DL ₅₀ densidade óptica- 625nm (<i>A. hydrophila</i>)	Número de animais avaliados por 15 dias para DL ₅₀
DL ₅₀ 1	0,150	N= 10
DL ₅₀ 2	0,250	N= 10
DL ₅₀ 3	0,500	N= 10
DL ₅₀ 4	0,650	N=10
DL ₅₀ 5	1,000	N=10

Tabela 2. Distribuição das tilápias para avaliação da eficácia terapêutica.

Grupos	Eficácia terapêutica (Infecção experimental com <i>S. agalactiae</i>)	Repetições		
		R1	R2	R3
S0	Controle (infectado e não tratado)	N=10	N=10	N=10
S1	Infectado e tratado com 40mg de Lincomicina	N=10	N=10	N=10
S2	Infectado e tratado com 20mg de Lincomicina	N=10	N=10	N=10
S3	Infectado e tratado com 10mg de Lincomicina	N=10	N=10	N=10
S4	Padrão fisiológico (valor de referência)	N=10		
Grupos	Eficácia terapêutica (Infecção experimental com <i>A. hydrophila</i>)	Repetições		
		R1	R2	R3
A0	Controle (infectado e não tratado)	N=10	N=10	N=10
A1	Infectado e tratado com 40mg de Lincomicina	N=10	N=10	N=10
A2	Infectado e tratado com 20mg de Lincomicina	N=10	N=10	N=10
A3	Infectado e tratado com 10mg de Lincomicina	N=10	N=10	N=10
A4	Padrão fisiológico (valor de referência)	N=10		

Para todos os animais submetidos à administração de lincomicina (S1, S2, S3, A1, A2, A3) iniciou-se este tratamento 1 dia antes da inoculação de cada um dos dois patógenos bacterianos. Foram coletados metade dos animais sobreviventes ao desafio infeccioso, no intervalo de 8 dias dessas infecções experimentais. Em seguida, os animais restantes foram tratados apenas com ração comercial (sem óleo e sem lincomicina) até o 12º dia, sendo este período denominado de recuperação (4 dias). Ainda, foram coletadas amostras de sangue para determinação do

hemograma, leucograma e dosagem de anticorpos circulantes no soro sanguíneo, órgãos como cérebro e rim caudal para isolamento das bactérias inoculadas nos animais.

2.3. Dieta experimental

A ração comercial extrusada, contendo 32% proteína bruta, 7% extrato etéreo, 5% fibra bruta e 12% matéria mineral (Nutripiscis® - Presence) foi utilizada para compor as dietas experimentais das tilápias submetidas aos protocolos experimentais. A alimentação foi realizada duas vezes ao dia (9h e 17h), com administração de 2% da biomassa dos tanques. A lincomicina utilizada foi a Lincomycin 300: Labyes do Brasil Ltda., a qual foi enviada para a farmácia de manipulação “DermoFlora” em Jaboticabal/SP que preparou cápsulas de 10mg cada uma. Para o preparo das dietas, diariamente a ração foi pesada proporcionalmente ao peso médio das tilápias de cada tanque. Em seguida, foi adicionado a lincomicina nas doses de 10, 20 e 40mg/kg⁻¹ p.v. e homogeneizado em 2% de óleo vegetal, para depois serem misturadas na ração, compondo as dietas de S1/A1, S2/A2 e S3/A3 respectivamente. Para padronização das dietas e balanço nutricional, foi adicionado 2% de óleo vegetal à dieta dos grupos controles (S0 e A0).

2.4. Anestesia dos peixes

As tilápias foram anestesiadas por imersão em solução aquosa de benzocaína na proporção de 1:10.000 para coleta de sangue e 1:500 no momento da eutanásia. A benzocaína foi diluída em álcool 98° (0,1 g/mL), completando o volume para 1L (Wedemeyer, 1970). Inicialmente foi realizado pré-anestesia, procedimento este em que o nível de água dos tanques era reduzido até um volume de 10L adicionando-se 0,1g de benzocaína já diluída em álcool 98°. Logo após, cada peixe era transferido para um recipiente contendo 1L de água com 0,1g de benzocaína, ambos os procedimentos eram realizados em aeração para minimizar o estresse ocasionado pela manipulação dos peixes, a qual era realizada logo que o opérculo parava de se movimentar, retirando-se o peixe da água e realizando-se a

coleta de sangue. Por fim, o animal era transferido para outro recipiente contendo 0,5g de benzocaína diluída em 1L de água para eutanásia.

2.5. Produção dos inóculos de *S. agalactiae* e *A. hydrophila*

A cepa de *S. agalactiae* (GenBank access number: MH359095.1) utilizada neste trabalho foi mantida congelada em freezer -80°C e no momento do uso, uma alíquota foi descongelada e o material colocado em 200mL de caldo Brain Heart Infusion broth (BHI broth) (Merck), homogeneizado e mantidos em estufa por 48h à 35°C para o crescimento da bactéria. Já a cepa de *A. hydrophila* (GenBank accession number: MH305534.1) utilizada foi mantida congelada em freezer -80°C e no momento do uso, uma alíquota foi descongelada e o material colocado em 200mL de caldo Tryptic Soy Broth (TSB) (Difco), homogeneizado e mantidos em estufa por 24h à 28°C para o crescimento da bactéria

Após o crescimento de ambas as bactérias, a cultura foi centrifugada a 4.000 rpm (rotações por minuto) por 20 minutos e a 4°C, em centrífuga clínica refrigerada, formando um pellet bacteriano suspenso em solução salina (PBS) e lavado três vezes.

2.6. Determinação das concentrações bacterianas 50% letais de *S. agalactiae* e de *A. hydrophila* em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Para determinação da DL₅₀ (dose letal em 50% dos indivíduos) da *S. agalactiae*, e *A. hydrophila*, após as centrifugações para a lavagem e formação dos sedimentos bacterianos, as suspensões bacterianas foram ajustadas por densidade óptica de 0,035; 0,070; 0,140; 0,280 e 0,560 para *S. agalactiae* e 0,150; 0,250; 0,500; 0,650 e 1,000 para *A. hydrophila* (Ariede et al., 2020) no comprimento de onda de 625nm em espectrofotômetro (2100 Único, Japão). Uma amostra de 100µl de cada concentração foi removida do inóculo para realização de diluições seriadas e contagens em triplicata realizada em placas contendo Brain Heart Infusion Agar (BHI ágar) (*S. agalactiae*) e Tryptic Soy Agar (TSA ágar) (*A. hydrophila*). As concentrações foram previamente testadas por inoculação intraperitoneal (IP) em 50 tilápias, escolhidas aleatoriamente e distribuídas em 5 tanques, sendo 10 peixes

($100 \pm 0,30\text{g}$) para cada concentração. A mortalidade diária foi observada durante 15 dias e após esse período a DL_{50} foi determinada com densidade óptica de 0,070 ($9,93 \times 10^7$ UFC-unidades formadoras de colônias)/ mL^{-1} para *S. agalactiae* e de 0,650 ($2,71 \times 10^7$ UFC/ mL^{-1}) para *A. hydrophila*.

2.7. Infecção experimental

Após a determinação da DL_{50} , foi realizada a inoculação nos grupos experimentais correspondentes de peixes por via IP. Os sedimentos bacterianos foram diluídos em PBS estéril e as concentrações ajustadas pela densidade óptica da solução em 0,070 ($9,93 \times 10^7$ UFC mL^{-1}) para *S. agalactiae* e 0,650 ($2,71 \times 10^7$ UFC/ mL^{-1}) para *A. hydrophila*. Com as suspensões mantidas em gelo, alíquotas de $0,5\text{mL}^{-1}$ foram transferidas para seringas de 1mL e após procedimentos de antissepsia com álcool, foi administrado o inóculo por via IP nas tilápias.

2.8. Concentração Inibitória Mínima (MIC)

As faixas de concentrações da lincomicina para a diluição seriadas foram realizadas entre 160 à $0,001\text{mg}/\text{mL}^{-1}$. As concentrações inibitórias mínimas (MIC) foram determinadas utilizando o método de caldo de microdiluição recomendado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2019). A microdiluição em caldo utiliza placas de Elisa estéreis, com 96 poços, permitindo visualização do crescimento bacteriano. Esta técnica envolve a preparação de diluições seriadas e logarítmicas de antimicrobianos em um meio de cultura líquido (100uL de Mueller-Hinton), possibilitando o crescimento bacteriano. As placas de microdiluição foram preparadas contendo as diferentes diluições do antibacteriano e o meio de cultura em um volume total de 200uL por poço. As concentrações finais de bactérias foram ajustadas em 5×10^5 UFC/mL as quais foram adicionadas a cada poço e incubadas a 28°C por 24h para *A. hydrophila* e a 35°C por 48h para a *S. agalactiae*. As MICs foram determinadas em triplicata, incluindo poços para controle positivo (sem antimicrobiano) e poços para controle negativo (sem bactéria).

Após o período de incubação de cada bactéria, os poços foram inspecionados visualmente para evidenciar o crescimento bacteriano, expresso pela turbidez.

Assim, os poços límpidos demonstraram que o crescimento bacteriano foi inibido, sendo que o primeiro poço límpido representa a concentração inibitória mínima (MIC), ou seja, a menor concentração do antibacteriano capaz de inibir o crescimento da bactéria (Anvisa, 2014).

2.9. Teste de sensibilidade à lincomicina (Disco de difusão)

O teste de sensibilidade à lincomicina foi realizado com base as normas CLSI (2019) que com auxílio de um “swab” estéril, as suspensões bacterianas ajustadas foram passadas sob a superfície estéril da placa de ágar Müller-Hinton (*A. hydrophila*) e em placa de ágar Müller-Hinton suplementada com 5% de sangue de carneiro desfibrinado (*S. agalactiae*), de forma que a distribuição do inóculo fosse uniforme por toda a superfície da placa. O disco antimicrobiano de 2µg de lincomicina foi colocado na superfície da placa de ágar semeada, tendo sido pressionado de encontro à placa e de maneira a assegurar contato completo com a superfície do ágar. As placas foram colocadas de forma invertida em uma estufa, a 28°C por 24h (*A. hydrophila*) e a 35°C por 48h (*S. agalactiae*) após a aplicação dos discos. Ato contínuo, após período de incubação, foi realizado a análise do diâmetro do halo de inibição total (área sem crescimento) a olho nu. Com o auxílio de um paquímetro, o halo foi medido em milímetros, encostando na parte posterior da placa de petri. O tamanho do halo de inibição foi classificado como organismo sensível, indeterminado ou resistente à lincomicina.

2.10. Avaliação clínica e comportamental

Diariamente, o sistema de aeração era desligado e os animais eram examinados nos tanques para observação de eventuais alterações comportamentais, sinais clínicos e mortalidade que pudessem resultar do tratamento com a lincomicina ou do desafio bacteriano. Assim sendo, excitabilidade, letargia, frequência respiratória alterada (batimento opercular), desorientação, hemorragias cutâneas, corrosão de nadadeira, ulcerações oculares, exoftalmia, distensão abdominal, alteração na pigmentação dos tecidos, entre outros, foram avaliados.

