

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste trabalho será disponibilizado somente a partir de 03/02/2019.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**EFICÁCIA TERAPÊUTICA, SEGURANÇA CLÍNICA E
ECOTOXICOLÓGICO DA FOSFOMICINA EM TILÁPIAS,
Oreochromis niloticus, COM AEROMONOSE E
ESTREPTOCOCOSE**

Roberto Barbuio

Médico Veterinário

Mestre em Medicina Veterinária Preventiva

**Jaboticabal - SP
2017**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**EFICÁCIA TERAPÊUTICA, SEGURANÇA CLÍNICA E
ECOTOXICOLÓGICO DA FOSFOMICINA EM TILÁPIAS,
Oreochromis niloticus, COM AEROMONOSE E
ESTREPTOCOCOSE**

Roberto Barbuio

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio de Andrade Belo

Co-Orientador: Prof. Dr. Claudinei da Cruz

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de
Jaboticabal, como parte das exigências para
a obtenção do título de Doutor em Medicina
Veterinária (Patologia Animal)**

**Jaboticabal - SP
2017**

B241e Barbuio, Roberto
EFICÁCIA TERAPÊUTICA, SEGURANÇA CLÍNICA E
ECOTOXICOLÓGICA DA FOSFOMICINA EM TILÁPIAS, *Oreochromis
niloticus*, COM AEROMONOSE E ESTREPTOCOCOSE / Roberto
Barbuio. -- Jaboticabal, 2017
xvi, 66 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017
Orientador: Marco Antonio de Andrade Belo
Banca examinadora: Silvia Patrícia Carraschi de Oliveira, Wilson
Gomes Manrique, Eduardo Makoto Onaka, Annelise Carla Camplesi
dos Santos
Bibliografia

1. Aeromonose 2. Antimicrobiano 3. Estreptococose, 4.
Tilapicultura. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias.

CDU 639.31

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: EFICÁCIA TERAPÊUTICA, SEGURANÇA CLÍNICA E ECOTOXICOLÓGICA
DA POSFOMICINA EM TILÁPIAS, *Oreochromis niloticus*, COM
AEROMONOSE E ESTREPTOCOCOSE

AUTOR: ROBERTO BARBUIO

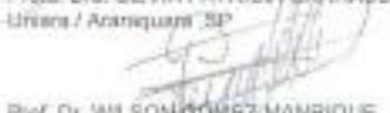
ORIENTADOR: MARCO ANTONIO DE ANDRADE BELO

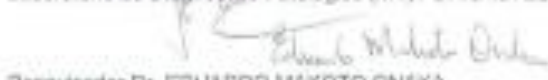
COORIENTADOR: CLAUDINEI DA CRUZ

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em MEDICINA
VETERINÁRIA - áreas: PATOLOGIA ANIMAL pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. MARCO ANTONIO DE ANDRADE BELO
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dra. SILVIA PATRICIA CARRASCHI DE OLIVEIRA
Unicamp / Aracaju, SP


Prof. Dr. WILSON GOMEZ MANRIQUE
Laboratório de Diagnóstico Patológico (MV) / UNICASTELO - Descalvado, SP


Pesquisador Dr. EDUARDO MAKOTO ONAKA
Instituto de Pesca / São José do Rio Preto, SP


Profa. Dra. ANELISE CARLA CAMPLESI DOS SANTOS
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 03 de fevereiro de 2017.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Roberto Barbuio - nascido em 14 de fevereiro de 1984 em Santa Rita do Passa Quatro/SP, filho de Maria Carolina Vercese e José Roberto Barbuio Médico Veterinário formado em 2008 pela Universidade Estadual Paulista - Unesp - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Câmpus de Jaboticabal. Atuou como clínico de 2009 a 2010 em clínicas veterinárias nas cidades de Ribeirão Preto e Franca - SP, Realizou mestrado de março de 2011 a fevereiro de 2013, sob orientação do Prof. Dr. Oswaldo Durival Rossi Júnior em Medicina Veterinária Preventiva pela mesma instituição, em 2013. No ano de 2013 ingressou como doutorando no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (Patologia Animal) da Universidade Estadual Paulista - Unesp - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Câmpus de Jaboticabal, Sob orientação do Prof. Dr. Marco Antonio de Andrade Belo.

Dedico aos meus pais Maria Carolina Vercese e José Roberto Barbuio e aos meus tios Marcius Tadeu Morandi e Maria Margarida Barbuio Morandi, os quais me proporcionaram as condições necessárias para a chegada até esse momento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Maria Carolina Vercese e José Roberto Barbuio pela dedicação, educação e atenção dadas a mim para que eu me torne uma pessoa melhor sempre.

Aos meus tios Marcius Tadeu Morandi e Maria Margarida Barbuio Morandi pelo incentivo e apoio

Às minhas irmãs Ana Carolina Barbuio e Carla Barbuio pelo companheirismo e exemplos

À minha noiva Juliana Olivencia Ramalho Nunes à qual em palavras é difícil descrever o quão sou grato por tudo o que ela me ajudou, ensinou, apoiou e incentivou e pelo companheirismo e amor dedicados a mim.

Ao meu orientador Marco Antonio de Andrade Belo pela honra dada a mim de sua orientação e pelos ensinamentos transmitidos.

Ao meu co-orientador Claudinei da Cruz por todos os ensinamentos, apoio, acolhimento e pela amizade que foram essenciais durante a minha pós graduação.

A todos os meus colegas de pós graduação que tiveram papel fundamental nesta jornada e em especial à Silvia Patrícia Carraschi e Vanessa Pavesi de Faria.

A Fapesp pelo bolsa de doutoramento processo fapesp 2013/11675-9.

A Unesp pelo apoio institucional.

