

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO TIANFENICOL SOBRE BACTÉRIAS PATOGENICAS DE PEIXES

Inácio Mateus Assane

Jaboticabal, São Paulo

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO TIANFENICOL SOBRE
BACTÉRIAS PATOGÊNICAS DE PEIXES**

Inácio Mateus Assane

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Pilarski

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

Jaboticabal, São Paulo

2018

Assane, Inácio Mateus
A844a Atividade antimicrobiana do tianfenicol sobre bactérias patogênicas
de peixes / Inácio Mateus Assane. – – Jaboticabal, 2018
xii, 79 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de
Aquicultura, 2018
Orientadora: Fabiana Pilarski
Banca examinadora: Jonas Augusto Rizzato Paschoal, Luiz
Augusto Do Amaral
Bibliografia

1. Antimicrobiano. 2. Tianfenicol. 3. Florfenicol. 4. Sinergismo,
Aeromonas, 5. Tilápia-do-Nilo I. Título. II. Jaboticabal-Centro
Aquicultura.

CDU 577.18:639.31

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
– Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Unidade Complementar - Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Atividade antimicrobiana do tianfenicol sobre bactérias patogênicas de peixes

AUTOR: INÁCIO MATEUS ASSANE

ORIENTADORA: FABIANA PILARSKI

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

Profa. Dra. FABIANA PILARSKI

Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos / Centro de Aquicultura - CAUNESP

Prof. Dr. JONAS AUGUSTO RIZZATO PASCHOAL

Departamento de Física e Química / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Ribeirão Preto da USP

Prof. Dr. LUIZ AUGUSTO DO AMARAL

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 28 de fevereiro de 2018

DEDICO

Ao meu pai, Mateus Assane, minha mãe, Fátima Buanal, “*In Memoriam*”, meus irmãos e minha filha Fátima Inácio Assane. A todas as pessoas que acreditam em mim e que me apoiam.

AGRADECIMENTOS

É difícil agradecer todas as pessoas que de algum modo, nos momentos serenos e/ou apreensivos, fizeram ou fazem parte da minha vida, por isso desde já agradeço à todos de coração;

Aos meus pais, Mateus Assane e Fátima Buanal (*"In Memoriam"*), e minha irmã Beatriz A. M. Jamal, que me deram toda a estrutura para que me tornasse a pessoa que sou hoje;

Aos meus irmãos, por todos momentos compartilhados, companheirismo, amor e amizade;

À Universidade Zambeze, por me ter dado a possibilidade de poder continuar com os estudos;

Ao Centro de Aquicultura da UNESP, pela oportunidade de Pós-graduação;

À minha orientadora, Profa. Dra. Fabiana Pilarski, pela amizade, dedicação, seriedade e disponibilidade durante o curso;

Aos professores Pedro Fernando Chimela Chume, Custódio Pedro Boane e Fabiana Pilarski, pelos valiosos conselhos, amizade e valiosa contribuição para minha formação profissional e pessoal;

Ao Gustavo Moraes Ramos Valladão, Kátia Suemi Gozi, Raphael Barbetta de Jesus e Thiago Fernandes da Silva, pelo apoio e companheirismo;

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos do Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP), pela agradável convivência;

Aos colegas discentes, funcionários e professores do CAUNESP;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por ter concedido a bolsa de estudo (Processo: 190049/2015-4).

À Des – Vet – Produtos Veterinários®, pelo suporte técnico e fornecimento do padrão de tianfenicol.

Obrigado!

Índice

AGRADECIMENTOS	vi
Índice de tabelas	ix
Índice de figuras	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1. Cenário atual da piscicultura	16
2.1.1. Produção	16
2.1.2. Doenças bacterianas.....	17
2.1.2.1. Aeromonose	18
2.1.2.2. Estreptococose/Lactococose	20
2.1.2.3. Enterococose	21
2.1.2.4. Pseudomonose	23
2.1.2.5. Infecção por <i>Citrobacter</i> spp.	24
2.1.2.6. Edwarsielose	25
2.1.3. Uso de antimicrobianos.....	25
2.1.3.1. Antimicrobianos aprovados no Brasil	32
2.1.3.1.1. Oxitetraciclina.....	32
2.1.3.1.2. Florfenicol.....	33
2.2. Tianfenicol.....	34
2.3. Teste de sensibilidade aos antimicrobianos.....	36
2.4. Interação entre antimicrobianos	38
3. OBJETIVOS	41
3.1. Objetivo geral:	41
3.2. Objetivos específicos:	41

4. MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1. Bactérias	42
4.2. Teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA)	43
4.2.1. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	43
4.2.1.1. Meio de cultura	43
4.2.1.2. Antimicrobiano	44
4.2.1.3. Inóculo	44
4.2.1.4. Leitura e interpretação dos resultados	45
4.2.2. Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)	46
4.3. Avaliação da interação TAF + FFC contra <i>A. hydrophila</i>	46
4.3.1. Teste de sinergismo: <i>checkerboard</i>	46
4.4. Eficácia <i>in vivo</i> do TAF isolado e combinado com FFC no tratamento de aeromonose em tilápia-do-Nilo	47
4.4.1. Delineamento experimental	47
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
6. RESULTADOS	49
6.1. Sensibilidade <i>in vitro</i>	49
6.2. Avaliação da interação pelo método de <i>checkerboard</i>	54
6.3. Eficácia do TAF e suas combinações no tratamento de aeromonose em tilápia-do-Nilo	54
7. DISCUSSÃO	56
8. CONCLUSÕES	60
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS	61
10. REFERÊNCIAS	63
11. APÊNDICES	79
11.1. Aprovação do Comitê de Ética	79

Índice de tabelas

Tabela 1. Lista dos antimicrobianos aprovados para o tratamento de doenças bacterianas na piscicultura mundial.	27
Tabela 2. Atividade antimicrobiana do tianfenicol, florfenicol e oxitetraciclina para 49 cepas de bactérias patogênicas de peixe e duas cepas padrão (ATCC®).	51
Tabela 3. Atividade antimicrobiana in vitro da combinação tianfenicol + florfenicol contra <i>Aeromonas hydrophila</i> (T3R) isolada de tilápia-do-Nilo doente.	54

Índice de figuras

Figura 1. Estrutura química de oxitetraciclina (OTC) (RSC, 2015).....	32
Figura 2: Estrutura química dos fenicois: TAF- tianfenicol, FFC- florfenicol e CFC- cloranfenicol (Adaptado de Schwarz, Kehrenberg, Doublet, & Cloeckaert, 2004).34	
Figura 3. Distribuição hipotética de CIMs de cepas de bactérias isoladas de peixes doentes, classificadas como clinicamente susceptíveis (completamente ou moderadamente), intermediária ou resistente; e microbiologicamente sensíveis ou com baixo, moderado ou alto nível de resistência (EUCAST, 2000).....	37
Figura 4. Fórmula de cálculo do índice de concentração inibitória fracionada e método de interpretação do resultado (GARCIA; ISENBERG, 2007)	40
Figura 5. Local de coleta dos peixes usados no isolamento das cepas de bactérias patogênicas utilizadas neste estudo.	42
Figura 6. Representação esquemática da metodologia usada para determinar a atividade antimicrobiana (CIM e CBM) do tianfenicol para 49 cepas de bactérias patogênicas de peixes.	45
Figura 7. Diferença visual entre os métodos usados para a leitura da concentração inibitória mínima (CIM): a) convencional, b) cloreto de trifeniltetrazólio.	50
Figura 8. Sobrevivência (%) de tilápias experimentalmente infectadas com <i>Aeromonas hydrophila</i> e tratadas com tianfenicol (TAF) e florfenicol (FFC) combinados e isolados. G1: <i>Aeromonas hydrophila</i> + TAF (10 mg kg ⁻¹); G2: <i>A. hydrophila</i> + FFC (10 mg kg ⁻¹); G3: <i>A. hydrophila</i> + [TAF + FFC] (5 + 2,5 mg kg ⁻¹); G4: <i>A. hydrophila</i> + [TAF + FFC] (2,5 + 1,25 mg kg ⁻¹); G5: <i>A. hydrophila</i> ; GC: Controle (PBS).....	55
Figura 9. Sinais clínicos de bacteriose observados em tilápias mortas após infecção experimental com cepa patogênica de <i>Aeromonas hydrophila</i> : a) opacidade ocular, exoftalmia (seta vermelha); b) hemorragia generalizada, ascite (seta magenta); c) cavidade peritoneal repleta de exsudado sanguinolento (seta amarela), hepatomegalia (seta azul) e renomegalia (seta verde).	56

Abreviações

C	Por cento
µL	Microlitro
µm	Micrometro
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CAUNESP	Centro de Aquicultura de Unesp
CBM	Concentração bactericida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMHCA	Caldo Mueller – Hinton de Cátions Ajustados
CTT	Cloreto de trifeniltetrazólio
CVM	<i>Center for Veterinary Medicine</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FFC	Florfenicol
FICI	Índice de Concentração Inibitória Fracionada
g	Grama
h	Hora
kg	Quilograma
mg	Miligrama
°C	Graus Celsius
OIE	<i>World Organization for Animal Health</i>
OMS/WHO	Organização Mundial de Saúde/ <i>World Health Organization</i>
OTC	Oxitetraciclina
pv	Peso vivo
SINDAN	Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal
TAF	Tianfenicol
UN	<i>United Nations</i>

RESUMO

Os surtos de bacterioses na piscicultura são imprevisíveis, por essa razão é necessário dispor de opções terapêuticas eficazes para reduzir a morbidade e mortalidade. Para que a terapia seja eficaz, a escolha do antimicrobiano deve se basear nas informações farmacocinéticas do fármaco no hospedeiro, nas condições de produção e na sensibilidade do patógeno. No Brasil, atualmente só dois antimicrobianos são legalizados para uso na aquicultura, a oxitetraciclina (OTC) e o florfenicol (FFC), os quais muitas vezes são ineficazes. Destes, somente o FFC é autorizado para tratar bacterioses em tilápia-do-Nilo, a espécie mais produzida no país. Este cenário nos levou a investigar a atividade antimicrobiana do tianfenicol (TAF) contra as principais bactérias patogênicas de peixes cultivados no Brasil. Foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) do TAF para 49 cepas isoladas de surtos de bacteriose ocorridos no período 2011 a 2017 em três estados. Adicionalmente, avaliou-se a atividade antimicrobiana do TAF (G1: 10 mg kg⁻¹), do FFC (G2: 10 mg kg⁻¹) e da combinação do TAF com o FFC (G3: TAF+FFC: 5 + 2,5 mg kg⁻¹ e G4: 2,5 + 1,25 mg kg⁻¹) no tratamento de aeromonose em tilápia-do-Nilo experimentalmente infectadas com *Aeromonas hydrophila*. Como resultado do estudo *in vitro*, mais da metade das cepas testadas foram sensíveis ao TAF, sendo que os gêneros *Aeromonas*, *Lactococcus* e *Vibrio* foram os mais sensíveis. No estudo *in vivo*, o TAF foi eficaz no tratamento da aeromonose em tilápia-do-Nilo, tanto isolado como combinado. Os grupos G1, G2, G3, G4 e o controle apresentaram uma taxa de sobrevivência de 88,33 ± 11,55%; 70 ± 10%; 73,33 ± 11,55%; 85,93 ± 5,13% e 3,33 ± 5,77%, respectivamente, sendo todos diferentes do controle ($p < 0,001$). Os resultados do estudo sugerem que o TAF pode ser uma boa opção de tratamento de aeromonose, lactococose e vibriose em peixes. Além disso, a combinação do TAF com o FFC apresentou um efeito sinérgico, mostrando que é possível reduzir a quantidade de antimicrobiano e obter o mesmo efeito terapêutico.

Palavras-chave: Antimicrobiano, tianfenicol, florfenicol, sinergismo, bactérias, *Aeromonas*, tilápia-do-Nilo.

ABSTRACT

Outbreaks of bacterial diseases in fish farm are unpredictable; therefore, it is necessary to have effective therapeutic options to reduce the morbidity and mortality. For effective therapy, the anticipated pharmacokinetics and antibacterial activity of the antimicrobial in the target fish species under the given conditions must be considered before decide which antimicrobial to use. In Brazil, only two antimicrobials are approved for use in aquaculture, oxytetracycline (OTC) and florfenicol (FFC), which are often ineffective. Moreover, only FFC is approved for use to treat bacterial diseases in Nile tilapia, the main specie in Brazil. This scenario led us to investigate the antibacterial activity o thiamphenicol (TAP) against the main bacteria infecting fishes in Brazil. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of TAP were determined for 49 strains isolated from diseases outbreaks registered during 2011 – 2017 in three States. Additionally the antibacterial activity of TAP (10 mg kg⁻¹), FFC (10 mg kg⁻¹) and TAF combined with FFC (G3: TAF+FFC: 5 + 2.5 mg kg⁻¹ e G4: 2.5 + 1.25 mg kg⁻¹) against *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia aeromoniosi models were evaluated. More than half of the tested strains were *in vitro* sensitive to TAP, being TAP highly potent against *Aeromonas*, *Lactococcus*, and *Vibrio*. The *in vivo* therapy with TAP alone and combined with FFC was effective to treat aeromoniosis in Nile tilapia. Groups G1, G2, G3, G4 and control had survival rate of 88.33 ± 11.55%; 70 ± 10%; 73.33 ± 11.55%; 85.93 ± 5.13% e 3.33 ± 5.77%, respectively, all being different from the control (p < 0,001). These findings suggest the potential of TAP as a treatment option for aeromoniosis, lactococcosis and vibriosis. The combination of TAF and FFC has a synergy effect, showing that it is possible to reduce the amount of antimicrobial while maintaining the therapeutic effectiveness.

Keywords: Antimicrobial, thiamphenicol, florfenicol, synergism, bacteria, *Aeromonas*, Nile tilapia.

1.INTRODUÇÃO

Apesar do grande potencial mundial para produção de organismos aquáticos (GENTRY et al., 2017a) e as expectativas de expansão do setor (FAO, 2016); o futuro da aquicultura é incerto. O volume de perdas causadas por doenças bacterianas, associado ao surgimento de várias cepas de bactérias resistentes aos poucos antimicrobianos disponíveis para uso legal no setor, é um dos problemas que dificultará o aproveitamento do potencial existente.

Cerca de 31 antimicrobianos diferentes são aprovados para uso na aquicultura de diferentes países (U.S. FDA, 2000; DAFF, 2013; DSA, 2015; YOSHIMIZU et al., 2016; LIU; STEELE; MENG, 2017; FELLESKATALOGEN, 2018; LOZANO et al., 2018). O Brasil, país com alto potencial para produção aquícola (GENTRY et al., 2017b), ocupando a 14ª posição entre os países maiores produtores mundiais de organismos aquáticos e a 2ª posição entre os países do continente americano (FAO, 2016), também vem se deparando com problemas de bacterioses que ocasionam grandes perdas na produção (SEBASTIÃO et al., 2015; CHIDEROLI et al., 2017a). Para controlar o problema, existem dois antimicrobianos aprovados para uso na aquicultura no Brasil, a oxitetraciclina (OTC) e o florfenicol (FFC) (SINDAN, 2018). Outros aprovados para uso em outras espécies ou mesmo não aprovados, são ilegalmente utilizados. Destes, só o FFC é autorizado para ser usado no tratamento de doenças em tilápia-do-Nilo; a espécie de peixe mais produzida no país (IBGE, 2017). Existem relatos da ineficiência terapêutica da OTC (CARRASCHI et al., 2011; CHIDEROLI et al., 2017a) e do FFC (OLIVEIRA, 2016) no Brasil. Todavia, o florfenicol é o que geralmente apresenta melhores resultados terapêuticos, inclusive para bactérias multirresistentes (CHIDEROLI et al., 2017a).

O fato do florfenicol ter uma alta atividade antimicrobiana e ser o único antimicrobiano aprovado para utilização na produção de tilápia-do-Nilo pode acelerar o processo de desenvolvimento de resistência (DANG et al., 2007; MIRANDA; ROJAS, 2007; MIRANDA; TELLO; KEEN, 2013) e como resultado faltarem medidas terapêuticas eficazes.

A Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) recomenda que antimicrobianos com alta atividade antimicrobiana sejam usados como segunda linha de tratamento (OIE, 2015). Diante deste cenário, é necessário estudar novas opções de tratamento para as principais doenças que ocorrem na piscicultura brasileira.

O tianfenicol (TAF) é um antimicrobiano análogo ao cloranfenicol, do qual deriva o florfenicol (FFC); de alta distribuição tissular e amplo espectro de ação contra bactérias Gram positivas e Gram negativas (CANNON; HARFORD; DAVIES, 1990), com alguns efeitos benéficos sobre células do sistema imune (TULLIO et al., 2004; WEI et al., 2016b) e sem efeitos colaterais consideráveis (YUNIS; MANYAN; ARIMURA, 1973); como a anemia aplástica e a genotoxicidade associada ao cloranfenicol. Este antimicrobiano é usado em muitos países para o tratamento de bacterioses em humanos e animais domésticos. Na China e no Japão ele é legalizado para o uso na aquicultura (YOSHIMIZU et al., 2016; LIU; STEELE; MENG, 2017). No Brasil, o tianfenicol é usado na medicina humana e veterinária. Para torna-lo disponível para aquicultura estudos de farmacocinética, depleção de resíduos e atividade antimicrobiana devem ser realizados.

No presente trabalho foi avaliada a atividade antimicrobiana do TAF isolado e combinado com FFC contra bactérias isoladas de peixes doentes provenientes de três estados brasileiros e testada a sua eficácia no tratamento de aeromonose em tilápia-do-Nilo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cenário atual da piscicultura

2.1.1. Produção

O crescimento populacional (UN, 2017), o desenvolvimento industrial e as limitações na captura de organismos aquáticos (FAO, 2016) em quantidade e qualidade desejadas para alimentar uma população crescente e mais exigente, fazem da aquicultura uma indústria promissora. Nas duas últimas décadas, o consumo *per capita* de peixe aumentou em mais de 100%, tendo sido registrado um recorde de 20 kg ano⁻¹ em 2014 (FAO, 2016). Este fato demonstra a necessidade do aumento da produção piscícola de forma sustentável para o alcance do bem-estar da humanidade e segurança alimentar (UN, 2015), sem esgotar os recursos naturais já escassos. Resultados de um estudo recente, sobre o potencial mundial para o desenvolvimento da aquicultura; revelam que existem condição para produzir anualmente cerca de 15 bilhões de toneladas de peixe (GENTRY et al., 2017b), o que seria mais que suficiente para atender a demanda crescente por organismos aquáticos.

Atualmente, a piscicultura representa cerca de 67,8% da produção mundial de organismos aquáticos; estimada em cerca de 106 milhões de toneladas (FAO, 2017). Grande parte da produção mundial de peixes, tanto em águas interiores como nas marinhas, é feita na Ásia (89,3%), Américas (4,3%) e Europa (3,9%) (FAO, 2017). No entanto, só alguns países nestes continentes têm uma produção expressiva, que se situa próximo da metade do total produzido pelo continente.

Nas Américas, o Chile é o maior produtor (41,1%), seguido do Brasil (34,8%), sendo 99,9% da produção chilena feita no mar e 100% da brasileira em águas interiores (FAO, 2016). Avaliando o potencial aquícola dos países americanos (GENTRY et al., 2017b), as dificuldades que a piscicultura chilena tem passado nos últimos tempos (ASCHE et al., 2009; FORSTER; HART, 2016; APABLAZA et al., 2017) e a queda de produção (5,0% de 2014 para 2015) no Chile (FAO, 2016, 2017); é possível que em poucos anos o Brasil se torne o maior produtor de peixe do continente se a sua produção continuar a crescer no ritmo atual (1,5% de 2014 para 2015 e 4,4% de 2015 para 2016) (IBGE, 2015, 2017). A Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) estima que até 2025 a produção anual brasileira de peixe aumentará em mais de 100% (FAO, 2016).

Para que a produção de peixe continue a crescer no mundo é necessário que vários problemas verificados na aquicultura atualmente sejam ultrapassados de forma sustentável. Um dos problemas que merece grande atenção é a questão das doenças e da resistência bacteriana aos antimicrobianos, que vêm surgindo num ritmo desproporcional ao do desenvolvimento de novas alternativas profiláticas e terapêuticas.