2.11. Avaliação hematológica

Peixes sobreviventes aos desafios bacterianos no estudo de DL₅₀, após serem anestesiados, foram submetidos à coleta de 1,5mL de sangue pelo vaso caudal de cada animal após o oitavo e 12º dia de infecção. O sangue foi aliquotado em dois conjuntos: uma seringa revestida de heparina (5000 UI) e outra sem heparina, para obtenção de plasma e soro, respectivamente. Durante a troca de seringas (com e sem heparina), não era retirada a agulha do vaso sanguíneo puncionado, para que não houvesse perda de sangue. O hemograma foi realizado por contagem em hemocítmetro (câmara de Neubauer) utilizando solução de Natt e Herrick (1952) na proporção 1:100 v:v). O hematócrito foi determinado pela técnica de centrifugação do microhematócrito. Para determinar as concentrações de hemoglobina circulante, utilizou-se o reagente Hemoglobina (Labtest), fazendo-se a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540nm e, em adição a isso, os valores de volume corpuscular médio (VCM) foram obtidos pelo cálculo $VCM = (HT/HE) \times 100$ e concentração hemoglobina corpuscular média (CHCM) pelo cálculo $CHCM = (HG/HT) \times 100$. Ainda, as contagens diferenciais de leucócitos foram realizadas em extensões sanguíneas com a contagem de 200 células, estabelecendo o percentual de cada tipo celular de interesse, após coloração prévia das extensões com May-Grünwald Giensa Wrigth (Belo et al., 2013).

2.12. Determinação da concentração de anticorpos por método de ELISA indireto

Para quantificar/detectar os anticorpos de tilápia específicos para *S. agalactiae* primeiramente a placa foi sensibilizada (*Coating*) com a suspensão antigênica de *S. agalactiae*, previamente preparada após sonicação das culturas bacterianas, já para anticorpos de tilápia específicos para *A. hydrophila* a placa foi sensibilizada (*Coating*) com a suspensão antigênica de *A. hydrophila*. Ambas suspensões antigênicas bacterianas foram diluídas em tampão carbonato de sódio (pH 9,6), em uma diluição de 1/1000, adicionando-se 100µL/cavidade e incubando-se a microplaca *over night* a 4°C. Em seguida, foram realizadas 4 lavagens da placa inteira com 0,05% Tween 20 em PBS pH 7,3 (300 µL/cavidade). Para o bloqueio, as

superfícies das cavidades da microplaca, adicionou-se 1% BSA – 5% Sacarose diluídos em PBS (200 µL/cavidade), incubando-se por 1h à 37°C. Após esse período, foram realizadas 4 lavagens com PBS (pH 7,3) acrescido de 0,05% Tween 20 (300 µL/cavidade) para posteriormente serem adicionadas as amostras de soro sanguíneo dos peixes experimentalmente infectados ou dos grupos controle. Para isso, as amostras séricas foram diluídas a 1/20 em PBS/Tween 20 a 0,05% e 1% de BSA, tendo sido adicionado 100 µL/cavidade de cada uma dessas diluições e incubando-se esta fase da reação por 2h a 37°C. Em seguida, foram realizadas 4 lavagens das microplacas, como foi anteriormente descrito. A seguir, o anticorpo primário constituído de IgG produzida em Coelhos anti-IgM de Tilápia (Clissa et al., 2021), foi diluído a 1/1000 em PBS/Tween 0,05% com 1% BSA e adicionado no volume de 100 µL/cavidade e incubando-se a reação por 1h em 37°C. Após esse período, foram realizadas 4 lavagens da placa em 0,05% Tween 20 em PBS (pH 7,3) (300 µL/poço), seguindo-se da adição do anticorpo secundário (anticorpo conjugado → Anti-Rabbit IgG com a Peroxidase (Sigma) o qual foi preparado na sua diluição recomendada (1/3000) em PBS/Tween 20 a 0,05% e 1% de BSA para ser adicionado em um volume de 100 µL/cavidade e incubando-se por 1h em 37°C. Em seguida, as cavidades da microplaca foram lavadas como foi anteriormente descrito para que então fosse adicionado o substrato (100 µL/cavidade) constituído por Tetra-Metil-Benzidina (TMB) (Sigma) e aguardando-se a reação de clivagem enzimática ocorrer por 25 minutos no escuro e a temperatura ambiente. Depois desse período, a reação enzimática foi bloqueada após a adição de 50 µL/cavidade de solução de H₂SO₄ a 30% para que e em seguida fosse realizada a leitura das densidades ópticas (D.O.) de cada uma das cavidades da microplaca no comprimento de onda de 450nm.

2.13. Análise estatística

O desenho experimental para avaliação da eficácia terapêutica foi inteiramente randomizado em esquema fatorial 4x2 (quatro tratamentos: 40, 20, 10 e controle X dois períodos de avaliação: 8 e 12 dias após desafio). As análises de variância para comparar os diferentes grupos experimentais foram realizadas utilizando o procedimento GLM (General Linear Model) do programa SAS, versão

9.3 (Statistical Analysis Software, 2012). Diferenças significativas ($P < 0.05$) foram estimadas com base no teste de Tukey ao nível de confiança de 95%.

O modelo de Kaplan-Meier foi utilizado para calcular a probabilidade de sobrevivência específica em função do tempo de Tilápias do Nilo tratadas com lincomicina (40, 20 e 10 mg) ou não (controle) submetidas a infecção experimental com *S. agalactiae* e *A. hydrophila*. Após a infecção experimental com *S. agalactiae* a mortalidade foi observada a cada 24 horas durante 12 dias. Já no desafio com *A. hydrophila* devido ao caráter infeccioso da cepa utilizada, após a infecção experimental a mortalidade foi observada 6, 12, 18 e 24 horas após a infecção, seguindo até 12 dias. Foram atribuídos aos peixes que morreram como 1 e aos sobreviventes 0. As diferenças entre as curvas de mortalidade dos tratamentos com lincomicina foram testadas quanto à significância ($p < 0,05$) pelo teste log-rank e a razão do risco de morte de Mantel-Haenszel utilizando software GraphPad Prism 6.

3. Resultados

3.1. *Streptococcus agalactiae*

3.1.1. Concentração Inibitória Mínima (MIC)

A determinação do teste de concentração inibitória mínima da lincomicina para *S. agalactiae* revelou 2µg/mL como a quantidade mínima desta lincosamida para inibir o crescimento deste microrganismo.

3.1.2. Teste antibiograma

De acordo com as normas da CLSI (2019), o tamanho dos halos formados com os discos de lincomicina devem ser baseados nas classificações de diâmetros pré-estabelecidas para clindamicina, pois ainda não há estudos relatando o diâmetro de halo formado para esse antibacteriano.

A interpretação do tamanho do halo formado para *S. agalactiae* em disco com 2µg de lincomicina foi classificado de acordo com as normas da CLSI (2019) Resistente: ≤ 15 ; Indeterminado: 16-18 e Sensível: ≥ 19 e, no caso da cepa de *S.*

agalactie usada nesse estudo foi observado um halo de inibição de crescimento bacteriano de 44mm, classificando esta cepa bacteriana como sensível à lincomicina.

3.1.3. Avaliação de alterações clínicas e comportamentais nos peixes infectados com *S. agalactiae*

Tilápias do grupo controle (não tratadas com lincomicina) apresentaram anorexia 24 horas após a inoculação de *S. agalactiae* e a primeira morte ocorreu após 48 horas do desafio. Peixes do grupo controle e tratados com a menor dose lincomicina (10mg), exibiram sinais típicos de estreptococose após 96 e 120 horas do desafio, respectivamente, incluindo sinais clínicos como letargia, natação errática, rigidez dorsal, boquejamento na superfície da água, opacidade da córnea e exoftalmia uni ou bilateral, que em alguns casos foi associada a perfuração córnea e levando ao colapso do globo ocular. Nenhum sinal clínico e comportamental alterado foi observado nos animais tratados com 20 e 40mg de lincomicina, apesar de ter ocorrido mortalidade em grupos tratados com 20mg.

3.1.4. Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier nos peixes infectados com *S. agalactiae*

A Figura 1 apresentam as curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier. Tilápias tratadas com 40mg de lincomicina desafiadas com *S. agalactiae* apresentaram probabilidade de sobrevivência estatisticamente superior à tilápias tratadas com 20mg ($p=0,021$), 10mg ($p=0,010$) e controle ($p<0,0001$). A razão do risco de morte dos peixes tratados com 40mg em relação aos outros tratamentos é de 7,96 (1,38 a 46,01) tratados com 20mg, 8,17 (1,64 a 40,76) tratados com 10mg e 11,52 (4,30 a 30,84) controle. Além disso, os tratamentos com 20 e 10mg de lincomicina apresentaram significativamente menos mortes que o grupo controle ($p = 0,0012$ e $p = 0,0037$) respectivamente. A razão do risco de morte entre os grupos 20 mg e o controle é de 4,19 (1,76 a 10,00) e 10 mg em relação ao controle é de 3,52 (1,51 a 8,26).

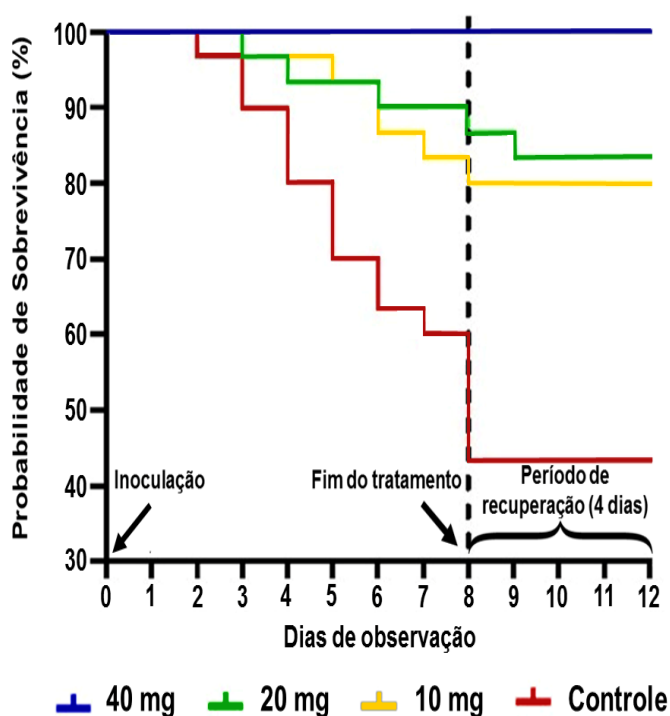


Figura 1. Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier de Tilápia do Nilo tratadas com lincomicina e submetidas a teste de infecção experimental com *S. agalactiae*. Os peixes foram tratados um dia com o fármaco antes da infecção experimental sendo o tratamento continuado por mais 8 dias. Tilápias submetidas (n = 120) a desafio experimental com *S. agalactiae*. As mortes foram observadas a cada 24 horas por 14 dias após a inoculação de *S. agalactiae*. Tratamentos: 40 mg (n = 30); 20 mg (n = 30); 10 mg (n = 30); Controle (não tratados; n = 30).