Ao laboratório do Núcleo de Ensino e Pesquisas Ambientais em Matologia (Nepeam), ao laboratório de microbiologia de alimentos do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e ao laboratório de toxicologia da Universidade Castelo Branco (Unicastelo) Campus de Descalvado - SP.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
Certificado de aprovação do CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais.....	xiv
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
CAPÍTULO 1. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	2
2.1. Objetivo Geral.....	2
2.2. Objetivos Específicos.....	2
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3.1. Fosfomicina.....	3
3.2. Tilapicultura intensiva no Brasil.....	4
3.3. <i>Aeromonas hydrophila</i>	5
3.4. <i>Streptococcus agalactiae</i>	6
4. REFERÊNCIAS.....	7
CAPÍTULO 2. AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DA FOSFOMICINA PARA TILÁPIA (<i>Oreochromis niloticus</i>) e ORGANISMOS NÃO ALVO.....	11
ABSTRACT.....	11
RESUMO.....	11
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1. Toxicidade aguda da fosfomicina para peixes.....	13
3.2. Toxicidade aguda para o caramujo <i>Pomacea canaliculata</i>	13
3.3. Toxicidade aguda para as plantas <i>Lemna minor</i> e <i>Azolla caroliniana</i>	13
3.4. Toxicidade aguda para <i>Daphnia magna</i>	13
3.5. Avaliação do risco de intoxicação ambiental.....	15

4. RESULTADOS.....	15
5. DISCUSSÃO.....	17
6. CONCLUSÃO.....	18
7. REFERÊNCIAS.....	18
CAPÍTULO 3. ESTUDO DA SEGURANÇA CLÍNICA DA FOSFOMICINA	
PARA	
TILÁPIA,	
<i>Oreochromis</i>	
<i>niloticus</i>	20
ABSTRACT.....	20
RESUMO.....	21
1. INTRODUÇÃO.....	22
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1 Fosfomicina.....	22
2.2 Tilapicultura intensiva no Brasil.....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1. Peixes e acondicionamento.....	23
3.2. Delineamento experimental.....	24
3.3. Padronização da ração com a adição de fosfomicina.....	24
3.4. Anestesia dos peixes.....	24
3.5. Avaliação hematológica.....	24
3.6. Avaliações comportamentais, sinais clínicos e mortalidade.....	24
3.7. Avaliação do bioquímico sérico.....	24
3.8. Avaliação morfométrica e histopatológica dos órgãos.....	24
3.9. Análise estatística.....	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
5. CONCLUSÃO.....	36
6. REFERÊNCIAS.....	36
CAPÍTULO 4. AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA TERAPÊUTICA DO	
ANTIMICROBIANO FOSFOMICINA, PARA O TRATAMENTO DE	
<i>Aeromonas hydrophila</i> E <i>Streptococcus agalactiae</i> EM TILÁPIAS DO	
NILO (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	
ABSTRACT.....	40

RESUMO.....	41
1. INTRODUÇÃO.....	42
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	42
2.1. Fosfomicina.....	43
2.2. Tilapicultura intensiva no Brasil.....	43
2.3. <i>Aeromonas hydrophila</i>	43
2.4. <i>Streptococcus agalactiae</i>	44
3. OBJETIVOS.....	44
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	44
4.1. Peixes e acondicionamento.....	44
4.2. Delineamento experimental.....	45
4.3. Padronização da ração com a adição de fosfomicina.....	45
4.4. Anestesia dos peixes.....	45
4.5. Isolamento da <i>Aeromonas hydrophila</i> e infecção experimental.....	45
4.6. Isolamento do <i>Streptococcus agalactiae</i> e infecção experimental.....	46
4.7. Avaliações comportamentais, sinais clínicos e mortalidade.....	46
4.8. Avaliação hematológica.....	46
4.9. Avaliação do bioquímico sérico.....	46
4.10. Avaliação morfométrica e histopatológica dos órgãos.....	46
4.11. Reisolamento dos patógenos	47
4.12. Análise estatística.....	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
5.1. Estudo de Eficácia Terapêutica com Desafio por <i>A. hydrophila</i>	47
5.2. Estudo de Eficácia Terapêutica com Desafio por <i>S. agalactiae</i>	55
6. CONCLUSÃO.....	62
7. REFERÊNCIAS.....	62

LISTA DE TABELAS

Página

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Distribuição das tilápias no estudo de segurança clínica.....	24
Tabela 2. Valores médios observados no estudo hematológico de tilápias tratadas com diferentes concentraçõesde fosfomicina.....	26
Tabela 3. Valores médios observados no estudo leucocitário de tilápias tratadas com diferentes concentraçõesde fosfomicina.....	27
Tabela 4. Valores médios observados no estudo bioquímico sanguíneo de tilápias tratadas com diferentes concentrações de fosfomicina.....	28
Tabela 5. Valores médios observados no estudo bioquímico sanguíneo de tilápias tratadas com diferentes concentrações de fosfomicina.....	29
Tabela 6. Valores médios observados na análise somática renal cranial e caudal (INS), hepática (IHS) e esplênica (IES) de tilápias tratadas com diferentes concentrações de fosfomicina.....	33

CAPÍTULO 4

Tabela 1 Distribuição das tilápias no estudo de eficácia terapêutica.....	45
Tabela 2. Valores médios observados no estudo hematológico de tilápias infectadas com <i>A. hydrophila</i> e tratadas com 10mg/Kg de p.v. de fosfomicina.....	48
Tabela 3. Valores médios observados no estudo leucocitário de tilápias infectadas com <i>A. hydrophila</i> e tratadas com 10mg/Kg de p.v. de fosfomicina.....	48
Tabela 4. Valores médios observados no estudo bioquímico sanguíneo de tilápias infectadas com <i>A. hydrophila</i> e tratadas com 10mg/Kg de p.v. fosfomicina.....	49
Tabela 5. Valores médios observados no estudo bioquímico sanguíneo (dosagens de ALT, AST, FA e Creatinina) de tilápias infectadas com <i>A. hydrophila</i> e tratadas com 10mg/Kg de p.v. fosfomicina.....	50