2.1.2. Doenças bacterianas

As doenças estão presentes na piscicultura praticamente desde os primórdios da atividade. Elas ocorrem tanto em ambiente marinho como em águas interiores, e geralmente a sua incidência varia entre as espécies de peixes. Com o tempo, devido má qualidade do ambiente de produção associada as práticas de manejo inadequadas, as doenças vêm ganhando mais espaço na piscicultura. As mudanças climáticas também têm influenciado nesse aumento de surtos de doença na piscicultura em todo mundo; visto que não só proporcionam condições favoráveis para a multiplicação e estabelecimento de patógenos em ambientes que normalmente não sobreviveriam, mas também contribuem para que o hospedeiro fique mais susceptível à infecção (HARVELL et al., 2002; KNOUFT; FICKLIN, 2017).

Surtos de doenças na piscicultura têm originado grandes perdas econômicas em várias partes do mundo (SANO, 1998; WEI, 2002; BONDAD-REANTASO et al., 2005; DA SILVA et al., 2012; GENG et al., 2014; TAVARES-DIAS; MARTINS, 2017), o que constitui um entrave para o desenvolvimento global da atividade. Dentre os principais patógenos na piscicultura comercial, as bactérias são as que mais têm chamado a atenção da sociedade nos últimos vinte anos; não só por causarem elevados prejuízos econômicos na produção, mas também por que algumas espécies são zoonóticas (WEINSTEIN et al., 1997; NAWAZ et al., 2008; NOGA, 2010) e/ou resistentes aos antimicrobianos usados atualmente (NAWAZ et al., 2008; CHIDEROLI et al., 2017a) e podem transmitir genes de resistência para espécies de bactérias patogênicas para os humanos (DANG et al., 2007; NAWAZ et al., 2008; MIRANDA; TELLO; KEEN, 2013; ILIEV et al., 2015; XIONG et al., 2015; CHENIA, 2016; WHO, 2017).

Apesar de uma grande porcentagem das espécies de bactérias patogênicas existentes já ter sido associada a casos de doença em peixes, somente algumas espécies, de um número de gêneros reduzido é responsável por surtos com importância econômica na piscicultura mundial (SUDHEESH et al., 2012). Esta situação pode estar relacionada a especificidade das bactérias pelo hospedeiro e o número reduzido de espécies de peixe com uma produção expressiva no mundo.

Com o recente aumento da produção brasileira de pescado, a incidência de doenças bacterianas também aumentou. Somente no período de 2010 a 2014 foram registrados pelo menos 178 surtos de bacteriose em quatro estados brasileiros; tendo sido isoladas bactérias de 12 espécies (SEBASTIÃO et al., 2015). Este número pode ser ainda maior se forem considerados os casos não reportados. Os gêneros *Aeromonas*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Flavobacterium* (FIGUEIREDO et al., 2005; SALVADOR et al., 2005; SEBASTIÃO et al., 2015; FUKUSHIMA et al., 2017) e recentemente *Francisella* (ASSIS et al., 2017; SEBASTIÃO et al., 2017), são os que mais têm sido reportados como responsáveis por infecções.

2.1.2.1. Aeromonose

A aeromonose ou septicemia hemorrágica é uma doença bacteriana causada por bactérias do gênero *Aeromonas* (STANIER, 1943).

O gênero *Aeromonas* é composto por bactérias Gram negativas em forma de bacilos ou cocobacilos com as extremidades arredondadas (0,3 – 1,0 µm de largura e 1,5 – 3,5 µm de comprimento), que ocorrem isoladas, aos pares ou raramente em cadeias curtas (BRENNER et al., 2005). A maior parte move-se por flagelo polar simples, de 1.7 µm de comprimento de onda, podendo haver formação de flagelos peritriquios em culturas jovens em meio sólido (BRENNER et al., 2005). Bactérias deste gênero são quimiorganotróficas não formadoras de endósporos, anaeróbias facultativas, apresentam mecanismo oxidativo e fermentativo para a redução da D-glucose (COLWELL; MAC DONELL; DE LEY, 1986; BULLER, 2014). Geralmente são oxidase positiva e catalase positiva (BRENNER et al., 2005). A identificação das espécies de *Aeromonas* é feita pela avaliação de características

fenotípicas, bioquímicas e genéticas (JANDA, 1991; ABBOTT; CHEUNG; JANDA, 2003; JANDA; ABBOTT, 2010; AUSTIN; AUSTIN, 2016).

Os sinais da infecção por *Aeromonas* spp. variam de acordo com a espécie e/ou subespécie do patógeno. No Brasil, *Aeromonas caviae* (MARTINS et al., 2008; SEBASTIÃO et al., 2015) *A. hydrophila* (DA SILVA et al., 2012; SEBASTIÃO et al., 2015), *A. jandaei* (SEBASTIÃO et al., 2015) e *A. veronii* (SEBASTIÃO et al., 2015) são as principais espécies reportadas. Infecções agudas por estas espécies geralmente ocasionam septicemia hemorrágica caracterizada por lesões e hemorragia no corpo, melanose, exoftalmia, ascite com intestino repleto de exsudado sanguinolento, hepatomegalia, esplenomegalia e liquefação do rim (NOGA, 2010; AUSTIN; AUSTIN, 2016).

O tratamento da aeromonose é feito mediante administração de antimicrobianos ou produtos homeopáticos na ração (SINDAN, 2018). Todavia, na aquicultura comercial brasileira os antimicrobianos são os mais usados, principalmente a oxitetraciclina (Terramicina-TM-700®) e o florfenicol (FF-50® e AquaFlor® 50% Premix). Destes, o florfenicol é o único legalizado para uso em tilápia-do-Nilo (SINDAN, 2018). Apesar da dose e o período de administração de um antimicrobiano variarem de acordo com a espécie de peixe e a forma de administração do mesmo; no Brasil é possível verificar algumas variações na dosagem de acordo com o fornecedor do produto. Como exemplo cita-se o tratamento da aeromonose em tilápia-do-Nilo, a Merck Sharp & Dohme Saúde Animal LTDA recomenda a administração de 10 mg de florfenicol por kg de peixe por dia, durante 10 dias consecutivos; enquanto que a Farmacologia em Aquicultura Veterinária LTDA recomenda 20 mg do mesmo princípio ativo para o mesmo período e espécie de peixe (SINDAN, 2018). Esta variação pode estar relacionada com as características intrínsecas das formulações comercializadas por estas duas empresas.

Apesar de existirem relatos de resistência de *Aeromonas* spp. ao florfenicol e a oxitetraciclina fora do Brasil (DANG et al., 2007); em geral, as espécies isoladas de surtos de doença em tilápia-do-Nilo cultivada no Brasil são sensíveis ao florfenicol (GODOY et al., 2008; SEBASTIÃO, 2015).

2.1.2.2. Estreptococose/Lactococose

A estreptococose (também conhecida por lactococose, de acordo com a espécie de bactéria envolvida na infecção); é uma doença causada por bactérias da família *Streptococcaceae* (DEIBEL; SEELEY, 1974). A família *Streptococcaceae* é composta por três gêneros, nomeadamente: *Streptococcus* Rosenbach, 1984; *Lactococcus* (SCHLEIFER et al., 1986) e *Lactovum* (MATTHIES, GÖßNER, ACKER, SCHRAMM, & DRAKE, 2004); sendo que somente os dois primeiros causam infecções em peixes.

O gênero *Streptococcus* é composto por bactérias Gram positivas de forma esférica ou ovoide, com menos de 2,0 µm de diâmetro, que ocorrem em cadeia ou aos pares quando cultivadas em meio líquido; imóveis, não formadoras de endósporo; anaeróbias facultativas; catalase e oxidase negativa quimiorganotróficas com metabolismo fermentativo (VOS et al., 2009). Este é um dos principais gêneros bacterianos responsáveis por grandes perdas econômicas na piscicultura mundial e associado à casos de infecção humana a partir de peixes contaminados (WEINSTEIN et al., 1997). Na tilapicultura brasileira existem pelo menos três espécies descritas em casos de surtos com grandes perdas econômicas; nomeadamente: *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae* e *S. iniae* (SALVADOR et al., 2005; SEBASTIÃO et al., 2015; ASSIS et al., 2017). Destas três, *S. agalactiae* é a espécie que apresenta maior casuística e consequentemente maior importância econômica.

Em tilápia-do-Nilo, a infecção por *S. agalactiae* é caracterizada por meningoencefalite e septicemia hemorrágica (AUSTIN; AUSTIN, 2016). Os sinais mais comuns da infecção por *S. agalactiae* são: letargia, natação errática, aos giros ou em espiral; melanose; opacidade ocular; lesão e/ou hemorragia no olho ou exoftalmia; hemorragia no tegumento, na base da nadadeira e na região opercular; ascite e abscessos externos (AUSTIN; AUSTIN, 2007; EVANS; PASNIK; KLESJUS, 2015).

Atualmente, existe uma vacina injetável sendo usada no Brasil para a imunização ativa de tilápia-do-Nilo contra *S. agalactiae* e em caso de infecção, o tratamento é realizado pela administração oral (na ração) de 10 ou 20 mg (dependendo da marca do antimicrobiano) de florfenicol por quilograma de peixe por dia, durante 10 dias consecutivos (SINDAN, 2018). Todavia, existem relatos de

alta resistência ao florfenicol (SEBASTIÃO, 2015) e ineficácia terapêutica do mesmo em bactérias isoladas de peixes brasileiros (OLIVEIRA, 2016; CHIDEROLI et al., 2017b).

O gênero *Lactococcus* (SCHLEIFER et al., 1986), que também pode causar a estreptococose ou lactococose, é composto por bactérias Gram positivas, com forma ovoide ou esférica, que podem ocorrer separadas, aos pares ou em cadeia (geralmente alongadas na direção da cadeia); pertencentes ao grupo sorológico de Lancefield N; imóveis; não formadoras de endósporo; não β -hemolíticas; anaeróbias facultativas; catalase negativas (SCHLEIFER et al., 1985). Devido as semelhanças fenotípicas e bioquímicas entre as espécies de *Lactococcus*, assim como entre elas e bactérias dos gêneros *Streptococcus* e *Enterococcus*; testes genéticos são de extrema importância para a correta identificação (SCHLEIFER et al., 1985; AUSTIN; AUSTIN, 2016).

No Brasil, existem relatos de surtos de lactococose na aquicultura, sendo a *Lactococcus garviae*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* as espécies predominantes (EVANS; KLESIUS; SHOEMAKER, 2009; SEBASTIÃO et al., 2015; FUKUSHIMA et al., 2017).

Os sinais da infecção por *Lactococcus* em peixe podem variar de acordo com a espécie de peixe e da bactéria, sendo mais comum verificar em tilápia-do-Nilo sinais semelhantes a septicemia hemorrágica provocada pelo *S. agalactiae* (AUSTIN; AUSTIN, 2007, 2016). Por falta de um tratamento específico para lactococose no Brasil, o florfenicol é usado na mesma dosagem e por período igual ao usado no tratamento da septicemia hemorrágica causada por *S. agalactiae*. Contudo, existem registros de resistência ao florfenicol em *Lactococcus* spp. isoladas de peixes no Brasil (SEBASTIÃO, 2015).

2.1.2.3. Enterococose

A enterococose é uma doença bacteriana causada por bactérias do gênero *Enterococcus* (SCHLEIFER & KILPPER-BALZ, 1984). O gênero *Enterococcus* é constituído por bactérias Gram positivas de forma ovoide, que podem ser móveis e ocorrer separadas, aos pares ou em cadeias curtas, geralmente alongadas na direção da cadeia; não formadoras de endósporo; anaeróbias facultativas, geralmente catalase negativas, contudo, algumas espécies podem produzir

pseudocatalase quando cultivadas em ágar contendo sangue (SCHLEIFER; KILPPER-BALZ, 1984; SVEC; DEVRIESE, 2015). Bactérias deste gênero geralmente são quimiorganotróficas de metabolismo fermentativo, com L – ácido láctico como principal produto final da fermentação da glicose e têm atividade hemolítica variável de acordo com a espécie (SVEC; DEVRIESE, 2015). A identificação das espécies de *Enterococcus* é baseada nas características fenotípicas, bioquímicas e genotípicas (SVEC; DEVRIESE, 2015). No entanto, existe uma grande variabilidade nas características fenotípicas e bioquímicas tradicionalmente usadas para identificar bactérias deste gênero, por isso sempre que possível é necessário realizar uma avaliação genética para a correta identificação das espécies.

A patogenicidade de espécies de *Enterococcus* foi, durante muito tempo questionada, principalmente devido ao fato de fazerem parte da microbiota intestinal normal de muitas espécies animais, incluindo a humana. Todavia, com os avanços verificados nas duas últimas décadas no diagnóstico deste gênero bacteriano, o número de registros de doenças provocadas por ele aumentou exponencialmente, havendo relatos de doença em humanos (REID; COCKERILL; PATEL, 2001; LU et al., 2002; KAYAOGU; ORSTAVIK, 2004), várias espécies de animais domésticos (LU et al., 2002; SANCIU et al., 2012; SEPUTIENE et al., 2012) e peixes (TORANZO et al., 1995; ROMALDE et al., 1996; BEKKER et al., 2011). No Brasil, pelo menos quatro espécies de *Enterococcus* já foram descritas causando doenças em peixes, nomeadamente *E. casseliflavus*, *E. faecalis*, *E. durans* e *E. sulfureus*; sendo *E. casseliflavus*, *E. faecalis* as espécies predominantes (SEBASTIÃO et al., 2015).

Os sinais da enterococose variam de acordo com a espécie animal e do *Enterococcus* envolvido. Nos casos de infecção reportados em peixes, os sinais observados são similares aos da infecção por *Lactococcus* (AUSTIN; AUSTIN, 2007, 2016; NOGA, 2010).

No Brasil não existe nenhum tratamento específico para enterococose, sendo usados os dois antimicrobianos disponíveis para uso na aquicultura. No entanto, pelo fato da maior parte dos isolados de *Enterococcus* obtidos de infecções em humanos, animais domésticos e peixes, apresentarem uma alta resistência aos antimicrobianos atualmente em uso (PETERSEN; DALSGAARD, 2003; SEBASTIÃO, 2015); facilidade de desenvolvimento de genes resistência e

capacidade de transmissão dos mesmos entre eles e com outras espécies de bactérias; a antibioticoterapia tem se mostrado ineficiente.

2.1.2.4. Pseudomonose

O gênero *Pseudomonas* Migula, 1894 é composto por bactérias aeróbias Gram negativas; com forma de bacilo retos ou ligeiramente curvos, mas não helicoidal (0,5 – 1,0 µm x 1,5 – 5,0 µm); geralmente móveis por um ou mais flagelos polares ou peritríquios; não formadoras de esporos e catalase e oxidase positivas (BRENNER et al., 2005; YANG et al., 2013). Bactérias deste gênero podem ser identificadas pela combinação de análises fenotípicas, bioquímicas e genéticas; sendo primordial fazer a análise genética para a identificação das espécies (BRENNER et al., 2005).

No ambiente aquático, *Pseudomonas* spp. podem ser encontradas tanto em animais doentes como em sadios, o que faz acreditar que sejam patógenos secundários ou oportunistas (WOO; BRUNO, 2011). Todavia, altas taxas de mortalidade em infecção natural são verificadas, principalmente quando a temperatura da água é baixa (15 – 20°C) (NOGA, 2010; WOO; BRUNO, 2011; SOTO-RODRIGUEZ et al., 2013).

Espécies de *Pseudomonas* podem causar várias doenças; dentre as quais as mais comuns são: ascite hemorrágica bacteriana, septicemia, doença dos pontos vermelhos e podridão da nadadeira (NOGA, 2010; WOO; BRUNO, 2011). Ao fazer a necropsia de peixes infectados por *Pseudomonas* é possível verificar grânulos no baço e abscessos na bexiga natatória (MIYASHITA, 1984). No Brasil, pelo menos sete espécies de *Pseudomonas* já foram relacionadas com doenças em tilápia-do-Nilo; nomeadamente, *P. chlororaphis*, *P. fulva*, *P. libanensis*, *P. monteilii*, *P. mosselii*, *P. plecoglossida* e *P. putida* (SEBASTIÃO et al., 2015).

O tratamento de doenças causadas por *Pseudomonas* geralmente é feito com antimicrobianos. Todavia, bactérias deste gênero geralmente são resistentes aos antimicrobianos atualmente disponíveis (DANG et al., 2007; NOGA, 2010; ILIEV et al., 2015). No Brasil, o florfenicol é o único antimicrobiano legalizado para o tratamento de doenças causadas por *Pseudomonas* sensíveis em tilápia-do-Nilo (SINDAN, 2018). O agravante na piscicultura é que o diagnóstico e tratamento de doenças raramente é acompanhado por testes de sensibilidade aos antimicrobianos.

2.1.2.5. Infecção por *Citrobacter* spp.

O gênero *Citrobacter* Werkman e Gillen, 1932 é composto por bacilos retos (~1,0 µm x 2,0 – 6,0 µm) Gram negativos, oxidase negativa e catalase positiva; que ocorrem separados e aos pares, geralmente movimentando-se por flagelos peritriquios (BRENNER et al., 2005). Bactérias deste gênero são anaeróbias facultativas, tendo metabolismo respiratório e fermentativo (BRENNER et al., 2005). A identificação das espécies deve preferencialmente ser feita através de testes bioquímicos e moleculares (BRENNER et al., 2005). *Citrobacter* spp. é uma Enterobacteriaceae geralmente encontrada na água, solo, alimentos, intestino humano e de várias espécies animais; incluindo peixes (LIPSKY et al., 1980; TORANZO et al., 1994; BRENNER et al., 2005).

Citrobacter freundii é a principal espécie patogênica para peixes (TORANZO et al., 1994; BRENNER et al., 2005; NAWAZ et al., 2008; NOGA, 2010; LÜ et al., 2011; WOO; BRUNO, 2011; AUSTIN; AUSTIN, 2016); havendo relatos dela como agente etiológico primário (AUSTIN; STOBIE; ROBERTSON, 1992; KARUNASAGAR; KARUNASAGAR; PAI, 1992; SVETLANA; DOBRILA; VELJOVIĆ, 2003) e secundária, em infecções mistas com protozoários (GALLANI et al., 2016), vírus (SANZ, 1991) ou outras bactérias (EL-BARBARY; HAL, 2017). Atualmente ele é considerado um patógeno emergente.

A infecção por *C. freundii* geralmente ocorre quando há má qualidade da água ou peixes imunossuprimidos. Os principais sinais clínicos incluem letargia, movimentos descoordenados, lesões hemorrágicas na pele, olho e base da nadadeira (AUSTIN; STOBIE; ROBERTSON, 1992; KARUNASAGAR; KARUNASAGAR; PAI, 1992; SVETLANA; DOBRILA; VELJOVIĆ, 2003; LÜ et al., 2011). Na necropsia do animal doente é possível observar hemorragia no peritônio e renomegalia (KARUNASAGAR; KARUNASAGAR; PAI, 1992). Contudo, nos casos de gastroenterites, os sinais anteriormente citados podem não ser verificados (SVETLANA; DOBRILA; VELJOVIĆ, 2003). Nestes casos é comum verificar alterações inflamatórias no intestino (SVETLANA; DOBRILA; VELJOVIĆ, 2003). No Brasil existe pelo menos um relato de *C. freundii* em tilápia-do-Nilo, ocorrido em 2013 (SEBASTIÃO, 2015) e o primeiro isolamento da bactéria em *Pseudoplatystoma reticulatum* (DE PÁDUA et al., 2014).

O tratamento da infecção por *Citrobacter* com antimicrobianos é geralmente ineficiente, devido a sua alta resistência (BRENNER et al., 2005;

NAWAZ et al., 2008; GALLANI et al., 2016). O ideal é prevenir o surgimento da infecção, garantindo boa qualidade de água e redução do estresse durante o manejo (AUSTIN; AUSTIN, 2016).

2.1.2.6. Edwarsielose

A edwarsielose é uma das principais doenças responsáveis por grandes perdas econômicas na piscicultura mundial. Ela é causada por bactérias do gênero *Edwardsiella* Ewing e McWhorter 1965. O gênero *Edwardsiella* é composto por bacilos retos (~1,0 µm x 2,0 – 3,0 µm) Gram negativos, oxidase negativos, catalase positivos, geralmente móveis por flagelos peritriquios e anaeróbios facultativos (BRENNER et al., 2005). A identificação das espécies deste gênero pode ser feita com base em características fenotípicas, bioquímicas e genotípicas. Para uma boa identificação é imprescindível realizar a identificação molecular (BRENNER et al., 2005).

O quadro clínico da edwarsielose varia de acordo com a espécie do patógeno envolvida, podendo ocorrer septicemia hemorrágica ou enterite. Cerca de quatro espécies de *Edwardsiella* são patogênicas para peixes, nomeadamente: *E. tarda*, *E. ictaluri*, *E. piscida* e *E. hoshinae* (JORGENSEN et al., 2015). Destas, a *E. tarda* é a que possui maior diversidade de hospedeiros e ampla distribuição geográfica.