A Tabela 3 apresenta os percentuais relativos de sobrevivência (RPS) das tilápias infectadas com *S. agalactiae* e tratadas com lincomicina. Verificou-se efeito dose-resposta ao tratamento com esta lincosamida com RPS de 64,70; 70,59 e 100% dos tratamentos com 10, 20 e 40 mg/kg⁻¹ de p.v. respectivamente, quando comparado aos animais controles.

Tabela 3. Percentual relativo de sobrevivência das tilápias infectadas com *S. agalactiae* e tratadas com diferentes doses de lincomicina.

Tratamento	Número de animais mortos	Mortalidade (%)	Percentual relativo de sobrevivência (RPS) ¹
Controle	17 (30)	56,66	.
10 mg de lincomicina	6 (30)	20	64,70
20 mg de lincomicina	5 (30)	16,66	70,59
40 mg de lincomicina	0 (30)	0	100

¹ Porcentagem relativa de sobrevivência (RPS), calculada pela equação: $RPS = [1 - (\% \text{ mortalidade do grupo tratado} / \% \text{ mortalidade do grupo controle})] \times 100$

3.1.5. Análise hematológica nos peixes infectados com *S. agalactiae*

Na avaliação hematológica (Figura 2) de tilápias tratadas com lincomicina, não foi observada diferença significativa ($P < 0.05$) no percentual de hematócrito, bem como nos valores de VCM, HCM e CHCM. Entretanto, após 8 DPI foi observado uma diminuição nos valores circulantes de eritrócitos nos animais tratados com 10mg de lincomicina e nos peixes do grupo controle em comparação as tilápias tratadas com a maior dose de lincomicina (40mg)

Na avaliação da concentração de hemoglobina, foi observado diminuição aos 8 DPI nos grupos tratado com 10mg de lincomicina e no grupo controle, em comparação aos peixes tratados com 40 e 20mg de lincomicina e padrão fisiológico, apesar de não ter sido encontrada nenhuma diferença estatística. Na evolução do tempo, no período de recuperação (12 DPI) foi observado aumento significativo ($P < 0.05$) nos valores adscritos dos grupos 10mg e controle.

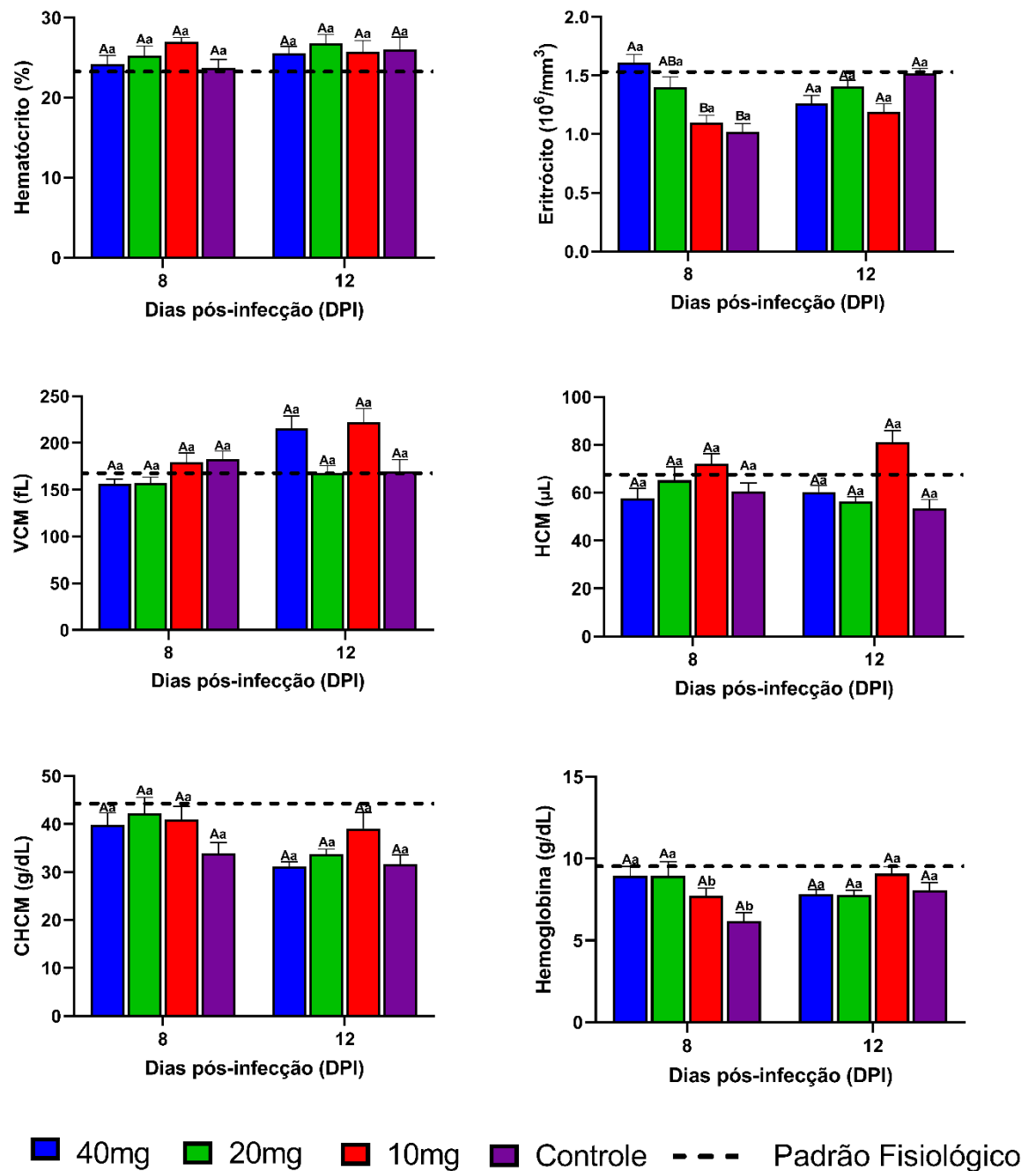


Figura 2. Análise sanguínea de tilápias após tratamento com lincomicina e desafiadas com *S. agalactiae*. Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). Letras maiúsculas comparam os diferentes tratamentos dentro de cada dia experimental, letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento entre os diferentes dias experimentais.

Na avaliação leucocitária (Figura 3) correspondente ao período de recuperação (12 DPI), foi observado diminuição de leucócitos totais por influência de linfopenia observada em todos os grupos tratados com lincomicina, a qual foi significativa ($P < 0.05$) no grupo tratado com 40mg de lincomicina quando comparado aos animais do grupo controle. Todos os grupos submetidos ao tratamento com lincomicina (40, 20 e 10mg) apresentaram neutropenia e monocitopenia aos 8 DPI quando comparados aos animais do grupo controle. Além disso, essa diminuição na contagem de neutrófilos e monócitos também foi observada na evolução do tempo, isto é, ela persistiu no período de recuperação (12 DPI).

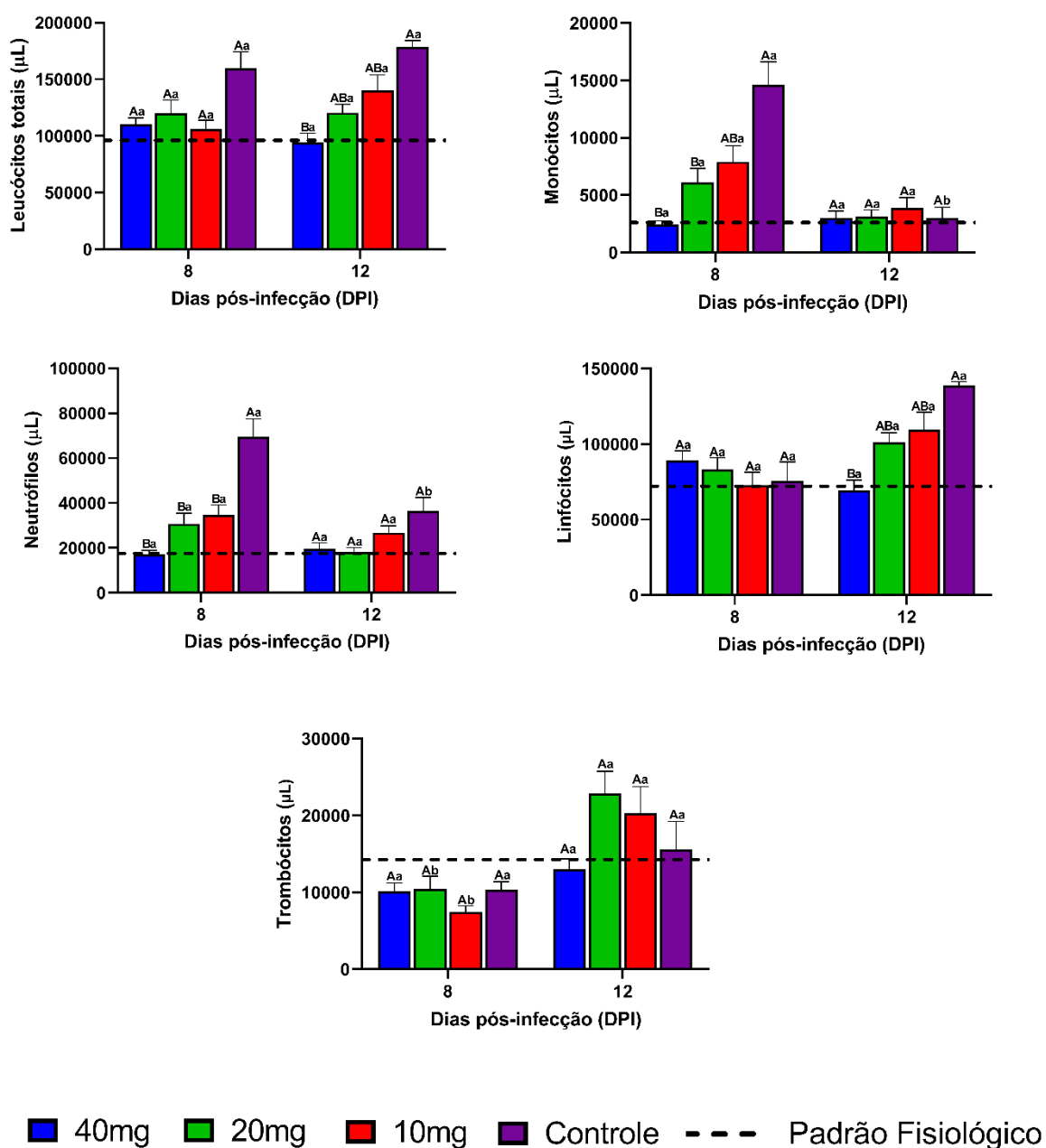


Figura 3. Análise leucocitária de tilápias após tratamento com lincomicina e desafiadas com *S. agalactiae*. Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). Letras maiúsculas comparam os diferentes tratamentos dentro de cada dia experimental, letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento entre os diferentes dias experimentais.