Tabela 6. Valores médios observados na análise somática renal cranial e caudal (INS), hepática (IHS) e esplênica (IES) de tilápias infectadas com <i>A. hydrophila</i> e tratadas com 10mg/Kg de p.v. fosfomicina.....	53
Tabela 7. Valores médios observados no estudo hematológico de tilápias infectadas com <i>S. agalactiae</i> e tratadas com 10mg/Kg de p.v. de fosfomicina.....	55
Tabela 8. Valores médios observados no estudo leucocitário de tilápias tratadas com diferentes concentrações de fosfomicina.....	56
Tabela 9. Valores médios observados no estudo bioquímico sanguíneo de tilápias infectadas com <i>S. agalactiae</i> e tratadas com 10mg/Kg de p.v. fosfomicina.....	57
Tabela 10. Valores médios observados no estudo bioquímico sanguíneo (dosagens de ALT, AST, FA e Creatinina) de tilápias infectadas com <i>S. agalactiae</i> e tratadas com 10mg/Kg de p.v. fosfomicina.....	58
Tabela 11. Valores médios observados na análise somática renal cranial e caudal (INS), hepática (IHS) e esplênica (IES) de tilápias infectadas com <i>S. agalactiae</i> e tratadas com 10mg/Kg de p.v. fosfomicina.....	62

LISTA DE FIGURAS

Página

CAPÍTULO 2.

Figura 1. Aclimatação (A), pesagem e distribuição dos peixes nos aquários (B), administração da fosfomicina e avaliação por 2dias (C), Aclimatação (D), pesagem e distribuição dos caramujos nos aquários (E), administração da fosfomicina e avaliação por 2dias (F). Aclimatação (G), distribuição dos frondes nos recipientes (H), administração da fosfomicina e avaliação por 7 dias (I). Reprodução (J), Aclimatação (K), distribuição dos neonatos nos tubos de ensaio, administração da fosfomicina e avaliação por 2dias (L)..... 14

Figura 2. Média dos parâmetros de qualidade de água dos três ensaios definitivos com a tilápia (*Oreochromis niloticus*) 16

Figura 3. Média dos parâmetros de qualidade de água dos três ensaios definitivos com o caramujo (*Pomacea canaliculata*) 17

CAPÍTULO 3

Figura 1. (A) Sistema de tanques de alvenaria com capacidade de 400L (NEPEAM - UNESP), (B) Captura, (C) Anestesia dos peixes com benzocaína diluída em álcool 98°, (D) Venopunção de vaso caudal seringas com e sem anticoagulante, (E) Analisador bioquímico semi-automático (Modelo LabQuest – Bioplus), (F) Centrífuga de microhematócrito , (G) Microcentrífuga de "eppendorfs", (H) Morfometria, necropsia, (I) pesagem dos órgãos..... 25

Figura 2. Valores médios e ANOVA observados na análise sérica de creatinina das tilápias tratadas com fosfomicina. Médias seguidas por letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)..... 30

Figura 3. Fotomicrografia de corte histológico de fígado de tilápias, *O. niloticus*, submetidas a diferentes concentrações de fosfomicina. A. Tratamento T1, 2dias, B.Tratamento T2, 4dias e C. Tratamento T3, 8dias. Linha tracejada: perda da arquitetura dos cordões hepáticos, seta preta: núcleo picnótico, seta verde: degeneração hidrópica com necrose de hepatócitos, VC: veia centrolobular, seta branca: dilatação sinusóide hepática. Coloração H.E, aumento de 40x..... 31

Figura 4. Fotomicrografia em 40x de corte histológico de rim de tilápias, *O. niloticus*, submetidas a diferentes concentrações de fosfomicina. A. Tratamento T1, 2dias, B. Tratamento T2, 4dias e C. Tratamento T3, 8dias. A. Glomeruloesclerose difusa. Aderência do tufo glomerular ao folheto parietal (seta negra), isquemia glomerular (estrela). Túbulo necrótico (círculo), núcleos picnóticos (seta branca), redução lúmen tubular (seta vermelha), espessamento hialino do mesângio (seta amarela) B. Glomerulonefrite membranosa com necrose tubular. Isquemia glomerular (estrela), túbulos necróticos (círculo), núcleos picnóticos (seta branca), redução lúmen tubular (seta vermelha), espessamento hialino do mesângio (seta amarela), infiltrado inflamatório (I) C. Glomerulonefrite membranosa com necrose tubular. Isquemia glomerular (estrela), túbulos necróticos (círculo), núcleos picnóticos (seta branca), redução lúmen tubular (seta vermelha), espessamento hialino do mesângio (seta amarela), infiltrado inflamatório (I)..... 32

Figura 5. Fotomicrografia de corte histológico de baço de tilápias, *O. niloticus*, submetidas a diferentes concentrações de fosfomicina. A. Tratamento T1, 2dias, B. Tratamento T2, 4dias e C. Tratamento T3, 8dias. Centro de melanomacrófagos (seta branca), melanomacrófago livre (seta preta)..... 35

Figura 6. Valores médios observados no estudo de qualidade de água de tilápias tratadas com fosfomicina..... 36

CAPÍTULO 4

Figura 1. Semeadura em meio de cultura (A), obtenção do "pellet" por centrifugação (B) e inóculo (C)..... 46

Figura 2. Necropsia dos peixes (A), "imprinting" dos órgãos nas placas (B) e crescimento colônias e seleção para testes bioquímicos (C)..... 47

Figura 3. Fotomicrografia de corte histológico de fígado de tilápias, *O. niloticus*, desafiadas com *Aeromonas hydrophila* e tratadas com 10mg/p.v. fosfomicina. A. Tratamento T1, 2 dias, B. Tratamento T2, 2 dias, C. Tratamento T1, 4 dias, D. Tratamento T2, 4 dias, E. Tratamento T1, 8 dias, F. Tratamento T2, 8 dias, G. Tratamento T1, 12 dias, H. Tratamento T2, 1Basal. Linha tracejada: perda da arquitetura dos cordões hepáticos, seta preta: núcleo picnótico seta verde: degeneração hidrópica com necrose de hepatócitos, VC: veia centrolobular, seta branca: dilatação sinusóide hepática. Coloração H.E, aumento de 40x..... 51