Os sinais mais característicos da edwarsielose em tilápia-do-Nilo são: distensão abdominal e presença de colônias granulomatosas de bactérias em diferentes tecidos (ROBERTS, 2012). No Brasil, existem vários relatos de surtos de edwarsielose em tilápia-do-Nilo (SEBASTIÃO et al., 2015).

O tratamento da edwarsielose é feito com antimicrobianos, geralmente sulfonamidas ou tetraciclina. No entanto, estes só ajudam a reduzir a mortalidade, por isso é importante melhorar as condições de higiene e qualidade da água (ROBERTS, 2012). No Brasil não existe nenhum tratamento específico para essa doença.

2.1.3. Uso de antimicrobianos

Atualmente, pelo menos 31 antimicrobianos são legalmente usados na piscicultura mundial (Tabela 1). A Ásia, continente com maior produção de peixe no

mundo, é também o continente com maior quantidade de antimicrobianos legalizados na piscicultura; só na China e Japão existem pelo menos 27 antimicrobianos diferentes (Tabela 1). Apesar dessa quantidade relativamente alta, vários outros antimicrobianos são usados de forma ilegal (LIU; STEELE; MENG, 2017). No Chile, cerca de cinco antimicrobianos são legalizados para uso na aquicultura (Tabela 1). No entanto, a preocupação em relação ao uso de grandes quantidades, principalmente na salmonicultura, é crescente no país (DSA, 2015; LOZANO et al., 2018). No Brasil, não obstante ao crescente número de relatos de perdas por bacteriose; só dois antimicrobianos têm uso aprovado na piscicultura, a oxitetraciclina e o florfenicol, sendo o florfenicol o único permitido para o tratamento de bacterioses em tilápia-do-Nilo (SINDAN, 2018).

A oxitetraciclina é considerada altamente importante para a saúde humana (WHO, 2017) e criticamente importante para a medicina veterinária (OIE, 2015). Segundo a Organização Mundial da Saúde Animal (OIE), antimicrobianos altamente importantes para a saúde humana e veterinária não devem ser usados como primeira linha de tratamento na produção animal e caso seja necessário, o uso deve preferencialmente ser feito depois de testes bacteriológicos.

Na Europa, o uso de antimicrobianos na produção de peixes é regulamentada por normas gerais da União Europeia (EMEA, 2006); e específicas, que variam de acordo com o país europeu. A maior parte dos países subdesenvolvidos não possuem normas específicas para o controle de antimicrobianos na piscicultura. Nestes países há uma tendência de seguir as normas europeias e americanas (CVM, 2011). Em vista disso, existe uma proposta de unificação das normas existentes para criação de uma norma global, que não só beneficiará os países que não têm normas, mas também ajudará a melhorar o controle do uso de antimicrobianos na aquicultura mundial. As diferenças nas normas existentes já foram responsáveis por várias rejeições de cargas de peixe, principalmente de origem asiática.

Tabela 1. Lista dos antimicrobianos aprovados para o tratamento de doenças bacterianas na piscicultura mundial.

País / Antimicrobiano	Doença / Patôgeno	Hospedeiro	Recomendação ¹			Referência
			Via e per. Admin.	Dose (mg/kgpv)	Carência	
África do Sul						
Florfenicol	**	Bagres, Salmonideos	**	**	**	(DAFF, 2013)
Oxitetraciclina		Truta, salmão, bagres				
		Peixes em geral				
Sulfadiazina : Trimetoprim		Bagres, Salmonideos				
Brasil						
Oxitetraciclina	<i>Aeromonas e Pseudomonas</i>	Salmonideos	Oral: 10 dias	8300	21 dias	(SINDAN, 2018)
		Bagres				
Florfenicol	<i>Yersinia</i>	Truta		10	9 dias*	
	<i>Aeromonas e Streptococcus</i>	Tilapia		10 a 20	14 dias	
Canada						
Sulfadimetoxina : Ormetoprim	<i>Aeromonas</i>	Salmonideos	**	**	42 dias	(GC, 2010)
Florfenicol		Salmão			12 dias	
Oxitetraciclina	<i>Haemophilus, Aeromonas, Columnariose, Cytophaga e Yersinia</i>				40 a 80 dias	
Sulfadiazina : Trimetoprim	<i>Vibrio</i>				80 dias	
Chile						
Ácido oxálico	**	**	Oral: 10	20	450° dia	

Continuação...

País / Antimicrobiano	Doença / Patôgeno	Hospedeiro	Recomendação ¹			Referência
			Via e per. Admin.	Dose (mg/kgpv)	Carência	
Chile						
Amoxicilina	Columnariose	Salmão	Oral: 10	70,4	300° dia	(DSA, 2015; LOZANO et al., 2018)
Eritromicina	Renibacteriose e <i>Piscirickettsia</i>		Oral: 21	77 - 100	500° dia	
Flumequina	Columnariose e <i>Piscirickettsia</i>		Oral: 10 - 12	10 a 30	300° dia	
Florfenicol	Columnariose, Renibacteriose e <i>Piscirickettsia</i>		Oral: 10	10	100 – 300° dia	
Oxitetraciclina			Oral: 10 - 15	13,57 - 82	600° dia	
China						
Ácido oxálico	**	**	**	**	**	(LIU; STEELE; MENG, 2017)
Doxiciclina						
Enrofloxacina						
Florfenicol						
Flumequina						
Neomicina						
Norfloxacina						
Tianfenicol						
Trimetoprim						
Sulfadiazina						
Sulfametoxazol						
Sulfamonometoxina						
Estados Unidos da América						
Oxitetraciclina	<i>Haemophilus, Aeromonas, Pseudomonas e Flavobacterium</i>	Salmonideos	Oral: 10 dias	55,12 - 82,67	21 dias	(U.S. FDA, 2000)
	<i>Aeromonas e Pseudomonas</i>	Bagres				
Sulfadimetoxina: Ormetoprim - 25:5	<i>Edwardsiella</i>		Oral: 5 dias	30	3 dias	

Continuação...

País / Antimicrobiano	Doença / Patôgeno	Hospedeiro	Recomendação ¹			Referência		
			Via e per. Admin.	Dose (mg/kgpv)	Carência			
Estados Unidos da América								
	<i>Aeromonas</i>	Salmonideos	Oral: 5 dias	30	42 dias	(U.S. FDA, 2000)		
Florfenicol	<i>Aeromonas</i> e <i>Flavobacterium</i>		Oral: 10 dias	10	15 dias			
	<i>Edwardsiella</i> e <i>Flavobacterium</i>	Bagres			12 dias			
Sulfamerazina	<i>Aeromonas</i>	Truta	**	**	21 dias			
Japão								
Ácido oxálico	Pseudotuberculose	<i>Perciformes</i>	Oral	30	16 dias	(YOSHIMIZ U et al., 2016)		
	Vibriose	<i>Clupeiiformes</i>		20	21 dias			
			Imersão: 30 min		14 dias			
	Furunculose	<i>Clupeiiformes</i>	Oral	10	21 dias			
	Vibriose	<i>Marsupenaeus</i>		50	30 dias			
	Aeromonose	<i>Cypriniformes</i>		10	28 dias			
	Edwardsielose	<i>Anguiliformes</i>		20	25 dias			
	<i>Red fin disease</i>							
<i>Red spot disease</i>								
Amoxicilina	Pseudotuberculose	<i>Perciformes</i>		40	5 dias			
Ampicilina				20				
Bicozamicina				10	27 dias			
Doxiciclina	Estreptococose			50	20 dias			
Eritromicina					30 dias			
Florfenicol	Pseudotuberculose			10			5 dias	
	Estreptococose							
	Furunculose						<i>Clupeiiformes</i>	14 dias
	Vibriose							
	Edwardsielose						<i>Anguiliformes</i>	7 dias
Fosfomicina	Pseudotuberculose			<i>Perciformes</i>			40	15 dias

Continuação...

País / Antimicrobiano	Doença / Patógeno	Hospedeiro	Recomendação ¹			Referência
			Via e per. Admin.	Dose (mg/kgpv)	Carência	
Japão						
Josamicina	Estreptococose	<i>Perciformes</i>	Oral	50	20	(YOSHIMIZ U et al., 2016)
Lincomicina				40	10	
Oxitetraciclina	Vibriose	<i>Clupeiformes</i>		50	30	
	Furunculose					
	Estreptococose					
	Vibriose					
	Estreptococose	<i>Pleuronectiformes</i>			40	
	Vibriose	<i>Tetraodontiformes</i>			-	
		<i>Marsupenaeus</i>				
	Edwardsielose	<i>Anguiliformes</i>		30		
Espiramicina	Estreptococose	<i>Perciformes</i>		40		
Sulfamonometoxina	Vibriose	<i>Clupeiformes</i>		200	15	
				100	30	
	Furunculose			150		
	Vibriose					
	Furunculose					
	Vibriose					
		<i>Red fin disease</i>	<i>Anguiliformes</i>	200	30	
Tianfenicol	Pseudotuberculose	<i>Perciformes</i>	50	15		
	Vibriose					
<i>Tobicillin</i>	Estreptococose		100 000 unidades	4		
<i>Sodium nifurstyrenate</i> (NFS-Na)	Flexibacteriose	<i>Pleuronectiformes</i>	10 g/1k	2		
Sulfafurazol	Vibriose	<i>Clupeiformes</i>	200	15		

Continuação...

País / Antimicrobiano	Doença / Patógeno	Hospedeiro	Recomendação ¹			Referência
			Via e per. Admin.	Dose (mg/kgpv)	Carência	
Japão						
Sulfafurazol	Vibriose	<i>Clupeiformes</i>	Oral	200	15	(YOSHIMIZ U et al., 2016)
	<i>Flavobacterium psychrophilum</i>					
	<i>Chondrococcus</i>	<i>Cypriniiformes</i>			10	
Bronopol	Desinfecção de ovos	<i>Clupeiformes</i>	Imersão 30 min	0.1 - 0.2 mL/L	-	
Sulfamonometoxina: Ormetoprim (3:1)	Vibriose	<i>Anguiliiformes</i>	Oral	50	15	
	Edwarsielose				37	
Miloxacina						
Noruega						
Benzilpenicilina: Dihidroestreptomicina	**	**	**	**	**	(FELLESK ATALOGE N, 2018)
Florfenicol						
Flumequina						
Ácido oxálico						
Oxitetraciclina						
Trimetoprim: Sulfadiazina	Furunculose e Septicemia hemorrágica		Oral: 5 a 8 dias	75 a 100		

¹O período de carência (C) deve ser determinado com base na temperatura da água de cultivo, usando a seguinte fórmula: $C = 135 \div T \text{ H}_2\text{O } ^\circ\text{C}$. Caso a temperatura da água de cultivo seja 15°C, o período de carência será de 9 dias.

** A lei recomenda que seja seguida a informação fornecida na bula do produto.

2.1.3.1. Antimicrobianos aprovados no Brasil

No Brasil somente dois antimicrobianos são legalizados para uso na piscicultura (Tabela 1). Este cenário, associado ao crescente número de surtos de bacterioses, propicia o uso inadequado de substâncias não autorizadas na atividade. Por outro lado, o uso contínuo dos mesmos antimicrobianos pode acelerar o processo de desenvolvimento de resistência bacteriana e tornar os antimicrobianos ineficazes (MILLER, 2007; MIRANDA; TELLO; KEEN, 2013).

2.1.3.1.1. Oxitetraciclina

A oxitetraciclina (OTC) (Figura 1) é um antimicrobiano com amplo espectro de ação, amplamente usado no mundo para o tratamento de doenças na medicina humana e veterinária. A Organização Mundial da Saúde (OMS) a considera como um antimicrobiano altamente importante para a saúde humana (WHO, 2017). Todavia, ela é usada na produção animal devido as suas características farmacocinéticas, farmacodinâmicas e bacteriostáticas peculiares (GIGUÈRE; PRESCOTT; DOWLING, 2013); sendo considerada pela Organização Mundial da Saúde Animal como um dos antimicrobianos criticamente importantes para a produção animal (OIE, 2015). A semelhança das outras tetraciclinas, ela inibe a síntese proteica da bactéria prevenindo a ligação do aminoacil-RNA transportador ao ribossomo da bactéria. Vários genes de resistência a oxitetraciclina em bactérias isoladas de ambientes aquáticos tem sido descritos na literatura (DANG et al., 2007; ISHIDA et al., 2010; MIRANDA; TELLO; KEEN, 2013).

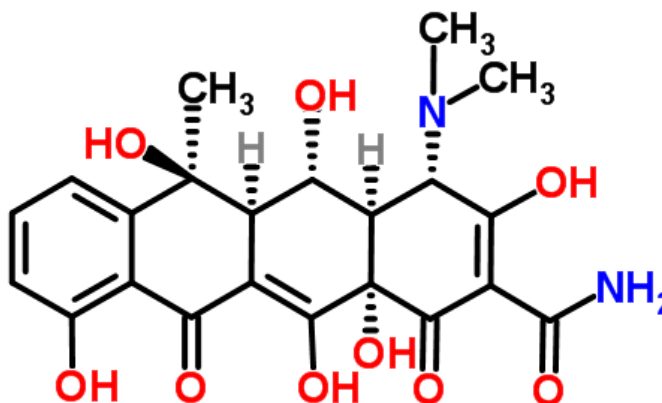


Figura 1. Estrutura química de oxitetraciclina (OTC) (RSC, 2015)

No Brasil, a oxitetraciclina é um dos principais antimicrobianos usados no tratamento de doenças bacterianas em animais domésticos. Recentemente, a sua utilização na aquicultura foi legalizada, podendo ser usada para tratar várias doenças bacterianas em crustáceos, lagostas, salmonídeos e bagres (SINDAN, 2018). Todavia, a sua absorção e distribuição tecidual em peixes é baixa (CHEN; BOWSER, 2005) o que faz com que sejam usadas doses elevadas e muitas vezes ineficazes (CARRASCHI et al., 2011; CHIDEROLI et al., 2017a).

2.1.3.1.2. Florfenicol

O florfenicol (FFC) é um derivado do tianfenicol (Figura 2), também com amplo espectro de ação e amplamente usado na medicina veterinária (GIGUÈRE; PRESCOTT; DOWLING, 2013) e criticamente importante para o tratamento de doenças de peixes (OIE, 2015). Ele inibe a síntese proteica e é considerado primeiramente como bacteriostático.

O florfenicol é a primeira e principal opção de tratamento de bacterioses na piscicultura em vários países, inclusive no Brasil (Tabela 1). Contudo, mecanismos de resistência ao florfenicol têm sido verificados em bactérias isoladas de ambientes aquáticos (MCINTOSH et al., 2008; MIRANDA; TELLO; KEEN, 2013). No Brasil o FFC é comercializado sob as marcas FF-50[®] e AquaFlor[®] 50% Premix. Ele é o único antimicrobiano legalizado para uso em tilápia-do-Nilo (SINDAN, 2018).

Para que um antimicrobiano seja aprovado na produção de uma espécie de peixe, estudos de farmacocinética, farmacodinâmica, depleção de resíduos e atividade antimicrobiana do mesmo para bactérias que acometem a espécie devem ser feitos em condições mais próximas possíveis das de produção. Geralmente, espécies diferentes apresentam padrões farmacocinéticos diferentes para o mesmo antimicrobiano (MALVISI et al., 2002; CHEN et al., 2004) e a mesma espécie também apresenta padrões farmacocinéticos diferentes para o mesmo antimicrobiano quando administrado em condições de temperaturas (BJÖRKLUND; BYLUND, 1990) e salinidade diferentes (FENG; JIA; LI, 2008). As informações produzidas pelos estudos de farmacocinética, depleção de resíduo e atividade antimicrobiana de um antimicrobiano são importantes para estabelecer a dose do antimicrobiano para as espécies de bactérias sensíveis e o período de carência do mesmo; garantido dessa maneira que o tratamento da bacteriose seja eficaz e o

peixe tratado seja comercializado com o mínimo de resíduo de antimicrobiano possível.

2.2. Tianfenicol

O tianfenicol (TAF) é um antimicrobiano da família dos fenicois (Figura 2) (CANNON; HARFORD; DAVIES, 1990), usado em muitos países para o tratamento de bacterioses em humanos (WHO, 2017) e animais domésticos (OIE, 2015; EMA, 2016), devido ao seu amplo espectro de ação contra bactérias (Gram negativas e Gram positivas, tanto aeróbicas como anaeróbicas) (ALBINI et al., 1999; MARCHESE et al., 2002) e poucos efeitos colaterais, que quando ocorrem são reversíveis (TURTON et al., 2000; GIGUÈRE; PRESCOTT; DOWLING, 2013). Na bactéria, ele inibe a síntese proteica (YUNIS; MANYAN; ARIMURA, 1973), ligando-se irreversivelmente a subunidade 50s do ribossomo. Estudos feitos com mamíferos indicam que o TAF também estimula a resposta imune inata, pelo aumento da eficiência fagocitária dos granulócitos (TULLIO et al., 2004); entretanto, a sua administração em doses altas pode originar alterações hematológicas (PAAPE; MILLER; ZIV, 1990; TURTON et al., 2000, 2002).

O padrão de distribuição tecidual e o tempo necessário para a absorção, distribuição e excreção do TAF varia de acordo com espécie animal e condições de produção. Todavia, em um estudo para comparar os parâmetros farmacocinéticos do TAF em ratos, coelhos, cães, porcos, ovelhas e bezerros, verificou-se que a farmacocinética do TAF obedece uma escala alométrica, onde os valores da eliminação, meia vida e volume de distribuição aumentam com o aumento do peso vivo do animal (CASTELLS et al., 2001).

Em peixes, e em alguns mamíferos (CASTELLS et al., 2001), o TAF é metabolizado na forma ativa pela via renal, não havendo a glucuronidação hepática que se verifica na maioria dos antimicrobianos (GIGUÈRE; PRESCOTT; DOWLING, 2013).

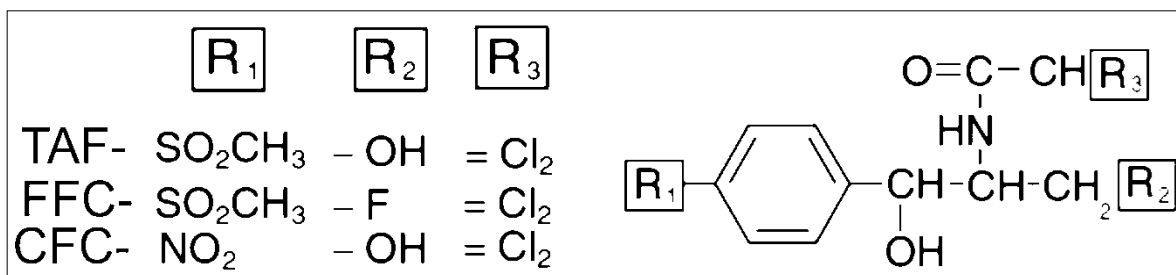


Figura 2: Estrutura química dos fenicois: TAF- tianfenicol, FFC- florfenicol e CFC- cloranfenicol (Adaptado de Schwarz, Kehrenberg, Doublet, & Cloeckaert, 2004).

O metabolismo dos antimicrobianos metabolizados pela via hepática é fortemente influenciado por outros antimicrobianos que têm a metabolização pela mesma via, e por doenças hepáticas (GIGUÈRE; PRESCOTT; DOWLING, 2013).

O TAF é amplamente usado na Europa, China e Japão no controle de infecções bacterianas em humanos e animais de produção (EMEA, 2006; GIGUÈRE; PRESCOTT; DOWLING, 2013; EMA, 2016). No Japão (YOSHIMIZU et al., 2016) e na Cinha (LIU; STEELE; MENG, 2017) o TAF é legalmente utilizado para o tratamento de bacterioses produção de organismos aquáticos destinados ao consumo humano (Tabela 1).