3.1.6. Burst respiratório leucocitário nos peixes infectados com *S. agalactiae*

As análises de produção de reativos de oxigênio (EROs) (Figura 4) apresentaram diminuição significativa ($P < 0.05$) após 8 e 12 DPI nos grupos tratados com 40 e 20mg de lincomicina quando comparados aos peixes tratados com 10mg e aos animais do grupo controle. Vale ressaltar, que os grupos tratados com 40mg de lincomicina, assemelhou-se com os valores observados nos animais do grupo padrão fisiológico.

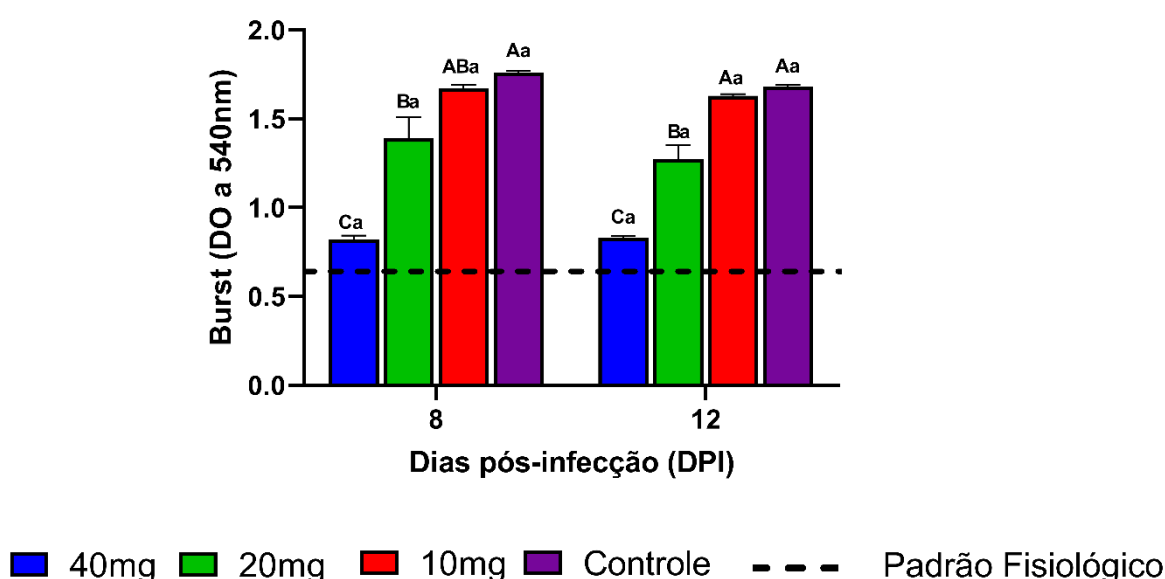


Figura 4. Valores médios observados na determinação de espécies reativas de oxigênio (EROs) para tilápias inoculadas *S. agalactiae* tratadas com diferentes doses de lincomicina. Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). Letras maiúsculas comparam os diferentes tratamentos.

3.1.7. Mensuração de anticorpos por métodos Elisa indireto nos peixes infectados com *S. agalactiae*

Na avaliação da mensuração de anticorpos (Figura 5), foi observado um efeito dose-resposta em relação ao uso da lincomicina, pois os animais tratados com a dose mais elevada desta lincosamida demonstram níveis de anticorpos estatisticamente superiores ($P < 0.05$) após 8 dias do desafio bacteriano, quando comparado aos demais grupos experimentais do presente estudo. Já, no período de recuperação (12 dias), essa resposta nos animais tratados com 40mg de lincomicina

permaneceu elevada em comparação aos demais grupos, porém as diferenças estatísticas não foram significantes.

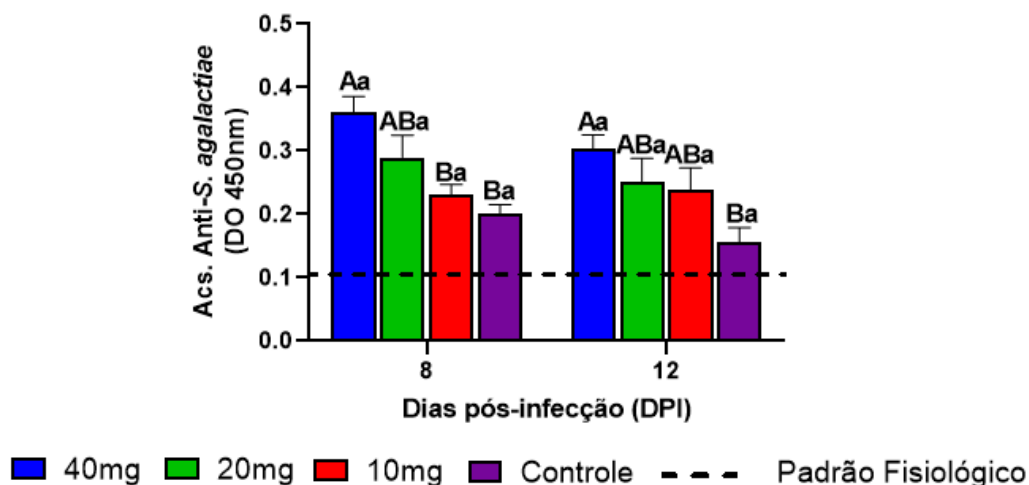


Figura 5. Valores médios de anticorpos contra *S. agalactiae*, mensurados como densidades ópticas determinadas por ELISA indireto em tilápias desafiadas com *S. agalactiae* e tratadas lincomicina. Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). Letras maiúsculas comparam os diferentes tratamentos dentro de cada dia experimental, letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento entre os diferentes dias experimentais.

3.2. *Aeromonas hydrophila*

3.2.1. Concentração Inibitória Mínima (MIC)

A determinação do teste de concentração mínima inibitória da lincomicina para *A. hydrophila* revelou 7µg/mL como a quantidade mínima desta lincosamida para inibir o crescimento deste microrganismo.

3.2.2. Teste de sensibilidade à lincomicina

De acordo com as diretrizes da CLSI (2019), atualmente não existem dados para lincomicina, e, portanto, os isolados foram classificados como não sensíveis a esse antibacteriano se exibissem resistência completa (crescimento de *A. hydrophila* até a borda do disco) e como sensíveis caso contrário (Davis et al., 2018). No

presente estudo, não houve formação de halo de inibição para cepa de *A. hydrophila* em discos de antibiograma com 2µg de lincomicina, sendo classificada como resistente a este antibacteriano.

3.2.3 Avaliação comportamental e de sinais clínicos em peixes infectados com *A. hydrophila*

Os peixes de todos os tratamentos apresentaram anorexia e apatia 5 horas após inoculação da bactéria e mortalidade 9 horas após, exceto grupo tratado com 40 mg. Os animais do grupo controle, 10 e 20mg exibiram sinais típicos de aeromonose principalmente entre 24 e 48 horas após a inoculação, incluindo exoftalmia e opacidade da córnea, erosão de nadadeiras, hemorragia cutânea e de brânquias e ascite. As tilápias tratadas com 40mg de lincomicina apresentaram ascite e hemorragia cutânea.

3.2.4 Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier em peixes infectados com *A. hydrophila*

As tilápias tratadas 40 e 10mg de lincomicina apresentaram mortalidade significativamente inferior ao grupo controle ($p = 0,0001$; $p = 0,0283$) respectivamente. Ainda, a razão de risco de morte para esses grupos (Figura 6) em relação ao grupo controle foi de 5,50 (2,31 a 13,096) nos tratados com 40mg e 2,47 (1,10 a 5,56) nos tratados com 10mg. Não houve diferença estatística ($P > 0.05$) no número de mortalidade entre os tratamentos 40, 20 e 10mg. Ademais o grupo tratado com 20mg não diferiu estatisticamente ($P > 0.05$) do controle em mortalidade.

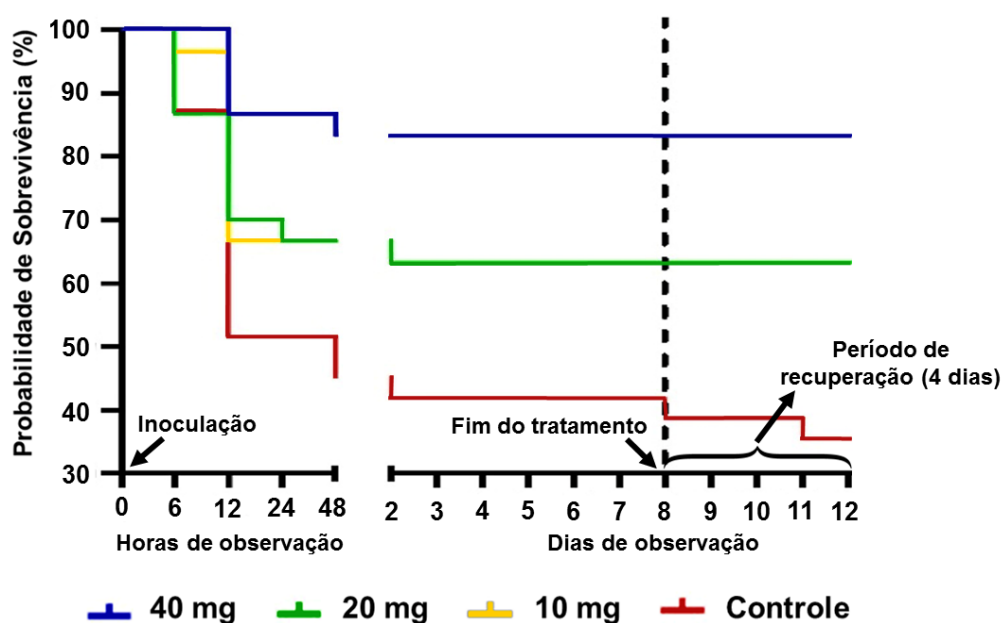


Figura 6. Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier de Tilápia do Nilo tratadas com lincomicina e submetidas a teste de infecção experimental. Os peixes foram tratados um dia com o fármaco antes da infecção experimental sendo o tratamento continuado por mais 8 dias. Tilápias submetidas (n = 120) a desafio experimental com *A. hydrophila*. Na infecção experimental as mortes foram observadas 6, 12, 18 e 24 após a infecção, seguindo a cada 24 horas durante 14 dias. Tratamentos: 40 mg (n = 30); 20 mg (n = 30); 10 mg (n = 30); Controle (não tratados; n = 30).

A Tabela 4 apresenta o percentual relativo de sobrevivência (RPS) das tilápias infectadas com *A. hydrophila* e tratadas com lincomicina. Verificou-se efeito dose-resposta ao tratamento com esta tetraciclina com RPS de 45; 45 e 75% dos tratamentos com 20, 40 e 80mg/kg⁻¹ de p.v., respectivamente, quando comparado aos animais controles.