Figura 4. Fotomicrografia de corte histológico de rim de tilápias, *O. niloticus*, desafiadas com *Aeromonas hydrophila* e tratadas com 10mg/p.v. fosfomicina A. Tratamento T1, 2 dias, B. Tratamento T2, 2 dias, C. Tratamento T1, 4 dias, D. Tratamento T2, 4 dias, E. Tratamento T1, 8 dias, F. Tratamento T2, 8 dias, G. Tratamento T1, 12 dias, H. Tratamento T2, 1Basal. Coloração H.E, aumento de 40x. Aderência do tufo glomerular ao folheto parietal (seta negra), isquemia glomerular (estrela). Túbulo necrótico (círculo), núcleos picnóticos (seta branca), redução lúmen tubular (seta vermelha), espessamento hialino do mesângio (seta amarela) B. Glomerulonefrite membranosa com necrose tubular. Isquemia glomerular (estrela), túbulos necróticos (círculo), núcleos picnóticos (seta branca), redução lúmen tubular (seta vermelha), espessamento hialino do mesângio (seta amarela), infiltrado inflamatório (I) C. Glomerulonefrite membranosa com necrose tubular. Isquemia glomerular (estrela), túbulos necróticos (círculo), núcleos picnóticos (seta branca), redução lúmen tubular (seta vermelha), espessamento hialino do mesângio (seta amarela), infiltrado inflamatório (I), retração glomerular (seta amarela)..... 52

Figura 5. Fotomicrografia de corte histológico de baço de tilápias, *O. niloticus*, desafiadas com *Aeromonas hydrophila* e tratadas com 10mg/p.v. fosfomicina. A. Tratamento T1, 2 dias, B. Tratamento T2, 2 dias, C. Tratamento T1, 4 dias, D. Tratamento T2, 4 dias, E. Tratamento T1, 8 dias, F. Tratamento T2, 8 dias, G. Tratamento T1, 12 dias, H. Tratamento T2, 1Basal. Coloração H.E, aumento de 40x. Centro de melanomacrófagos (seta branca), melanomacrófago livre (seta preta)..... 54

Figura 6. Fotomicrografia de corte histológico de fígado de tilápias, *O. niloticus*, desafiadas com *Streptococcus agalactiae* e tratadas com 10mg/p.v. fosfomicina. A. Tratamento T3, 2 dias, B. Tratamento T4, 2 dias, C. Tratamento T3, 4 dias, D. Tratamento T4, 4 dias, E. Tratamento T3, 8 dias, F. Tratamento T4, 8 dias, G. Tratamento T3, 12 dias, H. Tratamento T4, 1Basal. Linha tracejada: perda da arquitetura dos cordões hepáticos, seta preta: núcleo picnótico seta verde: degeneração hidrópica com necrose de hepatócitos, VC: veia centrolobular, seta branca: dilatação sinusóide hepática. Coloração H.E, aumento de 40x..... 59

Figura 7. Fotomicrografia de corte histológico de rim de tilápias, *O. niloticus*, desafiadas com *Streptococcus agalactiae* e tratadas com 10mg/p.v. fosfomicina. A. Tratamento T3, 2 dias, B. Tratamento T4, 2 dias, C. Tratamento T3, 4 dias, D. Tratamento T4, 4 dias, E. Tratamento T3, 8 dias, F. Tratamento T4, 8 dias, G. Tratamento T3, 12 dias, H. Tratamento T4, 1Basal. Coloração H.E, aumento de 40x. Aderência do tufo glomerular ao folheto parietal (seta negra), isquemia glomerular (estrela). Túbulo necrótico (círculo), núcleos picnóticos (seta branca), redução lúmen tubular (seta vermelha), espessamento hialino do mesângio (seta amarela) B. Glomerulonefrite membranosa com necrose tubular. Isquemia glomerular (estrela), túbulos necróticos (círculo), núcleos picnóticos (seta branca), redução lúmen tubular (seta vermelha), espessamento hialino do mesângio (seta amarela), infiltrado inflamatório (I) C. Glomerulonefrite membranosa com necrose tubular. Isquemia glomerular (estrela), túbulos necróticos (círculo), núcleos picnóticos (seta branca), redução lúmen tubular (seta vermelha), espessamento hialino do mesângio (seta amarela), infiltrado inflamatório (I), retração glomerular (seta amarela)..... 60

Figura 8. Fotomicrografia de corte histológico de baço de tilápias, *O. niloticus*, desafiadas com *Streptococcus agalactiae* e tratadas com 10mg/p.v. fosfomicina. A. Tratamento T3, 2 dias, B. Tratamento T4, 2 dias, C. Tratamento T3, 4 dias, D. Tratamento T4, 4 dias, E. Tratamento T3, 8 dias, F. Tratamento T4, 8 dias, G. Tratamento T3, 12 dias, H. Tratamento T4, 1Basal. Coloração H.E, aumento de 40x. Centro de melanomacrófagos (seta branca), melanomacrófago livre (seta preta)..... 61



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



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 01979/14 do trabalho de pesquisa intitulado "Estudo de eficácia terapêutica, segurança clínica e ecotoxicológica do antibiótico fosfomicina, administrado via oral, para o tratamento de *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae* em tilápias do nilo, *Oreochromis niloticus*", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marco Antonio de Andrade Belo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 11 de março de 2014.

Jaboticabal, 11 de março de 2014.