Os padrões farmacocinéticos do TAF variam bastante entre as espécies e condições de produção; como temperatura da água e salinidade, no caso de organismos aquáticos. Em camarão-branco-do-pacífico (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931) cultivado em água doce a uma temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, a administração oral de uma dose de TAF de 10 mg kg^{-1} de peso vivo, possibilita o alcance de uma concentração de $7,96 \pm 1,61 \mu\text{g mL}^{-1}$ de TAF na hemolinfa e $2,98 \mu\text{g g}^{-1}$ no hepatopâncreas 2h após a administração (FANG et al., 2013). Em robalo (*Dicentrarchus labrax* Linnaeus, 1758), a administração de uma dose superior (15 mg kg^{-1}) confere concentrações inferiores ao plasma [$5,6 \mu\text{g mL}^{-1}$] (CASTELLS et al., 2000) e fígado [$6,36 \pm 3,45 \mu\text{g mL}^{-1}$] (MALVISI et al., 2002). No entanto, ao aumentar a dose para 30 mg kg^{-1} é possível verificar uma concentração maior no plasma [$9,4 \mu\text{g mL}^{-1}$] (CASTELLS et al., 2000). Em dourada (*Sparus aurata* Linnaeus 1758) concentrações próximas de $9,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($8,5 \pm 5,4 \mu\text{g mL}^{-1}$) são verificadas no fígado após administração de 15 mg kg^{-1} (MALVISI et al., 2002). Em mamíferos, geralmente as concentrações de TAF verificadas após administração de doses 15 ou 30 mg kg^{-1} são muito superiores em relação as verificadas em organismos aquáticos. Gamez et al. (1992) chegaram a quantificar $18,6 \mu\text{g}$ de TAF mL^{-1} de plasma de bezerros 88,1 minutos depois de administrar uma dose de 30 mg kg^{-1} de TAF via intramuscular, e verificaram que a concentração do antimicrobiano permanecia por mais de 8h numa concentração superior a $5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Em um estudo similar, Abdennebi et al. (1994) quantificaram $19,90 \pm 2,84 \mu\text{g}$ de TAF mL^{-1} de plasma de vacas leiteiras e de corte 50 minutos depois da administração de uma dose de 30 mg kg^{-1} .

Na literatura existem relatos de efeitos sinérgicos e aditivos da combinação de tianfenicol com outros antimicrobianos (incluindo o florfenicol) no tratamento de doenças bacterianas em caprinos, suínos e aves (TOSHIHIDE, 1998; WEI et al., 2016a, 2016b).

2.3. Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

Os testes de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) são uma ferramenta necessária para a tomada de decisão no processo de tratamento de doenças bacterianas de peixes. Apesar da recente padronização do método para realizar este teste com bactérias isoladas de peixes (MILLER et al., 2003, 2005; GIESEKER et al., 2012); a sua aplicação prática ainda é difícil, principalmente pela falta de critérios de interpretação dos resultados obtidos (CLSI, 2014). A ambiguidade da definição de sensibilidade bacteriana (sensível [S], intermediária [I] e resistente [R]) também é um fator que complica a interpretação e comparação dos resultados dos TSA (Figura 3). A definição microbiológica destes termos pode basear-se somente na distribuição dos valores dos parâmetros de sensibilidade (como a concentração inibitória mínima – CIM) observados numa população de bactérias ao se fazer o TSA, ou em mecanismos de resistência demonstrados fenotipicamente ou genotipicamente pela bactéria (EUCAST, 2000). Em termos clínicos, a sensibilidade (S, I e R) é definida pela comparação do resultado do TSA (geralmente CIM ou CBM – concentração bactericida mínima) com o padrão farmacocinético do antimicrobiano no hospedeiro (EUCAST, 2000). Com base nesta definição, uma bactéria é considerada sensível a um antimicrobiano se após a administração de numa dose segura para o hospedeiro, for capaz de chegar a uma concentração superior a CIM no local da infecção (geralmente se usa a concentração do antimicrobiano no sangue) (EUCAST, 2000). Alguns autores dividem as bactérias sensíveis (sob ponto de vista clínico) em completamente sensíveis e moderadamente sensíveis; chamando de completamente sensíveis as que também são sensíveis sob ponto de vista microbiológico e moderadamente sensíveis as que apresentam baixo nível de mecanismos de resistência bacteriana, mas geralmente respondem bem aos regimes terapêuticos comumente usados (Figura 3).

Existem três métodos bem controlados padronizados para gerar resultados reprodutíveis da sensibilidade de bactérias à antimicrobianos, nomeadamente: teste de diluição em caldo, teste de diluição em ágar e teste de disco difusão. Destes, só o primeiro (MILLER et al., 2005; GIESEKER et al., 2012) e o último (MILLER et al., 2003) são padronizados para bactérias isoladas de organismos aquáticos. Os resultados produzidos por estes testes apresentam qualidades diferentes sobre o ponto vista terapêutico.

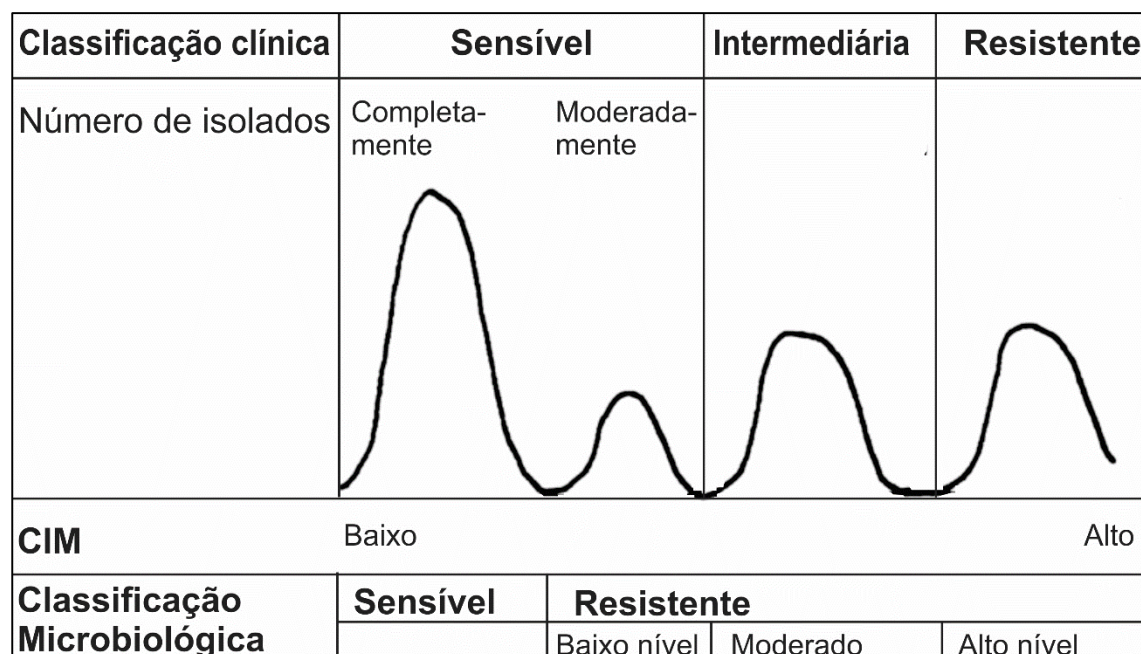


Figura 3. Distribuição hipotética de CIMs de cepas de bactérias isoladas de peixes doentes, classificadas como clinicamente susceptíveis (completamente ou moderadamente), intermediária ou resistente; e microbiologicamente sensíveis ou com baixo, moderado ou alto nível de resistência (EUCAST, 2000).

Os testes de diluição dão como resultado a concentração mínima do antimicrobiano necessária para inibir a multiplicação da bactéria; que é designada concentração inibitória mínima (CIM) e geralmente expressa em $\mu\text{g mL}^{-1}$; enquanto que o teste de disco difusão gera como informação o diâmetro (em mm) da zona de inibição do antimicrobiano, que serve para qualificar as bactérias em resistentes e susceptíveis ao antimicrobiano, de acordo com tabelas fornecidas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI (NCCLS, 2002) ou pelo *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* - EUCAST (EUCAST, 2017). Em termos terapêuticos a informação gerada pelos testes de diluição é mais importante.

O método de diluição em caldo padronizado, estabelece as condições de teste para bactérias isoladas de organismos cuja temperatura ideal de multiplicação é $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ou $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fornece os intervalos de concentrações de 10 antimicrobianos diferentes (ácido oxálico, ampicilina, enrofloxacina, eritromicina, florfenicol, flumequina, gentamicina, ormetoprim – sulfadimetoxina, oxitetraciclina e trimetoprim – sulfametoxazol) para o controle da qualidade com *Escherichia coli* ATCC® 25922™ e *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC® 33658™ em testes realizados a 22°C , 28°C e $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (somente *E. coli*) (CLSI, 2014). Todavia, continuam faltando critérios de interpretação dos resultados e condições para determinação da atividade antimicrobiana para bactérias de multiplicação lenta em caldo Mueller-Hinton. A leitura interpretativa só é possível de ser realizada conhecendo as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas do antimicrobiano nos diferentes hospedeiros e os resultados clínicos da terapia (CLSI, 2006).

2.4. Interação entre antimicrobianos

Conhecer o mecanismo de ação de diferentes antimicrobianos possibilita prever a sua interação quando eles são usados em combinação e permite desenvolver alternativas terapêuticas onde os efeitos colaterais da monoterapia são reduzidos. Durante muito tempo esta técnica foi somente usada para o tratamento empírico de pessoas e animais domésticos. A combinação de antimicrobianos, ou multi-antibioticoterapia, é bastante usada e estudada na medicina humana (LE; BAYER, 2003; RAHAL, 2006) e veterinária (WEI et al., 2016b; TUVSHINTULGA et al., 2017) com vista a desenvolver alternativas terapêuticas eficazes, com o mínimo de efeitos colaterais possível e capazes de tratar doenças provocadas por bactérias multirresistentes (RAHAL, 2006; WEI et al., 2016a). Na piscicultura mundial, pelo menos quatro combinações de antimicrobianos são legalmente utilizadas no tratamento de doenças bacterianas (Tabela 1).

Combinações teoricamente promissoras podem apresentar efeitos terapêuticos antagônicos, ao invés dos efeitos sinérgicos ou aditivos esperados (GIGUÈRE; PRESCOTT; DOWLING, 2013). Em oposição, combinações que teoricamente parecem inviáveis, principalmente pelo fato de serem antimicrobianos

da mesma família ou com o mesmo mecanismo de ação, podem apresentar efeitos sinérgicos e resultados terapêuticos muito superiores aos esperados (WEI et al., 2016b). Este fato, faz com que mesmo conhecendo o mecanismo de ação do antimicrobiano seja necessário realizar estudos *in vitro* e *in vivo* para aferir a eficácia da combinação. Um dos maiores problemas dos testes *in vitro* é a baixa reprodutibilidade (ODDS, 2003) dos resultados e as diferentes interpretações que podem ocorrer de acordo com o modelo matemático usado para a análise (GRECO; BRAVO; PARSONS, 1995).

Apesar do conhecimento da base teórica sobre sinergismo entre antimicrobianos ser antigo e existirem combinações historicamente conhecidas como sinérgicas, como por exemplo a combinação trimetoprim + sulfonamida, mecilinam + ampicilina, β -lactam + amino glicosídeo, amoxicilina + ácido clavulânico e macrolídeo + rifampicina (GIGUÈRE; PRESCOTT; DOWLING, 2013); as técnicas *in vitro* usadas para avaliar as interações não são consensuais e os resultados apresentados para a mesma combinação quase sempre são divergentes (LE; BAYER, 2003; GARCIA; ISENBERG, 2007). Por tanto, o ideal é realizar testes complementares e experimentos *in vivo* para aferir a eficácia terapêutica de uma combinação (GARCIA; ISENBERG, 2007).

Vários métodos *in vitro* podem ser usadas para avaliar a interação entre antimicrobianos; nomeadamente: método de disco difusão; método de diluição em ágar; método de macro diluição em caldo, em séries limitadas (*checkerboard* limitado); método da curva de tempo – morte (*time-kill*) e o método de micro diluição em formato de tabuleiro de xadrez (*checkerboard*) (ODDS, 2003; GARCIA; ISENBERG, 2007). No entanto, todos eles apresentam precisão e acurácia diferente para prever o tipo de interação, e geralmente oferecem resultados divergentes para a mesma combinação (ODDS, 2003); principalmente por medirem parâmetros diferentes (GARCIA; ISENBERG, 2007).

O *checkerboard* é o teste que menos prevê sinergismo, mas por ser mais fácil e rápido é o mais usado para avaliar a interação (ODDS, 2003). Outro aspecto que também faz que ele seja o teste mais usado é pelo fato dos seus resultados serem usados para realizar os outros testes. O *time-kill* é o um dos melhores testes *in vitro* para estudo da dinâmica do sinergismo e antagonismo entre antimicrobianos. Ele possibilita determinar o número de bactérias que permanecem viáveis no tempo depois da exposição aos antimicrobianos separados e

combinados; determinando assim a taxa e a extensão da mortalidade (GARCIA; ISENBERG, 2007).

No método *time-kill*, o sinergismo é geralmente definido como a redução em $\geq 2 - \log_{10}$ UFC mL⁻¹ pela combinação quando comparado ao antimicrobiano mais ativo isolado, e antagonismo quando há um aumento em $\geq 2 - \log_{10}$ UFC mL⁻¹ (GARCIA; ISENBERG, 2007). No *checkerboard* a interpretação de sinergismo é feita a partir do resultado de cálculos algébricos (Figura 4) que usam como base a CIM dos antimicrobianos isolados e combinados; sendo sinérgica, antagônica ou indiferente a combinação que tiver a CIM maior, menor ou equivalente a CIM dos antimicrobianos isolados, respectivamente (GARCIA; ISENBERG, 2007).

FICI= FIC_A + FIC_B; onde:	Interpretação:
FIC_A = MIC_A na combinação ÷ MIC_A isolado;	i. Sinergismo: FICI ≤ 0,5;
FIC_B = MIC_B na combinação ÷ MIC_B isolado;	ii. Indiferença: 0,5 < FICI ≤ 4,0;
FICI- índice de concentração inibitória fracionado;	iii. Antagonismo: FICI > 4.
FIC- concentração inibitória fracionada.	

Figura 4. Fórmula de cálculo do índice de concentração inibitória fracionada e método de interpretação do resultado (GARCIA; ISENBERG, 2007)

Não obstante a fórmula de cálculo do FICI ser usado universalmente, a interpretação dada ao índice obtido varia muito entre os pesquisadores. Enquanto pesquisadores mais conservadores da área de microbiologia clássica usam o índice como uma estimativa inequívoca da interação, os da área clínica consideram a resposta terapêutica como chave para correta interpretação do índice (ODDS, 2003).

Assim, com a crescente problemática da falta de antimicrobianos disponíveis para o tratamento de doenças de peixes, o desenvolvimento de alternativas terapêuticas na piscicultura nacional tem caráter inovador e proporcionará diminuição de prejuízos relacionados à falta de qualidade e ao mesmo tempo, reduzirá o uso indiscriminado de antimicrobianos, um pré-requisito para conformidade e certificação do pescado visando à sua comercialização e exportação.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral:

- Avaliar o potencial do tianfenicol como uma opção de tratamento para doenças bacterianas de peixes cultivados no Brasil.

3.2. Objetivos específicos:

- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do tianfenicol para bactérias patogênicas de peixes.
- Avaliar a atividade antimicrobiana da combinação de tianfenicol com florfenicol contra *Aeromonas hydrophila*.
- Avaliar a eficácia *in vivo* do tianfenicol isolado e combinado com florfenicol no tratamento de aeromonose em tilápia-do-Nilo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Bactérias

Um total de quarenta e nove cepas de bactérias patogênicas isoladas de acará bandeira (*Pterophyllum scalare* Liechtenstein, 1823) [1], cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*, Linnaeus 1766) [2], tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758) [42], pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) [3] e pintado (*Piaractus carassans* Spix e Agassiz, 1829) [1] durante surtos de bacteriose ocorridos em três estados brasileiros (Figura 5), foram usadas para determinar a atividade antimicrobiana *in vitro* (Concentração inibitória mínima – CIM e concentração bactericida mínima – CBM) do tianfenicol (TAF). A identificação das bactérias foi feita por avaliação fenotípica, bioquímica e genética das culturas puras; tendo se observado cepas de *Aeromonas caviae* (1), *Aeromonas hydrophila* (17), *Aeromonas jandaei* (4), *Aeromonas veronii* (4), *Citrobacter freundii* (3), *Edwardsiella tarda* (2), *Enterococcus casseliflavus* (2), *Lactococcus garviae* (3), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (1), *Lactococcus raffinolactis* (1), *Pseudomonas fulva* (2), *Pseudomonas monteilli* (1), *Pseudomonas plecoglossida* (1), *Streptococcus agalactiae* (6) e *Vibrio fluvialis* (1). Duas cepas padrão, *A. hydrophila* ATCC® 7966™ e *Escherichia coli* ATCC® 25922™ foram usadas para comparação e controle de qualidade, respectivamente.



Figura 5. Local de coleta dos peixes usados no isolamento das cepas de bactérias patogênicas utilizadas neste estudo.

As sequências obtidas no sequenciamento do gene 16S rRNA das bactérias, durante o processo de identificação, foram depositadas no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI); sob o número de acesso apresentados na Tabela 2. As cepas IA1, L5 e T3R foram as únicas sequenciadas durante a realização do estudo; as demais foram obtidas do Banco de Cepas do Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos (LAPOA) do Centro de Aquicultura de Unesp (CAUNESP).

4.2. Teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA)

4.2.1. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Primeiro foi determinada a CIM do TAF para a cepa controle de qualidade, *E. coli* ATCC® 25922™ a 28°C; usando a oxitetraciclina (OTC) como antimicrobiano de referência para o controle da qualidade do teste. Em seguida fez-se a determinação da CIM do TAF para as cepas de interesse.

Todas as CIMs foram determinadas em placas de micro titulação de 96 poços, estéreis e com tampa e fundo em forma de U; com base na metodologia de microdiluição em caldo recomendada pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2014), com três réplicas.

Adicionalmente, foi determinada a atividade antimicrobiana do FFC e da OTC, para 57,14% e 71,43% dos patógenos estudados, respectivamente. As amostras foram aleatoriamente selecionadas.

4.2.1.1. Meio de cultura

Todos os testes foram realizados em Caldo Mueller – Hinton de Cátions Ajustados (CMHCA, Difco) e pH 7,2. O CMHCA foi suplementado com sangue equino lizado (2,5%) para os testes das amostras de *Streptococcus* e *Lactococcus*, e com NaCl (1,5%) para as de *Vibrio*. As amostras de *Vibrio* também foram testadas com o meio sem a adição de NaCl.

No dia do teste, 180 µL do meio de cultura (adequado para cada bactéria) foram colocados no primeiro poço da linha de teste e 100 µL nos restantes poços. No poço controle de contaminação do meio de cultura (C -) foram colocados mais 100 µL de meio, para perfazer 200 µL (volume final do teste).

4.2.1.2. Antimicrobiano

Para a preparação da solução estoque de antimicrobiano; o padrão de Tianfenicol Sigma – Aldrich® Lote: BCBP3008V (TAF $\geq 99,0\%$ de pureza), Florfenicol Sigma – Aldrich® Lote: MKBV1157V (FFC $\geq 99,0\%$ de pureza) e Oxitetraciclina Sigma – Aldrich® Lote: BCBG9599V (OTC $\geq 95,0\%$ de pureza) foi adquirido comercialmente; pesado, dissolvido em etanol a 95,0% (os dois primeiros) ou água destilada estéril (o último) e diluído em água destilada estéril, para obter concentrações de 20.480 $\mu\text{g TAF mL}^{-1}$; 1.280 $\mu\text{g FFC mL}^{-1}$ e 1.280 $\mu\text{g OTC mL}^{-1}$, respectivamente. Estas soluções foram preparadas para uso imediato.

As placas de teste foram preparadas com gradientes de concentração de antimicrobiano para o uso imediato. 20 μL da solução estoque de antimicrobiano foi diluído em 180 μL de CMHCA previamente colocado no 1º poço da linha de teste, para obter uma concentração de 2048 $\mu\text{g TAF mL}^{-1}$; 128 $\mu\text{g FFC mL}^{-1}$ ou 128 $\mu\text{g OTC mL}^{-1}$, de acordo com o antimicrobiano a ser testado. Em seguida foi feita a diluição seriada pela metade do conteúdo do primeiro poço (100 μL) até ao último poço de teste, com vista a deixar as linhas de teste com os seguintes gradientes de concentração: 2.048 – 0,0156 $\mu\text{g TAF mL}^{-1}$; 128 – 0,25 $\mu\text{g FFC mL}^{-1}$ ou 128 – 0,25 $\mu\text{g OTC mL}^{-1}$. Do último poço de teste foram descartados 100 μL ; ficando todos poços com 100 μL de solução (com exceção do C -).