Tabela 4. Percentual relativo de sobrevivência das tilápias infectadas com *A. hydrophila* e tratadas com diferentes doses de lincomicina

Tratamento	Número de animais mortos	Mortalidade (%)	Percentual relativo de sobrevivência (RPS) ¹
Controle	20 (30)	66,66	.
10 mg de lincomicina	11 (30)	36,66	45
20 mg de lincomicina	11 (30)	36,66	45
40 mg de lincomicina	5 (30)	16,66	75

¹ Porcentagem relativa de sobrevivência (RPS), calculada pela equação: $RPS = [1 - (\% \text{ mortalidade do grupo tratado} / \% \text{ mortalidade do grupo controle})] \times 100$

3.2.5. Análise hematológica em peixes infectados com *A. hydrophila*

Na avaliação hematológica (Figura 7) de tilápias tratadas com lincomicina e desafiadas com *A. hydrophila* não foi observado diferença significativa ($P < 0.05$) no percentual de hematócrito e nos valores de VCM, HCM e CHCM. Tilápias tratadas com 10mg de lincomicina e grupo controle apresentaram diminuição significativa de eritrócitos circulantes e na concentração de hemoglobina, quando comparados aos animais tratados com 40 e 20mg.

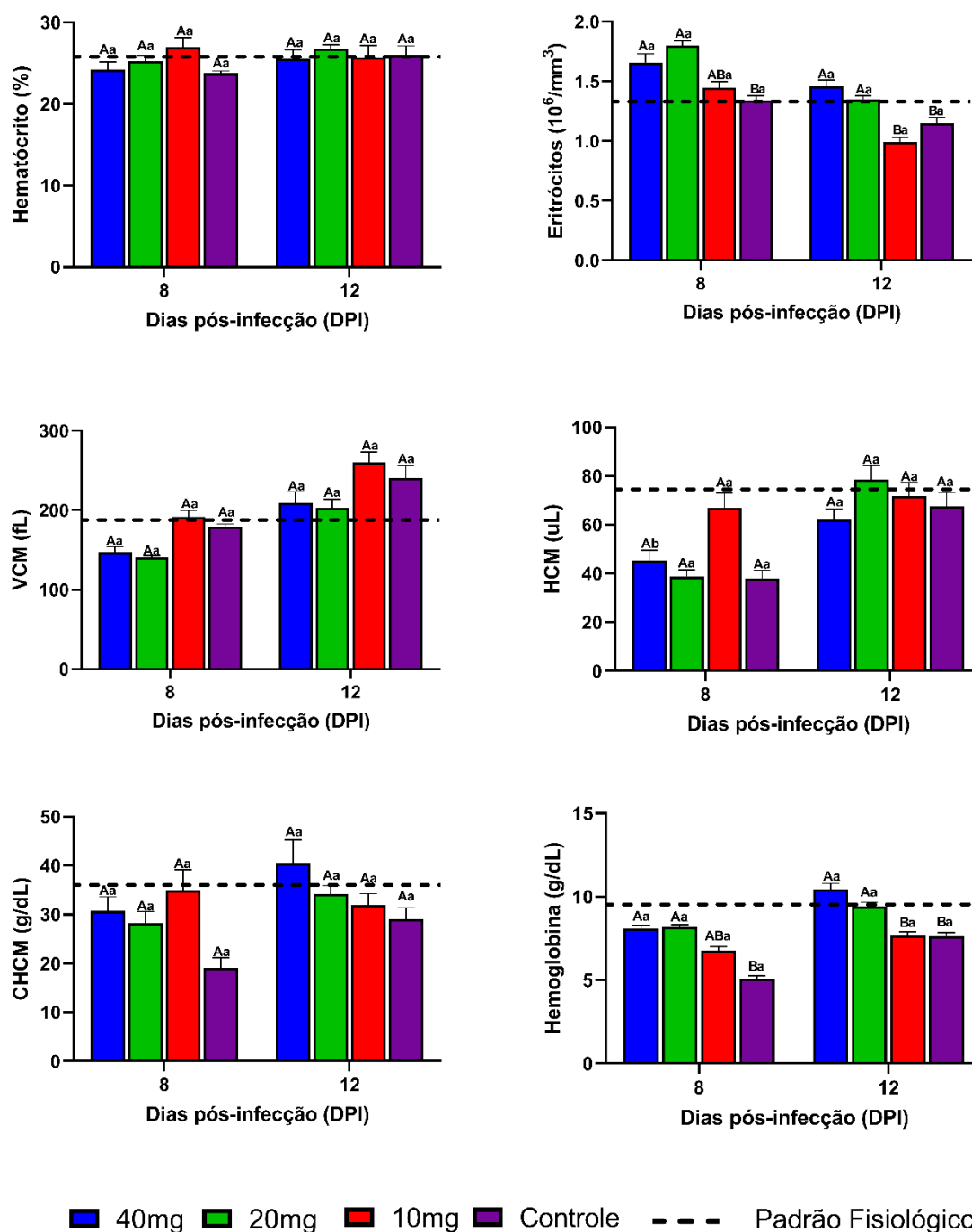


Figura 7. Análise sanguínea de tilápias após tratamento com lincomicina e desafiadas com *A. hydrophila*. Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). Letras maiúsculas comparam os diferentes tratamentos dentro de cada dia experimental, letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento entre os diferentes dias experimentais.

Na análise do leucograma (Figura 8) das tilápias tratadas com lincomicina não foram observadas diferenças significativas ($P>0.05$) dos leucócitos totais, bem como na contagem diferencial de neutrófilos, linfócitos e trombócitos. Porém, com o passar dos dias experimentais, no período de recuperação, peixes tratados com 40mg de lincomicina apresentaram aumento de monócitos circulantes em relação aos demais tratamentos e grupo controle.

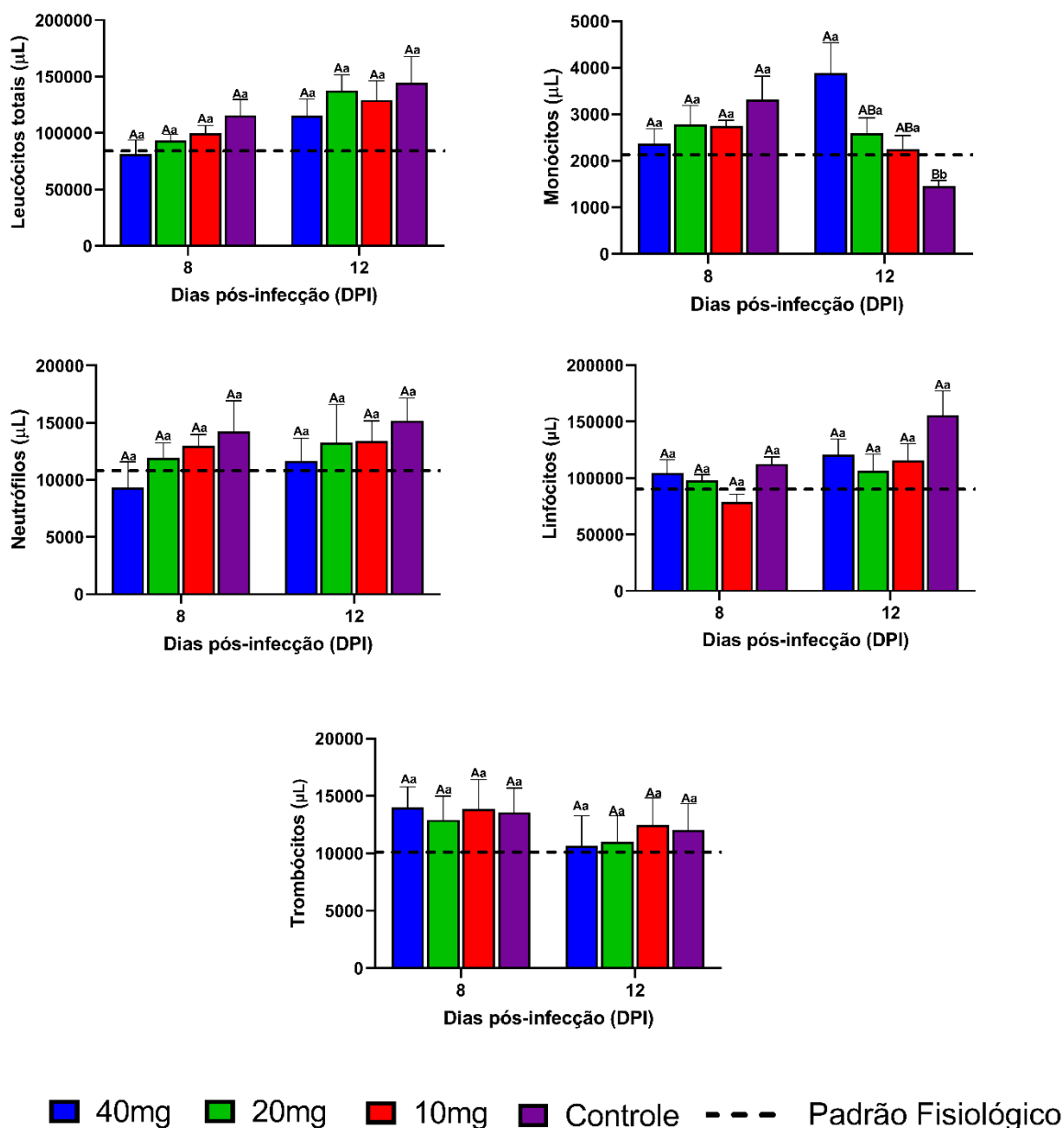


Figura 8. Análise leucocitária de tilápias após tratamento com lincomicina e desafiadas com *A. hydrophila*. Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P<0.05$). Letras maiúsculas comparam os

diferentes tratamentos dentro de cada dia experimental, letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento entre os diferentes dias experimentais.

3.2.6. Burst respiratório leucocitário em peixes infectados com *A. hydrophila*

A avaliação de produção de reativos de oxigênio (EROs) (Figura 9) mostrou diminuição significativa ($P < 0.05$) nos grupos tratados com 40 e 20mg de lincomicina quando comparados aos peixes tratados com 10mg e animais do grupo controle, 8 e 12 DPI. Destaca-se que tilápias tratadas com 40 e 20mg de lincomicina, tiveram valores similares ao padrão fisiológico.