Prof.ª Dr.ª Paola Castro Moraes
Coordenadora - CEUA

ESTUDO DE EFICÁCIA TERAPÊUTICA, SEGURANÇA CLÍNICA E ECOTOXICOLÓGICO DA FOSFOMICINA, NO TRATAMENTO DE AEROMONOSE E STREPTOCOCOSE EM TILÁPIAS (*Oreochromis niloticus*)

RESUMO - O presente estudo teve por objetivos avaliar a eficácia terapêutica a segurança clínica e ecotoxicológica do antimicrobiano fosfomicina para o tratamento de aeromonose e streptococose em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Para tal, a segurança clínica foi avaliada com as doses de 10, 20 e 40 mg de fosfomicina.kg⁻¹; os estudos de eficácia com a dose terapêutica de 10 mg de fosfomicina.kg⁻¹, foram conduzidos com peixes desafiados com *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae*; os ensaios de ecotoxicidade foram feitos para a determinação de CL₅₀ em peixes (*O. niloticus*) e plantas aquáticas (*Lemna minor*) e de CE₅₀ para crustáceos (*Daphnia magna*) e moluscos (*Pomacea canaliculata*). Nos estudos foram utilizadas tilápias de 112g ± 5,6g, acondicionadas em tanques de 400 L (n=10). Ambos os estudos de eficácia terapêutica com 10 mg.kg⁻¹ demonstraram a eficácia para *A. hydrophila* e *S. agalactiae*, pois nas análises de reisolamento destes microrganismos não ocorreu crescimento dos mesmos em amostras de fígado, rim, baço e cérebro dos peixes tratados quando comparados aos grupos infectados e não tratados nos quais o número de unidades formadoras de colônias (UFC) foi de 7,6 ± 2,4 por placa. Na infecção por *A. hydrophila* apresentaram microcitose e linfopenia, assim como, trombocitose na fase inicial da infecção seguida de trombocitopenia. Lesões nos tecidos hepáticos e renais corroboraram as alterações da atividade enzimática sérica de ALT, AST, FA e nos níveis de creatinina, colesterol e triglicerídeos. Na infecção por *S. agalactiae* apresentaram diminuição do número de eritrócitos e dos valores percentuais de hematócrito, caracterizando quadro de hemólise, associado à linfopenia, trombocitopenia e neutrofilia na fase inicial da infecção. Verificou-se correlação entre as lesões nos tecidos hepáticos e renais aos valores séricos de ALT, AST, FA e nos níveis de creatinina. Nos ensaios ecotoxicológicos para peixe (*O. niloticus*), molusco (*P. canaliculata*), microcrustáceo (*D. magna*) e macrófitas (*L. minor* e *A. caroliniana*), os resultados demonstraram segurança ecotoxicológica da fosfomicina sendo considerada praticamente não tóxica para estes organismos (CL e CE₅₀ > 100,0 mg.L⁻¹). A formulação Fosfomicin C[®] atenuou as alterações patológicas em peixes infectados quando comparado aos não infectados. Porém essa mesma formulação causou alterações no estudo de segurança clínica. Os estudos demonstram a viabilidade do uso da fosfomicina na dose 10 mg.kg⁻¹ para basal da estreptococose e aeromonose na tilapicultura, porém existe a necessidade de testar o antibiótico puro, para verificar se as alterações observadas foram causadas pelo antibiótico ou por algum outro componente.

Palavras-chaves: *Aeromonas* sp., *Streptococcus* sp., antimicrobiano, histopatologia.

STUDY OF THERAPEUTIC EFFECTIVENESS, CLINICAL AND ECOTOXICOLOGICAL SAFETY OF PHOSPHIMYCIN, IN THE TREATMENT OF AEROMONOSIS AND STREPTOCOCCOSIS IN TILAPIA (*Oreochromis niloticus*)

ABSTRACT - The present study aimed to evaluate the therapeutic efficacy of clinical and ecotoxicological safety of antimicrobial fosfomicin for the treatment of aeromonose and streptococcosis in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). For this, clinical safety was evaluated with doses of 10, 20 and 40 mg of fosfomicin.kg-1; Efficacy studies with the therapeutic dose of 10 mg of fosfomicin.kg-1 were conducted with fish challenged with *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus agalactiae*; The ecotoxicity assays were performed for the determination of LC50 in fish (*O. niloticus*) and aquatic plants (*Lemna minor*) and EC50 for crustaceans (*Daphnia magna*) and molluscs (*Pomacea canaliculata*). In the studies, tilapia of 112 g $\pm$ 5.6 g were used, packed in 400 L tanks (n = 10). Both therapeutic efficacy studies with 10 mg.kg-1 demonstrated efficacy for *A. hydrophila* and *S. agalactiae*, because in the reisolation analyzes of these microorganisms there was no growth in liver, kidney, spleen and brain samples of treated fish, While in the infected and untreated groups, mean growth was greater than ten colony forming units (CFU) per plaque. In the *A. hydrophila* infection they presented microcytosis and lymphopenia, as well as thrombocytosis in the initial phase of infection followed by thrombocytopenia. Liver and renal tissue damage corroborated the changes in serum enzyme activity of ALT, AST, FA and creatinine, cholesterol and triglyceride levels. In *S. agalactiae* infection, there was a decrease in the number of erythrocytes and percentage values of hematocrit, characterizing hemolysis, associated with lymphopenia, thrombocytopenia and neutrophilia in the initial phase of infection. There was a correlation between hepatic and renal tissue damage in serum ALT, AST, AF, and creatinine levels. In the ecotoxicological assays for fish (*O. niloticus*), mollusc (*P. canaliculata*), microcrustaceans (*D. magna*) and macrophytes (*L. minor* and *A. caroliniana*), the results demonstrated ecotoxicological safety of fosfomicin being considered practically non-toxic for these Organisms (CL and EC 50 > 100.0 mg.L-1). The Fosfomicin C® formulation attenuated pathological changes in infected fish compared to uninfected fish. However, the same formulation caused changes in the clinical safety study. The studies demonstrate the feasibility of using fosfomicin at a dose of 10 mg.kg-1 for streptococcal and aeromonose control in tilapicultura, but there is a need to test the pure antibiotic to verify if the observed changes were caused by the antibiotic or some other component.

Keywords: *Aeromonas* sp., *Streptococcus* sp., antimicrobial, histopathology.

CAPÍTULO 1 - Considerações Gerais

1. Introdução

A aquicultura tem cada vez mais adquirido importância no mercado mundial (FAO, 2016) e o Brasil possui um imenso potencial para o desenvolvimento desta atividade (MPA, 2010).