4.2.1.3. Inóculo

Para preparação do inóculo, as bactérias foram repicadas em meio sólido específico para cada bactéria. Cerca de 4 – 5 colônias pura, cuja morfologia e coloração Gram eram iguais, foram selecionadas e transferidas para uma solução salina de 0,85% ou 0,9% NaCl (de acordo com a espécie), ajustando a densidade para $1,5 \times 10^8$ UFC mL^{-1} . O ajuste foi feito em espectrofotômetro (0,08 – 0,1 de absorbância num comprimento de onda de 625 nm). A suspensão ajustada foi diluída 10^{-2} ($\sim 1,0 \times 10^6$ UFC mL^{-1}) e 100 μL dela foi inoculado em cada poço de teste. Após inoculação todos poços obtiveram volume de 200 μL e uma densidade de $\sim 5,0 \times 10^5$ UFC mL^{-1} de bactéria. As linhas de teste ficaram com os seguintes gradiente de concentração de antimicrobiano: 1024 – 0,0078 $\mu\text{g TAF mL}^{-1}$; 64 – 0,125 $\mu\text{g FFC mL}^{-1}$ e 64 – 0,125 $\mu\text{g OTC mL}^{-1}$. Três poços foram usados como controle em cada linha; um para o inóculo (C+: 100 μL de inóculo + 100 μL de meio

de cultura); um para o solvente (CS: 100 μL de inoculo + 100 μL de meio de cultura contendo o mesmo volume de solvente que o 1º poço) e um para o meio de cultura (C-: 200 μL de meio de cultura usado na linha de teste).

Em cada placa do teste foi reservada uma linha para o controle de qualidade, onde foi inoculada a cepa de *E. coli* ATCC® 25922™. A cepa de *A. hydrophila* ATCC® 7966™ foi inoculada em placas separadas para cada antimicrobiano, no mesmo esquema usado para as cepas de interesse.

Logo depois da inoculação, 10 μL do C+ foram diluídos 10^{-3} em solução salina e 100 μL da solução foi espalhado em meio sólido específico, com auxílio de uma alça de Drigalski. Em seguida as placas foram seladas com plástico filme e incubadas a 28°C por 24h. Na Figura 6 é apresentado o esquema do teste.

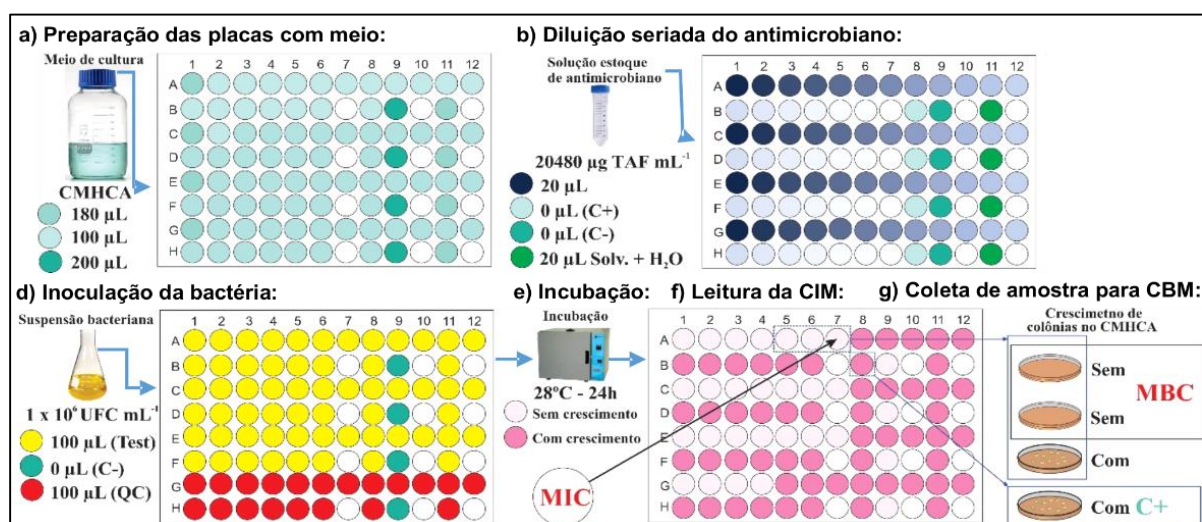


Figura 6. Representação esquemática da metodologia usada para determinar a atividade antimicrobiana (CIM e CBM) do tianfenicol para 49 cepas de bactérias patogênicas de peixes.

4.2.1.4. Leitura e interpretação dos resultados

A leitura das placas foi feita usando o método convencional e a coloração com cloreto de trifeniltetrazólio (CTT) (Sigma – Aldrich®); após a incubação a 28°C por 24h. Primeiro foram anotados os números de todos poços sem multiplicação visível e em seguida dispensou-se em cada poço 20 μL da solução de CTT (5 mg mL^{-1}). As placas foram incubadas por 15 minutos para depois proceder a segunda leitura; que foi baseada na coloração dos poços com CTT. A CIM foi o poço sem multiplicação visível com a menor concentração de antimicrobiano na linha de teste.

Os resultados do TSA foram interpretados sob ponto de vista clínico; tendo sido usado como valores de corte, dados obtidos de estudos de farmacocinética feitos em condições similares² aos do presente estudo.

a) TAF (CASTELLS et al., 2000; FANG et al., 2013):

- i. Sensível: $CIM \leq 8 \mu\text{g mL}^{-1}$;
- ii. Resistente: $CIM > 8 \mu\text{g mL}^{-1}$;

b) FFC (FENG; JIA; LI, 2008; KOSOFF et al., 2009):

- i. Sensível: $CIM \leq 4 \mu\text{g mL}^{-1}$;
- ii. Intermediária: $4 \mu\text{g mL}^{-1} < CIM \leq 8 \mu\text{g mL}^{-1}$;
- iii. Resistente: $CIM > 8 \mu\text{g mL}^{-1}$;

c) OTC (CHEN et al., 2004):

- i. Sensível: $CIM \leq 1 \mu\text{g mL}^{-1}$;
- ii. Intermediária: $1 \mu\text{g mL}^{-1} < CIM \leq 2 \mu\text{g mL}^{-1}$;
- iii. Resistente: $CIM > 2 \mu\text{g mL}^{-1}$.

4.2.2. Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)

Para a determinação da CBM; 10 μL do conteúdo do poço da CIM e dos 2 poços anteriores a ele (também sem multiplicação) foi diluído 10^3 em solução salina a 0,9% e 100 μL da suspensão foi espalhado em meio sólido específico e incubado a 28°C por 24h (Figura 6). A CBM foi o poço com a menor concentração de antimicrobiano na linha, cuja placa não teve multiplicação de bactéria ou teve redução de 99,9%, quando comparado ao crescimento do C+. A determinação da CBM foi feita com base no resultado de três réplicas.

4.3. Avaliação da interação TAF + FFC contra *A. hydrophila*

4.3.1. Teste de sinergismo: *checkerboard*

A interação entre os antimicrobianos foi primeiro avaliada pelo método de microdiluição em caldo – *checkerboard*, proposto por Garcia e Isenberg (2007). O teste foi feito em placa de microtitulação com 96 poços estéreis, com tampa e fundo em U. Foi utilizada a CIM de cada antimicrobiano para a cepa que seria testada

² Foram selecionados estudos feitos com tilápia a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ em água doce. No caso do tianfenicol, por não existirem estudos nestas condições (FDA, 2017), calculou-se a média dos valores obtidos nos estudos existentes.

(T3R) como base para estabelecer o gradiente de concentrações. O intervalo de concentração do TAF foi 32 – 0,0625 µg TAF mL⁻¹ e do FFC 8 – 0,125 µg FFC mL⁻¹. Na placa do controle de qualidade (*E. coli* ATCC® 25922™) as concentrações de TAF e FFC foram 4096 – 8 µg TAF mL⁻¹ e 128 – 2 µg FFC mL⁻¹, respectivamente.

O meio de cultura, solução de antimicrobiano e inóculo foram preparados com base nos mesmos princípios seguidos para a realização da CIM. A incubação das placas também foi a 28°C por 24 h.

O Índice de Concentração Inibitória Fracionado (FICI) foi determinado como base na fórmula:

- a) $FICI = FIC_{TAF} + FIC_{FFC}$; onde $FIC_{TAF} = CIM_{TAF} \text{ na combinação} \div CIM_{TAF} \text{ isolado}$ e $FIC_{FFC} = CIM_{FFC} \text{ na combinação} \div CIM_{FFC} \text{ isolado}$.

A interpretação do resultado foi feita com base nos conceitos propostos pela *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Disease* – ESCMID (EUCAST, 2000); que estabelecem o seguinte:

- i. Efeito sinérgico: $FICI \leq 0,5$;
- ii. Efeito aditivo: $0,5 > FICI \leq 1$.
- i. Indiferença: $1 < FICI < 2$;
- ii. Efeito antagônico: ≥ 2 .

4.4. Eficácia *in vivo* do TAF isolado e combinado com FFC no tratamento de aeromonose em tilápia-do-Nilo

A escolha da tilápia-do-Nilo como modelo experimental para avaliar a eficácia do TAF e suas combinações no tratamento de aeromonose baseou-se no fato da tilápia ser a mais produzida no Brasil, e uma das mais importantes para a aquicultura mundial, e só existir um antimicrobiano legalizado no Brasil para o tratamento de doenças bacterianas que acometem a espécie.

4.4.1. Delineamento experimental

Duzentos e cinquenta e cinco (255) juvenis de tilápia-do-Nilo saudáveis (52 ± 8 g), foram distribuídos e aclimatados por sete dias em 17 tanques de água com capacidade para 250 L (15 peixes por tanque), em sistema aberto, com aeração e renovação constante de água. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial própria para a fase, numa taxa de 1,5% do peso vivo (ração onívoros – Trouw Nutrition®).

Durante o período experimental, as variáveis limnológicas da água foram aferidas com auxílio de uma sonda multiparâmetros (U-52 G – Horiba, Japão). Todas as variáveis mantiveram-se dentro da faixa de conforto recomendada para a espécie, com temperatura de $28,72 \pm 0,47^{\circ}\text{C}$; pH de $7,58 \pm 0,18$; oxigênio dissolvido: $5,83 \pm 1,25 \text{ mg L}^{-1}$ ($75,9 \pm 16,13\%$); potencial de oxido-redução (ORP): de $146,29 \pm 10,56 \text{ mV}$; condutividade elétrica de $0,18 \text{ mS cm}^{-1}$; total de sólidos dissolvidos (TDS) de $0,12 \text{ g L}^{-1}$ e salinidade de $0,01\%$.

Após o período de aclimação, 170 juvenis ($70 \pm 12 \text{ g}$) foram selecionados nas mesmas caixas experimentais acima descritas (10 peixes por caixa), divididos em seis grupos experimentais, denominados Grupo 1 (G1: TAF isolado), no qual 30 juvenis de tilápia-do-Nilo foram inoculados intraperitonealmente com $4,6 \times 10^7 \text{ UFC mL}^{-1}$ de *A. hydrophila* (T3R) (1 mL kg^{-1}), previamente anestesiados em solução alcoólica de benzocaína e logo após a inoculação, 10 mg mL^{-1} TAF (1 mL kg^{-1}) foi administrada por gavagem e os peixes distribuídos aleatoriamente em três caixas de água (10 peixes por caixa). O Grupo 2 (FFC isolado), no qual 30 juvenis de tilápia-do-Nilo foram inoculados intraperitonealmente com $4,6 \times 10^7 \text{ UFC mL}^{-1}$ de *A. hydrophila* (T3R) (1 mL kg^{-1}) e tratados com 10 mg mL^{-1} FFC (1 mL kg^{-1}) e os peixes distribuídos aleatoriamente em três caixas de água (10 peixes por caixa). Grupo 3 (Combinação 1: TAF + FFC), em que 30 juvenis de tilápia-do-Nilo foram inoculados intraperitonealmente com $4,6 \times 10^7 \text{ UFC mL}^{-1}$ de *A. hydrophila* (T3R) (1 mL kg^{-1}) e tratados via gavagem com $5 \text{ mg TAF} + 2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ FFC (1 mL kg^{-1}) e os peixes distribuídos aleatoriamente em três caixas de água (10 peixes por caixa). Grupo 4 (Combinação 2: TAF + FFC), em que os 30 juvenis foram inoculados com $4,6 \times 10^7 \text{ UFC mL}^{-1}$ de *A. hydrophila* (T3R) e tratados por gavagem com $2,5 \text{ mg TAF} + 1,25 \text{ mg mL}^{-1}$ FFC (1 mL kg^{-1}). Os peixes foram aleatoriamente distribuídos em três caixas de água. Grupo 5 (Controle T3R), 30 juvenis de tilápia-do-Nilo foram inoculadas com $4,6 \times 10^7 \text{ UFC mL}^{-1}$ de *A. hydrophila* (T3R) e tratadas por gavagem com PBS (1 mL kg^{-1}) e os peixes distribuídos aleatoriamente em três caixas de água. Grupo 6 = CG (Controle PBS), 20 juvenis de tilápia foram inoculados intraperitonealmente com 1 mL kg^{-1} de PBS e em seguida administrado via gavagem a mesma quantidade de PBS. Os peixes foram distribuídos em duas caixas experimentais e serviram como controle negativo do experimento.

Os peixes continuaram a ser alimentados duas vezes ao dia (1,5% pv) com ração comercial (onívoros – Trouw Nutrition®) própria para a espécie, durante todo o período experimental.

A mortalidade diária foi registrada a cada seis 6h, durante 10 dias após a infecção experimental e tratamento. No décimo dia, três peixes de cada tratamento foram selecionados aleatoriamente para análise microbiológica. Para a análise microbiológica, os peixes foram mortos em solução alcoólica de benzocaína e em seguida o rim cranial retirado assepticamente e inoculado em água peptonada estéril, e diluídos na concentração de 10^{-8} para então semeadura em meio *Tryptone Soya Agar* (Sigma – Aldrich®) para visualização do formato e textura da colônia, incubadas a 25°C por 24 h. Em seguida, uma colônia foi incubada em *Tryptone Soya Broth* (Sigma – Aldrich®) nas mesmas condições citadas e então armazenadas com 30% de glicerol a -70°C e posteriormente foi realizado o sequenciamento genético para confirmar a infecção por *Aeromonas hydrophila*.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados da porcentagem de mortalidade do experimento *in vivo* foram transformados em raiz quadrada, submetidos a análise de variância (ANOVA) e teste de médias pelo método de comparações múltiplas de Holm – Sidak a 5 % de probabilidade.

6. RESULTADOS

6.1. Sensibilidade *in vitro*

Os métodos usados para a leitura das placas apresentaram resultados satisfatórios; tendo sido possível visualizar facilmente a multiplicação bacteriana com e sem a coloração de cloreto de trifeniltetrazólio (Figura 7).

A concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do TAF para a cepa controle de qualidade, *Escherichia coli* ATCC® 25922™, variou de 64 – 128 µg mL⁻¹ e 512 µg mL⁻¹, respectivamente. Para a cepa ambiental, *Aeromonas hydrophila* ATCC® 7966™, a CIM e CBM do TAF foi de 1 µg mL⁻¹ e 4 µg mL⁻¹, respectivamente. A CIM do florfenicol (FFC) e da oxitetraciclina (OTC) para a cepa controle de qualidade, *E. coli* ATCC® 25922™ (Tabela 2), esteve dentro do

intervalo de concentrações estabelecido na metodologia usada; o que significa que os testes foram realizados dentro dos padrões recomendados (CLSI, 2014).

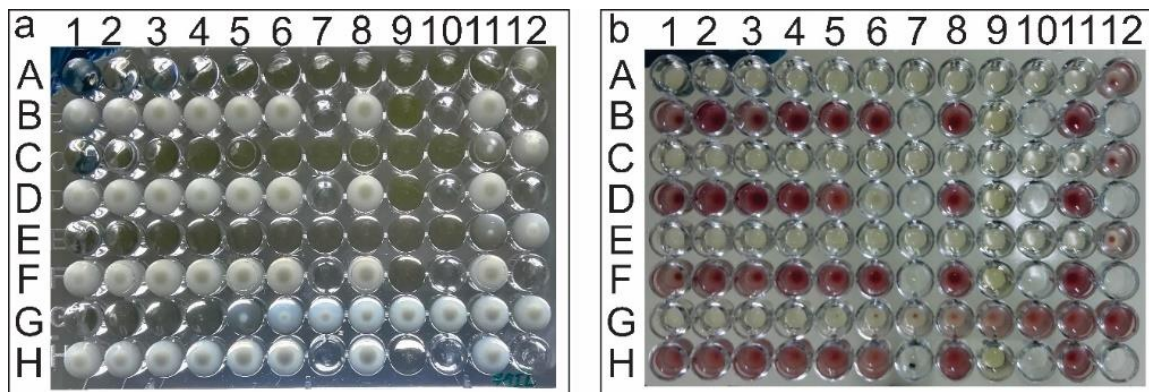


Figura 7. Diferença visual entre os métodos usados para a leitura da concentração inibitória mínima (CIM): a) convencional, b) cloreto de trifêniltetrazólio.

A CIM e CBM do TAF, FFC e OTC para as bactérias estudadas são apresentadas na Tabela 2. A OTC apresentou CIMs inferiores aos intervalos de concentração estudadas em algumas cepas de *Aeromonas hydrophila* (3/13), *A. jandaei* (1/4), e *A. veronii* (1/3). Por outro lado, o TAF e FFC tiveram CIMs superiores aos intervalos, em algumas cepas de *Edwardsiella tarda* (TAF) e/ou *Pseudomonas fulva* (TAF e FFC).

A diferença entre os valores da CIM e CBM do TAF e FFC foi inferior à três diluições na maior parte das cepas de *A. hydrophila* (18/20, incluindo a *A. hydrophila* ATCC® 7966™). Vinte e oito, das cinquenta cepas testadas (incluindo a *A. hydrophila* ATCC® 7966™) foram sensíveis ao TAF. O TAF teve atividade bactericida contra *Aeromonas* spp., *Citrobacter* spp., *Streptococcus* spp. e *Vibrio* spp.; e bacteriostática para *Enterococcus* spp., *Lactococcus* spp. e *Pseudomonas* spp. Todavia, a ação bactericida contra *Citrobacter* spp. e *Streptococcus* spp. só foi verificada em concentrações maiores do que a linha de corte (CBM > 8 µg mL⁻¹). Os gêneros *Aeromonas* (88,46%), *Lactococcus* (60%) e *Vibrio* (100%) foram os mais sensíveis. Contudo, algumas *Aeromonas* spp. e *Lactococcus* spp. tiveram CIM > 8 µg mL⁻¹. *Edwardsiella* spp. e *Pseudomonas* spp. foram resistentes aos três antimicrobianos testados e *Citrobacter* spp. ao TAF e FFC (Tabela 2).

Das amostras selecionadas aleatoriamente, para testar a sensibilidade à OTC e ao FFC, 44,18% foram resistentes à OTC e 28,57% ao FFC. Com exceção da cepa ambiental, *Aeromonas hydrophila* ATCC® 7966™, todas as cepas de *Aeromonas* envolvidas no estudo (19) foram sensíveis ao florfenicol (Tabela 2).

Tabela 2. Atividade antimicrobiana do tianfenicol, florfenicol e oxitetraciclina para 49 cepas de bactérias patogênicas de peixe e duas cepas padrão (ATCC®).

Cepa Nº Acesso	Hospedeiro	Isolamento		Atividade antimicrobiana µg mL ⁻¹						Interpretação*		
				TAF		FFC		OTC				
		Ano	Local	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	TAF	FFC	OTC
<i>Aeromonas caviae</i>												
KU605565.1	<i>O. niloticus</i>	2014	A	8	8	-	-	-	-	S	-	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>												
KU605574.1	<i>O. niloticus</i>	2015	B	32	32	1	1	0,25	0,25	R	S	S
KU605575.1				32	32	-	-	-	-	R	-	-
KU605576.1			C	32	32	-	-	-	-	R	-	-
KU605578.1				2	2	-	-	-	-	S	-	-
KU605579.1				2	2	0.5	1	≤0,125	0,25	S	S	S
KJ561018.1		2011	E	1	1	0,5	1	≤0,125	0,25	S	S	S
KU605548.1		2013	F	0,5	1	0,5	0,5	≤0,125	≤0,125	S	S	S
KU605549.1				0,5	2	1	1	0,25	0,25	S	S	S
KU605547.1		2012		4	4	2	2	0,5	0,5	S	S	S
KU605546.1				1	2	0,5	1	0,25	0,25	S	S	S
KJ561023.1		2012	G	1	2	-	-	-	-	S	-	-
KJ561031.1				0,5	1	1	1	>64	>64	S	S	R
KJ561029.1				0,5	1	0,5	1	>64	>64	S	S	R
KJ561026.1				0,5	1	-	-	-	-	S	-	-
T3R		2016	D	1	1	0,5	0,5	32	32	S	S	R
KU605566.1		2014	A	1	1	0,5	1	0,125	0,25	S	S	S
KJ561015.1	<i>P. mesopotamicus</i>		D	1	1	1	1	0,25	0,5	S	S	S
ATCC® 7966™	-	-	-	1	4	8	16	0,5	2	S	I	S
<i>Aeromonas jandaei</i>												

Continuação...