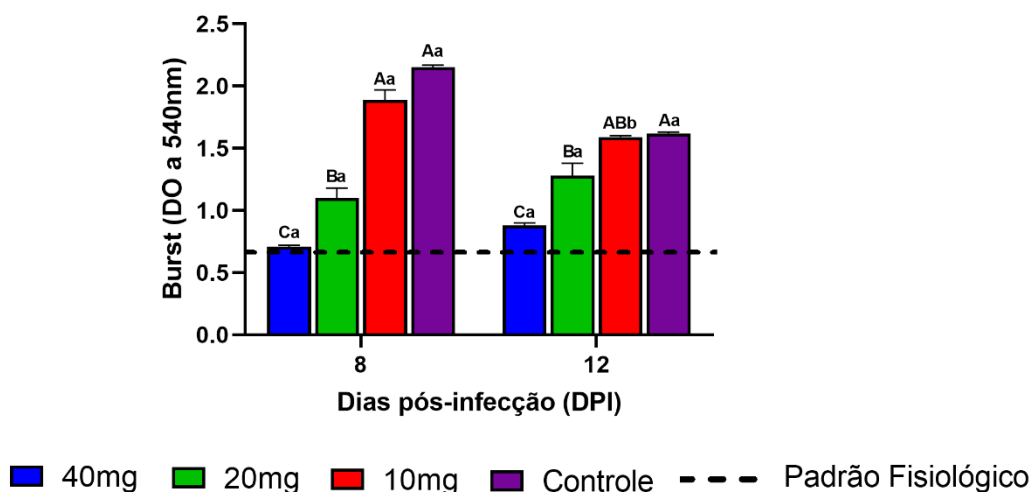


Figura 9. Valores médios observados na determinação de espécies reativas de oxigênio (EROs) para tilápias inoculadas *A. hydrophila* e tratadas com diferentes doses de lincomicina. Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). Letras maiúsculas comparam os diferentes tratamentos.

3.2.7. Mensuração de anticorpos por métodos Elisa indireto em peixes infectados com *A. hydrophila*

Na mensuração de anticorpos por método indireto de Elisa (Figura 10) foram observadas maiores concentrações nos animais do grupo controle em relação aos animais submetidos aos tratamentos com lincomicina. Vale ressaltar que apenas três tilápias do grupo controle sobreviveram ao estímulo bacteriano após 12 dias do desafio.

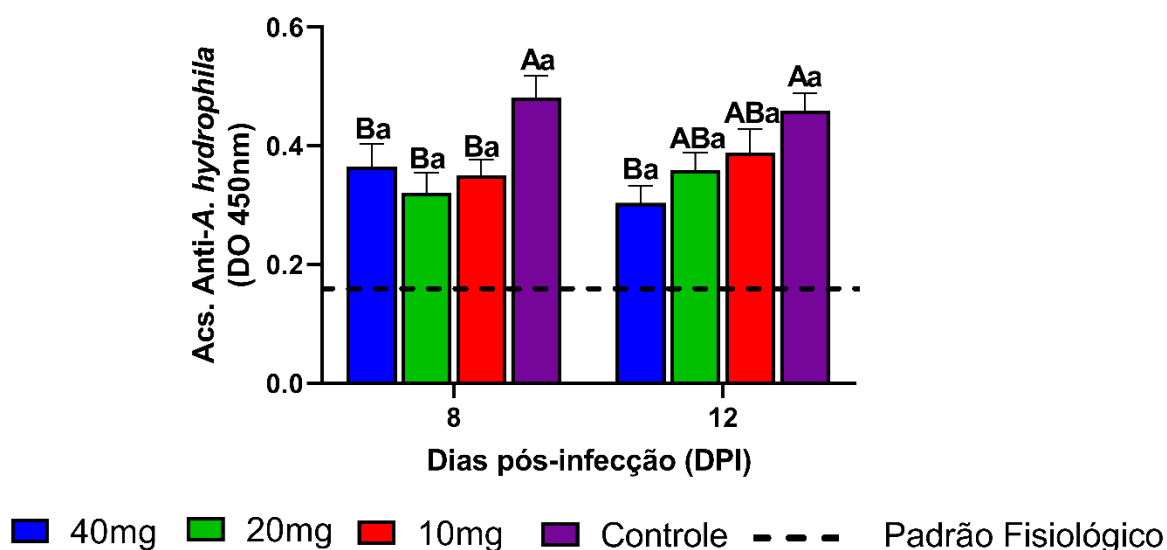


Figura 10. Valores médios da densidade ótica determinada por ELISA indireto da quantidade de anticorpos anti-*A. hydrophila* em tilápias inoculadas com *A. hydrophila* e tratadas com lincomicina. Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). Letras maiúsculas comparam os diferentes tratamentos dentro de cada dia experimental, letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento entre os diferentes dias experimentais.

4. Discussão

4.1. *Streptococcus agalactiae*

O estudo de eficácia terapêutica da lincomicina em tilápias revelou efeito dose-resposta no controle antibacteriano de *S. agalactiae* durante infecção experimental, resultando em eficácia de 100; 70,59 e 64,70% para os tratamentos com 40, 20 e 10mg de lincomicina/Kg⁻¹ de p.v., respectivamente, quando comparado aos peixes controles, o que corrobora com os achados dos estudos de sensibilidade antimicrobiana (antibiograma) *in vitro* realizado com discos contendo 2µg de lincomicina e da concentração inibitória mínima de 2µg/mL. Tal achado também foi evidenciado por Lee et al. (2022), que avaliaram a farmacocinética das doses de 10 e 20mg de lincomicina/kg⁻¹ de p.v. em linguado-de-oliva (*Paralichthys olivaceus*) após uma única aplicação injetável para tratamento de estreptococose.

A utilização de teste de sensibilidade, como o antibiograma, contribui para tomada de decisões terapêuticas eficazes, pois a utilização de antibacterianos de forma inadequada pode levar a falha terapêutica, aumento da morbidade e, conseqüentemente, da mortalidade relacionada à infecção pelo patógeno (Rigos et al., 2015). Em geral, os microrganismos Gram-positivos, como *Bacillus anthracis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus viridans*, são sensíveis à lincomicina e à clindamicina. No presente estudo, foi observado que a cepa de *S. agalactiae* usada na infecção experimental apresentou-se sensível à lincomicina de acordo com a CLSI (2019), levando à formação de um halo de inibição de 44mm. Resultado semelhante foi observado por vários outros autores (Laite et al., 2017; Guérin-Faubleé et al., 2002; Soumya, et al., 2022), que observaram suscetibilidade de cepas de *S. agalactiae* frente ao antibacteriano lincomicina. Tais achados podem sugerir que a lincomicina seja um antibacteriano adequado para controle de infecções ocasionadas por *S. agalactiae* em tilápias do Nilo, já que de acordo com Ma et al. (2020), estratégias de prevenção e tratamento com antibióticos rotineiramente têm sido relatadas como as mais eficazes para controlar a infecção de *S. agalactiae* em criações comerciais de tilápias.

Os parâmetros hematológicos são considerados uma ferramenta fundamental para avaliar o estado de saúde dos peixes, e esses indicadores são alterados por diversos fatores, como estressores, infecções, alta densidade de estocagem, contaminação ambiental, entre outros (Costa et al., 2022). Além disso, a fisiologia e o metabolismo dos peixes podem ser significativamente afetados por infecções bacterianas, alterando a concentração de hemoglobina e a contagem de glóbulos vermelhos, que estão relacionados a um desequilíbrio no transporte de O₂ e CO₂ no sangue dos peixes (Kim et al., 2021). No presente estudo, as tilápias tratadas com a menor dose de lincomicina e as do grupo controle, apresentaram diminuição de eritrócitos e hemoglobina, assim como observado por Martis et al. (Martins et al., 2011), que relataram essa diminuição significativa em tilápia do Nilo, sob infecção por *Streptococcus iniae*. Esses achados são consistentes com este estudo, realçando o efeito antibacteriano do fármaco aqui utilizado, visto que não

foram observadas essas alterações nos animais submetidos a maior concentração (40mg) de lincomicina.

Os leucócitos são componentes importantes do sistema imunológico dos peixes, que possuem várias funções imunológicas, como fagocitose para polimorfonucleares e monócitos / macrófagos e produção de anticorpos por linfócitos B (Yousefi et al., 2021). Além disso, neutrófilos e monócitos circulam na corrente sanguínea e migram para os tecidos onde participam da imunidade inespecífica e podem destruir patógenos, como bactérias, por meio de fagocitose (Zhu e Su, 2022). Em mamíferos, os locais de inflamação acometidos por agentes infecciosos estimulam maior recrutamento dessas células, fazendo com que a medula óssea produza mais leucócitos a partir de células maduras e progenitoras sanguíneas para atender a demanda de leucócitos circulantes (Havixbeck et al., 2016). Neste estudo, foi observado uma diminuição leucócitos totais por influência da diminuição de linfócitos, neutrófilos e monócitos nos animais tratados com o lincomicina quando comparado aos animais controle. Moraes (2017) também observou uma diminuição similar em estudo da eficácia terapêutica da amoxicilina para o tratamento de estreptococose em tilápias do Nilo. A lincomicina com seu efeito antibacteriano possivelmente atenuou a resposta inflamatória havendo a menor necessidade de recrutamento celular, por outro lado, os leucócitos aumentados no grupo controle resultariam da indução do sistema de defesa não específico (Panigrahi et al., 2005) e/ou fagocitose aumentada e atividade citotóxica (Picchiatti et al., 2007).

O oxigênio molecular é um composto indispensável para todos os organismos aeróbicos, uma vez que este elemento é crítico para produção de energia, porém, é um potente oxidante, que pode levar ao estresse oxidativo (Biller e Takahashi, 2018). A produção de espécies reativas de oxigênio e os radicais livres resultantes são cruciais para a defesa do organismo e seus subprodutos são considerados potentes bactericidas que atuam ativamente na destruição de patógenos invasivos (Dong et al., 2017). Isto explica o ocorrido no presente estudo, visto que, a produção de EROs aumentou significativamente em tilápias controle e tratadas com a menor dose do fármaco (10mg) após estímulos bacterianos com a *S. agalactiae*, quando comparados aos animais tratados com as doses mais altas da lincomicina (40 e 20mg). Gong et al. (2020) verificaram esse aumento após a infecção bacteriana por

Vibrio alginolyticus em zebrafish, no entanto, quando tratados com triptofano apresentaram uma redução significativa de EROs, corroborando com os resultados obtidos no estudo. Dananjaya et al. (2016), avaliaram o efeito antimicrobiano de nanocomposto de prata de quitosana em *Aliivibrio salmonicida* em peixes e identificaram diminuição de EROs, desse modo, os resultados observados em ambos os estudos sugerem que esta diminuição possa ser devido a maior morte celular bacteriana e consequente menor estímulo para a produção de EROS com atividade bactericida.

A indução da resposta imune humoral é altamente desejável para proteger o hospedeiro eficientemente contra a invasão de patógenos (Li et al., 2014). Devido à falta de um homólogo de IgG e de um mecanismo de troca de classe em peixes teleósteos, os principais tipos de respostas de anticorpos no soro de peixes são mediados principalmente por IgM (Yao et al., 2019; Carapetis et al., 2014). Os anticorpos podem facilitar a fagocitose de patógenos por opsonização e ativar a via clássica do complemento em peixes, fornecendo um fator favorável contra a invasão de patógenos (Rauta e Nayak, 2012). De acordo com Jautova et al. (2003), existe uma interação entre a clindamicina (pertencente ao grupo da lincomicina) e as células fagocíticas, essa interação resulta da penetração direta do antibacteriano nos fagócitos ou da modificação indireta da bactéria alvo antes de sua fagocitose.