Neste contexto, o cultivo mundial de algumas espécies de peixes vem crescendo significativamente e dentre estas, destacam-se as tilápias, pelas características favoráveis à produção e boa aceitação pelo consumidor (MPA, 2010).

A manipulação dos ecossistemas aquáticos para a maximização da produtividade traz consigo inúmeros desafios, dentre eles as doenças bacterianas. 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 às mais diversas enfermidades (HIRSCH et al, 2006). Neste preceito, agentes etiológicos que causam aparentemente poucos danos às populações de peixes em seu habitat natural, podem tornar-se agentes precursores de doenças de grande importância econômica quando submetidos às condições de criação (YOUSEFIA; AMIRI, 2009). Com isso, o uso de fármacos na aquicultura para o tratamento de doenças é inevitável durante o ciclo produtivo.

Por outro lado, poucos são os antimicrobianos aprovados para o uso em aquicultura, de acordo com Food and Drug Administration (FDA), órgão regulamentador do uso de drogas nos Estados Unidos, apenas a oxitetraciclina e florfenicol podem ser adicionados a ração e usados no basal de enfermidades bacterianas em aquicultura (FDA, 2012). Neste contexto, o baixo nível de resíduo na carcaça, segurança clínica aos animais e ao ambiente aquático são propriedades importantes que devem estar associadas à eficácia no basal antimicrobiano, tornando extremamente complexo os processos de aprovação de novos fármacos (FDA, 2012).

De acordo com a Resolução XXVIII da 75ª sessão geral da comissão internacional da Organização Mundial de Sanidade Animal (OIE) que define a lista

de antimicrobianos de importância na medicina veterinária, a fosfomicina pode ser empregada no basal bacteriano de aves, suínos e bovinos, apresentando grande potencial para o uso em peixes, no entanto, necessitando do delineamento de protocolos terapêuticos eficazes para seu uso em organismos aquáticos (OIE, 2007).

A fosfomicina é um antimicrobiano que vem sendo empregado com sucesso na avicultura e suinocultura, administrado na água ou na ração dos animais, apresentando amplo espectro de ação antimicrobiana (GUTIERREZ et al., 2010). No entanto, outro fator extremamente relevante, quando se estuda a administração exógena de compostos farmacológicos, é a inocuidade dos mesmos. Pois, aliado à sua atividade terapêutica, estas formulações devem oferecer segurança clínica aos animais. Segundo Klaassen (2006), toda substância é potencialmente tóxica, sendo a dose correta o que diferencia o remédio do tóxico.

Partindo-se da importância patogênica da aeromonose e estreptococose para a tilapicultura, associado à necessidade de desenvolvimento de programas sanitários eficazes para controlar estas enfermidades em plantéis aquícolas, além de avaliar os possíveis danos ao meio ambiente, estudos relacionados à utilização de novos fármacos se fazem necessários.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

O presente estudo teve por objetivos avaliar a eficácia terapêutica, segurança clínica e ecotoxicológica do antibiótico fosfomicina.

2.1.1. Objetivos Específicos

Avaliar a ecotoxicidade da fosfomicina para o peixe alvo de tratamento *Oreochromis niloticus* e os organismos não alvos: *Danio rerio*, *Pomacea canaliculata*, *Lemna minor* e *Azolla caroliniana* e *Daphnia magna*.

Avaliar a segurança clínica da fosfomicina nas concentrações de 10, 20 e 40 mg.Kg⁻¹ em tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus*.

6. CONCLUSÃO

O antimicrobiano fosfomicina foi eficaz para o controle das duas espécies de bactérias *A. hydrophila* e *S. agalactiae* utilizadas nestes estudos, sendo necessários outros estudos para o ajuste da concentração ideal a ser utilizada em campo e do período residual deste antimicrobiano.

7. REFERÊNCIAS

Abeyta Jr, C., Kaysner C.A., Wekell M.M., Sullivan Stelma, G.N. 1989. Recovery of *Aeromonas hydrophila* from oysters implicated in an outbreak of foodborne illness. Journal of Food Protection, 49: 643-646.

Alexandrino, A.C., Okumuro M.P.M., Baldassi, L, Araujo, A.P., Kurodo, C.K., Araujoc. K., Walkasa, Y.S. 2000. Ocorrência de *Aeromonas hydrophila* em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) em cultivo intense-relato de caso. Bol. Inst. Pesca, 26(1): 111-117.