Cepa Nº Acesso	Hospedeiro	Atividade antimicrobiana µg mL ⁻¹										
		Isolamento		TAF		FFC		OTC		Interpretação*		
		Ano	Local	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	TAF	FFC	OTC
IA1	<i>O. niloticus</i>	2017	D	2	2	0,5	1	0,25	0,25	S	S	S
KU605541.1		2016	A	1	2	0,5	0,5	0,25	0,25	S	S	S
KJ561033.1		2011	E	1	1	2	4	≤0,125	≤0,125	S	S	S
KJ561032.1		2013	H	1	2	0,5	0,5	16	16	S	S	R
<i>Aeromonas veronii</i>												
KX385275.1	<i>O. niloticus</i>	2015	C	0,5	2	0,5	0,5	≤0,125	0,25	S	S	S
KU605577.1				0,5	2	-	-	-	-	S	-	-
KJ561039.1		2013	H	2	2	0,25	0,25	0,5	0,5	S	S	S
KJ561035.1	<i>P. mesopotamicus</i>	2014	D	1	1	1	1	32	32	S	S	R
<i>Citrobacter freundii</i>												
KJ561090.1	<i>P. corruscans</i>	2011	E	128	128	16	64	0,5	2	R	R	S
KJ561092.1	<i>P. fasciatum</i>	2012	I	64	128	-	-	-	-	R	-	-
LP15/3	<i>P. scalare</i>	2015	D	64	64	32	64	1	2	R	R	S
<i>Edwardsiella tarda</i>												
KJ560941.1	<i>O. niloticus</i>	2012	G	>1024	>1024	32	64	64	64	R	R	R
I3	<i>O. niloticus</i>	2016	D	>1024	>1024	64	>64	32	64	R	R	R
<i>Enterococcus casseliflavus</i>												
KJ560959.1	<i>O. niloticus</i>	2010	J	16	>128	-	-	-	-	R	-	-
KJ560960.1		2011	D	64	>256	-	-	-	-	R	-	-
<i>Lactococcus garviae</i>												
KJ560984.1	<i>O. niloticus</i>	2011	E	4	>16	-	-	-	-	S	-	-
KJ560986.1		2012	G	4	>16	-	-	-	-	S	-	-
KJ560992.1	<i>P. fasciatum</i>	2012	I	2	>8	-	-	-	-	S	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>												
KJ561005.1	<i>O. niloticus</i>	2012	G	32	>128	-	-	-	-	R	-	-

Continuação...

Cepa Nº Acesso	Hospedeiro	Atividade antimicrobiana µg mL ⁻¹											
		Isolamento		TAF		FFC		OTC		Interpretação*			
		Ano	Local	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	TAF	FFC	OTC	
<i>Lactococcus raffinolactis</i>													
KJ561011.1	<i>O. niloticus</i>	2011	D	512	>1024	-	-	-	-	R	-	-	
<i>Pseudomonas fulva</i>													
KJ561097.1	<i>O. niloticus</i>	2011	E	128	>512	16	32	32	32	R	R	R	
KJ561098.1		2012	G	>1024	>1024	>64	>64	4	4	R	R	R	
<i>Pseudomonas monteilii</i>													
KJ561100.1	<i>O. niloticus</i>	2012	G	512	>1024	64	>64	>64	>64	R	R	R	
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>													
KJ561104.1	<i>O. niloticus</i>	2012	G	512	1024	64	>64	>64	>64	R	R	R	
<i>Streptococcus agalactiae</i>													
KU605567.1	<i>O. niloticus</i>	2014	C	128	512	-	-	1	4	R	-	S	
KU605568.1				128	512	-	-	4	16	R	-	R	
KU605569.1				128	512	-	-	8	32	R	-	R	
KU605571.1				B	128	512	-	-	4	16	R	-	R
KU605572.1					128	512	-	-	4	16	R	-	R
KX385295.1		2016	C	128	512	-	-	0,5	2	R	-	S	
<i>Vibrio fluvialis</i>													
L5	<i>P. mesopotamicus</i>	2016	D	2	2	1	2	0,25	1	S	S	S	
Controle de qualidade													
ATCC® 25922™	<i>Escherichia coli</i>	-	-	64-128	512	8	32	0,5	-	R	R	S	

* S – sensível; I – intermediária; R – resistente.

Aproximadamente um quarto (26,32%) das cepas de *Aeromonas* foram resistentes a OTC. O FFC e a OTC tiveram ação bactericida sobre 95,83% e 97,14% das bactérias testadas aleatoriamente, respectivamente. O ano e local de isolamento não tiveram grande influência no padrão de sensibilidade das bactérias; visto que bactérias do mesmo gênero apresentaram padrões semelhantes mesmo tendo sido coletadas de lugares diferentes em anos diferentes (Tabela 2).

6.2. Avaliação da interação pelo método de *checkerboard*

A CIM do TAF e FFC para a cepa controle, *E. coli* ATCC® 25922™, esteve dentro das concentrações esperadas, tendo sido de 64 µg mL⁻¹ e 8 µg mL⁻¹, respectivamente. A combinação do TAF com FFC teve efeito aditivo tanto para a cepa controle de qualidade (FICI = 1), como para *A. hydrophila* (T3R) (Tabela 3); por essa razão se decidiu realizar a avaliação *in vivo* da combinação.

Tabela 3. Atividade antimicrobiana *in vitro* da combinação tianfenicol + florfenicol contra *Aeromonas hydrophila* (T3R) isolada de tilápia-do-Nilo doente.

Poço sem crescimento	TAF		FFC		ΣFICI (FICI TAF + FICI FFC)	Interpretação
	[µg/mL]	FICI	[µg/mL]	FICI		
A6	1	CIM TAF	0	CIM TAF	CIM TAF	CIM TAF
C5	0,5	0,5	0,125	0,25	0,75	Aditivo
D5	0,5	CIM FFC	0,5	CIM FFC	CIM FFC	CIM FFC

6.3. Eficácia do TAF e suas combinações no tratamento de aeromonose em tilápia-do-Nilo

Os peixes desafiados começaram a morrer logo nas primeiras 6h pós desafio. Mais da metade (60%) dos peixes desafiados e não medicados (grupo 5: G5) morreram nesse período com sinais característicos de aeromonose. Por outro lado, a taxa de mortalidade verificada nesse período, nos grupos de peixes desafiados e medicados foi menor e similar entre os grupos (G1, G2, e G3 = 6.67%; e G4 = 10,74%). Nenhum peixe do grupo controle (CG) morreu. 12h pós desafio, a mortalidade no G5 chegou aos 90% enquanto nos outros grupos permaneceu estável (G1= 13,33%; G2= 13,33%; G3= 13,33% e G4= 10,74). A taxa de

mortalidade foi estabilizada 36h após à infecção. Ao final dos 10 dias de observação, os grupos tratados com os antimicrobianos tiveram maior porcentagem de sobrevivência (G1= $88,33 \pm 11,55\%$; G2= $70 \pm 10\%$; G3= $73,33 \pm 11,55\%$ e G4= $85,93 \pm 5,13\%$) em relação ao grupo não tratado [G5= $3,33 \pm 5,77\%$] (Figura 8) ($p < 0,001$). Todos os peixes mortos durante o experimento apresentaram sinais característicos de aeromonose, como hemorragia generalizada, exoftalmia, opacidade ocular, ascite com intestino repleto de exsudado sanguinolento, hepatomegalia e renomegalia (Figura 9). Na análise bacteriológica realizada, foi possível isolar uma bactéria com características fenotípicas, bioquímicas e moleculares similares à bactéria usada na infecção experimental; o que sugere que seja a mesma bactéria usada na infecção experimental.

Apesar do teste *in vitro* ser realizado para avaliar a interação entre o TAF e FFC ter demonstrado resultados com efeitos aditivos, na avaliação *in vivo*, uma dose proporcional a combinação aditiva (G3) e outra mais baixa (G4), foram capazes de controlar a mortalidade (Figura 8); o que pode ter resultado de uma interação sinérgica entre os antimicrobianos. Foi possível controlar a mortalidade dos peixes desafiados usando cerca de 37,5% da quantidade de antimicrobiano normalmente usada para o mesmo fim. Não houve diferença significativa na taxa de mortalidade entre os peixes tratados com os antimicrobianos ($p < 0,001$). Nenhuma bactéria foi isolada dos peixes sobreviventes.

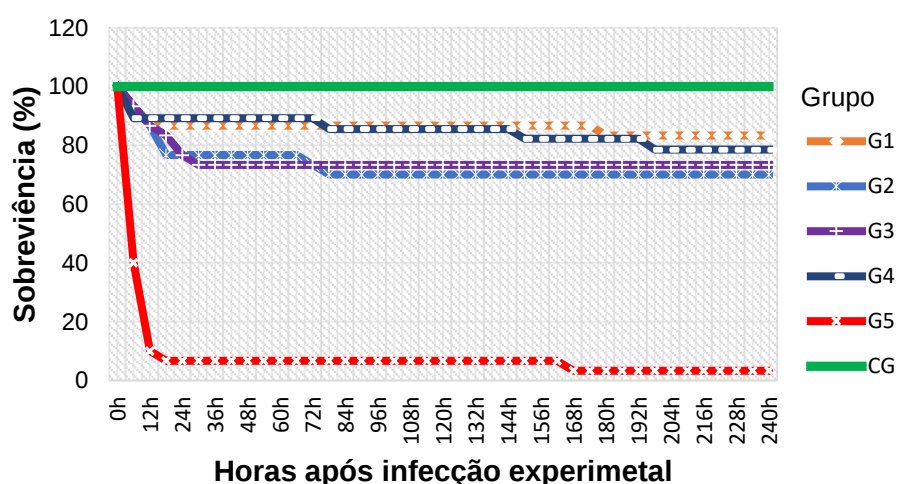


Figura 8. Sobrevivência (%) de tilápias experimentalmente infectadas com *Aeromonas hydrophila* e tratadas com tianfenicol (TAF) e florfenicol (FFC) combinados e isolados. G1: *Aeromonas hydrophila* + TAF (10 mg kg^{-1}); G2: *A. hydrophila* + FFC (10 mg kg^{-1}); G3: *A. hydrophila* + [TAF + FFC] ($5 + 2,5 \text{ mg kg}^{-1}$); G4: *A. hydrophila* + [TAF + FFC] ($2,5 + 1,25 \text{ mg kg}^{-1}$); G5: *A. hydrophila*; GC: Controle (PBS).



Figura 9. Sinais clínicos de bacteriose observados em tilápias mortas após infecção experimental com cepa patogênica de *Aeromonas hydrophila*: a) opacidade ocular, exoftalmia (seta vermelha); b) hemorragia generalizada, ascite (seta magenta); c) cavidade peritoneal repleta de exsudado sanguinolento (seta amarela), hepatomegalia (seta azul) e renomegalia (seta verde).

7. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nos testes *in vitro* permitem inferir que o TAF pode ser uma boa alternativa para tratar doenças causadas por *Aeromonas* (*A. caviae*, *A. hydrophila*, *A. jandaei* e *A. veronii*), *Lactococcus garviae* e *Vibrio fluvialis* em tilápia-do-Nilo cultivada no Brasil, pois grande parte das cepas avaliadas (75%) apresentaram uma CIM ($\leq 2 \mu\text{g mL}^{-1}$) e CBM ($\leq 4 \mu\text{g mL}^{-1}$) inferior às concentrações ($\sim 8 \mu\text{g mL}^{-1}$) que são alcançadas nos tecidos de organismos aquáticos após administração do antimicrobiano pela via oral (CASTELLS et al., 2000; MALVISI et al., 2002; FANG et al., 2013).

Para que um antimicrobiano seja eficaz no tratamento de uma bacteriose, concentrações maiores ou iguais a CIM do antimicrobiano para a bactéria devem ser alcançadas no local de infecção no hospedeiro. Fukui et al. (1987) ao administrarem uma dose de TAF de 10 mg kg^{-1} à kinguios (*Carassius auratus* Linnaeus, 1758) infectados experimentalmente com *Vibrio anguillarum* ($\text{CIM}_{\text{TAF}} = 3,2 \mu\text{g mL}^{-1}$), verificaram sobrevivência de 100% dos peixes no final do período experimental (4 dias). No entanto, em um experimento separado realizado pelo mesmo grupo de pesquisadores, a infecção experimental de enguias (*Anguilla anguilla* Linnaeus, 1758) com uma cepa de *Edwardsiella tarda* ($\text{CIM}_{\text{TAF}} = 12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) só foi controlada (100% de sobrevivência) com uma dose de TAF de 25 mg kg^{-1} . Nesse experimento, as doses de $12,5$ e $6,3 \text{ mg kg}^{-1}$ resultaram em 60% e 100% de mortalidade, respectivamente. Apesar de não existirem valores de corte epidemiológico do TAF para bactérias isoladas de organismos aquáticos; a correlação existente entre a CIM, a dose administrada e o efeito terapêutico

verificado, permite afirmar que as bactérias descritas como sensíveis com base no experimento *in vivo* podem ser tratadas com doses de TAF de 10 mg kg⁻¹. Assim, as CIMs verificadas se encontram abaixo do valor de corte epidemiológico ($\leq 4 \mu\text{g mL}^{-1}$) proposto por Godoy et al. (2008) para o FFC (antimicrobiano da mesma família do TAF e com padrão farmacocinético igual (FANG et al., 2013)).

O resultado do *checkerboard* da combinação de TAF com FFC mostrou que estes possuem um efeito aditivo contra *A. hydrophila* de acordo com os conceitos propostos pela *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Disease* – ESCMID (EUCAST, 2000); indicando que é possível diminuir as quantidades de antimicrobiano e melhorar a atividade antimicrobiana. A resistência ao TAF foi verificada em bactérias dos gêneros *Citrobacter*, *Edwardsiella* e *Pseudomonas*, que também foram resistentes ao FFC e OTC. Bactérias destes gêneros geralmente apresentam resistência à esses antimicrobianos (FUKUI; FUJIHARA; KANO, 1987).

A alta taxa de sobrevivência ($88,33 \pm 11,55\%$) e ausência do patógeno no final do experimento *in vivo*, nos peixes infectados com *A. hydrophila* e tratados com TAF (10 mg kg⁻¹) comparado a baixa sobrevivência no grupo de peixes desafiados e não medicados (grupo controle= $3,33 \pm 5,77\%$), comprova que a bactéria é sensível ao antimicrobiano (CIM= $1 \mu\text{g mL}^{-1}$) e indica que esta terapia é eficaz para reduzir significativamente a mortalidade de tilápia-do-Nilo. Esse é o primeiro relato da eficácia *in vivo* do TAF no controle de aeromonose em tilápia-do-Nilo. Por outro lado, mesmo não tendo dados farmacocinéticos do tianfenicol em tilápia-do-Nilo, pode se inferir que ao administrar uma dose de TAF de 10 mg kg⁻¹ a tilápia-do-Nilo cultivadas em água doce a $28,72 \pm 0,47^\circ\text{C}$ pode conferir ao plasma concentrações $\geq 1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (CIM da bactéria usada na infecção experimental) ou estimular de alguma forma o combate à infecção pelo peixe. Tullio et al. (2004) ao estudarem a influência do TAF sobre a resposta imunológica inata humana no combate de *Streptococcus pyogenes*, verificaram que o antimicrobiano não só agia diretamente sobre a bactéria, mas também estimulava a resposta imunológica pelo aumento da eficiência fagocitária dos granulócitos.

Apesar da ausência de diferença estatística ($p < 0,001$) entre a sobrevivência dos peixes tratados com 10 mg kg⁻¹ de TAF ($88,33 \pm 11,55\%$) e 10 mg kg⁻¹ de florfenicol – FFC ($70 \pm 10\%$); o ligeiro aumento na sobrevivência dos peixes tratados com TAF, pode ter ocorrido devido as pequenas diferenças na

absorção e distribuição tecidual deste antimicrobiano, uma vez que a CIM do TAF para a cepa usada foi maior (1 vs. 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Fang et al. (2013) ao compararem parâmetros farmacocinéticos e de distribuição tecidual do TAF e FFC em camarão – branco – do – pacífico, não observaram diferença significativa entre os parâmetros farmacocinéticos, contudo, verificaram uma concentração máxima de TAF na hemolinfa, músculo e hepatopâncreas maior que a do FFC ($7,96 \pm 1,61 \mu\text{g mL}^{-1}$ vs. $5,53 \pm 1,14 \mu\text{g mL}^{-1}$; $2,98 \pm 0,53 \mu\text{g mL}^{-1}$ vs. $1,91 \pm 0,18 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $204,25 \pm 33,41 \mu\text{g mL}^{-1}$ vs. $164,22 \pm 25,64 \mu\text{g mL}^{-1}$, respetivamente). Apesar do reconhecimento universal de que o antimicrobiano deve estar presente em concentração suficiente e por tempo adequado no local da infecção, as variáveis que afetam a duração do tratamento não são bem conhecidas (GIGUÈRE; PRESCOTT; DOWLING, 2013). Giguère et al. (2013) afirmaram que o tratamento por 2 – 3 dias são suficientes para determinar a eficácia terapêutica de um antimicrobiano contra um patógeno. De fato, após 36h de experimento, a mortalidade cumulativa nos grupos de peixes desafiados e medicados com antimicrobiano ficou estável (G1= 13,33%; G2= 23,33%; G3= 26,67% e G4= 10,74%) e continuou menor em relação à observada no grupo desafiado e não medicado (G5= 93,33%). Efeitos similares utilizando o mesmo antimicrobiano também foram observados por Soto et al. (2010), ao avaliarem a eficácia terapêutica do florfenicol no tratamento da infecção por *Francisella asiática* em tilápia-do-Nilo.

A eficácia *in vivo* da combinação de TAF com FFC no tratamento de aeromonose em tilápia-do-Nilo (determinada pela porcentagem de sobrevivência, G3= $73,33 \pm 11,55\%$ e G4= $85,93 \pm 5,13\%$), depois do resultado *in vitro* obtido pelo *checkerboard* indicar que a combinação destes antimicrobianos no máximo poderia resultar num efeito aditivo contra a cepa de *A. hydrophila* estudada, reforça a necessidade de realizar experimentos *in vivo* para determinar o efeito terapêutico da combinação de antimicrobianos.

Os métodos *in vitro* mais usados para avaliar o sinergismo geram muita polêmica, principalmente por não gerarem resultados reprodutíveis e por sofrerem grande influência do modelo estatístico usado para analisar os dados (ODDS, 2003). Greco et al. (1995), ao realizarem uma revisão crítica sobre o estudo do sinergismo, alertaram para a diferente interpretação que pode ocorrer com os dados gerados, de acordo com o modelo matemático usado na análise. Toshihide

et al. (1998), ao compararem a atividade antimicrobiana do TAF isolada e três outros antimicrobianos (ampicilina, oxitetraciclina e canamicina) com a atividade antimicrobiana do TAF combinado com a tilosina (TLS) ou lincomicina, contra *Pasteurella multocida*, *P. haemolytica* e *Mycoplasma bovis*, verificaram que a combinação de TAF e TLS apresentou resultados terapêuticos superiores em relação aos observados com os outros antimicrobianos estudados. No entanto, a concentração inibitória fracionada (FICI) obtida pelo *checkerboard* apresentava valores próximos de um. Wei et al. (2016a, 2016b) também verificaram algo similar, só que decidiram fazer *Time-kill curve* para confrontar os dados. Algumas concentrações que foram primeiramente identificadas como aditivas pelo *checkerboard* passaram para sinérgicas e no experimento *in vivo* também tiveram melhores resultados terapêuticos. No nosso estudo, também pode ter ocorrido sinergismo nas combinações. Contudo, pela falta de estudos farmacocinéticos do TAF em tilápia-do-Nilo cultivada em água doce a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, e não termos testado o tratamento com a concentração do TAF correspondente a combinação; abre-se a possibilidade do efeito verificado ter ocorrido isoladamente ao TAF e não a combinação; visto que mesmo não tendo diferença significativa na sobrevivência do G1 ($88,33 \pm 11,55\%$), este grupo teve sobrevivência superior as duas combinações (G3= $73,33 \pm 11,55\%$ e G4= $85,93 \pm 5,13\%$). Todavia, em um estudo feito para avaliar a eficácia terapêutica do TAF e FFC no tratamento de vibriose (*Vibrio anguillarum*: $\text{MIC}_{\text{TAF}} = 3,2 \mu\text{g mL}^{-1}$; $\text{MIC}_{\text{FFC}} = 0,4 \mu\text{g mL}^{-1}$) em kinguios, verificou-se que as doses de $2,5 \text{ mg kg}^{-1}$ de TAF e $1,30 \text{ mg kg}^{-1}$ de FFC reduziam 40% e 70% da mortalidade, respectivamente (FUKUI; FUJIHARA; KANO, 1987).