Neste estudo, a produção de anticorpos anti-*S. agalactiae* específicos pode ser associada à eficácia da lincomicina. O nível de proteção em peixes tratados contra *S. agalactiae* correspondeu ao nível de anticorpos produzidos contra o patógeno, podendo ser observado através do teste de ELISA indireto, que mostrou que as tilápias tratadas com o antibacteriano tiveram aumento na produção de anticorpos anti-*S. agalactiae*, quando comparados ao grupo controle. Associado a este achado, foi observado também que os animais submetidos as maiores concentrações de lincomicina apresentavam-se bem clinicamente, com baixa/nenhuma mortalidade e sem sinais clínicos característicos de estreptococose, evidenciando possivelmente, que a lincomicina, em adição a sua atividade antimicrobiana, possa exercer um efeito imuno-modulador positivo sobre a resposta imune humoral para peixes teleósteos.

4.2. *Aeromonas hydrophila*

O antibiograma é um teste que oferece como resultado padrões de resistência ou susceptibilidade de uma bactéria específica a vários antimicrobianos, auxiliando na eficácia do tratamento e evitando sua utilização de forma inadequada (Bourély et al., 2018). A lincomicina é uma lincosamida semissintética bacteriostática, tendo eficácia no tratamento de infecções causadas por muitos cocos Gram-positivos aeróbicos e anaeróbicos (Rodrigues et al., 2020). Por outro lado, os microrganismos Gram-negativos como *E. coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella* sp., são geralmente resistentes à lincomicina e à clindamicina. No presente estudo, foi observado que a cepa de *A. hydrophila* apresentou-se resistente à lincomicina de acordo com a CLSI (2019), não havendo formação de halo de inibição. O alto nível de resistência das cepas de *Aeromonas* aos antibióticos lincosamidas também foi documentado em estudos anteriores (Bourély et al., 2020; De Silva et al., 2021; Stratev et al., 2013). A alta resistência dessa bactéria a esses antibióticos ocorre porque as lincosamidas inibem eficientemente o crescimento de bactérias Gram-positivas, principalmente formas estafilocócicas e estreptocócicas, mas têm baixa atividade contra muitas bactérias Gram-negativas, como as bactérias *Aeromonas* (Perliński et al., 2021). De acordo com Lüthje e Schwarz (2007), a resistência bacteriana aos antibióticos lincosamidas pode ser devida à modificação do local alvo, mecanismos de efluxo ativos, mutações e inativação enzimática das drogas. Possivelmente, nossos resultados também indicaram que a cepa de *A. hydrophila* foi capaz de seguir pelo menos um dos mecanismos de resistência mencionados acima, por apresentar resistência a lincomicina no antibiograma. Tais achados podem sugerir que a lincomicina não seja um antibacteriano de predileção para controle de infecções ocasionadas por *A. hydrophila* em tilápias do Nilo.

Tilápias tratadas com a menor dose da lincomicina e do grupo controle apresentaram diminuição de eritrócitos e hemoglobina. Isso pode ser atribuído à intensa atividade hemolítica da aerolisina e da β -hemolisina produzidas por *A.*

hydrophila e que possuem atividades líticas nos eritrócitos levando à anemia (Pal et al., 2015).

O Burst oxidativo é uma via metabólica que se encontra não ativada nas células entretanto, pode ser ativado após a entrada do patógeno no meio interno do organismo hospedeiro e este mecanismo possui a função de produzir compostos oxidantes que atuam na destruição de microrganismos (Farias et al., 2016). Recentemente, várias evidências têm demonstrado o envolvimento do estresse oxidativo na fisiopatologia de doenças infecciosas bacterianas em peixes (Baldissera et al., 2018). No presente estudo, os peixes dos grupos controle e tratado com 10mg de lincomicina apresentaram um aumento significativo de EROs, quando comparado aos animais submetidos ao tratamento com 40 e 20mg desse antimicrobiano, de modo que, a avaliação do “burst” respiratório de leucócitos das tilápias, demonstra o efeito antibacteriano da lincomicina por reduzir a carga infectante bacteriana, reduz o estímulo para a produção de EROs.

Os peixes possuem muitos mecanismos humorais e celulares inespecíficos e específicos para resistir às doenças bacterianas (Ellis, 1999). Os anticorpos se constituem em uma defesa humoral específica ao inibir a adesão bacteriana, ou a invasão de células hospedeiras não fagocíticas e também neutralizar as toxinas e outros fatores de virulência bacterianos (Magnadottir, 2010). No presente estudo, animais do grupo controle apresentaram um aumento de anticorpos anti-*A. hydrophila*, o que pode ser atribuído a uma limitação do protocolo da infecção experimental com esta bactéria que ocorreu, pois, restaram apenas três peixes sobreviventes do grupo controle após o desafio com *A. hydrophila*, o que possivelmente interferiu na análise estatística dos resultados das mensurações de anticorpos. Além disso, esses peixes remanescentes estavam bem clinicamente e não apresentavam sinais característicos de aeromonose, sugerindo a hipótese de que possuísem maior resistência à infecção bacteriana, já que apresentavam maiores quantidades de anticorpos. Ainda e de acordo com Sakai (1999) o lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias Gram-negativas atua como imunoestimulante para peixes, levando ao aumento da fagocitose, da produção de anticorpos e aumento da produção de ânion superóxido. Pode-se especular que as eventuais atividades imuno-modulatórias; ou no sentido de estimular ou de inibir respostas

imunes em grupos tratados com o antimicrobiano lincomicina dependam da interação com outros fatores e, principalmente, com componentes do próprio agente infeccioso envolvido e há diferenças marcantes, no caso das bactérias como *S. agalactiae* e *A. hydrophila*.

5. Conclusão

O estudo imunofarmacológico da administração via oral da lincomicina para tilápias do Nilo (*O. niloticus*), em seu conjunto, revelou o potencial deste antibacteriano para uso na tilapicultura, fornecendo resultados convincentes da eficácia terapêutica da lincomicina contra a infecção por *S. agalactiae*, ao revelar efeito dose-resposta para o controle desta infecção experimental, bem como na produção de anticorpos anti-*S. agalactiae*, confirmando a hipótese de que a ação antibacteriana da lincomicina auxiliou também os mecanismos de imunidade das tilápias tratadas, principalmente na dose de 40mg/kg. Entretanto, os achados para *A. hydrophila* sugerem que a lincomicina não é um antibacteriano de predileção para o controle da infecção por esta bactéria em tilápias do Nilo. Embora o mecanismo exato de aumento da resposta de anticorpos permaneça a ser elucidado, as presentes observações requerem uma investigação mais aprofundada do significado prático de tais fenômenos em termos de implicações e aplicações clínicas para a tilapicultura.

6. Referências

Anvisa – **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico**, Diretriz Aprovada — Sexta Edição. CLSI, v. 23, n. 2, 2014.

Ariede RB, Freitas MV, Agudelo JF, Borges CH, Lira LV, Yoshida GM, Hashimoto DT (2020). Genetic (co) variation between resistance to *Aeromonas hydrophila* and growth in tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Aquaculture**, v. 523, n.735225.

Assane IM, Gozi KS, Valladão GMR, Pilarski F (2019). Combination of antimicrobials as an approach to reduce their application in aquaculture: Emphasis on the use of

thiamphenicol/florfenicol against *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture**, v.507, p.238-245.

Baldissera MD, Souza CF, Parmeggiani B, Leipnitz G, Verdi CM, Santos RV, Baldisserotto B (2018). The disturbance of antioxidant/oxidant balance in fish experimentally infected by *Aeromonas caviae*: relationship with disease pathophysiology. **Microbial pathogenesis**, v. 122, p. 53-57.

Belo MAA, Souza DGF, Faria VP, Prado EJR, Moraes FR, Onaka EM (2013). Haematological response of curimbas *Prochilodus lineatus*, naturally infected with *Neoechinorhynchus curemai*. **Journal of fish biology**, v. 82, n. 4, p. 1403-1410.

Belo, MAA, Moraes JRED, Soares VE, Martins ML, Brum CD, Moraes FRD (2012). Vitamin C and endogenous cortisol in foreign-body inflammatory response in pacus. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 47, n.7, p. 1015-1021.

Biller JD, Takahashi LS (2018). Oxidative stress and fish immune system: phagocytosis and leukocyte respiratory burst activity. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.90, p. 3403-3414.

Bourély C, Fortané N, Calavas D, Leblond A, Gay É (2018). Why do veterinarians ask for antimicrobial susceptibility testing? A qualitative study exploring determinants and evaluating the impact of antibiotic reduction policy. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 159, p. 123-134.

Boyd CE (1990). Water Quality in Ponds for Aquaculture, Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University, AL, USA.

Carapetis JR, Jacoby P, Carville K, Ang SJJ, Curtis N, Andrews R (2014). Effectiveness of clindamycin and intravenous immunoglobulin, and risk of disease in contacts, in invasive group A streptococcal infections. **Clinical infectious diseases**, v. 59, n.3, p. 358-365.

Carneiro PCF, Urbinati EC (2001). Salt as a stress response mitigator of matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther), during transport. **Aquaculture Research**, v. 32, n. 4, p. 297-304.

Clissa PB, Orefice DP, Colombini M, Guimarães MC, Bach EE, Dias DC, Tachibana L (2021). Production of polyclonal antibodies anti-Igm of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* for standardization of immunoenzymatic assay. **Ars Veterinaria**. v. 37, n.1, p. 03-04.

CLSI– Manual de Antibiógrama, LaborClin, 2019. Disponível em: laborclin.com.br/wp-content/uploads/2019/05/Manual_antibiograma_2019.pdf

Costa C, Oliveira S, Aracati M, Rodrigues L, Colturato L, Montassier H, Belo M (2022). Clinical safety of treatment with zileuton, 5-lox inhibitor, during acute inflammatory reaction in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Ars Veterinaria**. v. 38, n. 1, p. 23-30.

Dananjaya SHS, Godahewa GI, Jayasooriya RGPT, Lee J, De Zoysa M (2016). Antimicrobial effects of chitosan silver nano composites (CAGNCs) on fish pathogenic *Aliivibrio* (*Vibrio*) *salmonicida*. **Aquaculture**, v.450, p. 422-430.

Davis MF, Pisanic N, Rhodes SM, Brown A, Keller H, Nadimpalli M, Heaney CD (2018). Occurrence of *Staphylococcus aureus* in swine and swine workplace environments on industrial and antibiotic-free hog operations in North Carolina, USA: A One Health pilot study. **Environmental research**, v.163, p. 88-96.

de Oliveira TF, Queiroz, GA, Teixeira JP, Figueiredo HCP, Leal CAG (2018). Recurrent *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) treated with florfenicol. **Aquaculture**, v. 493, p. 51-60.