- Austin, B, Austin, D.A. 1999. Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish. Chichester: Springer Praxis, 3rd Edition, 459.
- Baylan, O. 2010. Fosfomicin: Past, Present And Future. Mikrobiyol Bul, 44: 311–321.
- Belo, M.A.A., Soares, V.E., Souza, L.M., Sobreira, M.F.R., Cassol, D.M.S., Toma, S.B. 2012. Hepatoprotective treatment attenuates oxidative damages induced by carbon tetrachloride in rats. Exp Toxicol Pathol, 64: 155-165.
- Belo, M.A.A., Moraes, F. R., Yoshida, L., Prado, E.J.R., Moraes, J.R.E., Soares, V.E., Silva, M.G., 2014. Deleterious effects of low level of vitamin E and high stocking density on the hematology response of pacu, during chronic inflammatory reaction. Aquaculture, 422-423: 124-128.
- Belo, M. A. A., Souza, D. G. F., Faria, V.P., Prado, E. J. R., Moraes, F. R., Onaka, E. M. 2013. Haematological response of curimbas *prochilodus lineatus*, naturally infected with *Neoechinorhynchus curemai*. J Fish Biol, 82: 1403-1410.
- Bergogne-Berezin E., Muller-Serieys C., Joly-Guillou M.L., Dronne N. 1987. Trometamol-Fosfomicin (Monuril). bioavailability and food-drug interactions. Eur Urol, 13 (Suppl): 64–68.
- Brown, E.D., Vivas, E.I., Walsh, C.T., Kolter, R. Mura (Murz), 1995. The enzyme that catalyzes the first committed step in peptidoglycan biosynthesis, is essential in *Escherichia coli*". J Of Bacteriol. 177(14): 4194–4197.
- Buchanan, R.L., Palumbo, S.A. 1985. *Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas sobria* as potential food poisoning species: a review. sobria como intoxicação alimentar espécies potenciais.Revisão. J Food Safety. 7: 15–29.
- Bunch, E. C., Bejerano, I. 1997. The effect of environmental factors on the susceptibility of hibrid tilapia *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus* to streptococcosis. Israeli J. Aquaculture, 49(2): 67-76.
- Carneiro, P.C.F., Urbinati, E.C. 2001. Salt as stress response mitigator of matrinxã *Brycon cephalus* during transport. Aquac Res, 32: 297-304.
- Castro, M.P. 2014. Acute aerocystitis in nile tilapia bred in net cages and supplemented with chromium carbochelatate and *Saccharomyces cerevisiae*. Fish Shellfish Immunol. 31: 284-290.
- Cipriano, R. 2001. *Aeromonas hydrophila* and motile aeromonad septicemias of fish. In: Fish diseases of Leaflet. United States Department of the Interior. Fish and Wildlife service Division of Fishery Research, Washington, p. 68.
- Claudiano G.S., Petrillo T.R., Manrique W.G., Castro M.P., Loureiro B.A., Marcusso P.F., Belo M.A.A., Moraes J.R.E., Moraes F.R. 2013. Acute aerocystitis in *Piaractus mesopotamicus*: participation of eicosanoids and pro-inflammatory cytokines, Fish Shellfish Immunol., 34: 1057–1062.
- Clauss, T.M., Dove, A. D.M., Arnold, J.E. 2008. Hematology disorders of fish. Vet Veterinary Clinics: Exotic Animal, 11: 445-462.
- Conroy, G., Conroy, D.A. 2004. Patología de Tilápias: Una Reseña General. In M.J.T. Ranzani-Paiva, R.M. Takemoto, M.A.P. Lizama, Editores. San De Org Aquat, Livraria Varela, São Paulo, Brasil, Sp. 221-253.
- Dooley, J.S.H., Trust, T.J. 1988. Surface protein composition of *Aeromonas hydrophila* virulent for fish: identification of an S-Layer protein. J. Bacteriol., 170: 499-506.
- Evans, J. J., Shoemaker, C. A., Klesius, P. H. 2000. Experimental *Streptococcus iniae* infection of hybrid striped bass (*Morone chrysops* X *Morone saxatilis*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*) by nares inoculation. Aquaculture, 189: 197-210.

FAO, 2016 FAO (Food And Agriculture Organization). El Estado Mundial De La Pesca Y La Acuicultura 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Roma.

FDA, 2012 FDA – Food and Drug Administration. Animal and Veterinary: Approved Drugs 2012. [Http://Www.Fda.Gov/Animalveterinary/Developmentapprovalprocess/Aquaculture/Ucm132954.Htm](http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/DevelopmentApprovalProcess/Aquaculture/Ucm132954.htm)

Fitzsimmons, K. 2000. *Tilapia*: "The most important aquaculture species in the 21st century". In K. Fitzsimmons And J. Carvalho, Editors. *Tilapia Aquaculture In The 21 St Century: Proccedings From The 5th International Symposium On Tilapia Aquaculture*. American Tilapia association society, Rio De Janeiro, Brasil.

Fujimoto, R.Y, Castro M.P., Moraes F.R., Martins M.L., Monfort K.C.F. 2007. Parâmetros sanguíneos de pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) alimentados com dietas suplementadas com cromo trivalente em duas densidades de estocagem Acta Sci. Biol. Sci., 29: 465–471.

Fujimoto, R.Y., Castro, M.P. Moraes, F.R., Goncalves, F.D. 2005. Efeito da suplementação alimentar com cromo trivalente em pacu *Piaractus mesopotamicus*(Holmberg, 1887), mantidos em duas densidades de estocagem. Parâmetros fisiológicos Bol. Inst. Pesca, 31: 155–162.

Grif, K., Dierich, M.P., Pfaller, K., Miglioli, P.A., Allerberger, F. 2001. "In vitro activity of fosfomycin in combination with various antistaphylococcal substances". J Ant Chem, 48(2): 209–17.

Gutierrez, L., Ocampo, L., Rosario, C., Sumano, H. 2010. Pharamacokinectics of disodium fosfomycin in broilers and dose strategies to comply with its pharmacodynamics versus *Escherichia coli*. Poultry Science, 89(10): 2106-2115.

Hardie, J.M., Whiley, R.A. 1997. Classification and overview of the genera Streptococcus and Enterococcus. J of Applied Microbiol Symp Suppl, 83: 1S–11S.

Hempel, E. 2002. Tilapia, the new whitefish. seafood international, Agra Europe, London, 17(10):16-20.

Hirsch, D., Júnior, D.J.P., Logato, P.V.R., Piccoli, R.H., Figueiredo, H.C.P. 2006. Identificação e resistência a antimicrobianos de espécies de *aeromonas* móveis isoladas de peixes e ambientes aquáticos. Ciência e Agrotecnologia, Lavras, 30(6): 1211-1217.

Janda, J.M., Abbott, S.L. 1998. Evolving concepts regarding the genus Aeromonas:an expanding panorama of species,diseases presentations,and unanswered questions.Clin. Infect. Dis., 27: 332-344.

Jarva H., 2003. Complement resistance mechanisms of streptococci. Molec Microbiol, 40: 95-107.

Kashanian, J., Hakimian, P., Blute, M. Jr. 2008. Nitrofurantoin: the return of an old friend in the wake of growing resistance. BJU Int, 102: 1634–1637.

Kirov, M. 2002. Lateral flagellaand swarming motility in Aeromonas Species.J. Bacteriol., 184: 547-555.

Lieschke and Trede, G.J. Lieschke, N.S. 2009. Trede Fish immunology Curr. Biol., 19: 678–682.