O TAF demonstrou ser uma boa alternativa para ser usado como primeira linha de tratamento de doenças bacterianas em tilápia-do-Nilo cultivada no Brasil. No entanto, para que ele seja legalizado, estudos sobre a farmacocinética, depleção e efeitos sobre o sistema imunológico da tilápia-do-Nilo devem ser realizados. Com esse conjunto de informação será possível estabelecer uma recomendação de utilização mais eficiente.

8. CONCLUSÕES

- O tianfenicol apresentou uma alta atividade antimicrobiana ($CIM \leq 2 \mu\text{g mL}^{-1}$) contra bactérias dos gêneros *Aeromonas*, *Lactococcus* e *Vibrio*.
- O tianfenicol foi eficaz no tratamento de aeromonose em tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758).
- Combinando o tianfenicol com o florfenicol foi possível diminuir 62,5% da dose de florfenicol atualmente usada para tratar aeromonose em tilápia-do Nilo e obter a mesma eficácia terapêutica.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso excessivo e inadequado de antimicrobianos na aquicultura, associado ao crescente número de doenças bacterianas que acometem organismos aquáticos de importância econômica; são problemas que podem a longo prazo tornar a aquicultura uma atividade inviável, caso não se tomem medidas a curto e longo prazo para resolvê-los. O uso exclusivo de antimicrobianos para o tratamento de bacterioses, cujo agente etiológico seja sensível e o aumento de opções terapêuticas eficazes para o mesmo agente etiológico, são medidas que podem contribuir para a resolução desses problemas.

O uso de doses subterapêuticas, assim como a administração de doses inefetivas, favorecem a emergência de resistência bacteriana e representam um perigo para a saúde pública e para o meio ambiente.

No presente trabalho, foi descrito o cenário atual do uso de antimicrobianos na aquicultura mundial, com maior enfoque no Brasil; onde somente um antimicrobiano é autorizado para tratar várias doenças bacterianas que acometem a principal espécie de peixe cultivada no país. Com o intuito de reverter essa situação; um antimicrobiano disponível no mercado e autorizado para outras espécies animais foi avaliado como uma opção de tratamento para as principais doenças que acometem peixes cultivados no Brasil. Adicionalmente, foi estudada a possibilidade de combinar este antimicrobiano com um dos antimicrobianos atualmente aprovados; visando reduzir a dose de antimicrobiano usada sem perder a eficácia terapêutica.

Apesar dos testes *in vitro* de sensibilidade aos antimicrobianos serem rápidos e indispensáveis para uma terapia efetiva; é importante que estes sejam acompanhados de testes *in vivo* de eficácia terapêutica quando o objetivo é implementar terapias envolvendo dois ou mais antimicrobianos. Para a legalização de um antimicrobiano; informações sobre a eficácia terapêutica *in vivo*, a farmacocinética e a farmacodinâmica do antimicrobiano são imprescindíveis.

O antimicrobiano estudado apresentou uma alta atividade antimicrobiana *in vitro* contra *Aeromonas* spp., *Lactococcus* spp., e *Vibrio* spp., o que permite afirmar que este pode ser uma boa opção de tratamento para bacterioses causadas por bactérias destes gêneros. Nos testes *in vivo*, *Aeromonas hydrophila* (a única espécie avaliada), foi sensível ao antimicrobiano isolado e às combinações do

antimicrobiano com um dos antimicrobianos aprovados; salientando que as combinações continham menos da metade da quantidade de antimicrobiano normalmente usada.

Para a legalização deste antimicrobiano na aquicultura brasileira, recomenda-se a realização de estudos de farmacocinética, farmacodinâmica, depleção de resíduos e influência sobre a saúde das principais espécies de organismos aquáticos cultivados no país.

10. REFERÊNCIAS

- ABBOTT, S. L.; CHEUNG, W. K. W.; JANDA, J. M. The genus *Aeromonas*: Biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 6, p. 2348–2357, 2003.
- ALBINI, E.; BELLUCO, G.; BERTON, M.; SCHIOPPACASSI, G.; UNGHERI, D. *In vitro* Antibacterial Activity of Thiamphenicol Glycinate Acetylcysteinate against Respiratory Pathogens. **Arzneimittel-Forschung**, v. 49, n. 1, p. 533–537, 1999.
- APABLAZA, P.; FRISCH, K.; BREVIK, ?yvind Jakobsen; SM?GE, S. B.; VALLESTAD, C.; DUESUND, H.; MENDOZA, J.; NYLUND, A. Primary isolation and characterization of *Tenacibaculum maritimum* from Chilean Atlantic salmon mortalities associated with a *Pseudochattonella* spp. algal bloom. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 7659, n. June, p. 08997659.2017.1339643, 2017.
- ASCHE, F.; HANSEN, H.; TVETERAS, R.; TVETERAS, S. The salmon disease crisis in Chile. **Marine Resource Economics**, v. 24, n. 4, p. 405–411, 2009.
- ASSIS, G. B. N.; TAVARES, G. C.; PEREIRA, F. L.; FIGUEIREDO, H. C. P.; LEAL, C. A. G. Natural coinfection by *Streptococcus agalactiae* and *Francisella noatunensis* subsp . *orientalis* in farmed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L .). **Journal of Fish Diseases**, v. 40, n. 1, p. 51–63, 2017.
- AUSTIN, B.; AUSTIN, D. A. **Bacterial fish pathogens: diseases of farmed and wild fish**. Fourth ed. Edinburgh: Springer, 2007.
- AUSTIN, B.; AUSTIN, D. A. **Bacterial fish pathogens, disease of farmed and wild fish**. Sixth Edit ed. [s.l.] Springer International Publishing Switzerland, 2016.
- AUSTIN, B.; STOBIE, M.; ROBERTSON, P. A. W. *Citrobacter freundii*: the cause of gastro-enteritis leading to progressive low level mortalities in farmed raibow trout, *Onchorhynchus mykiss* Walbaum, in Scotland. **Bulletin of the European Association of Fish Pathologists**, v. 12, n. 5, p. 2, 1992.
- BEKKER, A.; HUGO, C.; ALBERTYN, J.; BOUCHER, C. E.; BRAGG, R. R. Pathogenic Gram-positive cocci in South African rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Journal of Fish Diseases**, v. 34, n. 6, p. 483–487, 2011.
- BJÖRKLUND, H.; BYLUND, G. Temperature-related absorption and excretion of

oxytetracycline in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). **Aquaculture**, v. 84, n. 3–4, p. 363–372, 1990.

BONDAD-REANTASO, M. G.; SUBASINGHE, R. P.; ARTHUR, J. R.; OGAWA, K.; CHINABUT, S.; ADLARD, R.; TAN, Z.; SHARIFF, M. Disease and health management in Asian aquaculture. **Veterinary Parasitology**, v. 132, n. 3–4 SPEC. ISS., p. 249–272, 2005.

BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T.; GARRITY, G. M.; BRENNER, D. J.; VOS, P. De; GARRITY, G. M.; GOODFELLOW, M.; NOEL, R. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Proteobacteria, The Gammaproteobacteria**. Second Edi ed. [s.l.] Springer, 2005.

BULLER, N. B. **Bacteria and fungi from fish and other aquatic animals: A practical identification manual**. Second Edi ed. [s.l.] CABI, 2014.

CANNON, M.; HARFORD, S.; DAVIES, J. A comparative study on the inhibitory actions of chloramphenicol, thiamphenicol and some fluorinated derivatives. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 26, n. 3, p. 307–317, 1990.

CARRASCHI, S. P.; CRUZ, C.; MACHADO NETO, J. G.; CASTRO, M. P.; BORTOLUZZI, N. L.; GÍRIO, A. C. F. Eficácia do florfenicol e da oxitetraciclina no controle de *Aeromonas hydrophila* em pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 3, p. 579–583, 2011.

CASTELLS, G.; CAPECE, B. P. S.; PÉREZ, F.; MARTÍ, G.; ARBOIX, M.; CRISTÒFOL, C. Allometric analysis of thiamphenicol disposition among seven mammalian species. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 24, n. 3, p. 193–197, 2001.

CASTELLS, G.; INTORRE, L.; BERTINI, S.; CRISTÒFOL, C.; SOLDANI, G.; ARBOIX, M. Oral single-dose pharmacokinetics of thiamphenicol in the sea-bass (*Dicentrarchus labrax*). **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 23, n. 1, p. 53–54, 2000.

CHEN, C.; BOWSER, P. R. Pharmacokinetics of oxytetracycline in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* challenged with *Streptococcus iniae* and *Vibrio vulnificus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 36, n. 3, p. 262–270, 2005.

CHEN, C. Y.; GETCHELL, R. G.; WOOSTER, G. A.; CRAIGMILL, A. L.; BOWSER, P. R. Oxytetracycline residues in four speices of fish after 10-day oral dosing in feed. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 16, n. 4, p. 208–219, 2004.

CHENIA, H. Y. Prevalence and characterization of plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Aeromonas* spp. isolated from South African freshwater fish. **International Journal of Food Microbiology**, v. 231, p. 26–32, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.04.030>>.

CHIDEROLI, R. T.; AMOROSO, N.; MAINARDI, R. M.; SUPHORONSKI, S. A.; DE PADUA, S. B.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A.; MOSELA, M.; MORALEZ, A. T. P.; DE OLIVEIRA, A. G.; ZANOLO, R.; DI SANTIS, G. W.; PEREIRA, U. P. Emergence of a new multidrug-resistant and highly virulent serotype of *Streptococcus agalactiae* in fish farms from Brazil. **Aquaculture**, v. 479, p. 45–51, 2017a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.05.013>>.

CHIDEROLI, R. T.; AMOROSO, N.; MAINARDI, R. M.; SUPHORONSKI, S. A.; DE PADUA, S. B.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A.; MOSELA, M.; MORALEZ, A. T. P.; DE OLIVEIRA, A. G.; ZANOLO, R.; DI SANTIS, G. W.; PEREIRA, U. P. Emergence of a new multidrug-resistant and highly virulent serotype of *Streptococcus agalactiae* in fish farms from Brazil. **Aquaculture**, v. 479, n. March, p. 45–51, 2017b.

CLSI, C. and L. S. I. **Methods for Broth Dilution Susceptibility Testing of Bacteria Isolated From Aquatic Animals; Proposed Guideline**. [s.l: s.n.]v. 25

CLSI, C. and L. S. I. Methods for broth dilution susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals; Approved Guideline — Second Edition. **CLSI document VET04-A2**, n. June, 2014.

COLWELL, R. R.; MAC DONELL, M. T.; DE LEY, J. Proposal to Recognize the Family Aeromonadaceae fam. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, n. 3, p. 473–477, 1986.

CVM, C. for V. M. Enforcement Priorities for Drug Use in Aquaculture. **Program Policy and Procedures Manual**, p. 1–15, 2011.

DA SILVA, B. C.; MOURIÑO, J. L. P.; VIEIRA, F. N.; JATOBÁ, A.; SEIFFERT, W. Q.; MARTINS, M. L. Haemorrhagic septicaemia in the hybrid surubim (*Pseudoplatystoma corruscans* × *Pseudoplatystoma fasciatum*) caused by

Aeromonas hydrophila. **Aquaculture Research**, v. 43, n. 6, p. 908–916, 2012.

DAFF, D. of A. F. & F. **South African Aquacutred Fish Monitoring and Control Programme**. [s.l: s.n.].

DANG, H.; ZHANG, X.; SONG, L.; CHANG, Y.; YANG, G. Molecular determination of oxytetracycline-resistant bacteria and their resistance genes from mariculture environments of China. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 6, p. 2580–2592, 2007.

DE PÁDUA, S. B.; MARQUES, D. P.; SEBASTIÃO, F. A.; PILARSKI, F.; MARTINS, M. L.; ISHIKAWA, M. M. Isolation, characterization and pathology of *Citrobacter freundii* infection in native Brazilian catfish *Pseudoplatystoma*. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 7, n. 3, p. 151–157, 2014.

DSA, D. de S. A. Informe sobre uso de antimicrobianos en la salmonicultura nacional. **SERNAPESCA- Subdireccion de acuicultura, Departamento de Salud Animal**, p. 26, 2015.

EL-BARBARY, M. I.; HAL, A. M. Molecular identification and pathogenicity of *Citrobacter* and *Serratia* species isolated from cultured *Oreochromis niloticus*. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 43, n. 3, p. 255–263, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejar.2017.09.004>>.

EMA, E. M. A. Defined daily doses for animals (DDDvet) and defined course doses for animals (DCDvet): European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption (ESVAC). **European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumition (ESVAC)**, v. 44, n. April, 2016. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Other/2016/04/WC500205410.pdf>.

EMA, E. M. A. Committee for Medicinal Products for Veterinary use: Thiamphenicol (Extension to ovine and extrapolation to all mammalian species). **EMA Veterinary Medicines and Inspections**, n. March, p. 14, 2006.

EUCAST. **Reading guide EUCAST disk diffusion method for antimicrobial susceptibility testing**. [s.l: s.n.].

EUCAST, (European Commitee for Antimicrobial Susceptibility Testing).

Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 6, n. 9, p. 503–508, 2000.

EVANS, J. J.; KLESIUS, P. H.; SHOEMAKER, C. A. First isolation and characterization of *Lactococcus garvieae* from Brazilian Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), and pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* (Spix & Agassiz). **Journal of Fish Diseases**, v. 32, n. 11, p. 943–951, 2009.

EVANS, J. J.; PASNIK, D. J.; KLESIUS, P. H. Differential pathogenicity of five *Streptococcus agalactiae* isolates of diverse geographic origin in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). **Aquaculture Research**, v. 46, n. 10, p. 2374–2381, 2015.

FANG, W.; LI, G.; ZHOU, S.; LI, X.; HU, L.; ZHOU, J. Pharmacokinetics and tissue distribution of thiamphenicol and florfenicol in pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* in freshwater following oral administration. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 25, n. 2, p. 83–89, 2013.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. **Fisheries and Aquaculture Department**, p. 192, 2016.

FAO. An Overview of Recently Published Global Aquaculture Statistics. **Fisheries and Aquaculture Department**, p. 3, 2017. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-bs235e.pdf>>.

FELLESKATALOGEN. **Legemidler til dyr**. Disponível em: <<https://www.felleskatalogen.no/medisin-vet/retningslinjer-digital-bruk>>.

FENG, J. Bin; JIA, X. P.; LI, L. D. Tissue distribution and elimination of florfenicol in tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. caureus*) after a single oral administration in freshwater and seawater at 28 °C. **Aquaculture**, v. 276, n. 1–4, p. 29–35, 2008.

FIGUEIREDO, H. C. P.; KLESIUS, P. H.; ARIAS, C. R.; EVANS, J.; SHOEMAKER, C. A.; PEREIRA, D. J.; PEIXOTO, M. T. D. Isolation and characterization of strains of *Flavobacterium columnare* from Brazil. **Journal of Fish Diseases**, v. 28, n. 4, p. 199–204, 2005.

FORSTER, J.; HART, S. **Harmful Algal Blooms Assessing Chile's Historic HAB**

Events of 2016 A Report Prepared for the Global Aquaculture Alliance. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.aquaculturealliance.org/wp-content/uploads/2017/05/Final-Chile-report.pdf?x69012>>.

FUKUI, H.; FUJIHARA, Y.; KANO, T. *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of florfenicol, a new flourinated analog of thiamphenicol, against fish pathogens. **Fish Pathology**, v. 22, n. 4, p. 201–207, 1987.

FUKUSHIMA, H. C. S.; LEAL, C. A. G.; CAVALCANTE, R. B.; FIGUEIREDO, H. C. P.; ARIJO, S.; MORIÑIGO, M. A.; ISHIKAWA, M.; BORRA, R. C.; RANZANI-PAIVA, M. J. T. *Lactococcus garvieae* outbreaks in Brazilian farms Lactococcosis in *Pseudoplatystoma* sp. – development of an autogenous vaccine as a control strategy. **Journal of Fish Diseases**, v. 40, n. 2, p. 263–272, 2017.

GALLANI, S. U.; SEBASTIÃO, F. de A.; VALLADÃO, G. M. R.; BOARATTI, A. Z.; PILARSKI, F. Pathogenesis of mixed infection by *Spironucleus* sp. and *Citrobacter freundii* in freshwater angelfish *Pterophyllum scalare*. **Microbial Pathogenesis**, v. 100, p. 119–123, 2016.

GARCIA, L. S.; ISENBERG, H. D. **Clinical microbiology procedures handbook**. Second Edi ed. Washington: ASM Press, 2007.

GC, G. of C. **Veterinary drugs legislation and guidelines**. Disponível em: <<https://www.canada.ca/en/health-canada/services/drugs-health-products/veterinary-drugs/legislation-guidelines/policies/list-veterinary-drugs-that-authorized-sale-health-canada-use-food-producing-aquatic-animals.html>>.

GENG, Y.; LIU, D.; HAN, S.; ZHOU, Y.; WANG, K. Y.; HUANG, X. L.; CHEN, D. F.; PENG, X.; LAI, W. M. Outbreaks of vibriosis associated with *Vibrio mimicus* in freshwater catfish in China. **Aquaculture**, v. 433, p. 82–84, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.05.053>>.

GENTRY, R. R.; FROEHLICH, H. E.; GRIMM, D.; KAREIVA, P.; PARKE, M.; RUST, M.; GAINES, S. D.; HALPERN, B. S. Mapping the global potential for marine aquaculture. **Nature Ecology & Evolution**, 2017a.

GENTRY, R. R.; FROEHLICH, H. E.; GRIMM, D.; KAREIVA, P.; PARKE, M.; RUST, M.; GAINES, S. D.; HALPERN, B. S. Mapping the global potential for marine aquaculture. **Nature Ecology & Evolution**, v. 1, n. September, 2017b. Disponível

em: <<http://www.nature.com/articles/s41559-017-0257-9>>.

GIESEKER, C. M.; MAYER, T. D.; CROSBY, T. C.; CARSON, J.; DALSGAARD, I.; DARWISH, A. M.; GAUNT, P. S.; GAO, D. X.; HSU, H. M.; LIN, T. L.; OAKS, J. L.; PYECROFT, M.; TEITZEL, C.; SOMSIRI, T.; WU, C. C. Quality control ranges for testing broth microdilution susceptibility of *Flavobacterium columnare* and *F. psychrophilum* to nine antimicrobials. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 101, n. 3, p. 207–215, 2012.

GIGUÈRE, S.; PRESCOTT, J. F.; DOWLING, P. M. **Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine**. Fifth ed. [s.l.] Wiley Blackwell, 2013.

GODOY, D. T.; MIAN, G. F.; ZANOLO, R.; YUHARA, T. Y.; FARIA, F. C.; FIGUEIREDO, H. C. P. Patterns of resistance to florfenicol and bicyclomycin in Brazilian strains of motile aeromonads. **Aquaculture**, v. 285, n. 1–4, p. 255–259, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.08.014>>.

GRECO, W. R.; BRAVO, G.; PARSONS, J. The search for synergy: a critical review from response surface perspective. **Pharmacological Reviews**, v. 47, n. 2, p. 331–385, 1995.

HARVELL, C. D.; MITCHELL, C. E.; WARD, J. R.; ALTIZER, S.; DOBSON, A. P.; OSTFELD, R. S.; SAMUEL, M. D. Climate Warming and Disease Risks for Terrestrial and Marine Biota. **Science**, v. 296, n. 5576, p. 2158–2162, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1063699>>.

IBGE. Produção Pecuária Municipal 2015. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, v. 43, p. 1–49, 2015.

IBGE. Produção da Pecuária Municipal 2016. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, v. 44, 2017.

ILIEV, I.; MARHOVA, M.; GOCHEV, V.; TSANKOVA, M.; TRIFONOVA, S. Antibiotic resistance of gram-negative benthic bacteria isolated from the sediments of kardzhali dam (Bulgaria). **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 29, n. 2, p. 274–280, 2015.