De Silva LADS, Wickramanayake MVKS, Heo GJ (2021). Virulence and antimicrobial resistance potential of *Aeromonas* spp. associated with shellfish. **Letters in Applied Microbiology**. v. 73, n. 2, p. 176-186.

Dong M, Liang Y, Ramalingam R, Tang SW, Shen W, Ye R, Lam YW (2017). Proteomic characterization of the interactions between fish serum proteins and waterborne bacteria reveals the suppression of anti-oxidative defense as a serum-mediated antimicrobial mechanism. **Fish & shellfish immunology**, v.62, p.96-106.

Ellis AE (1999). Immunity to bacteria in fish. **Fish & shellfish immunology**, v. 9, n.4, p. 291-308.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). O Estado Mundial da Pesca e Aquicultura 2022 (SOFIA). <https://www.fao.org/3/cc0461en/online/sofia/2022/world-fisheries-aquaculture.html>. Acesso em. 25 de maio. 2022.

Farias THV, Levy-Pereira N, De Oliveira Alves L, De Carla Dias D, Tachibana L, Pilarski F, Ranzani-Paiva MJT (2016). Probiotic feeding improves the immunity of pacus, *Piaractus mesopotamicus*, during *Aeromonas hydrophila* infection. **Animal Feed Science and Technology**. v. 211, p. 137-144.

Fernandes DC, Eto SF, Funniceilli MI, Fernandes CC, Charlie-Silva I, Belo MA, Pizauro JM (2019). Immunoglobulin Y in the diagnosis of *Aeromonas hydrophila* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 500, p. 576-585.

Gong QY, Yang MJ, Yang LF, Chen ZG, Jiang M, Peng B (2020). Metabolic modulation of redox state confounds fish survival against *Vibrio alginolyticus* infection. **Microbial biotechnology**, v.13, n.3, p. 796-812.

Guérin-Faubleé V, Tardy F, Bouveron C, Carret G (2002). Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus* species isolated from clinical mastitis in dairy cows. **International journal of antimicrobial agents**. v. 19, n. 3, p. 219-226.

Havixbeck JJ, Rieger AM, Wong ME, Hodgkinson JW, Barreda DR (2016). Neutrophil contributions to the induction and regulation of the acute inflammatory response in teleost fish. **Journal of Leukocyte Biology, Chichester**, v. 99, n. 2, p. 241-252.

Hernandez E, Figueroa J, IRegui C (2009). Streptococcosis on a red tilapia, *Oreochromis sp.*: a case study. **Journal of Fish Diseases**. v. 32, p. 247- 52.

Jautova J, Dorko E, Pilipčinec E, Tkáčiková L (2003). Effect of vaccination therapy for acne, using a staphylococci antigenic complex in combination with clindamycin. **Folia microbiologica**, v.48, n.2, p.249-252.

Khan EA, Ma J, Xiaobin M, Jie Y, Mengyue L, Hong L, Liu A (2022). Safety evaluation study of lincomycin and spectinomycin hydrochloride intramuscular injection in chickens. **Toxicology Reports**, v. 9, p. 204-209.

Kim JH, Sohn S, Kim SK, Kim SR, Kim SK, Kim SM, Hur YB (2021). Effects on the survival rates, hematological parameters, and neurotransmitters in olive flounders,

Paralichthys olivaceus, reared in bio-floc and seawater by *Streptococcus iniae* challenge. **Fish & Shellfish Immunology**, v.113, p. 79-85.

Laith AA, Ambak MA, Hassan M, Sheriff SM, Nadirah M, Draman AS, Najjah M (2017). Molecular identification and histopathological study of natural *Streptococcus agalactiae* infection in hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Veterinary World**. v. 10, n. 1, p. 101.

Lee JH, Seo JS, Kim GW, Kwon MG, Kim DH, Park CI, Park J (2022). Effect of lincomycin, an injectable lincosamide antibiotic, against streptococcosis in cultured olive flounder *Paralichthys olivaceus* and its pharmacokinetic-pharmacodynamic profile. **Aquaculture**, v.548, n. 737667.

Li M F, Zhang BC, Li J, Sun L (2014). Sil: a *Streptococcus iniae* bacteriocin with dual role as an antimicrobial and an immunomodulator that inhibits innate immune response and promotes *S. iniae* infection. **PLoS One**, v.9, n.4.

Lüthje P, Schwarz S (2007). Molecular basis of resistance to macrolides and lincosamides among staphylococci and streptococci from various animal sources collected in the resistance monitoring program BfT-GermVet. **International journal of antimicrobial agents**, v. 29, n.5, p. 528-535.

Ma Y, Hao L, Liang Z, Ma J, Ke H, Kang H, Liu Z (2020). Characterization of novel antigenic vaccine candidates for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) against *Streptococcus agalactiae* infection. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 105, p. 405-414.

Magnadottir B (2010). Immunological control of fish diseases. **Marine biotechnology**, v.12, n.4, p. 361-379, 2010.

Manage, PM (2018). Heavy use of antibiotics in aquaculture; emerging human and animal health problems—a review.

Martins ML, Shoemaker CA, Xu D, Klesius PH (2011). Effect of parasitism on vaccine efficacy against *Streptococcus iniae* in Nile tilapia. **Aquaculture**, v. 314, n.1-4, p.18-23.

Moraes AC (2017). **Eficácia terapêutica, segurança clínica e ecotoxicológica da amoxicilina por via intramuscular para o tratamento de estreptococose em**

tilápias do Nilo. 2017. 87f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista - FCAV, Jaboticabal, 2017.

Natt MP, Herrick CA (1952). A new blood diluents for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. **Poultry Science** v. 31, p. 735-738.

OIE – World Organization for Animal Health 2015. OIE List of antimicrobial agents of veterinary importance. OIE - World Organization for Animal Health, Paris, 2015.

OIE – World Organization for Animal Health. Lista de agentes antimicrobianos importantes para la medicina veterinária (junio de 2021).<https://www.oie.int/app/uploads/2021/06/e-oie-lista-antimicrobianosjunio2021.pdf>.

Pal S, Ray SD, Homechaudhuri S (2015). Evaluation of in vivo non-specific immunity and oxidative stress in *Labeo rohita* (Hamilton, 1822) infected with *Aeromonas hydrophila* as biomarker for early diagnosis **Int J Fish Aquat Stud**,v. 3, n.1, 116-124.

Panigrahi A, Kiron V, Puangkaew J, Kobayashi T, Satoh S, Sugita H (2005). The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Aquaculture**, v. 243, n.1-4, p. 241-254, 2005.

Peixe BR (Associação Brasileira da Piscicultura). Anuario PeixeBR da piscicultura 2022.<https://www.peixebr.com.br/Anuario2022/.pdf>. Acesso em: 3 de jun. 2022.

Perliński P, Mudryk ZJ, Zdanowicz M (2021). Diversity and Antibiotic Resistance of *Aeromonas* in Inflow and Outflow Water in Carp Ponds.

Picchietti S, Mazzini M, Taddei AR, Renna R, Fausto, AM, Mulero V, Abelli L (2007). Effects of administration of probiotic strains on GALT of larval gilthead seabream: immunohistochemical and ultrastructural studies. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 22, n.1-2, p.57-67.

Pyörälä S, Baptiste KE, Catry B, Van Duijkeren E, Greko C, Moreno MA, Törneke K (2014). Macrolides and lincosamides in cattle and pigs: use and development of antimicrobial resistance. **The Veterinary Journal**, v. 200, n.2, p. 230-239.

Rauta PR, Nayak B, Das S (2012). Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: a model for higher organisms. **Immunology letters**, v.148, n.1, 23-33.

Revina O, Avsejenko J, Cirule D, Valdovska A (2017). Antimicrobial resistance of *Aeromonas* spp. isolated from the sea trout (*Salmo trutta* L.) in Latvia. **Res. Rural Dev**, v.1, p. 271-275.

Rigos G, Smith P (2015). A critical approach on pharmacokinetics, pharmacodynamics, dose optimisation and withdrawal times of oxytetracycline in aquaculture. **Reviews in Aquaculture**. v. 7, n. 2, p. 77-106.

Roberts RJ (2012). The bacteriology of teleosts. **Fish pathology**. p. 339-382.

Rodrigues FF, Morais MI, Melo IS, Augusto OS, Dutra MM, Costa SO, Machado RR (2020). Clindamycin inhibits nociceptive response by reducing tumor necrosis factor- α and CXCL-1 production and activating opioidergic mechanisms. **Inflammopharmacology**, v. 28, n. 2, p. 551-561.

Sakai M (1999). Current research status of fish immunostimulants. **Aquaculture**, v. 172, n.1-2, p. 63-92.

SAS Institute Inc. **SAS/STAT software changes and enhancements through computer program**. Release 8.9.3. Cary: SAS Institute, 2012.

Soumya Y, Srinivas M, Kavitha K, Srinithi K (2022). Antibigram of staphylococcal species isolated from canine pyometra.

Spížek J, Řezanka T (2017). Lincosamides: Chemical structure, biosynthesis, mechanism of action, resistance, and applications. **Biochemical pharmacology**, v. 133, p. 20-28.

Stratev D, Vashin I, Daskalov H (2013). Antimicrobial resistance of β -haemolytic *Aeromonas hydrophila* strains isolated from rainbow trouts (*Oncorhynchus mykiss*). **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**. v. 16, n. 4, p. 289-296.

Syed R, Masood Z, Hassan HU, Khan W, Mushtaq S, Ali, Ullah A (2022). Growth performance, haematological assessment and chemical composition of Nile tilapia,

Oreochromis niloticus (Linnaeus, 1758) fed different levels of Aloe vera extract as feed additives in a closed aquaculture system. **Saudi journal of biological sciences**, v.29, n.1, p. 296-303.

Wedemeyer G (1970). Stress of anesthesia with MS-222 and benzocaine in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, v.22, n.5.

Yao YY, Chen DD, Cui ZW, Zhang XY, Zhou YY, Guo X, Zhang Y (2019). A. Oral vaccination of tilapia against *Streptococcus agalactiae* using *Bacillus subtilis* spores expressing Sip. **Fish & shellfish immunology**, v. 86, p. 999-1008.

Yousefi M, Ghafarifarsani H, Hoseinifar SH, Rashidian G, Van Doan H (2021). Effects of dietary marjoram, *Origanum majorana* extract on growth performance, hematological, antioxidant, humoral and mucosal immune responses, and resistance of common carp, *Cyprinus carpio* against *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 108, p. 127-133.

Zdanowicz M, Mudryk ZJ, Perliński P (2020). Abundance and antibiotic resistance of *Aeromonas* isolated from the water of three carp ponds. **Veterinary Research Communications**. V. 44, n. 1, p. 9-18.

Zhu W, Su J (2022). Immune functions of phagocytic blood cells in teleost. **Reviews in Aquaculture**, v.14, n.2, p.630-646.