Merino, S. 1995. Emerging pathogens: Aeromonas spp. Intern J of Food Microbiol, 28: 157-168.

Moraes, A. C. 2011. Glucocorticoid activity of dexamethasone on cellular response in inflammatory exudate of tilapia, vaccinated and challenged with *Aeromonas hydrophila*. In: Rev Agrop Brasileira.

MPA, 2010 MPA - Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2010. [Http://Www.Mpa.Gov.Br/Images/Docs/Informacoes_E_Estatisticas/Boletim%20estat%C3%Adstico%20mpa%202010.Pdf](http://www.mpa.gov.br/Images/Docs/Informacoes_E_Estatisticas/Boletim%20estat%C3%Adstico%20mpa%202010.Pdf).

- Natt, M. P., Herrick, C. A. A 1952. new blood diluents for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. *Poultry Science*, 31: 735-738.
- Nizet, V. 2002. .Streptococcal â-hemolysins: Genetic and Role in Diseases Pathogenesis. *Trends in Microbiology*, 10: 575-580.
- Noga, E.J. 1986. The importance of *Lernae cruciata*(LeSeuer) in the initiation of skin lesions in largemouth bass *Micropterus salmoides* (Lacepede) in the Chowan River, North carolina, *J. Fish Dis.*, 9: 295-302.
- Oba, E. T. Mariano, W. S., Santos, L. R. B. 2009. Estresse em peixes cultivados: Agravantes e atenuantes para o manejo rentável. *Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo*, , Embrapa Amapá, Macapá Capítulo 8.
- OIE – World Organization For Animal Health. OIE list of antimicrobials of veterinary importance (2007). [Http://Web.OIE.Int/Downld/Antimicrobials/OIE_List_Antimicrobials.Pdf](http://Web.OIE.Int/Downld/Antimicrobials/OIE_List_Antimicrobials.Pdf).
- Padgett D, A., Glaser, R. 2003. How stress influences the immune response, *Trends Immunol.*, 24: 444–448.
- Patel, S. S., Balfour, J. A., Bryson, H. M. "Fosfomycin Tromethamine: 1997. "A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy as a single-dose oral treatment for acute uncomplicated lower urinary tract infections". *Drugs*, 53(4): 637–656.
- Pirarat, N., Katagiri, T., Chansue N., Ponpornpisit, A., Endo, M., Maita, M. 2012. The pathological effects of melamine and cyanuric acid in the diet of walking catfish (*Clarius Batrachus*) *J Comparat Pathol* 147: 259–266.
- Plumb, J. A. 1999. Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes. Ames, Iwoa: Iwoa State University Press, 328: 1-64.
- Popoff, M. 1984. III Genus *Aeromonas* Kluyver e van Niel, 1936. In *Bergey's Manual of Syst Bacteriol*. Krieg, NR and Holt, JG 1(1): 545–548.
- Raz R., 2012. Fosfomycin: An old—new antibiotic infectious diseases unit, Ha'emek Medical Centre, Afula, Israel, *Clin Microbiol Infect* 18: 4–7.
- Reque V. R., Moraes J. E. R., Belo M. A. A., Moraes F. R. 2010. Inflammation induced by inactivated *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapias fed diets supplemented with *Saccharomyces cerevisiae* *Aquaculture*, 300: 37–42.
- SAS Institute Inc. (2001) SAS/STAT software changes and enhancements through computer program. Release 8.2. Cary: SAS Institute.
- Shelton, W.L. 2002. Tilapia culture in the 21st century. In R.D. Guerrero Iii, Editor. *Proccedings Of The International Forum On Tilapia Farming In The 21st Century*, Los Baños, Laguna, Philippines 1-28.
- Shoemaker, C., Klesius, P. 1997. Streptococcal disease problems and control: a review. *Tilapia Aquaculture*, 2: 671-680.
- Snedecor, G.W., Cochran, G. 1980. *Statistical Methods*. Iowa State University Press. Ames.
- Soraci, A.L., Perez, D.S., Martinez, G., Dieguez, S., Tapia, M.O., Amanto, F., Harkes, R., Romano, O. 2011. Disodium-fosfomycin pharmacokinetics and bioavailability in post weaning piglets. *Research In Vet Sci*, 90(3): 498-502.
- Tavares-Dias M., Ono E.A., Pilarski F., Moraes F.R. 2007. Can thrombocytes participate in the removal of cellular debris in the blood circulation of teleost fish? A cytochemical study and ultrastructural analysis *Ichthyol*, 23: 709–712.

Tort, L., 2011. Stress and immune modulation in fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 35: 1366-1375.

Wendelaar-Bonga, S.E. 1997. The stress response in fish. *Physiological Review*, 77(3): 591-625.

Wedemeyer, G. 1970. Stress of anesthesia with MS-222 and benzocaine in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fisher. Res. Board Can.* 22(5).

Weibel, E.R., Staubli, W., Gnagi, H.R., Hess, F.A. 1969. Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. *J of Cell Biol.* 68-91.

Williams, G.J, Wei L, L.E.E A., Craig, J.C. 2006. Long-term antibiotics for preventing recurrent urinary tract infection in children. *Cochrane Database Syst Rev*, 3: CD001534.

Wills, P.J., Asha, V.V. 2006. preventive and curative effect of *Lygodium flexuosum* (L.) sw. on carbon tetrachloride induced hepatic fibrosis in rats *J. Ethnopharmacol*, 107: 7–11.

Yousefian, M., Amiri, M.S. 2009. A Review Of The Use Of Prebiotic In Aquaculture For Fish And Shrimp. *African J Of Biotechnol.* 8(25): 7313-7318.

Zimmermann, S., Fitzsimmons, K. Tilapicultura Intensive., In J.E.P.Cyrino, E.C. Urbinati, D.M. Fracalossi, N. Castagnolli, 2004. Editores. *Tóp Espec Em Piscic De Água Doce Tropic Intens*, Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, Jaboticabal , Brasil, SP, 239-266.