ISHIDA, Y.; AHMED, a M.; MAHFOUZ, N. B.; KIMURA, T.; EL-KHODERY, S. a; MOAWAD, a a; SHIMAMOTO, T. Molecular analysis of antimicrobial resistance in

gram-negative bacteria isolated from fish farms in Egypt. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 72, p. 727–734, 2010.

JANDA, J. M. Recent advances in the study of the taxonomy, pathogenicity, and infectious syndromes associated with the genus *aeromonas*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 4, n. 4, p. 397–410, 1991.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. The genus *Aeromonas*: Taxonomy, pathogenicity, and infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 1, p. 35–73, 2010.

JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; CARROLL, K. C.; LANDRY, M. L.; FUNKE, G.; RICHTER, S. S.; WARNOCK, D. W. **Manual of clinical microbiology**. 11th. ed. [s.l: s.n.]

KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I.; PAI, R. Systemic *Citrobacter Freundii* infection in common carp, *Cyprinus carpio* L., fingerlings. **Journal of Fish Diseases**, v. 15, n. 1, p. 95–98, 1992.

KAYAOGLU, G.; ORSTAVIK, D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 15, n. 5, p. 308–320, 2004.

KNOUFT, J. H.; FICKLIN, D. L. The Potential Impacts of Climate Change on Biodiversity in Flowing Freshwater Systems. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 48, n. 1, p. annurev-ecolsys-110316-022803, 2017. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-ecolsys-110316-022803>>.

KOSOFF, R. E.; CHEN, C. Y.; WOOSTER, G. A.; GETCHELL, R. G.; BOWSER, P. R.; CLIFFORD, A.; CRAIG, J. L.; LIM, P.; WETZLICH, S. E.; CRAIGMILL, A. L.; TELL, L. A. Florfenicol residues in three species of fish after 10-day oral dosing in feed. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 21, n. 1, p. 8–13, 2009.

LE, T.; BAYER, A. S. Combination antibiotic therapy for infective endocarditis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 36, n. 5, p. 615–621, 2003.

LIPSKY, B. A.; HOOK III, E. W.; SMITH, A. A.; PLORDE, J. *Citrobacter* Infections in Humans: Experience at the Seattle Veterans Administration Medical Center and a Review of the Literature. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 2, n. 5, p. 746–

760, 1980.

LIU, X.; STEELE, J. C.; MENG, X. Z. Usage, residue, and human health risk of antibiotics in Chinese aquaculture: A review. **Environmental Pollution**, v. 223, p. 161–169, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2017.01.003>>.

LOZANO, I.; DÍAZ, N. F.; MUÑOZ, S.; RIQUELME, C. Antibiotics in Chilean Aquaculture: A Review. In: **Antibiotic Use in Animals**. [s.l: s.n.]p. 21.

LÜ, A.; HU, X.; ZHENG, L.; ZHU, A.; CAO, C.; JIANG, J. Isolation and characterization of *Citrobacter* spp. from the intestine of grass carp *Ctenopharyngodon idellus*. **Aquaculture**, v. 313, n. 1–4, p. 156–160, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.01.018>>.

LU, H.; WENG, X.; LI, H.; YIN, Y.; PANG, M.; TANG, Y. *Enterococcus faecium* - related outbreak with molecular evidence of transmission from pigs to humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 913–917, 2002.

MALVISI, B. J.; ROCCA, G.; ANFOSSI, P.; TOMASI, L.; SALVO, A. Di; ZANCHETTA, S.; MAGNI, A.; SELLO, M.; GIORGETTI, G. Tissue distribution and residue depletion of thiamphenicol after multiple oral dosing in seabass (*Dicentrarchus labrax* L.) and seabream (*Sparus aurata* L.). **Journal of Applied Ichthyology**, v. 18, p. 35–39, 2002.

MARCHESE, A.; DEBBIA, E. A.; TONOLI, E.; GUALCO, L.; SCHITO, A. M. *In Vitro* activity of thiamphenicol against multiresistant *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Staphylococcus aureus* in Italy. **Journal of Chemotherapy**, v. 14, n. 6, p. 554–561, 2002. Disponível em: <<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L36138797>>.

MARTINS, M. L.; MAKOTO, D.; MIYAZAKI, Y.; LUIZ, J.; MOURIÑO, P. *Aeromonas caviae* durante surto de mortalidade em tilápia do nilo e suplementação com vitamina c na dieta. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 34, n. 4, p. 585–590, 2008.

MATTHIES, C.; GÖSSNE, A.; ACKER, G.; SCHRAMM, A.; DRAKE, H. L. *Lactovum miscens* gen. nov., sp. nov., an aerotolerant, psychrotolerant, mixed-fermentative anaerobe from acidic forest soil. **Research in Microbiology**, v. 155, n. 10, p. 847–854, 2004.

MCINTOSH, D.; CUNNINGHAM, M.; JI, B.; FEKETE, F. A.; PARRY, E. M.; CLARK, S. E.; ZALINGER, Z. B.; GILG, I. C.; DANNER, G. R.; JOHNSON, K. A.; BEATTIE, M.; RITCHIE, R. Transferable, multiple antibiotic and mercury resistance in Atlantic Canadian isolates of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* is associated with carriage of an IncA/C plasmid similar to the *Salmonella enterica* plasmid pSN254. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 6, p. 1221–1228, 2008.

MILLER, R. A. **Development of standardized antimicrobial susceptibility testing methods and aeromonas salmonicida cutoff values for antimicrobial agents used in aquaculture**. 2007. University of Maryland, 2007.

MILLER, R. A.; WALKER, R. D.; CARSON, J.; COLES, M.; COYNE, R.; DALSGAARD, I.; GIESEKER, C.; HSU, H. M.; MATHERS, J. J.; PAPAPETROPOULOU, M.; PETTY, B.; TEITZEL, C.; REIMSCHUESSEL, R. Standardization of a broth microdilution susceptibility testing method to determine minimum inhibitory concentrations of aquatic bacteria. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 64, n. 3, p. 211–222, 2005.

MILLER, R. A.; WALKER, R. D.; BAYA, A.; CLEMENS, K.; COLES, M.; HAWKE, P.; HENRICSON, B. E.; HSU, H. M.; MATHERS, J. J.; PAPAPETROPOULOU, M.; REIMSCHUESSEL, R.; OAKS, J. L. Antimicrobial susceptibility testing of aquatic bacteria : quality control disk diffusion ranges for *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Aeromonas salmonicida* subsp . *salmonicida* ATCC 33658 at 22 and 28°C. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 9, p. 4318–4323, 2003.

MIRANDA, C. D.; ROJAS, R. Occurrence of florfenicol resistance in bacteria associated with two Chilean salmon farms with different history of antibacterial usage. **Aquaculture**, v. 266, n. 1–4, p. 39–46, 2007.

MIRANDA, C. D.; TELLO, A.; KEEN, P. L. Mechanisms of antimicrobial resistance in finfish aquaculture environments. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. AUG, 2013.

MIYASHITA, T. *Pseudomonas fluorescens* and *Edwardsiella tarda* Isolated from Diseased Tilapia. **Fish Pathology**, v. 19, n. 1, p. 45–50, 1984.

NAWAZ, M.; KHAN, A. A.; KHAN, S.; SUNG, K.; STEELE, R. Isolation and characterization of tetracycline-resistant *Citrobacter* spp. from catfish. **Food Microbiology**, v. 25, n. 1, p. 85–91, 2008.

NCCLS. **Performance standards for antimicrobial disc and dilution susceptibility for bacteria isolated from animals; Approved standards**. 2nd. ed. [s.l.] Clinical and Laboratory Standards Institute, 2002. v. 22

NOGA, E. J. **Fish Disease: Diagnosis and Treatment**. Second Edi ed. [s.l.] Wiley Blackwell, 2010.

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 1–1, 2003. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/dkg301>>.

OIE, W. O. for A. H. Oie List of Antimicrobial Agents of Veterinary Importance. **OIE International Commitee**, v. 33, n. May, p. 1–9, 2015.

OLIVEIRA, T. F. de. **Therapeutic efficacy of florfenicol against Streptococcus agalactiae**. 2016. Universidade Federal de Minas Gerais, 2016.

PAAPE, M. J.; MILLER, R. H.; ZIV, G. Effects of Florfenicol, Chloramphenicol, and Thiamphenicol on Phagocytosis, Chemiluminescence, and Morphology of Bovine Polymorphonuclear Neutrophil Leukocytes. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 7, p. 1734–1744, 1990.

PETERSEN, A.; DALSGAARD, A. Species composition and antimicrobial resistance genes of *Enterococcus* spp., isolated from integrated and traditional fish farms in Thailand. **Environmental Microbiology**, v. 5, n. 5, p. 395–402, 2003.

RAHAL, J. J. Novel Antibiotic Combinations against Infections with Almost Completely Resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* Species. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n. Supplement 2, p. S95–S99, 2006.

REID, K. C.; COCKERILL, F. R.; PATEL, R. Clinical and epidemiological features of *Enterococcus casseliflavus/flavescens* and *Enterococcus gallinarum* bacteremia: a report of 20 cases. **Clinical infectious diseases**, v. 32, n. 11, p. 1540–6, 2001. Disponível em: <<http://cid.oxfordjournals.org/content/32/11/1540.long>>.

ROBERTS, R. J. **Fish pathology**. 4th. ed. [s.l.] Blackwell, 2012.

ROMALDE, J. L.; MAGARIÑOS, B.; NUÑEZ, S.; BARJA, J. L.; TORANZO, A. E. Host range susceptibility of *Enterococcus* sp. Strains isolated from diseased turbot: Possible routes of infection. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n.

2, p. 607–611, 1996.

SALVADOR, R.; ECKEHARDT, E.; JULIO, M.; FREITAS, C. De. 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**, v. 35, n. 6, p. 1374–1378, 2005.

SANCIU, G.; MAROGNA, G.; PAGLIETTI, B.; CAPPUCCINELLI, P.; LEORI, G.; RAPPELLI, P. Outbreak of mastitis in sheep caused by multi-drug resistant *Enterococcus faecalis* in Sardinia, Italy. **Epidemiology and Infection**, n. August 2008, p. 1–3, 2012.

SANO, T. Control of fish disease, and the use of drugs and vaccines in Japan. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 14, n. 3–4, p. 131–137, 1998. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1439-0426.1998.tb00630.x>>.

SANZ, F. Rainbow trout mortalities associated with a mixed infection with *Citrobacter freundii* and IPN virus. **Bulletin of the European Association of Fish Pathologists**, v. 11, n. 6, p. 222, 1991.

SCHLEIFER, K. H.; KILPPER-BALZ, R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the Genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 34, n. 1, p. 31–34, 1984. Disponível em: <<http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-34-1-31>>.

SCHLEIFER, K. H.; KRAUS, J.; DVORAK, C.; KILPPER-BÄLZ, R.; COLLINS, M. D.; FISCHER, W. Transfer of *Streptococcus lactis* and related Streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 6, n. 2, p. 183–195, 1985.

SCHLEIFER, K. H.; KRAUS, J.; DVORAK, C.; KILPPER-BÄLZ, R.; COLLINS, M. D.; FISCHER, W. Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB. List No. 65. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, n. 2, p. 354–356, 1986.

SCHWARZ, S.; KEHRENBURG, C.; DOUBLET, B.; CLOECKAERT, A. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. **FEMS**

Microbiology Reviews, v. 28, n. 5, p. 519–542, 2004.

SEBASTIÃO, F. A.; PILARSKI, F.; KEARNEY, M. T.; SOTO, E. Molecular detection of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* in cultured Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) in three Brazilian states. **Journal of Fish Diseases**, n. May, p. 1–5, 2017.

SEBASTIÃO, F. D. A. **Validação de técnicas moleculares para o diagnóstico de bactérias em peixes, visando redução de tempo e custo**. 2015. Universidade Estadual Paulista, 2015.

SEBASTIÃO, F. D. A.; FURLAN, L.; HASHIMOTO, D. T.; PILARSKI, F. Identification of bacterial fish pathogens in Brazil by direct colony PCR and 16S rRNA gene sequencing. **Advances in Microbiology**, n. June, p. 409–424, 2015.

SEPUTIENE, V.; BOGDAITE, A.; RUZAUSKAS, M.; SUZIEDELIENE, E. Antibiotic resistance genes and virulence factors in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from diseased farm animals: pigs, cattle and poultry. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 15, n. 3, p. 431–438, 2012.

SINDAN. **Compêndio de Produtos Veterinários**, 2018. . Disponível em: <<http://www.cpv.com.br/cpv.com.br>>.

SOTO-RODRIGUEZ, S. A.; CABANILLAS-RAMOS, J.; ALCARAZ, U.; GOMEZ-GIL, B.; ROMALDE, J. L. Identification and virulence of *Aeromonas dhakensis*, *Pseudomonas mosselii* and *Microbacterium paraoxydans* isolated from Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, cultivated in Mexico. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, n. 3, p. 654–662, 2013.

STANIER, R. Y. A Note on the Taxonomy of *Proteus Hydrophilus*. **Journal of bacteriology**, v. 46, n. 2, p. 213–4, 1943.

SUDHEESH, P. S.; AL-GHABSHI, A.; AL-MAZROOEI, N.; AL-HABSI, S. Comparative pathogenomics of bacteria causing infectious diseases in fish. **International Journal of Evolutionary Biology**, v. 2012, p. 1–16, 2012. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ijeb/2012/457264/>>.

SVEC, P.; DEVRIESE, L. A. *Enterococcus*. In: WHITMAN, W. B. (Ed.). **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**. [s.l: s.n.]p. 1–25.

SVETLANA, J.; DOBRILA, J. D.; VELJOVIĆ, L. J. *Citrobacter freundii* as a cause of disease in fish. **Acta Veterinaria**, v. 53, n. 5–6, p. 399–410, 2003.

TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M. L. An overall estimation of losses caused by diseases in the Brazilian fish farms. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 41, n. 4, p. 913–918, 2017.

TORANZO, A. E.; CUTRIN, J. M.; NUNEZ, S.; ROMALDE, J. L.; BARJA, J. L. Antigenic characterization of *Enterococcus* strains pathogenic for turbot and their relationship with other Gram-positive bacteria. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 21, n. 3, p. 187–191, 1995.

TORANZO, A. E.; CUTRIN, J. M.; ROBERSON, B. S.; NUNEZ, S.; ABELL, J. M.; HETRICK, F. M.; BAYA, A. M. Comparison of the taxonomy, serology, drug resistance transfer, and virulence of *Citrobacter freundii* strains from mammals and poikilothermic hosts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 6, p. 1789–1797, 1994.

TOSHIHIDE, K. Study on treatment of bacterial respiratory in cattle using a combination of antibacterial infectious agents disease. **The Tohoku Journal Veterinary Clinics**, v. 21, n. 2, p. 35–49, 1998.

TULLIO, V.; CUFFINI, A.; MANDRAS, N.; ROANA, J.; BANCHE, G.; UNGHERI, D.; CARLONE, N. Influence of thiamphenicol on the primary functions of human polymorphonuclear leucocytes against *Streptococcus pyogenes*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 24, n. 4, p. 381–385, 2004.

TURTON, J. A.; ANDREWS, C. M.; HAVARD, A. C.; ROBINSON, S.; YORK, M.; WILLIAMS, T. C.; GIBSON, F. M. Haemotoxicity of thiamphenicol in the BALB/c mouse and Wistar Hanover rat. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 12, p. 1849–1861, 2002.

TURTON, J. A.; HAVARD, A. C.; ROBINSON, S.; HOLT, D. E.; ANDREWS, C. M.; FAGG, R.; WILLIAMS, T. C. An assessment of chloramphenicol and thiamphenicol in the induction of aplastic anaemia in the BALB/c mouse. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, n. 10, p. 925–938, 2000.

TUVSHINTULGA, B.; ABOULAILA, M.; SIVAKUMAR, T.; TAYEBWA, D. S.; GANTUYA, S.; NARANBAATAR, K.; ISHIYAMA, A.; IWATSUKI, M.; OTOGURO,

K.; ÔMURA, S.; TERKAWI, M. A.; GUSWANTO, A.; RIZK, M. A.; YOKOYAMA, N.; IGARASHI, I. Chemotherapeutic efficacies of a clofazimine and diminazene aceturate combination against piroplasm parasites and their AT-rich DNA-binding activity on *Babesia bovis*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 13888, 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41598-017-14304-0>>.

U.S. FDA. Drugs Approved for Use in Aquaculture. n. February, p. 2010, 2000. Disponível em: <<http://www.fda.gov/cvm/index/aquaculture/appendixa6.htm>>.

UN, (United Nations). The Millennium Development Goals Report. **Departmente of Economic and Social Affairs of the United Nations**, p. 72, 2015.

UN, (United Nations). World Population Prospects: The 2017 Revision, Key findings and advance tables. **United Nations DESA Population Division**, p. 53, 2017.

VOS, P. De; GARRITY, G. M.; JONES, D.; KRIEG, N. R.; LUDWING, W.; RAINEY, F. A.; SCHLEIFER, KARL-HEINZ WHITMAN, W. B. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Firmicutes**. [s.l.] Springer, 2009.

WEI, C.; CHANG, S.; SHIEN, J.; KUO, H.-C.; CHEN, W.-Y.; CHOU, C. Synergism between two amphenicol of antibiotics, florfenicol and thiamphenicol, against *Staphylococcus aureus*. **Veterinary Record**, v. 178, n. 13, p. 319–319, 2016a.

WEI, C.; SHIEN, J.; CHANG, S.; CHOU, C. Florfenicol as a modulator enhancing antimicrobial activity: example using combination with thiamphenicol against *Pasteurella multocida*. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 389, 2016b.

WEI, Q. **Social and economic impacts of aquatic animal health problems in aquaculture in China**. [s.l: s.n.].

WEINSTEIN, M. R.; LITT, M.; KERTESZ, D.; WYPER, P.; ROSE, D.; COULTER, M.; MCGREER, A.; FACKLAM, R.; OSTACH, C.; WILLEY, B. M.; BORCZYK, A.; LOW, D. E. Invasive infections due to fish pathogen, *Streptococcus iniae*. **The New England Journal of Medicine**, v. 337, n. 9, p. 589–594, 1997.

WHO, W. H. O. Critically important antimicrobials for human medicine. **WHO Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance (AGISAR)**, v. 5th rev. G, 2017.

WOO, P. T. K.; BRUNO, D. W. **Fish diseases and disorders: viral, bacterial and**

fungal infections. Second ed. [s.l.] CABI, 2011. v. 3

XIONG, W.; SUN, Y.; ZHANG, T.; DING, X.; LI, Y.; WANG, M.; ZENG, Z. Antibiotics, Antibiotic Resistance Genes, and Bacterial Community Composition in Fresh Water Aquaculture Environment in China. **Microbial Ecology**, v. 70, n. 2, p. 425–432, 2015.

YANG, G.; HAN, L.; WEN, J.; ZHOU, S. *Pseudomonas guangdongensis* sp. nov., isolated from an electroactive biofilm, and emended description of the genus *Pseudomonas* Migula 1894. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. PART 12, p. 4599–4605, 2013.

YOSHIMIZU, M.; KASAI, H.; AOKI, T.; OTOTAKE, M.; SAKAI, M.; JUNG, T.-S.; HIKIMA, J.; OKAMOTO, N.; SAKAMOTO, T.; OZAKI, A.; YAZAWA, R. **Fish Diseases- Prevention and treatment of diseases caused by fish pathogens**. [s.l.] Eolss Publishers / UNESCO, 2016.

YUNIS, A. A.; MANYAN, D. R.; ARIMURA, G. K. Comparative effect of chloramphenicol and thiamphenicol on DNA and mitochondrial protein synthesis in mammalian cells. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 81, n. 5, p. 713–718, 1 maio 1973.

11. APÊNDICES

11.1. Aprovação do Comitê de Ética

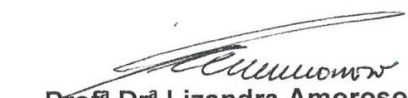


CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado “**Tianfenicol: distribuição tecidual, depleção e influência sobre a resposta imune de tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758)**”, protocolo nº 019865/16, sob a responsabilidade da Prof.^a Dr.^a Fabiana Pilarski, 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 31 de outubro de 2017.

Vigência do Projeto	12/02/2017 a 12/09/2017
Espécie / Linhagem	<i>Oreochromis niloticus</i> – Tilápia do Nilo
Nº de animais	371
Peso / Idade	100g
Sexo	Machos
Origem	Piscicultura – Arealva/SP

Jaboticabal, 31 de outubro de 2017.


Profª Drª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA