

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

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

Roberto Barbuio

Médico Veterinário

Mestre em Medicina Veterinária Preventiva

**Jaboticabal - SP
2017**

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

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

Roberto Barbuio

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio de Andrade Belo

Co-Orientador: Prof. Dr. Claudinei da Cruz

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

**Jaboticabal - SP
2017**

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

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

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

CDU 639.31



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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


AUTOR: ROBERTO BARBUIO

ORIENTADOR: MARCO ANTONIO DE ANDRADE BELO

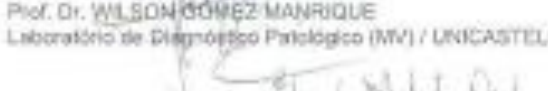
COORIENTADOR: CLAUDINEI DA CRUZ

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


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


Prof. Dra. SELVIA PATRÍCIA CARRASCHI DE OLIVEIRA
União / Araraquã, SP


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


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


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

Jaboticabal, 03 de fevereiro de 2017.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

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

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

A Unesp pelo apoio institucional.

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

SUMÁRIO

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

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

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

LISTA DE TABELAS

	Página
CAPÍTULO 3	
Tabela 1. Distribuição das tilápias no estudo de segurança clínica.....	24
Tabela 2. Valores médios observados no estudo hematológico de tilápias tratadas com diferentes concentraçõesde fosfomicina.....	26
Tabela 3. Valores médios observados no estudo leucocitário de tilápias tratadas com diferentes concentraçõesde fosfomicina.....	27
Tabela 4. Valores médios observados no estudo bioquímico sanguíneo de tilápias tratadas com diferentes concentrações de fosfomicina.....	28
Tabela 5. Valores médios observados no estudo bioquímico sanguíneo de tilápias tratadas com diferentes concentrações de fosfomicina.....	29
Tabela 6. Valores médios observados na análise somática renal cranial e caudal (INS), hepática (IHS) e esplênica (IES) de tilápias tratadas com diferentes concentrações de fosfomicina.....	33
CAPÍTULO 4	
Tabela 1 Distribuição das tilápias no estudo de eficácia terapêutica.....	45
Tabela 2. Valores médios observados no estudo hematológico de tilápias infectadas com <i>A. hydrophila</i> e tratadas com 10mg/Kg de p.v. de fosfomicina.....	48
Tabela 3. Valores médios observados no estudo leucocitário de tilápias infectadas com <i>A. hydrophila</i> e tratadas com 10mg/Kg de p.v. de fosfomicina.....	48
Tabela 4. Valores médios observados no estudo bioquímico sanguíneo de tilápias infectadas com <i>A. hydrophila</i> e tratadas com 10mg/Kg de p.v. fosfomicina.....	49
Tabela 5. Valores médios observados no estudo bioquímico sanguíneo (dosagens de ALT, AST, FA e Creatinina) de tilápias infectadas com <i>A. hydrophila</i> e tratadas com 10mg/Kg de p.v. fosfomicina.....	50

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

LISTA DE FIGURAS

Página

CAPÍTULO 2.

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

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

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

CAPÍTULO 3

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

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

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

Figura 4. Fotomicrografia em 40x de corte histológico de rim de tilápias, <i>O. niloticus</i> , submetidas a diferentes concentrações de fosfomicina. A. Tratamento T1, 2dias, B. Tratamento T2, 4dias e C. Tratamento T3, 8dias. A. Glomeruloesclerose difusa. Aderência do tufo glomerular ao folheto parietal (seta negra), isquemia glomerular (estrela). Túbulo necrótico (círculo), núcleos picnóticos (seta branca), redução lúmen tubular (seta vermelha), espessamento hialino do mesângio (seta amarela) B. Glomerulonefrite membranosa com necrose tubular. Isquemia glomerular (estrela), túbulos necróticos (círculo), núcleos picnóticos (seta branca), redução lúmen tubular (seta vermelha), espessamento hialino do mesângio (seta amarela), infiltrado inflamatório (I) C. Glomerulonefrite membranosa com necrose tubular. Isquemia glomerular (estrela), túbulos necróticos (círculo), núcleos picnóticos (seta branca), redução lúmen tubular (seta vermelha), espessamento hialino do mesângio (seta amarela), infiltrado inflamatório (I).....	32
Figura 5. Fotomicrografia de corte histológico de baço de tilápias, <i>O. niloticus</i> , submetidas a diferentes concentrações de fosfomicina. A. Tratamento T1, 2dias, B. Tratamento T2, 4dias e C. Tratamento T3, 8dias. Centro de melanomacrófagos (seta branca), melanomacrófago livre (seta preta).....	35
Figura 6. Valores médios observados no estudo de qualidade de água de tilápias tratadas com fosfomicina.....	36
 CAPÍTULO 4	
Figura 1. Semeadura em meio de cultura (A), obtenção do "pellet" por centrifugação (B) e inóculo (C).....	46
Figura 2. Necropsia dos peixes (A), "imprinting" dos órgãos nas placas (B) e crescimento colônias e seleção para testes bioquímicos (C).....	47
Figura 3. Fotomicrografia de corte histológico de fígado de tilápias, <i>O. niloticus</i> , desafiadas com <i>Aeromonas hydrophila</i> e tratadas com 10mg/p.v. fosfomicina. A. Tratamento T1, 2 dias, B. Tratamento T2, 2 dias, C. Tratamento T1, 4 dias, D. Tratamento T2, 4 dias, E. Tratamento T1, 8 dias, F. Tratamento T2, 8 dias, G. Tratamento T1, 12 dias, H. Tratamento T2, 1Basal. Linha tracejada: perda da arquitetura dos cordões hepáticos, seta preta: núcleo picnótico seta verde: degeneração hidrópica com necrose de hepatócitos, VC: veia centrolobular, seta branca: dilatação sinusóide hepática. Coloração H.E, aumento de 40x.....	51

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

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

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

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

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



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



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

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

Jaboticabal, 11 de março de 2014.


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

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

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

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

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

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

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

CAPÍTULO 1 - Considerações Gerais

1. Introdução

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

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

A manipulação dos ecossistemas aquáticos para a maximização da produtividade traz consigo inúmeros desafios, dentre eles as doenças bacterianas. Em geral, o aumento de espécimes por área, somado às práticas de manejo, resulta na ocorrência do estresse, condição fisiológica responsável por imunossuprimir os sistemas de defesa dos peixes, predispondo-os às mais diversas enfermidades (HIRSCH et al, 2006). Neste preceito, agentes etiológicos que causam aparentemente poucos danos às populações de peixes em seu habitat natural, podem tornar-se agentes precursores de doenças de grande importância econômica quando submetidos às condições de criação (YOUSEFIA; AMIRI, 2009). Com isso, o uso de fármacos na aquicultura para o tratamento de doenças é inevitável durante o ciclo produtivo.

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

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

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

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

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

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

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

2.1.1. Objetivos Específicos

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

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

Avaliar a eficácia terapêutica da fosfomicina administrado via oral, para o tratamento de aeromonose e streptococose em tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus*.

3. Revisão de Literatura

3.1. Fosfomicina

A fosfomicina é um antibiótico de largo espectro, tendo sido isolado pela primeira vez por triagem de culturas em caldo de *Streptomyces fradiae* provenientes de amostras de solo (GRIF et al., 2001). A fosfomicina é bactericida e inibe a biogênese da parede celular bacteriana por inativar a enzima UDP-N-acetilglucosamina-3-enolpiruviltransferase, também conhecida como mura (BROWN et al., 1995).

Esta enzima catalisa importante passo na biossíntese de peptidoglicano, mediando a ligação de fosfoenolpiruvato (PEP) para o grupo 3'-hidroxila de UDP-N-acetilglucosamina. Esta porção de piruvato fornece o ligante que une a porção glicano ao peptídeo na molécula do peptidoglicano. Portanto, a fosfomicina é um análogo que inibe a PEP Mura por alquilação de um resíduo de cisteína do centro ativo e este fármaco entra na célula bacteriana por meio do transportador de glicerofosfato (BROWN et al., 1995).

A fosfomicina é utilizada para o tratamento de infecções bacterianas resistentes a múltiplas drogas e isso tem chamado a atenção para este medicamento (BAYLAN, 2010). É razoavelmente solúvel em água (BERGOGNE-BEREZIN, 1987), fortemente polar e estável em condições de armazenamento (Raz, 2012).

A fosfomicina é principalmente excretada na urina por filtração glomerular e seu pico na urina ocorre dentro de 4 horas após a administração. Esta droga tem boa penetração nos rins, parede da bexiga, próstata, vesículas seminais e no líquido cefalorraquidiano (KASHANIAN et al., 2008; WILLIAMS et al., 2006).

Este antimicrobiano possui atividade antibacteriana ampla contra agentes patogênicos Gram-positivos e Gram-negativos, sendo indicado para o tratamento de

Escherichia coli, *Pasteurella multocida*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* sp. em aves de postura e de corte (GUTIERREZ et al., 2010) e em suínos (SORACI et al., 2011). Em outros mamíferos inclusive nos seres humanos, é indicada também para o tratamento de infecções por *Citrobacter*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Enterococcus* spp. (PATEL et al., 1997).

3.2. Tilapicultura intensiva no Brasil

O crescente aumento na comercialização mundial das tilápias, espécies de teleósteos do gênero *Oreochromis*, especialmente pelo aumento da produção na China e outros países em desenvolvimento, como o Brasil (HEMPEL, 2002), transformou este grupo de peixes no segundo mais importante para a aquicultura e o terceiro mais importado pelos EUA e Europa, depois somente dos camarões marinhos e salmões (CONROY; CONROY, 2004). Tal fato é resultante do potencial fisiológico reprodutivo e de adaptação destes animais, que apresentam elevada rusticidade, fácil domesticação e excelente valor agregado para a comercialização, gerando perspectivas de se tornarem o mais importante grupo de espécies aquícolas neste século XXI (FITZSIMMONS, 2000; SHELTON, 2002).

De acordo com as estatísticas do Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA), a produção de tilápias representou cerca de 38% da produção de pescado continental no Brasil no ano de 2010, sendo este ciclídeo o grupo de peixes mais criado. Neste contexto, destaca-se a espécie *Oreochromis niloticus*, comumente chamada de “tilápia do Nilo”, de origem africana, oriunda da bacia do Rio Nilo, pertencente à família Cichlidae. Para Zimmermann; Fitzsimmons (2004), no Brasil, a tilapicultura segue a mesma tendência mundial, com predomínio de tilápias nilóticas ao invés de tilápias vermelhas, pois estas apresentam crescimento mais rápido e um rendimento de filé superior quando comparadas às demais espécies de tilápias.

A produção comercial de tilápias foi iniciada em nosso país após a primeira introdução de tilápias nilóticas no Nordeste em 1971, com um número muito reduzido de animais, provenientes da Costa do Marfim. Apesar disso desenvolveram, até 1996, uma indústria de 20 mil toneladas, gerando como problema mais grave a elevada consanguinidade entre as populações. Em 1996,

foram trazidos 20.800 exemplares da tilápia nilótica, população Chitralada da Tailândia. A entrada das “tilápias tailandesas” no Paraná e Rio Grande do Sul deu um novo impulso a tilapicultura intensiva no Brasil na última metade dos anos 90 (ZIMMERMANN, 2002).

De acordo com Zimmermann; Fitzsimmons (2004), em 2002 foi introduzida uma nova linhagem de tilápia nilótica com elevado potencial zootécnico, proveniente da maior empresa de genética de tilápias do mundo (GenoMar), bem como, a introdução de linhagens de outra empresa de genética de tilápias da Inglaterra (FishGen), que intensificaram ainda mais os sistemas de produção de tilápias nilóticas no Brasil. Para estes autores, a intensificação da atividade deverá continuar, porém, cada vez mais se discutirá a sustentabilidade da mesma, através da busca de custos mínimos.

Da mesma forma, as disputas por novos mercados, a concorrência com outros países neste início das exportações, a necessidade de se desenvolver um mercado interno mais forte, bem como as novas oportunidades de uma aquicultura intensiva, deverão considerar os aspectos sanitários na produção das tilápias, através de manejos eficientes do sistema aquático que visem melhorar não somente a produtividade, mas também proteger o consumidor e o meio ambiente (ZIMMERMANN; FITZSIMMONS, 2004).

3.3. *Aeromonas hydrophila*

A *Aeromonas hydrophila* é um bacilo gram-negativo anaeróbico facultativo que possui flagelo móvel, apresentando crescimento em meios simples e as colônias crescem de um a três milímetros de diâmetro a 25°C, durante 48 horas, sendo arredondadas brilhantes e de coloração creme (ALEXANDRINO et al., 2000).

Consideradas oportunistas, se manifestam em hospedeiros debilitados ou infectados por outros patógenos (DOOLEY; TRUST,1988; MERINO et al.,1995). Neste caso, o estresse, principalmente provocado por condições ambientais e fisiológicas adversas, é considerado um fator predisponente ao aparecimento da doença causada por esta bactéria (MERINO et al.,1995).

Fatores de risco predisponentes incluem alterações bruscas de temperatura, elevadas densidades de estocagem, poluição orgânica, hipóxia, entre outros. As aeromonas móveis geralmente invadem feridas na pele, comumente com infecções por fungos ou ectoparasitos (NOGA,1986). Fatores produzidos pela bactéria, que podem facilitar o contágio, são importantes elementos de virulência bacteriana. Dentre estes destacam-se as fimbrias, que facilitam sua adesão às células do hospedeiro (CIPRIANO, 2001).

Os sinais clínicos característicos da aeromonose são a septicemia hemorrágica, petéquias distribuídas por toda a superfície corporal do animal, anemia, corrosão de nadadeira, ulcerações oculares, eritrodermatite, escamas protusas, exoftalmia e distensão abdominal por ascite (AUSTIN; AUSTIN,1999; KIROV et al.,2002).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, *A. hydrophila* é considerada uma doença de veiculação hídrica para os seres humanos, apresentando grande importância para a saúde pública (MERINO et al., 1995). Em seres humanos, esta bactéria pode causar febre, dor abdominal, vômito, diarreias, meningite, endocardite, septicemia, inflamação do tecido conjuntivo e síndrome urêmica, além de infecções respiratórias e intestinais, especialmente em indivíduos imunossuprimidos (JANDA; ABBOTT, 1998).

3.4. *Streptococcus agalactiae*

O *Streptococcus agalactiae* é classificado como do grupo B Lancefield apresentando células esféricas ou cubóides. Esta bactéria é Gram-positiva, catalase negativa e unem-se em forma de pares ou cadeias. É imóvel, não esporulada e anaeróbia facultativa. Obtém energia por meio da fermentação de carboidratos como a glicose (HARDIE; WHILEY, 1997).

Seu papel mais importante está na capacidade de seus polissacarídeos inibirem a fagocitose por macrófagos e neutrófilos do hospedeiro (NIZET, 2002), sendo o ácido siálico fator essencial para a patogenicidade, pois impede a deposição do componente C3b do sistema complemento, inibindo a fagocitose (JARVA et al., 2003).

São bactérias oportunistas amplamente distribuídas no ambiente aquático associadas à má qualidade da água, manejo inadequado e condições de criação intensiva, causando prejuízos importantes para a aquicultura mundial (BUNCH; BEJERANO, 1997).

Nos peixes, o quadro clínico principal é a meningoencefalite acompanhada de anorexia, natação errática com movimentos giratórios na superfície da água e escurecimento da pele. Macroscopicamente encontram-se hemorragias cutâneas difusas em todo o corpo. Outras conseqüências são esplenomegalia, ascite e septicemia (SHOEMAKER; KLESIUS, 1997; PLUMB, 1999). Histologicamente ocorre severa inflamação granulomatosa, necrose, vacuolização de hepatócitos e congestão esplênica (EVANS et al., 2000).

4. Referências

- Alexandrino, A.C., Okumuro M.P.M., Baldassi, L, Araujo, A.P., Kurodo, C.K., Araujoc. K., Walkasa, Y.S. 2000. Ocorrência de *Aeromonas hydrophila* em truta arco-irís (*Oncorhynchus mykiss*) em cultivo intense-relato de caso. **Bol. Inst. Pesca**, 26(1): 111-117.
- Austin, B, Austin, D.A. 1999. Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish. **Chichester: Springer Praxis**, 3rd Edition, 459.
- Baylan, O. 2010. Fosfomycin: Past, Present And Future. **Mikrobiyol Bul**, 44: 311–321.
- Bergogne-Berezin E., Muller-Serieys C., Joly-Guillou M.L., Dronne N. 1987. Trometamol-Fosfomycin (Monuril). bioavailability and food-drug interactions. **Eur Urol**, 13 (Suppl): 64–68.
- Brown, E.D., Vivas, E.I., Walsh, C.T., Kolter, R. Mura (Murz), 1995. The enzyme that catalyzes the first committed step in peptidoglycan biosynthesis, is essential in *Escherichia coli*". **J Of Bacteriol**. 177(14): 4194–4197.
- Bunch, E. C., Bejerano, I. 1997. The effect of environmental factors on the susceptibility of hibrid tilapia *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus* to streptococcosis. Israeli J. **Aquaculture**, 49(2): 67-76.
- Cipriano,R. 2001. *Aeromonas hydrophila* and motile aeromonad septicemias of fish. In: Fish diseases of Leaflet. United States Department of the Interior. **Fish and Wildlife service Division of Fishery Research**, Washigton, p. 68.

Conroy, G., Conroy, D.A. 2004. Patología de Tilápias: Una Reseña General. In M.J.T. Ranzani-Paiva, R.M. Takemoto, M.A.P. Lizama, Editores. San De Org **Aquat**, Livraria Varela, São Paulo, Brasil, Sp. 221-253.

Dooley, J.S.H., Trust, T.J. 1988. Surface protein composition of *Aeromonas hydrophila* virulent for fish: identification of an S-Layer protein. **J. Bacteriol.**, 170: 499-506.

Evans, J. J., Shoemaker, C. A., Klesius, P. H. 2000. Experimental *Streptococcus iniae* infection of hybrid striped bass (*Morone chrysops* X *Morone saxatilis*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*) by nares inoculation. **Aquaculture**, 189: 197-210.

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

FDA, 2012 FDA – Food and Drug Administration. Animal and Veterinary: Approved Drugs 2012.
[Http://Www.Fda.Gov/Animalveterinary/Developmentapprovalprocess/Aquaculture/Ucm132954.Htm](http://www.fda.gov/animalveterinary/developmentapprovalprocess/aquaculture/ucm132954.htm)

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

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

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

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

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

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

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

- Jarva H., 2003. Complement resistance mechanisms of streptococci. **Molec Microbiol**, 40: 95-107.
- Kashanian, J., Hakimian, P., Blute, M. Jr. 2008. Nitrofurantoin: the return of an old friend in the wake of growing resistance. **BJU Int**, 102: 1634–1637.
- Kirov, M. 2002. Lateral flagella and swarming motility in *Aeromonas* Species. **J. Bacteriol.**, 184: 547-555.
- Klaassen, C. D. Princípios de toxicologia e tratamento do envenenamento. In: Brunton, L.L., Lazo, J. S., Parker, K. L. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11ª Ed., Mc.Graw Hill, Rio de Janeiro, 2006, p.1573-1584.
- Merino, S. 1995. Emerging pathogens: *Aeromonas* spp. **Intern J of Food Microbiol**, 28: 157-168.
- MPA, 2010 MPA - Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2010. [Http://www.Mpa.Gov.Br/Images/Docs/Informacoes_E_Estatisticas/Boletim%20estat%C3%A1stico%20mpa%202010.Pdf](http://www.mpa.gov.br/images/docs/informacoes_E_Estatisticas/Boletim%20estat%C3%A1stico%20mpa%202010.pdf).
- Nizet, V. 2002. Streptococcal α -hemolysins: Genetic and Role in Diseases Pathogenesis. **Trends in Microbiology**, 10: 575-580.
- Noga, E.J. 1986. The importance of *Lernaeus cruciatus* (LeSeuer) in the initiation of skin lesions in largemouth bass *Micropterus salmoides* (Lacepede) in the Chowan River, North Carolina, **J. Fish Dis.**, 9: 295-302.
- OIE – World Organization For Animal Health. OIE list of antimicrobials of veterinary importance (2007). [Http://Web.OIE.Int/Downld/Antimicrobials/OIE_List_Antimicrobials.Pdf](http://web.oie.int/download/antimicrobials/OIE_List_Antimicrobials.pdf).
- Patel, S. S., Balfour, J. A., Bryson, H. M. "Fosfomicin Tromethamine: 1997. "A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy as a single-dose oral treatment for acute uncomplicated lower urinary tract infections". **Drugs**, 53(4): 637–656.
- Plumb, J. A. 1999. Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes. Ames, Iowa: **Iowa State University Press**, 328: 1-64.
- Raz R., 2012. Fosfomicin: An old—new antibiotic infectious diseases unit, Ha'emek Medical Centre, Afula, Israel, **Clin Microbiol Infect** 18: 4–7.
- Shelton, W.L. 2002. Tilapia culture in the 21st century. In R.D. Guerrero Iii, Editor. **Proceedings Of The International Forum On Tilapia Farming In The 21st Century**, Los Baños, Laguna, Philippines 1-28.
- Shoemaker, C., Klesius, P. 1997. Streptococcal disease problems and control: a review. **Tilapia Aquaculture**, 2: 671-680.

Soraci, A.L., Perez, D.S., Martinez, G., Dieguez, S., Tapia, M.O., Amanto, F., Harkes, R., Romano, O. 2011. Disodium-fosfomicin pharmacokinetics and bioavailability in post weaning piglets. **Research In Vet Sci**, 90(3): 498-502.

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

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

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

CAPÍTULO 2 - Avaliação ecotoxicológica da fosfomicina para tilápia (*Oreochromis niloticus*) e organismos não alvo

¹Roberto Barbuio, ¹Vanessa Pavesi de Faria, ²Alessandra Cristina de Moraes, ²Marco Antonio de Andrade Belo, ^{3,4}Silvia Patrícia Carraschi de Oliveira, ^{4,5}Claudinei da Cruz

ABSTRACT - Barbuio R., Moraes, A.C., Faria V.P., Belo M.A.A., Carraschi S.P. & Cruz C., 2016. Avaliação ecotoxicológica da fosfomicina para tilápia (*Oreochromis niloticus*) e organismos não alvo. Universidade Estadual Paulista, Rodovia Paulo Donato Castellane s/n, Jaboticabal, SP 14884-900, Brasil. E-mail: betobarbuio@gmail.com

The present study aimed to evaluate the ecotoxicological safety of antimicrobial fosfomycin. For the five ecotoxicity assays were performed for the determination of LC50 in fish, organisms targeted for treatment (*O. niloticus*) and for aquatic bioindicators (*Lemna minor* and *Azolla caroliniana*) and EC50 for microcrustacean bioindicators (*Daphnia magna*) and Mollusk (*Pomacea canaliculata*). To that end, the lots of each species were quarantined for health status assessment and sensitivity tests to see if programs were within the standards for testing. After the preliminary tests were carried out to determine the interval between a higher concentration than zero cause and a lower cause than the 100% cause of mortality up to the limit of 100 mg.L⁻¹ of fosfomycin. The definitive assays for each species were performed in three types of completely randomized trials in three trials with three replicates of each concentration for each species. The results of the ecotoxicological tests demonstrated that fosfomycin is practically non-toxic to these organisms (CL and EC50 > 100.0 mg.L⁻¹) (Zucker, 1985).

INDEX TERMS: Bioindicador, toxicology, antimicrobial

Resumo - Objetivou-se com o presente estudo, avaliar a segurança ecotoxicológica do antimicrobiano fosfomicina. Para tanto ensaios de ecotoxicidade foram realizados para a determinação de CL₅₀ em peixe, organismo alvo do tratamento (*O. niloticus*) e para os bioindicadores plantas aquáticas (*Lemna minor* e *Azolla caroliniana*) e CE₅₀ para os bioindicadores microcrustáceo (*Daphnia magna*) e molusco (*Pomacea canaliculata*). Para tanto os lotes de cada espécie passaram por quarentena para avaliação do estado de saúde e por testes de sensibilidade para verificar se estavam dentro das normas para os ensaios. Após foram realizados os ensaios preliminares para determinar o intervalo entre a maior concentração que causa zero e a menor que causa 100% de mortalidade até o limite de 100mg.L⁻¹ da fosfomicina. Os ensaios definitivos para cada uma das espécies foi realizado em delineamento inteiramente casualizado em três ensaios com três réplicas de cada concentração para cada espécie. Os resultados dos ensaios ecotoxicológicos demonstraram que a fosfomicina é praticamente não tóxica para os organismos testados (CL e CE50 > 100,0 mg.L⁻¹) (Zucker, 1985), pois não causa mortalidade para os organismos teste em concentrações até 100 mg.L⁻¹

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Bioindicador, toxicologia, antimicrobiano

¹Departamento de Patologia Veterinária, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Rodovia de Acesso Paulo Donato Castellane s/n, Zona Rural, Jaboticabal, SP 14884-012.

²Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Rodovia de Acesso Paulo Donato Castellane s/n, Zona Rural, Jaboticabal, SP 14884-012.

³Instituto de Pesca, Rua Francisco Matarazzo, 455 Parque Água Branca, São Paulo-SP, 05001-970

⁴Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais em Matologia (Nepeam) da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Rodovia de Acesso Paulo Donato Castellane s/n, Zona Rural, Jaboticabal, SP 14884-012.

⁵Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos (Unifeb), Avenida Professor Roberto Frade Monte, nº 389, CEP: 14783-226, Barretos, SP, Brasil

1. INTRODUÇÃO

O uso de fármacos para o tratamento de doenças na aquicultura pode ser necessário durante o ciclo de criação. Os aspectos que envolvem a produção intensiva como a alta taxa de arraçoamento, manejo constante e elevada densidade de estocagem, geram estresse para os peixes, propiciando condições favoráveis para o desenvolvimento de patógenos oportunistas. Poucos fármacos são registrados para uso na aquicultura brasileira, com isso vários medicamentos não destinados para esse fim são administrados sem basal no ambiente aquático. Dessa forma, o desenvolvimento de novas moléculas é fundamental para aumentar a possibilidade de sucesso no basal dos principais patógenos que ocorrem durante os ciclos de produção, diminuir as perdas causadas pela mortalidade, permitir a segurança do consumidor e do ambiente, monitorando os efeitos nos organismos não alvos, além de saber o tempo de exposição, tempo de tratamento, e também período de carência para que o pescado possa ser destinado ao consumo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

No Brasil, para o desenvolvimento de novos produtos (antimicrobianos e parasiticidas para aquicultura) é necessário o estudo de avaliação do risco e da periculosidade que o produto pode oferecer para o ambiente. Dessa avaliação resulta uma classificação que indica o perfil ecotoxicológico do produto e fornece instruções para o uso correto (IBAMA, 1987). Os testes de toxicidade são etapas iniciais de avaliação de risco de xenobióticos, proporcionando a caracterização da resposta ecológica a um elemento químico (Cairns et al., 1998). Para esses testes são utilizadas diversas espécies representantes da cadeia trófica. Para fins de avaliação ecotoxicológicas os organismos devem possuir características como: representatividade de um grupo ecológico; fácil disponibilidade para obtenção; ciclo reprodutivo curto, cosmopolita e se possível ser uma espécie nativa (Wolff et al., 2007).

A biomanipulação dos ecossistemas aquáticos com a maximização dos recursos produtivos traz consigo inúmeros desafios, dentre os quais se destaca o basal sanitário das populações de peixes. Em geral, o aumento de espécimes por área, somado às práticas de manejo, resulta na ocorrência do estresse, condição fisiológica responsável por imunossuprimir os sistemas de defesa dos peixes, predispondo-os a mais diversas enfermidades (Hirsch et al., 2006). Neste preceito, agentes etiológicos que causam aparentemente poucos danos às populações de peixes em seu habitat natural, podem tornar-se agentes precursores de doenças de grande importância econômica quando submetidos às condições de criação (Yousefian & Amiri, 2009).

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

De acordo com a Resolução XXVIII da 75ª sessão geral da comissão internacional da Organização Mundial de Sanidade Animal (OIE) que define a lista de antimicrobianos de importância na medicina veterinária, a fosfomicina pode ser empregada no basal bacteriano de aves, suínos e bovinos, apresentando grande potencial para o uso em peixes, no entanto, necessitando do delineamento de protocolos terapêuticos eficazes para seu uso em organismos aquáticos (OIE, 2007). A fosfomicina é um antimicrobiano que vem sendo empregado com sucesso na avicultura e suinocultura, administrado na água ou na ração dos animais, apresentando amplo espectro de ação antimicrobiana (Gutierrez et al. 2010). No entanto, há outro fator extremamente relevante, quando se estuda a administração exógena de compostos farmacológicos, relaciona-se a inocuidade dos mesmos. Pois, aliado à sua atividade terapêutica, estas formulações devem oferecer segurança clínica aos animais. Segundo Klaassen (2006), toda substância é potencialmente tóxica, a dose correta diferencia o remédio do tóxico.

Portanto o objetivo desse trabalho foi avaliar a segurança ecotoxicológica da fosfomicina para organismos alvo e não alvo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Toxicidade aguda da fosfomicina para peixes. Para a realização dos ensaios de toxicidade aguda foi utilizado a tilápia, (*Oreochromis niloticus*), com média de peso de 2,72 g e o peixe paulistinha (*Danio rerio*), peso entre 0,35 e 1,0 g, aclimatados por dez dias em sala de bioensaio em caixas com capacidade de 250 L (figura 1 - A e B). O sistema de aeração foi contínuo promovido por bombas de ar, temperatura a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 12 horas de luz e alimentados até a saciedade uma vez ao dia, com ração comercial (32%PB).

Para avaliar a sanidade e a sensibilidade dos organismos teste foi realizado ensaio de toxicidade aguda, com a substância referência cloreto de potássio (KCl - 99,5% de pureza) (ABNT, 2011). Os ensaios foram realizados periodicamente, de acordo com a utilização de novos lotes de peixes, sendo as concentrações utilizadas: 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,5 e 3,0 g.L^{-1} para o paulistinha e 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 g.L^{-1} para a tilápia. Os resultados obtidos nestes ensaios foram de mortalidade de 50% podendo assim passarem para os testes com o fármaco de escolha.

Em seguida, foram realizados ensaios preliminares com a fosfomicina para determinar o intervalo de concentração que causa zero e 100% de mortalidade, utilizando a concentração máxima de 100 mg.L^{-1} .

Com base no intervalo obtido, foram realizados os ensaios definitivos, com três réplicas, três peixes por réplica, na densidade máxima de 1g.L^{-1} . As concentrações utilizadas foram 3,43; 11,16; 36,26 e 117,8 mg.L^{-1} . Os ensaios foram conduzidos em sistema estático, sem substituição e sifonagem de água, isento de alimentação durante o período de exposição (48 horas). A avaliação da mortalidade foi diária com a retirada dos peixes mortos dos aquários (Figura 1 - C) (ABNT, 2011).

Durante a realização dos ensaios foram analisadas as seguintes variáveis de qualidade da água: pH, oxigênio dissolvido (mg.L^{-1}), temperatura ($^\circ\text{C}$) e condutividade elétrica ($\mu\text{S.cm}^{-1}$) em 0, 24 e 48 horas após a exposição. Para o cálculo da concentração letal (CL50;2dias) foi utilizado o software Trimmed Spearman Karber (Hamilton et al.,1977).

3.2. Toxicidade aguda para o caramujo *Pomacea canaliculata*. Para os ensaios de toxicidade aguda para o caramujo (*Pomacea canaliculata*) a norma utilizada foi ABNT (2011) para peixes, que foi adaptada para os ensaios com o caramujo, garantindo assim, a padronização dos resultados. Os caramujos, com peso entre 1,0 e 2,0 g, foram selecionados e aclimatados em sala de bioensaio à temperatura $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 12 horas claro/escuro, com sistema de aeração contínua, sendo alimentados diariamente com *Hydrilla verticillata* (Figura 1 - D e E) (Venturini et al., 2008). Inicialmente foram realizados ensaios de sensibilidade com cloreto de potássio para a avaliação da sanidade dos lotes dos caramujos, estando dentro dos valores da carta referência do NEPEAM para este organismo.

Nos ensaios definitivos foram utilizados três caramujos por réplica, 3 réplicas por tratamento e as concentrações utilizadas foram: 0,0; 3,5; 11,0; 36,0 e 118,0 mg.L^{-1} , com duração de 48 horas (Figura 1 - F). Durante a realização dos ensaios foram analisadas as seguintes variáveis de qualidade da água: pH, oxigênio dissolvido (mg.L^{-1}), temperatura ($^\circ\text{C}$) e condutividade elétrica ($\mu\text{S.cm}^{-1}$) em 0, 24 e 48 horas após a exposição. A partir da imobilidade acumulada foi calculada a concentração efetiva (CE50;2dias) utilizando o software Trimmed Spearman Karber (Hamilton et al.,1977).

A concentração efetiva (CE50) é utilizada para alguns organismos devido a dificuldade que existe de avaliar se o organismo realmente veio a óbito, portanto é avaliada a imobilidade do mesmo.

3.3. Toxicidade aguda para as plantas *Lemna minor* e *Azolla caroliniana*. Para a realização dos testes de toxicidade aguda para as macrófitas aquáticas *Lemna minor* e *Azolla caroliniana*, as plantas foram cultivadas em casa de vegetação, em caixas de 1 L, após seu crescimento, transferidas para cristalizadores em meio de cultivo (Hoagland's) em sala de bioensaio com temperatura $25 \pm 2^\circ\text{C}$, sob fotoperíodo/claro de 24 horas, por quatro dias (Figura 1 - G e H)(OECD, 2002).

As plantas foram desinfetadas em solução de hipoclorito a 0,5% e, em seguida, quatro colônias com três frondes foram selecionadas para cada repetição em recipientes com 50 mL de meio Hoagland's. Inicialmente, para avaliação da sanidade do lote das plantas, foi realizado um ensaio com a substância referência cloreto de sódio (NaCl), estando dentro dos valores da carta referência do NEPEAM para este organismo.

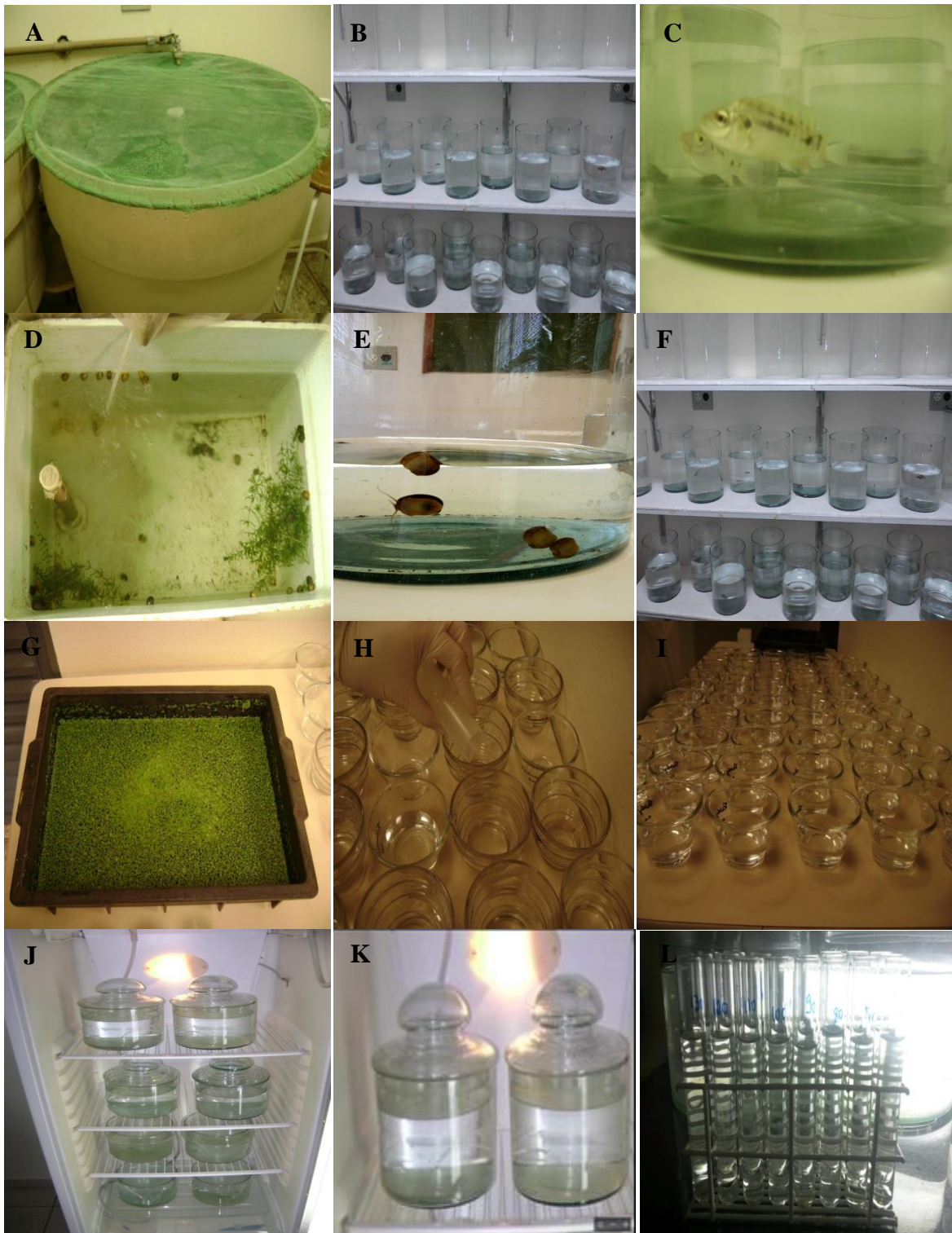


Fig 1. Aclimação (A), pesagem e distribuição dos peixes nos aquários (B), administração da fosfomicina e avaliação por 2 dias (C), Aclimação (D), pesagem e distribuição dos caramujos nos aquários (E), administração da fosfomicina e avaliação por 2 dias (F). Aclimação (G), distribuição dos frondes nos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

Nos ensaios definitivos as concentrações utilizadas foram 0,1; 1,0; 3,4; 11,6; 36,4; e 117,2 mg.L⁻¹, com 12 frondes por réplica, três réplicas em cada concentração, com duração de sete dias de exposição. Os

ensaios foram conduzidos em sistema estático e foram avaliados nos 3º, 5º e 7º dia após a exposição e observados o aumento do número de frondes, clorose (perda de clorofila) e necrose (morte das plantas)(Figura 1 - F). Para o cálculo da CL50;7d foi utilizado o software Trimmed Spearman Karber (Hamilton et al.,1977).

3.4. Toxicidade aguda para *Daphnia magna*. Os ensaios com o microcrustáceo foram realizados no Laboratório de Ecotoxicologia dos Agrotóxicos e Saúde Ocupacional (Laborseg) FCAV-UNESP de Jaboticabal. Os organismos foram cultivados em cristalizadores de 2,0 L de capacidade, com o meio de cultivo renovado completamente duas vezes por semana (ABNT, 2009). A alimentação da cultura foi composta por uma suspensão de algas da espécie *Scenedesmus subspicatus* na concentração aproximada de 5×10^6 células/indivíduo/dia e alimento composto constituído por solução de ração fermentada para peixes ornamentais e solução de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*). Os cristalizadores foram mantidos em estufas em temperatura controlada de $20 \pm 2^\circ \text{C}$, intensidade luminosa de aproximadamente 3.000 lux e fotoperíodo de 8 horas de escuro e 16 horas de luz (Figura 1 - J). Os neonatos com 4 a 24 h de vida, foram selecionados e distribuídos cinco em cada repetição. A sanidade do lote dos organismos teste foi avaliada utilizando o cloreto de sódio como substância referência, estando dentro dos valores da carta referência do Laboratório de Ecotoxicologia dos Agrotóxicos e Saúde Ocupacional do Laborseg. As concentrações utilizadas nos ensaios definitivos foram 60,0; 70,0; 80,0; 90,0 e 100,0 mg. L⁻¹ com três réplicas para cada concentração, contendo cinco neonatos por réplica, com duração de 48 h (Figura 1 K e L).

3.5. Avaliação do risco de intoxicação ambiental. O Risco de intoxicação ambiental é a combinação da exposição e da toxicidade do xenobiótico e foi calculado utilizando a razão entre a concentração ambiental estimada (CAE), que é a concentração/dose do fármaco utilizada no campo no tratamento, e a concentração letal CL50, obtida nos ensaios de toxicidade aguda. O valor do Q, também denominado de quociente de risco (RQ), é um número puro, pois as unidades dos parâmetros se anulam a divisão, sendo as classes de risco: $\text{RQ} > 0,5 =$ Alto risco; $0,05 < \text{RQ} < 0,5 =$ Médio risco e $\text{RQ} < 0,05 =$ Baixo risco. A CL50 da fosfomicina foi considerada com base na maior concentração que não causou mortalidade, ou seja, 100mg L⁻¹, para todos os organismos a CAE foi de 10 mg.Kg⁻¹ concentração utilizada nos ensaios de campo para tratar tilápias infectadas com *S. agalactiae* e *A. hydrophila*.

4. RESULTADOS

A CL50;2dias da fosfomicina para o organismo alvo *Oreochromis niloticus* (tilápia) e não alvo *Danio rerio* (paulistinha) foi maior que 100 mg.L⁻¹, pois esse antimicrobiano não causou mortalidade nas concentrações testadas 3,43 ; 11,16; 36,26 e 117,80 mg.L⁻¹, sendo classificado como praticamente não tóxico (CL50 > 100,0 mg.L⁻¹) (Zucker, 1985). Os peixes demonstraram agitação e aumento do batimento opercular somente após a administração do antimicrobiano (0 hora).

A fosfomicina diminuiu o O₂D que variou de 6,3 mg.L⁻¹ no basal para 3,9 mg.L⁻¹ em 117,8 mg.L⁻¹ e aumentou a condutividade elétrica que variou de 186,7 μS no basal para 321,3 μS em 117,8 mg.L⁻¹.O pH demonstrou uma pequena variação de 8,9 no basal para 8,4 em 117,8 mg.L⁻¹ (Figura 2).

Para a *Lemna minor* e *Azolla caroliniana* a CL50;7d da fosfomicina foi > 100,0 mg.L⁻¹, não apresentando mortalidade para ser possível o cálculo da CL50 pelo software, sendo classificada como praticamente não tóxica (CL50 > 100 mg.L⁻¹) (Zucker, 1985).

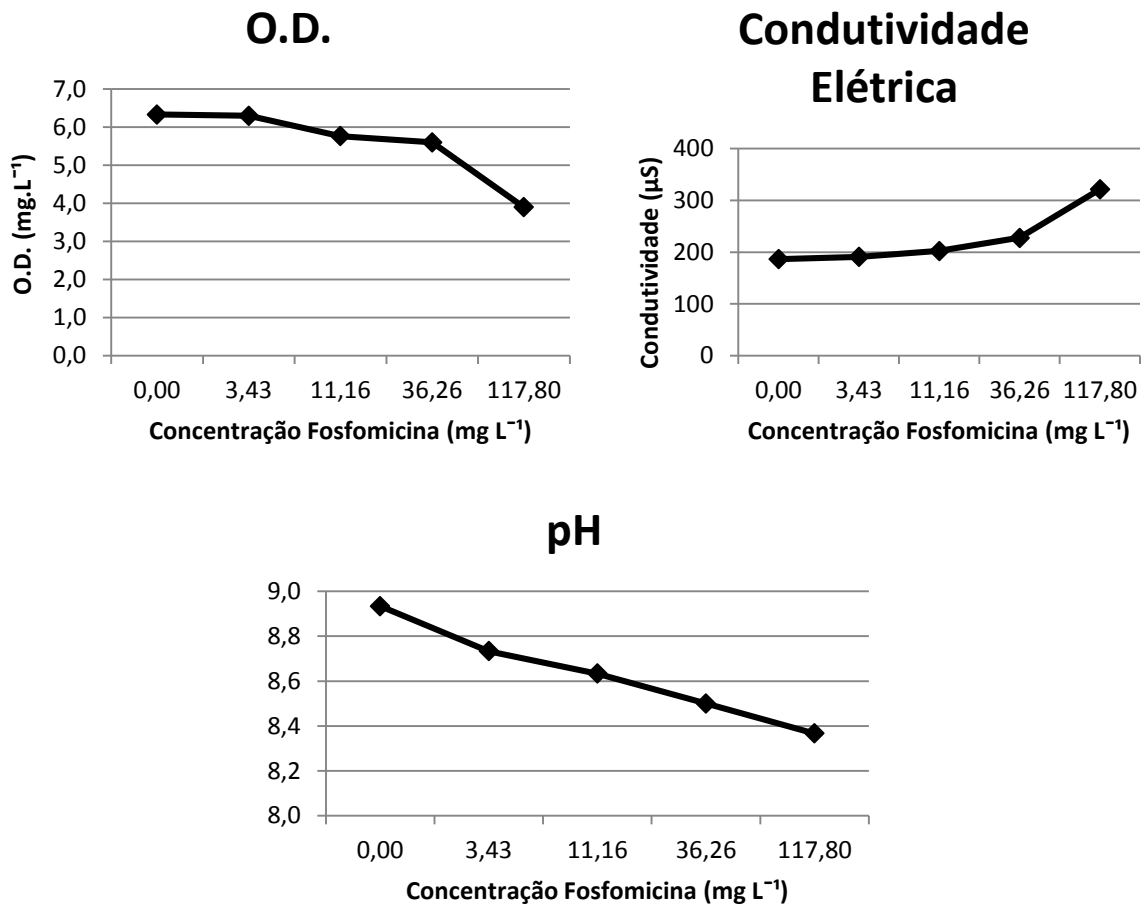


Fig 2. Média dos parâmetros de qualidade de água dos três ensaios definitivos com a tilápia (*Oreochromis niloticus*)

Nos ensaios com os caramujos ocorreu redução do O₂D que variou de 6,36mg.L⁻¹ no basal para 3,6 mg.L⁻¹ em 118mg.L⁻¹. A condutividade elétrica aumentou de 171,2 µS no basal para 501,8 µS em 118 mg.L⁻¹ e o pH apresentou uma leve diminuição de 8,2 no basal para 7,5 em 118 mg.L⁻¹ (Figura 3).

Para a *Daphnia magna* a CE50;2dias da fosfomicina foi > 100,0 mg L⁻¹, pois não ocorreu imobilidade dos neonatos em concentrações até 100 mg.L⁻¹, também sendo classificada como praticamente não tóxica (CL50 > 100 mg.L⁻¹) (Zucker, 1985).

Na avaliação de risco de intoxicação ambiental, não pôde concluir o risco da fosfomicina, pois não se chegou a um resultado de DL/CE50 que é necessário para esse cálculo.

As variáveis de qualidade de água alteradas pela fosfomicina nos ensaios de toxicidade aguda foram a condutividade elétrica que aumentou com o aumento da dose de fosfomicina, o oxigênio dissolvido e pH que diminuíram com o aumento da dose (Figuras 2 e 3).

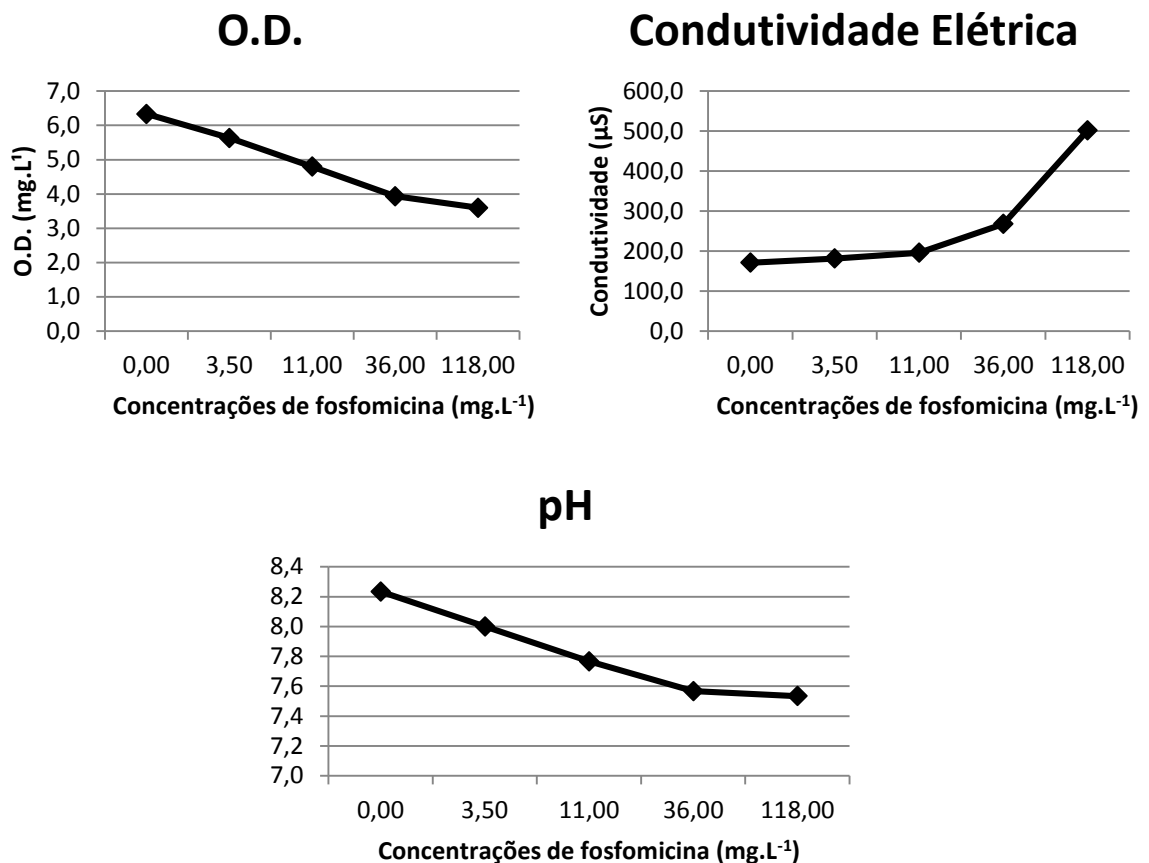


Fig 3. Média dos parâmetros de qualidade de água dos três ensaios definitivos com o caramujo (*Pomacea canaliculata*)

5. DISCUSSÃO

Segundo Prestes et al. (2013) os estudos ecotoxicológicos ilustram a necessidade de uma visão abrangente da toxicidade dos agentes químicos sobre espécies não-alvo, pois levando-se em conta a complexa biota aquática presente no ambiente natural e os diversos graus de sensibilidade entre as espécies, grupos pouco impactados pelo agente podem ser diretamente dependentes de outros que possuem elevada sensibilidade ao mesmo.

Na piscicultura intensiva, os antibacterianos são geralmente oferecidos junto ao alimento, sendo que cerca de 70-80% destes compostos acabam no ambiente (Hektoen et al. 1995). Porém poucos estudos investigaram os efeitos tóxicos de antimicrobianos veterinários nos organismos aquáticos (Wollenberger et al. 2000).

Os antimicrobianos são contaminantes ambientais biologicamente ativos, pois são geralmente muito solúveis e muitas vezes têm pouca biodegradabilidade. Esta propriedade representa um potencial de bioacumulação e persistência no ambiente. Drogas que têm modo específico de ações, provavelmente podem exercer efeitos sobre os ecossistemas terrestres e aquáticos, quando libertados no ambiente, uma maior atenção tem sido dirigida para a descarga, presença e potenciais efeitos adversos das drogas no ambiente (Halling-Sorensen et al. 1998).

Isto evidencia a necessidade de monitorar a ação de fármacos no ambiente, pois podem causar influencia negativa em organismo de algum dos níveis tróficos levando a um desequilíbrio em toda a cadeia.

Macri et al. (1988) investigaram a toxicidade aguda de furazolidona e encontraram valores de CL50 para *D. magna* e larvas *Culex pipiens* de 250, 60 e 10 mg.L⁻¹. Dojmi di Delupis et al., (1992)

estudaram a toxicidade de diferentes agentes antibacterianos para *D. magna* e demonstraram que apenas a bacitracina apresentou CE50;2dias inferior a 100 mg.L⁻¹.

Em estudo de toxicidade aguda para *D. magna*, Wollenberger et al. (2000) verificaram que os antimicrobianos metronidazol, olaquinox, oxitetraciclina e tetraciclina apresentaram CE50 > 100mg.L⁻¹ corroborando o presente estudo.

A fosfomicina demonstrou ter baixa toxicidade para os organismos testados, isso demonstra a segurança desse fármaco para o uso na aquicultura.

Apesar das alterações em alguns parâmetros de qualidade da água, isso ocorreu de forma acentuada apenas nas concentrações mais elevadas do antimicrobiano e essas concentrações não seriam utilizadas para tratamento devido ao alto custo e risco ao ambiente.

6. CONCLUSÃO

A fosfomicina é praticamente não tóxica para os diferentes organismos testados no presente estudo, o que é um importante ponto de partida para aprofundar os estudos desse antimicrobiano para uso na aquicultura.

7. REFERÊNCIAS

ABNT. 2011. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 15088: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes. São Paulo, 19.

Cairns, J. J., Niederlehner, B. R., Bidwell, J. R., 1998, Ecological toxicity testing. IN: MEYERS, R. A. Encyclopedia of Environmental Analysis and Remediation, John Wiley e Sons, Inc., New York, 1560.

FAO (Food and Agriculture Organization). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Roma.

FDA – Food and Drug Administration. Animal and Veterinary: Approved Drugs 2012. <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/DevelopmentApprovalProcess/Aquaculture/ucm132954.htm>.

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

Halling-Sorensen B., Nielsen S.N., Lanzky P.F., Ingerslev F., Lützhøft H.C., Jørgensen S.E. 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment – a review Chemosphere, 36(2): 357–393

Hamilton, M.A., Russo, R.C., Thurston, V. 1977. Trimed Spearman-Karber method for estimating medial lethal concentrations in toxicoty bioassays. Environ. Scien. Techonol., 7: 714-719.

Hektoen, H., Berge, J.A., Samuelsen, O., Yndestad, M., 1995. Resistance of antibacterial agents in marine sediments. Aquaculture 133: 175-184.

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

IBAMA, 1987, Avaliação da toxicidade aguda para peixes. Parte D. 3. Manual de testes para avaliação de ecotoxicidade de agentes químicos, p. D.3.2., 01/09.

Klaassen, C. D. 2006. Princípios de toxicologia e tratamento do envenenamento. In: Brunton, L.L., Lazo, J. S., Parker, K. L. As bases farmacológicas da terapêutica. 11ª Ed., Mc.Grall Hill, Rio de Janeiro, 1573-1584.

Macri, A., Stazi, A.V., Dojmi Di Delupis, G. 1988. Acute Toxicity of Furazolidone on *Artemia salina*, *Daphnia magna* and *Culex pipiens molestus* Larvae. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 16: 90-94.

Migliore, L., Brambilla, G., Casoria, P., Civitareale, C., Cozzolino, S., Gaudio, L. 1996. Effects of Antimicrobials for Agriculture as Environmental Pollutants *Fresenius Environ. Bull.*, 5 : 735-739.

MPA-Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2010. http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20Estat%20C3%ADstico%20MPA%202010.pdf.

OECD. 2002. Organization for Economic Cooperation and Development. *Lemna sp.* Growth Inhibition Test. In: *GUIDELINE for testing of chemicals*.

OIE - World Organization for Animal Health. OIE list of antimicrobials of veterinary importance (2007). http://web.oie.int/download/Antimicrobials/OIE_list_antimicrobials.pdf.

Prestes, E.B.; Clemente, Castro, V.L.S, Z.Jonsson, C.M. 2013. Avaliação da Toxicidade Aguda de Piraclostrobin, Epoxiconazole sua Mistura em *Colossoma macropomum* (tambaqui). *Ecotox. Environ. Contam.*, 8(1): 125-128.

Venturini, F.P. Cruz, C. Pitelli, R.A. 2008. Toxicidade aguda do sulfato de cobre e do extrato aquoso de folhas secas de nim para o caramujo (*Pomacea canaliculata*). *Acta Sci. Biol. Sci.*, 30.

Wollenberger, L., Halling-Sørensen B., Kusk K.O. 2000. Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna* *Chemosphere*. 40(7): 723-730.

Wolff, L. L.; Hreciuk, E. R.; Viana, D.; Zaleski, T.; Donatti, L. 2007, Population structure of *Phalloceros caudimaculatus* (Hensel, 1868) (Cyprinodontiformes, Poeciliidae) collected in a brook in Guarapuava, PR. *Braz. Arch. Biol. Tech.*, 50 (3): 417-423.

Yousefian, M., Amiri, M.S. 2009. A review of the use of prebiotic in aquaculture for fish and shrimp. *African J of Biotechnol.* 8(25): 7313-7318.

Zucker, E. 1985. Hazard Evaluation Division - Standard Evaluation Procedure - Acute Toxicity Test for Freshwater Fish. USEPA Publication, Washington, 540.

CAPÍTULO 3 - Estudo da segurança clínica da fosfomicina para tilápia (*Oreochromis niloticus*)

¹Roberto Barbuio, ¹Vanessa Pavesi de Faria, ²Marco Antonio de Andrade Belo, ³Claudinei da Cruz

ABSTRACT - Barbuio R., Faria V.P., Belo M.A.A. & Cruz C., 2016. Estudo da segurança clínica da fosfomicina para tilápia (*Oreochromis niloticus*). Universidade Estadual Paulista, Rodovia Paulo Donato Castellane s/n, Jaboticabal, SP 14884-900, Brasil. E-mail: betobarbuio@gmail.com

The objective of this study was to evaluate the clinical safety of antimicrobial fosfomycin for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Phosphozinc innocuity was evaluated in response dose, being tested as concentrations of 10, 20 and 40 mg of fosfomycin / kg of Fosfomycin C® formulation via feed for seven days, and material collections were carried out at 2, 4, 8 And 12 days, thus obtaining two collections during one administration and twice closing the administration of the drug. Ten healthy tilapia collected on day 2 were used as basal standard. Tilapia of 112 g ± 5.6 g were used in tanks of 400 L (n = 10 tilapia / tank). The concentrations of 20 and 40 mg of fosfomycin caused a decrease in the number of erythrocytes with the macrocytic type and a decrease in the number of leukocytes over time. Our fish were run by our biochemical genes with values in triglyceride values. Serum cholesterol levels decreased and ALT (alanine aminotransferase), AST (aspartate aminotransferase) and FA (alkaline phosphatase) increased in the treatments. Creatinine levels increased in all treatments in the basal medium. Histopathology revealed at all concentrations used with increased lesions and severity with increased concentrations for the liver, kidneys and spleen. In the liver, hepatocyte hypertrophy, hepatic cord architecture derangements, and hepatocyte necrosis were found. In the kidneys, the most common lesion for a diffuse glomerulosclerosis with onset of pycnotic nuclei, reaching necrosis with inflammation, inflammatory infiltrate, corroborating the deleterious findings observed, did not increase serum creatinine levels. In the spleen, a major alteration noted for the increase of the centers of melanomacrophages and free melanomacrophages. Studies of INS (nephrosomatic index) and INSC (nephrosomatic cranial index) revealed variations over time. The pH, OD (dissolved oxygen) decreased while conductivity increased throughout the study. Although it did not cause mortality the formulation Fosfomicina C® in the doses tested caused us the physiological parameters of the fish. Therefore, the studies necessary to evaluate the effect of pure fosfomycin in the fish organism.

TERMS OF INDEXATION: tilapicultura, antimicrobiano, innocuidade

RESUMO

Objetivou-se com o presente estudo avaliar a segurança clínica do antimicrobiano fosfomicina, para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). A inocuidade da fosfomicina foi avaliada em estudo de dose-resposta, testando-se as concentrações de 10, 20 e 40 mg de fosfomicina/kg da formulação Fosfomicin C[®] via ração durante sete dias, sendo as coletas de material realizadas em 2, 4, 8 e 12 dias, obtendo-se assim duas coletas durante a administração e duas após encerrada a administração do fármaco. Como padrão basal foram utilizadas 10 tilápias sadias coletadas no dia 2. Foram utilizadas 130 tilápias de 112 g ± 5,6 g, acondicionadas em tanques de 400 L (n=10 tilápias/tanque). As concentrações de 20 e 40 mg de fosfomicina causaram diminuição no número de eritrócitos com alterações do tipo macrocítica, e diminuição no número de leucócitos ao longo do tempo. Nos peixes tratados ocorreram alterações nos parâmetros bioquímicos com aumentos nos valores de triglicérides. Nos valores séricos de colesterol ocorreu a diminuição e a atividade enzimática sérica de ALT (alanina aminotransferase), AST (aspartato aminotransferase) e FA (fosfatase alcalina) das tilápias apresentaram aumento dentro dos tratamentos. Os níveis de creatinina aumentaram em todos os tratamentos em comparação ao basal. A histopatologia revelou alterações em todas as concentrações utilizadas com aumento das lesões e da gravidade com o aumento das concentrações para o fígado, rins e baço. No fígado, verificou-se hipertrofia dos hepatócitos, desarranjos da arquitetura dos cordões hepáticos e necrose dos hepatócitos. Nos rins a lesão mais comum foi a glomerulosclerose difusa com aparecimento de núcleos picnóticos, chegando à necrose com presença de infiltrado inflamatório, corroborando os achados deletérios observados no aumento dos níveis séricos de creatinina. No baço, a principal alteração notada foi o aumento dos centros de melanomacrófagos e melanomacrófagos livres. Os estudos dos INS (índice nefrossomático) e INSC (índice nefrossomático cranial) revelaram variações ao longo do tempo. O pH, o OD (oxigênio dissolvido) diminuíram enquanto a condutividade apresentou aumento ao longo do estudo. Apesar de não causar mortalidade a formulação Fosfomicin C[®] nas doses testadas causou alterações nos parâmetros fisiológicos dos peixes. Portanto, serão necessários novos estudos para avaliar o efeito da fosfomicina pura no organismo dos peixes.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: tilapicultura, antimicrobiano, inocuidade

¹Departamento de Patologia Veterinária, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Rodovia de Acesso Paulo Donato Castellane s/n, Zona Rural, Jaboticabal, SP 14884-012.

²Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Rodovia de Acesso Paulo Donato Castellane s/n, Zona Rural, Jaboticabal, SP 14884-012.

³Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais em Matologia (Nepeam) da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Rodovia de Acesso Paulo Donato Castellane s/n, Zona Rural, Jaboticabal, SP 14884-012.

1. INTRODUÇÃO

A aquicultura tem cada vez mais adquirido importância no mercado mundial e em 2014 um marco foi alcançado quando a contribuição da aquicultura para o fornecimento de peixe para consumo humano ultrapassou pela primeira vez os peixes capturados na natureza (FAO, 2016).

O consumo de peixe per capita no mundo registrou um aumento de uma média de 9,9 kg em 1960 para 19,7 kg em 2013, com estimativas preliminares apontando para aumentar para mais de 20 kg, em 2014 e 2015 (FAO, 2016).

Em 2014, a produção aquícola totalizou 73,8 milhões de toneladas, com um valor estimado de 160.200 milhões de dólares. Deste total, 49,8 milhões de toneladas foram de peixes ósseos (FAO, 2016).

O potencial do Brasil para o desenvolvimento da aquicultura é imenso, constituído por 8.400 Km de costa marítima, 5.500.000 hectares de reservatórios de águas doces, aproximadamente 12% da água doce disponível no planeta, além de clima extremamente favorável, mão-de-obra abundante e crescente demanda por pescado no mercado interno (MPA, 2010). Neste contexto, o cultivo mundial de algumas espécies de peixes vem crescendo significativamente nos últimos anos. Dentre estas, destacam-se as tilápias, pois apresentam elevada precocidade e rusticidade, além também da sua carne ser altamente apreciada pelo consumidor (MPA, 2010).

A biomanipulação dos ecossistemas aquáticos com a maximização dos recursos produtivos traz consigo inúmeros desafios, dentre os quais se destaca o basal sanitário das populações de peixes. Em geral, o aumento de espécimes por área, somado às práticas de manejo, resulta na ocorrência do estresse, condição fisiológica responsável por imunossuprimir os sistemas de defesa dos peixes, predispondo-os a mais diversas enfermidades (Hirsch et al, 2006). Neste preceito, agentes etiológicos que causam aparentemente poucos danos às populações de peixes em seu habitat natural, podem tornar-se agentes precursores de doenças de grande importância econômica quando submetidos às condições de criação (Yousefian & Amiri, 2009).

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

De acordo com a Resolução XXVIII da 75ª sessão geral da comissão internacional da OIE (Organização Mundial de Sanidade Animal) que define a lista de antimicrobianos de importância na Medicina Veterinária, a fosfomicina pode ser empregada no basal bacteriano de aves, suínos e bovinos, apresentando grande potencial para o uso em peixes, no entanto, necessitando do delineamento de protocolos terapêuticos eficazes para seu uso em organismos aquáticos (OIE, 2007). A fosfomicina é um antimicrobiano que vem sendo empregado com sucesso na avicultura e suinocultura, administrado na água ou na ração dos animais, apresentando amplo espectro de ação antimicrobiana (Gutierrez et al., 2010).

No entanto, outro fator extremamente relevante, quando se estuda a administração exógena de compostos farmacológicos, relaciona-se a inocuidade dos mesmos. Pois, aliado à sua atividade terapêutica, estas formulações devem oferecer segurança clínica aos animais. Segundo Klaassen (2006), toda substância é potencialmente tóxica, a dose correta diferencia o remédio do tóxico.

Partindo-se da importância da tilapicultura, associado à necessidade de desenvolvimento de programas sanitários eficazes para controlar estas enfermidades em plantéis aquícolas, o presente estudo tem por objetivos avaliar a segurança clínica do antimicrobiano fosfomicina, para o tratamento de tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fosfomicina - A fosfomicina é um antibiótico de largo espectro, tendo sido isolado pela primeira vez por triagem de culturas em caldo de *Streptomyces fradiae* provenientes de amostras de solo (Grif et al., 2001). A fosfomicina é bactericida e inibe a biogênese da parede celular bacteriana por inativar

a enzima UDP-N-acetilglucosamina-3-enolpiruviltransferase, também conhecida como mura (Brown et al., 1995).

Esta enzima catalisa importante passo na biossíntese de peptidoglicano, mediando a ligação de fosfoenolpiruvato (PEP) para o grupo 3'-hidroxila de UDP-N-acetilglucosamina. Esta porção de piruvato fornece o ligante que uni a porção glicano ao peptídeo na molécula do peptidoglicano. Portanto, a fosfomicina é um análogo que inibe a PEP Mura por alquilação de um resíduo de cisteína do centro ativo e este fármaco entra na célula bacteriana por meio do transportador de glicerofosfato (Brown et al., 1995).

A fosfomicina é utilizada para o tratamento de infecções bacterianas resistentes a múltiplas drogas e isso tem chamado a atenção para este medicamento (Baylan, 2010). É razoavelmente solúvel em água (Bergogne-Berezin, 1987), fortemente polar e estável em condições de armazenamento (Raz, 2012).

A fosfomicina é principalmente excretada na urina por filtração glomerular e seu pico ocorre dentro de 4 horas após a administração. Esta droga tem boa penetração nos rins, parede da bexiga, próstata, vesículas seminais e no líquido cefalorraquidiano (Kashanian et al., 2008; Williams et al., 2006).

Este antimicrobiano possui atividade antibacteriana ampla contra agentes patogênicos Gram-positivos e Gram-negativos, sendo indicado para o tratamento de *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* sp. em aves de postura e de corte (Gutierrez et al., 2010) e em suínos (Soraci et al., 2011). Em outros mamíferos inclusive nos seres humanos, é indicada também para o tratamento de infecções por *Citrobacter*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Enterococcus* spp (Patel et al., 1997).

2.2 Tilapicultura intensiva no Brasil - O crescente aumento na comercialização mundial das tilápias, espécies de teleósteos do gênero *Oreochromis*, especialmente pelo aumento da produção na China e outros países em desenvolvimento, como o Brasil (Hempel, 2002), transformou este grupo de peixes no segundo mais importante para a aquicultura e o terceiro mais importado pelos EUA e Europa, depois somente dos camarões marinhos e salmões (Conroy e Conroy, 2004). Tal fato é resultante do potencial fisiológico reprodutivo e de adaptação destes animais, que apresentam elevada rusticidade, fácil domesticação e excelente valor agregado para a comercialização, gerando perspectivas de se tornarem o mais importante grupo de espécies aquícolas neste século XXI (Fitzsimmons, 2000; Shelton, 2002).

De acordo com as estatísticas do Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA), a produção de tilápias representou cerca de 38% da produção de pescado continental no Brasil no ano de 2010, sendo este ciclídeo o grupo de peixes mais criado. Neste contexto, destaca-se a espécie *Oreochromis niloticus*, comumente chamada de “tilápia do Nilo”, de origem africana, oriunda da bacia do Rio Nilo, pertencente à família Cichlidae.

Para Zimmermann e Fitzsimmons (2004), no Brasil, a tilapicultura segue a mesma tendência mundial, com predomínio de tilápias nilóticas ao invés de tilápias vermelhas, pois estas apresentam crescimento mais rápido e um rendimento de filé superior quando comparadas às demais espécies de tilápias.

Da mesma forma, as disputas por novos mercados, a concorrência com outros países neste início das exportações, a necessidade de se desenvolver um mercado interno mais forte, bem como as novas oportunidades de uma aquicultura intensiva, deverão considerar os aspectos sanitários na produção das tilápias, através de manejos eficientes do sistema aquático que visem melhorar não somente a produtividade, mas também proteger o consumidor e o meio ambiente (Zimmermann & Fitzsimmons, 2004).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Peixes e acondicionamento - Para o presente estudo, foram utilizadas 130 tilápias do Nilo oriundas da mesma desova com aproximadamente 200g sendo acondicionadas em 13 tanques de alvenaria, com capacidade de 400L de água, com 10 tilápias em cada tanque, abastecidos com água corrente desprovida de cloro, proveniente de poço artesiano, com vazão de 1 L/min (Figura 1 - A). Após o transporte para os tanques, os peixes foram aclimatados durante 15 dias para que a concentração plasmática de cortisol e a osmolaridade voltassem aos níveis basais. Nos primeiros três dias de aclimação, os animais foram submetidos a banhos em solução de NaCl na concentração de 6,0 g/L conforme descrito por Carneiro e Urbinati (2001). Receberam ração comercial peletizada (32% de proteína bruta). O arraçoamento dos animais foi feito duas vezes ao dia, pela manhã e tarde, correspondendo a 3% da biomassa dos tanques. A qualidade da água foi avaliada nos períodos da manhã e da tarde, sendo a temperatura e concentração de oxigênio dissolvido medidos pelo aparelho YSI, modelo 55, e o pH e a condutividade elétrica pelo aparelho YSI, modelo 63.

3.2. Delineamento experimental - Os peixes foram distribuídos aleatoriamente em 13 tanques, sendo amostrados 10 animais por grupo em diferentes períodos conforme a Tabela 1.

Tabela 1. Distribuição das tilápias no estudo de segurança clínica

Ensaio de Segurança Clínica		Dias pós-início do tratamento			
Grupos	Tratamentos	2 dias	4 dias	8 dias	12 dias
T0	Basal	n= 10			
T1	Tratado com 10mg de fosfomicina/Kg	n= 10	n= 10	n= 10	n= 10
T2	Tratado com 20mg de fosfomicina/Kg	n= 10	n= 10	n= 10	n= 10
T3	Tratado com 40mg de fosfomicina/Kg	n= 10	n= 10	n= 10	n= 10

T1 - 10mg de fosfomicina/Kg que equivale a 2000g/tonelada de ração, T2 - 20mg de fosfomicina/Kg que equivale a 4000g/tonelada de ração e T3 - 40mg de fosfomicina/Kg que equivale a 8000g/tonelada de ração

3.3. Padronização da ração com a adição de fosfomicina - As tilápias foram alimentadas com dieta comercial (Fri Acqua Crescimento Tilápias), contendo 32% de proteína bruta. Na dieta dos animais do tratamento T1, foram adicionadas o antimicrobiano na proporção 2000g de Fosfomicina C® (Empresa OuroFino Agronegócio) por tonelada de ração, T2 suplementada com 4000g por tonelada e T3 com 8000g por tonelada. Para o preparo das dietas, a ração comercial foi pesada e adicionou-se 2% de óleo vegetal acrescido das respectivas quantidades de Fosfomicina C®, e armazenada em sacos plásticos escuros, mantida a -16°C, até o momento do uso. A ração foi ofertada durante sete dias, sendo as coletas de material realizadas em 2, 4, 8 e 12 dias, obtendo-se assim duas coletas durante a administração e duas após encerrada a administração do fármaco.

3.4. Anestesia dos peixes - Os peixes foram anestesiados por imersão em solução aquosa de benzocaína (Figura 1 B e C) na proporção de 1:500 no momento da eutanásia. Inicialmente, a benzocaína foi diluída em álcool 98° (0,1 g/mL), completando-se o volume para 1L conforme descrito por Wedemeyer (1970).

3.5. Avaliação hematológica - Foram colhidas amostras de sangue dos peixes por punção de vaso caudal 2, 4, 8 e 12 dias após o início da exposição ao fármaco (Figura 1 - D). A determinação da contagem global de células vermelhas e brancas foram realizadas em câmara de Neubauer, utilizando a solução de Natt e Herrick (1952) com diluente na proporção de 1:100. Foram realizadas a determinação do percentual de hematócrito em microcentrífuga e da quantidade de hemoglobina circulante com reagente de Drabkin's para leitura em comprimento de onda de 540nm e os valores de volume corpuscular médio (VCM) foram obtidos pelo cálculo $VCM = (HT/HE) \times 10$ e concentração hemoglobina corpuscular média (CHCM) pelo cálculo $CHCM = (HG/HT) \times 10$.

3.6. Avaliações comportamentais, sinais clínicos e mortalidade - Diariamente, os animais foram examinados nos tanques quanto ao eventual aparecimento de alterações comportamentais, sinais clínicos e mortalidade que pudessem resultar do tratamento com a fosfomicina.

3.7. Avaliação da bioquímica sérica - Amostras de sangue colhidas sem anticoagulante (Figura 1 - D) foram centrifugadas a 5.000 rpm por cinco minutos para obtenção de soro. O estudo do bioquímico sérico de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), proteínas totais, albumina, glicose, colesterol, triglicerídeos e creatinina foram determinadas enzimática ou colorimetricamente em analisador bioquímico semi-automático (Modelo LabQuest - Bioplus) (Figura 1 - E).

3.8. Avaliação morfológica e histopatológica dos órgãos - Após a necropsia o fígado, rim e baço foram coletados para avaliação morfológica (Figura 1 - H e I) que foi realizada de acordo com Weibel et al. (1969), através da proporção entre peso do órgão (PO) e peso corporal (PC) expressos como índice somático hepático, renal e esplênico calculado pela fórmula: Índice somático (IS) = $PO \times 100/PC$. Para os histopatológicos foram avaliados fígado, baço e rim, imediatamente após coletar um fragmento de

cada órgão, os mesmos foram fixados em formol a 10 % e após 24 horas os mesmos foram transferidos para o álcool 70%. Foram, então, encaminhados para preparo das peças no laboratório de patologia veterinária, onde foram emblocados em parafina ,cortados em espessura de 3µm, e foram corados em hematoxilina e eosina.

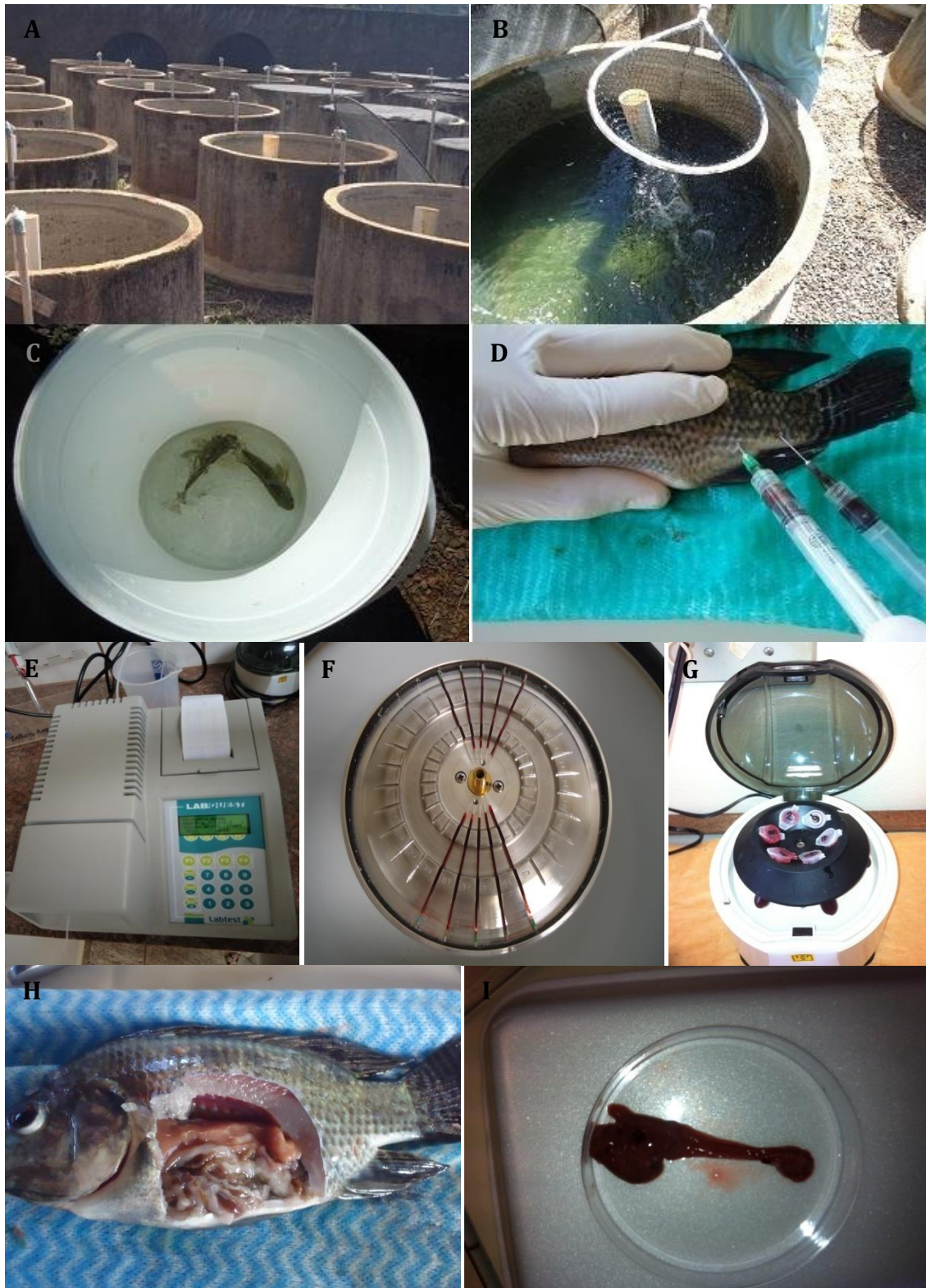


Fig 1. (A) Sistema de tanques de alvenaria com capacidade de 400L (NEPEAM - UNESP), (B) Captura, (C) Anestesia dos peixes com benzocaína diluída em álcool 98°, (D) Venopunção de vaso caudal seringas com e sem anticoagulante, (E) Analisador bioquímico semi-automático (Modelo LabQuest - Bioplus), (F) Centrífuga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

3.9. Análise estatística - Os dados experimentais foram submetidos à análise de variância através de delineamento inteiramente casualizado em parcela subdividida no tempo "Split Plot Design", tendo como tratamentos principais os grupos experimentais e as subparcelas os períodos experimentais, utilizando-se o pacote estatístico SAS, pelo procedimento PROC GLM, versão 9.3 (SAS, 2012). As comparações múltiplas foram aferidas pelo Teste de Tukey ao nível de 95% de confiança de acordo com Snedecor e Cochran (1980).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No estudo de segurança clínica notou-se diminuição no número de eritrócitos ao longo do tempo nas três concentrações da fosfomicina, associado a um aumento do volume corpuscular dos eritrócitos (Tabela 2).

Tabela 2. Valores médios observados no estudo hematológico de tilápias tratadas com diferentes concentrações de fosfomicina

		Eritrócitos	Hematócrito	Hemoglobina	VCM	CHCM
	TTO ²	(x10 ⁶ /μL)	(%)	(g/dL)	(fL)	(g/dL)
T0	BASAL	2,01 ^A	37,65 ^A	8,49 ^A	192,15 ^A	22,78 ^A
T1	10mg Basal	1,87 ^{AB}	38,05 ^A	7,72 ^A	206,40 ^A	20,34 ^A
	10mg 4dias	1,58 ^B	34,15 ^A	8,33 ^A	221,66 ^A	24,58 ^A
	10mg 8dias	1,62 ^B	36,60 ^A	9,12 ^A	230,39 ^A	25,24 ^A
	10mg 1Basal	1,63 ^B	39,35 ^A	9,15 ^A	244,55 ^A	23,35 ^A
T2	20mg Basal	1,72 ^{AB}	36,35 ^A	8,62 ^A	213,60 ^A	23,96 ^A
	20mg 4dias	1,63 ^B	38,44 ^A	11,33 ^A	247,52 ^A	29,14 ^A
	20mg 8dias	1,73 ^{AB}	37,30 ^A	8,55 ^A	218,28 ^A	24,42 ^A
	20mg 1Basal	1,57 ^B	35,80 ^A	8,92 ^A	229,01 ^A	25,18 ^A
T3	40mg Basal	1,85 ^{AB}	39,09 ^A	8,76 ^A	211,93 ^A	22,67 ^A
	40mg 4dias	1,71 ^{AB}	36,75 ^A	9,05 ^A	219,96 ^A	24,66 ^A
	40mg 8dias	1,58 ^B	36,50 ^A	9,25 ^A	232,43 ^A	25,43 ^A
	40mg 1Basal	1,58 ^B	34,50 ^A	8,84 ^A	228,83 ^A	25,61 ^A
DOSE		0,06ns	0,08ns	0,76ns	0,10ns	1,05ns
TEMPO		4,98**	0,83ns	0,91ns	2,22ns	1,55ns
DOSE*TEMPO		1,06ns	2,92*	0,95ns	0,86ns	0,42ns
Coef. Variação		14,08	10,25	31,4	16,84	28,75

O aumento do VCM associado à diminuição do número de eritrócitos, são descritas em casos de doenças hepáticas e anemias hemolíticas. O exame histopatológico do fígado (Figura 3) comprova as alterações causadas pela fosfomicina no tecido hepático e isso pode ser associado com o quadro hematológico observado, sugerindo que a degradação metabólica do fármaco, resulte em alterações hepáticas e hematológicas.

É comum o relato de alguns antimicrobianos causarem alterações hematológicas (Kuter et al., 2001). O cefuroxima está associado com diminuições de hemoglobina e hematócrito além de leucopenia (Glaxo et al., 1999).

Neu et al. (1992) relatam que a maioria dos efeitos hematológicos são dose dependente e reversíveis quando o tratamento é interrompido. Estas alterações hematopoiéticas incluem: citólise direta, a destruição imunomediada, genotoxicidade e inibição da síntese de proteína mitocondrial.

Tabela 3. Valores médios observados no estudo leucocitário de tilápias tratadas com diferentes concentrações de fosfomicina

	TTO	Linfócito	Monócito	Neutrófilo	Trombócito	Leucócitos
T0	BASAL	43339 ^A	1481 ^A	3589 ^{ABC}	20191 ^A	48410 ^A
T1	10mg 2dias	36786 ^A	1564 ^A	4631 ^A	18023 ^A	42981 ^A
	10mg 4dias	34003 ^A	1274 ^A	3333 ^{ABC}	19280 ^A	38611 ^A
	10mg 8dias	36950 ^A	1047 ^A	1720 ^{BC}	22040 ^A	39719 ^A
	10mg 12dias	35873 ^A	590 ^A	996 ^C	23283 ^A	37460 ^A
T2	20mg 2dias	30031 ^A	901 ^A	3172 ^{ABC}	20688 ^A	34104 ^A
	20mg 4dias	24469 ^A	1101 ^A	2228 ^{ABC}	22737 ^A	27800 ^A
	20mg 8dias	24461 ^A	798 ^A	2305 ^{ABC}	21047 ^A	27564 ^A
	20mg 12dias	26906 ^A	695 ^A	1782 ^{BC}	16070 ^A	29384 ^A
T3	40mg 2dias	44743 ^A	1543 ^A	4392 ^{AB}	29066 ^A	50679 ^A
	40mg 4dias	49440 ^A	1441 ^A	3450 ^{ABC}	27602 ^A	54159 ^A
	40mg 8dias	34046 ^A	488 ^A	1894 ^{ABC}	20630 ^A	35854 ^A
	40mg 12dias	40590 ^A	1163 ^A	1787 ^{BC}	18583 ^A	43541 ^A
DOSE		4,91 ^{**}	0,82 ^{ns}	0,67 ^{ns}	1,27 ^{ns}	0,06 ^{ns}
TEMPO		0,34 ^{ns}	2,40 ^{ns}	10,47 ^{**}	0,64 ^{ns}	4,98 ^{**}
DOSE*TEMPO		0,37 ^{ns}	0,77 ^{ns}	0,95 ^{ns}	1,23 ^{ns}	1,06 ^{ns}
Coef. Variação		57,15	88,84	65,7	51,64	14,08

O estudo leucocitário das tilápias não apresentaram alterações significativas quando comparadas aos animais basais (Tabela 3). Entretanto, na comparação entre peixes tratados verificou-se diminuição no número de leucócitos ao longo do tempo e peixes tratados com 20 mg apresentaram número menor de leucócitos em todos os períodos analisados.

De acordo com Belo et al. (2013), a análise do leucograma dos peixes representa uma ferramenta de diagnóstico e prognóstico de condições mórbidas. Em situações de intoxicação por compostos químicos, esses podem causar lesões nos tecidos resultando em inflamação e alterações no leucograma. A diminuição no número de leucócitos sanguíneos foi descrita com o uso de vários antimicrobianos, incluindo a nafcilina, oxacilina, piperacilina, cefalexina, imipenem (Neu et al., 1992).

Os tratamentos com fosfomicina nas três doses resultaram em alterações nos parâmetros bioquímicos (Tabela 4). Aumentos significativos ($p < 0,05$) nos valores de triglicerídeos foram observados ao longo do tratamento. O incremento sérico destes lipídios podem decorrer da mobilização de reservas teciduais para favorecer o metabolismo energético, resultantes de processos neoglicogênicos. Tais achados sugerem que o aumento deste lipídio poderia estar associado ao metabolismo da fosfomicina nas tilápias. Porém, pouca variação foi observada nos níveis sanguíneos de glicose, fato que poderia auxiliar na compreensão destas alterações metabólicas.

Tabela 4. Valores médios observados no estudo bioquímico sanguíneo de tilápias tratadas com diferentes concentrações de fosfomicina.

	TTO²	Proteínas Totais	Albumina	Colesterol	Triglicerídeos	Glicemia
T0	BASAL	3,00 ^{AB}	0,73 ^B	100,57 ^{AB}	88,20 ^{DEF}	69,30 ^A
T1	10mg 2dias	2,78 ^{AB}	0,72 ^B	85,40 ^B	54,11 ^F	77,10 ^A
	10mg 4dias	3,04 ^A	0,78 ^B	87,22 ^B	150,67 ^{BCDE}	81,40 ^A
	10mg 8dias	3,21 ^A	0,78 ^B	95,00 ^B	215,60 ^B	76,80 ^A
	10mg 12dias	3,15 ^A	0,78 ^B	95,30 ^B	206,80 ^B	73,60 ^A
T2	20mg 2dias	2,49 ^B	0,75 ^B	98,11 ^B	60,63 ^F	81,90 ^A
	20mg 4dias	3,00 ^{AB}	0,76 ^B	87,11 ^B	145,11 ^{BCDE}	85,33 ^A
	20mg 8dias	3,16 ^A	0,74 ^B	88,40 ^B	109,20 ^{CDEF}	83,20 ^A
	20mg 12dias	3,09 ^A	0,76 ^B	95,30 ^B	300,50 ^A	64,30 ^A
T3	40mg 2dias	3,20 ^A	0,89 ^A	122,20 ^A	70,86 ^{EF}	83,33 ^A
	40mg 4dias	2,80 ^{AB}	0,79 ^{AB}	102,75 ^{AB}	112,20 ^{CDEF}	68,30 ^A
	40mg 8dias	3,07 ^A	0,71 ^B	85,30 ^B	155,20 ^{BCD}	66,20 ^A
	40mg 12dias	2,98 ^{AB}	0,76 ^B	100,80 ^{AB}	181,30 ^{BC}	62,70 ^A
DOSE		1,74 ^{ns}	3,12 [*]	7,85 ^{**}	3,14 [*]	2,53 ^{ns}
TEMPO		5,98 ^{**}	109,13 ^{**}	4,13 ^{**}	50,25 ^{**}	3,38 [*]
DOSE*TEMPO		4,50 ^{**}	7,03 ^{**}	4,68 ^{**}	8,26 ^{**}	1,15 ^{ns}
Coef. Variação		10,43	9,56	15,09	34,48	24,02

O tratamento com 20 e 40 mg de fosfomicina resultou em diminuição dos valores séricos de colesterol (Tabela 4). O fígado exerce papel biológico importante no metabolismo deste lipídio e segundo Oba et al. (2009), a diminuição do colesterol circulante pode ser resultante da biossíntese de

pregnenolona, que é precursora na síntese de cortisol, que por sua vez, estaria atuando sobre a fisiologia do animal promovendo alterações metabólicas. Nos peixes teleósteos, a biossíntese de cortisol nas células interrenais ocorre a partir da degradação metabólica do colesterol (Tort, 2011), justificando os achados de diminuição deste lipídeo.

De acordo com Mommsen et al., (1999), processos neoglicogênicos resultantes da participação de catecolaminas e glicocorticoides endógenos durante a resposta ao estresse aumentam a demanda metabólica e conseqüentemente os valores séricos de triglicérides e glicose. Isso justifica a variação encontrada nesse estudo, pois a diminuição significa que ele está sendo consumido para gerar energia e o aumento subsequente, que o organismo está desprendendo maior quantidade para a corrente sanguínea para suprir a demanda.

Tilápias tratadas com 20 e 40 mg de fosfomicina apresentaram diminuição dos valores séricos de proteínas totais na fase inicial do tratamento, porém estes dados não foram significativos quando comparados aos valores séricos observados nos animais basais. No entanto, observa-se aparente aumento de albumina sérica na fase inicial do tratamento com 40 mg de fosfomicina. Segundo Belo et al. (2012), a hiperalbuminemia é um achado comumente associado a alterações no equilíbrio líquido-eletrolítico, sendo observado em animais com hemoconcentração. Estes resultados apresentam forte correlação aos achados do estudo do eritrograma, pois estes animais apresentaram aumento nos valores de hematócrito. Por outro lado, a redução do total de proteínas no soro pode estar ligada a lesão hepática causada pelo uso de fármaco (Nayak et al., 2004).

O estudo da atividade enzimática sérica de ALT, AST e FA das tilápias tratadas com as diferentes doses de fosfomicina (Tabela 5) apresentou variações significativas dentro dos tratamentos, porém quando comparadas aos animais do grupo basal não se verificou alterações significativas, exceto na atividade sérica de FA que apresentou diminuição significativa na fase de recuperação dos tratamentos (12dias).

Tabela 5. Valores médios observados no estudo bioquímico sanguíneo de tilápias tratadas com diferentes concentrações de fosfomicina.

TTO		ALT	AST	FA
T0	BASAL	14,43 ^A	55,44 ^{AB}	59,67 ^{AB}
T1	10mg 2dias	8,33 ^A	63,50 ^{AB}	45,25 ^{BC}
	10mg 4dias	11,11 ^A	27,11 ^B	60,00 ^{AB}
	10mg 8dias	20,00 ^A	92,40 ^A	79,90 ^A
	10mg 12dias	17,00 ^A	51,20 ^{AB}	36,20 ^C
T2	20mg 2dias	25,50 ^A	64,38 ^{AB}	54,22 ^{BC}
	20mg 4dias	23,56 ^A	42,00 ^{AB}	62,67 ^{AB}
	20mg 8dias	12,22 ^A	59,33 ^{AB}	60,40 ^{AB}
	20mg 12dias	19,00 ^A	40,80 ^{AB}	39,44 ^{BC}
T3	40mg 2dias	20,38 ^A	65,33 ^{AB}	59,00 ^{AB}
	40mg 4dias	18,89 ^A	54,00 ^{AB}	48,90 ^{BC}
	40mg 8dias	19,00 ^A	40,50 ^{AB}	63,50 ^{AB}
	40mg 12dias	13,00 ^A	52,40 ^{AB}	31,90 ^C
DOSE		2,32ns	0,32ns	0,94ns
TEMPO		0,14ns	2,28ns	23,46**
DOSE*TEMPO		2,42*	1,65ns	2,97*
Coef. Variação		59,91	71,55	27,26

Tilápias tratadas com fosfomicina apresentaram aumento não significativo na quantidade de ALT quando comparados aos valores apresentados por animais basais. Alterações nos valores séricos da atividade desta enzima são geralmente observados em lesões hepáticas reversíveis ou irreversíveis, por citotoxicidade do hepatócito ou por alterações na permeabilidade (Wills & Asha, 2006). E muitas vezes estes achados são acompanhados de alterações nos valores séricos de AST.

Neste estudo, apenas animais tratados com 10 mg no tempo de 8 dias (Tabela 5) apresentaram aumento significativo da atividade enzimática de AST quando comparado aos peixes do mesmo grupo amostrados 4 dias após o início do tratamento, porém ambos os valores são estatisticamente semelhantes aos valores de atividade enzimática sérica apresentado pelos animais do grupo basal. Segundo El-Sayed et al., (2007) a atividades das enzimas no soro ALT e AST são também usados como um indicador de estresse significativo. O aumento da ALT e AST sérica pode servir como biomarcador convencional de hepatotoxicidade e lesão de fígado, brânquias e rins (Venkateswara Rao, 2006).

As variações nos valores observados na bioquímica sérica, Tabelas 4 e 5 sugerem alterações na funcionalidade e citotoxicidade hepática. Tais resultados apresentam forte correlação com o estudo histopatológico do fígado destes animais (Figura 3).

No estudo histopatológico dos tecidos hepáticos, verificou-se hipertrofia dos hepatócitos e desarranjos da arquitetura dos cordões hepáticos 2 dias após o início do tratamento. Estas lesões evoluíram para necrose dos hepatócitos em 8 e 12 dias. Com o aumento da dose, as alterações ocorridas nos órgãos foram mais severas, assim como no passar do tempo para cada tratamento, na maior parte das lâminas avaliadas os principais danos foram notados no tempo de 8 dias.

A Figura 2 ilustra as variações médias observadas na análise da creatinina sérica de tilápias tratadas com fosfomicina. O estudo comparativo dos valores de creatinina de animais tratados com fosfomicina revelou níveis séricos superiores aos observados nos peixes do grupo basal, demonstrando alteração da capacidade renal de eliminação da mesma. Na patologia clínica, o aumento sérico da creatinina pode estar relacionado a alterações e lesões renais, associadas à perda da capacidade de filtração glomerular (Pirarat et al., 2012).

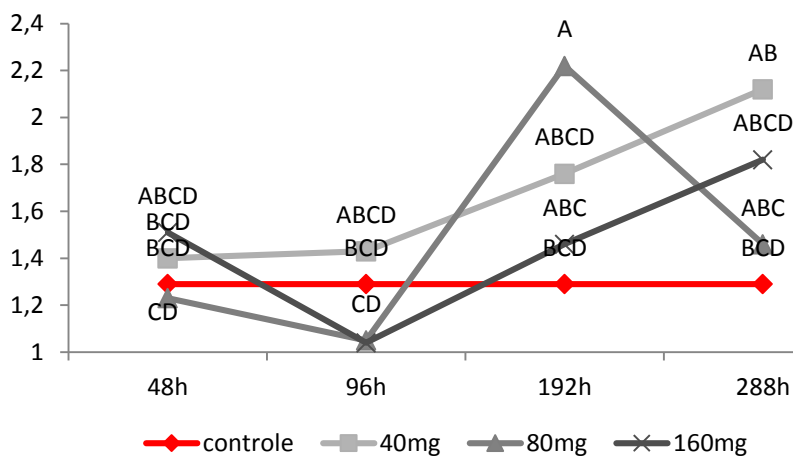


Fig 2. Valores médios e ANOVA observados na análise sérica de creatinina das tilápias tratadas com fosfomicina. Médias seguidas por letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

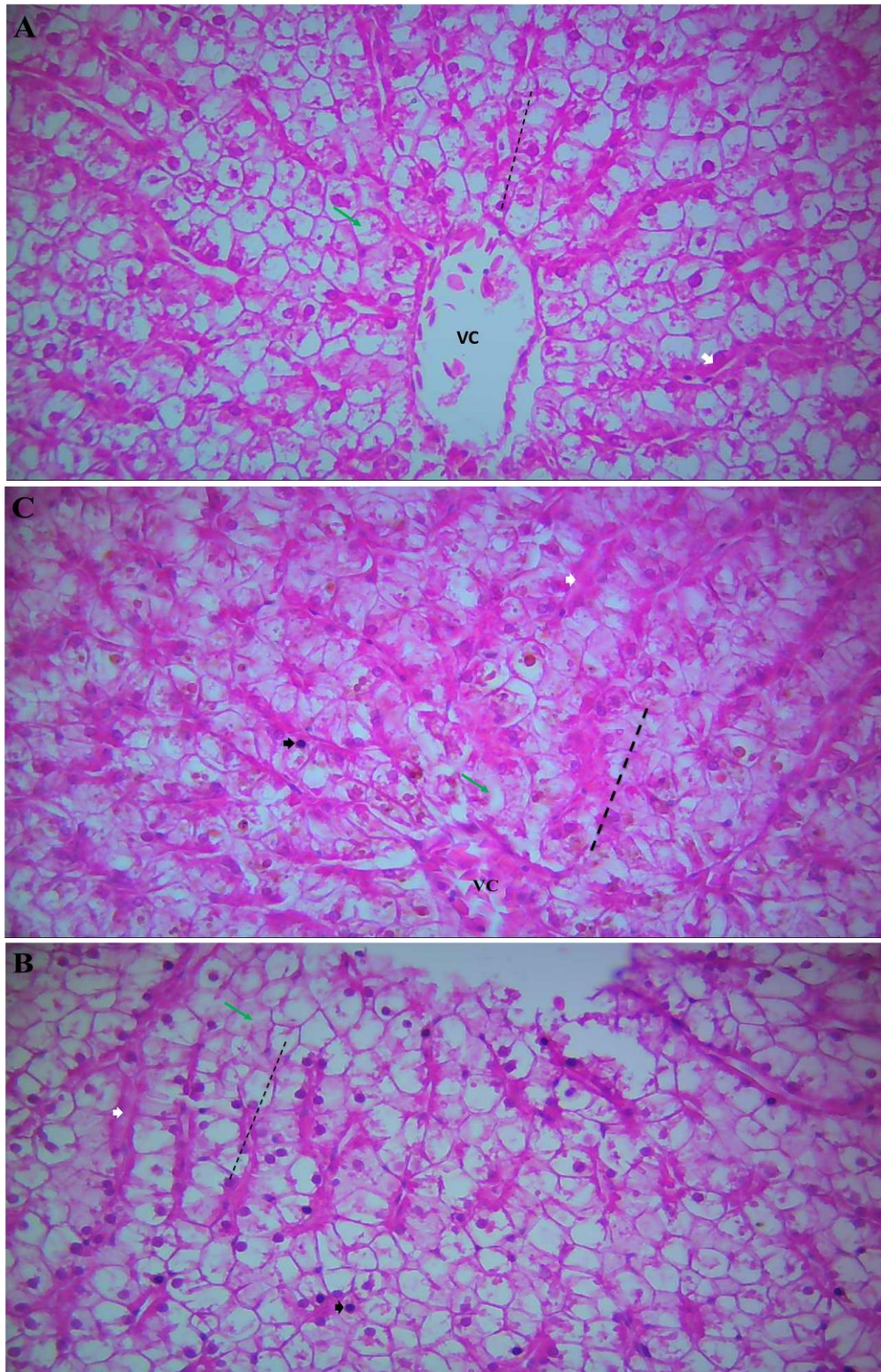


Fig 3. Fotomicrografia de corte histológico de fígado de tilápias, *O. niloticus*, submetidas a diferentes concentrações de fosfomicina. A. Tratamento T1, 2dias, B.Tratamento T2, 4dias e C. Tratamento T3, 8dias. Linha tracejada: perda da arquitetura dos cordões hepáticos, seta preta: núcleo picnótico,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

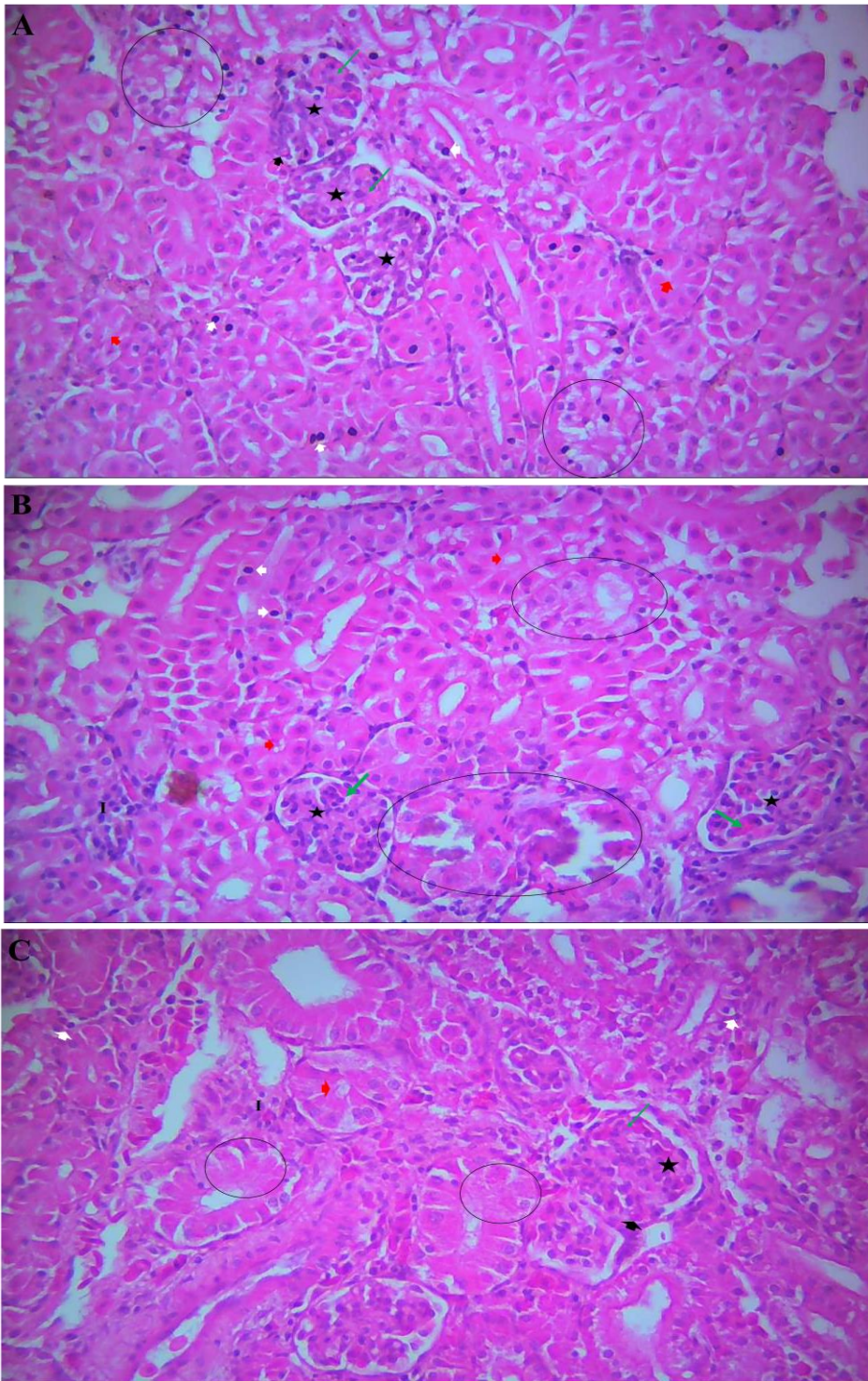


Fig 4. Fotomicrografia em 40x de corte histológico de rim de tilápias, *O. niloticus*, submetidas a diferentes concentrações de fosfomicina. **A.** Tratamento T1, 2dias, **B.** Tratamento T2, 4dias e **C.** Tratamento T3, 8dias. **A.** Glomerulosclerose difusa. Aderência do tufo glomerular ao folheto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

Nas análises histopatológicas dos rins dos peixes (Figura 4), foram observadas lesões de glomerulosclerose difusa com aparecimento de núcleos picnóticos em 2 dias, chegando à necrose com presença de infiltrado inflamatório 8 e 12 dias, corroborando os achados deletérios observados no aumento dos níveis séricos de creatinina.

Os rins dos peixes desempenham um papel importante na manutenção osmótica e na homeostase do organismo. Além disso, os tecidos renais recebem grandes volumes de sangue servindo como uma importante via de excreção de metabolitos de vários xenobióticos. Uma vez que os tecidos renais são potencialmente e continuamente expostos a produtos químicos tóxicos, o risco de efeitos deletérios é alta (Myers et al., 1993).

Outra análise importante que auxilia a interpretação destes achados refere-se ao estudo somático renal e hepático. Alterações congestivas ou inflamatórias pela presença de edema podem resultar em aumento dos valores somáticos (Belo et al., 2012). Os valores observados no estudo dos índices nefrossomático (INS), índice nefrossomático cranial (INSC), índice hepatossomático (IHS) e índice esplenossomático (IES) das tilápias tratadas com fosfomicina não diferiram significativamente ($p>0,05$) quando comparados aos observados nos animais do grupo basal (Tabela 6).

Tabela 6. Valores médios observados na análise somática renal cranial e caudal (INS), hepática (IHS) e esplênica (IES) de tilápias tratadas com diferentes concentrações de fosfomicina.

		ÍNDICES SOMÁTICOS			
	TTO ²	IHS	IES	INS	INSC
T0	BASAL	2,66 ^A	0,064 ^A	0,19 ^{ABC}	0,27 ^A
T1	10mg 2dias	2,57 ^A	0,069 ^A	0,22 ^A	0,25 ^A
	10mg 4dias	2,50 ^A	0,053 ^A	0,19 ^{ABC}	0,24 ^{AB}
	10mg 8dias	2,76 ^A	0,059 ^A	0,13 ^{BC}	0,20 ^{AB}
	10mg 12dias	2,53 ^A	0,051 ^A	0,14 ^{ABC}	0,22 ^{AB}
T2	20mg 2dias	2,75 ^A	0,058 ^A	0,20 ^{ABC}	0,23 ^{AB}
	20mg 4dias	2,76 ^A	0,054 ^A	0,19 ^{ABC}	0,24 ^{AB}
	20mg 8dias	2,88 ^A	0,054 ^A	0,12 ^C	0,18 ^B
	20mg 12dias	2,62 ^A	0,047 ^A	0,21 ^{AB}	0,24 ^{AB}
T3	40mg 2dias	2,64 ^A	0,058 ^A	0,19 ^{ABC}	0,20 ^{AB}
	40mg 4dias	2,56 ^A	0,043 ^A	0,19 ^{ABC}	0,23 ^{AB}
	40mg 8dias	2,53 ^A	0,049 ^A	0,14 ^{ABC}	0,20 ^{AB}
	40mg 12dias	2,34 ^A	0,039 ^A	0,18 ^{ABC}	0,24 ^{AB}
DOSE		0,42 ^{ns}	2,10 ^{ns}	0,29 ^{ns}	0,50 [*]
TEMPO		2,13 ^{ns}	2,47 ^{ns}	9,95 ^{**}	5,91 ^{**}
DOSE*TEMPO		4,12 ^{**}	0,15 ^{ns}	1,31 ^{ns}	1,28 ^{ns}
Coef. Variação		17,47	43,49	32,69	20,56

Os estudos dos INS (índice nefrossomático) e INSC revelaram aumento na fase inicial com 2 dias, seguido de diminuição gradativa até a coleta de 8 dias, sendo notado o aumento nestes índices em todas as doses no tempo de 12 dias, retornando aos níveis observados no basal (Tabela 6).

O IHS (índice hepatossomático) demonstrou interação entre a dose e o tempo, assim sendo, na dose de 10mg não se nota nenhuma alteração expressiva, já na dose de 80 mg ocorreu diminuição no índice no tempo de 8 dias retornando ao valor observado no basal em 12 dias. Na dose de 40mg nota-se diminuição constante ao longo do tempo, não demonstrando nenhuma tendência de retorno aos níveis observados no basal mesmo após o encerramento da administração da fosfomicina.

Singh e Reddy (1990) relataram comportamento similar ao do presente estudo para o IHS com o valor do índice aumentado após a exposição ao xenobiótico, seguido de uma ligeira depleção que persistiu nos períodos posteriores de exposição, eles chegaram à conclusão de que os valores observados podem ser devido a um mau funcionamento do fígado. Tóxicos podem influenciar o número de linfócitos, viabilidade e índices de órgãos imunocompetentes em peixes (Arunkumar et al., 2000 e Fátima et al., 2001). As alterações no INSC foram observadas por Fournier (2000) em peixes, indicando uma situação crônica de estresse e correlacionando a isso distúrbios no sistema imunológico dos peixes devido aos efeitos tóxicos de xenobióticos.

No estudo histopatológicos do baço (Figura 5), a principal alteração notada tanto com o aumento da dose, quanto com o passar do tempo, foram o aumento dos centros de melanomacrófagos e melanomacrófagos livres.

Os Centros de melanomacrófagos são agrupamentos de células que contêm pigmentos, encontradas na matriz dos tecidos hematopoiéticos. Os macrófagos formam grandes agregados e são maiores após a atividade fagocítica de partículas celulares, pigmentos de melanina, grânulos de hemossiderina e resíduos de lipofuscina (Agius, 1985)

Leknes et al., (2007) sugeriu que os macrófagos do rim e baço de platis (*Xiphophorus maculatus*), podem ter papel importante na limpeza de macromoléculas e de partículas exógenas presentes na circulação. Foi evidenciado que os centros de melanomacrófagos (CMMs) possuem diferentes tipos de pigmentos, sendo melanina, lipofuscina, e hemossiderina as mais comuns (Agius e Roberts, 2003).

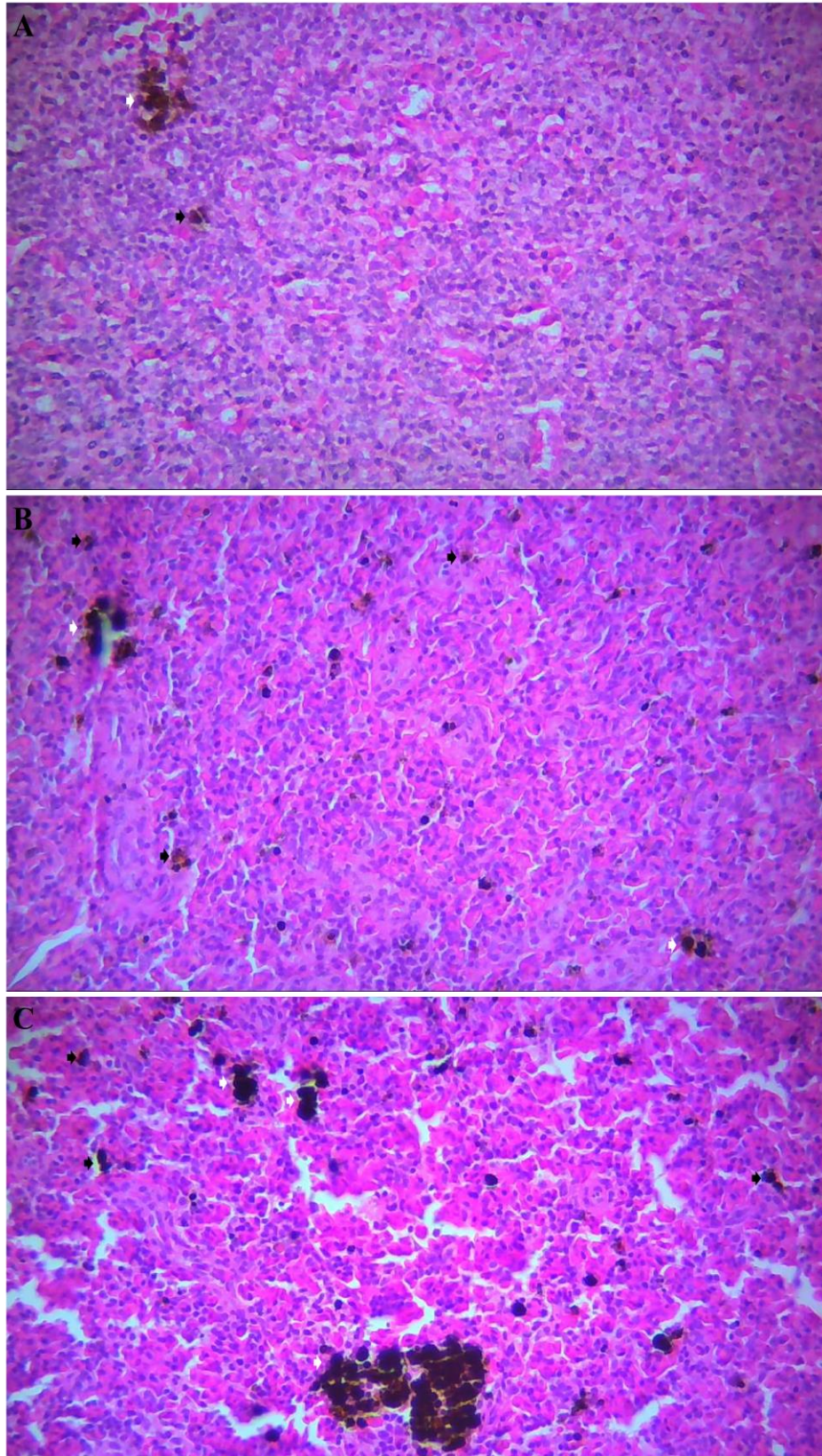


Fig 5. Fotomicrografia de corte histológico de baço de tilápias, *O. niloticus*, submetidas a diferentes concentrações de fosfomicina. A. Tratamento T1, 2dias, B. Tratamento T2, 4dias e C. Tratamento T3, 8dias. Centro de melanomacrófagos (seta branca), melanomacrófago livre (seta preta).

O pH, a temperatura, o OD, e a condutividade apresentaram variações ao longo do estudo, conforme pode ser observado na Figura 6. A condutividade demonstrou diminuição nas aferições do período da tarde ao longo do experimento. Ao contrário o pH e o O.D. sofreram aumentos.

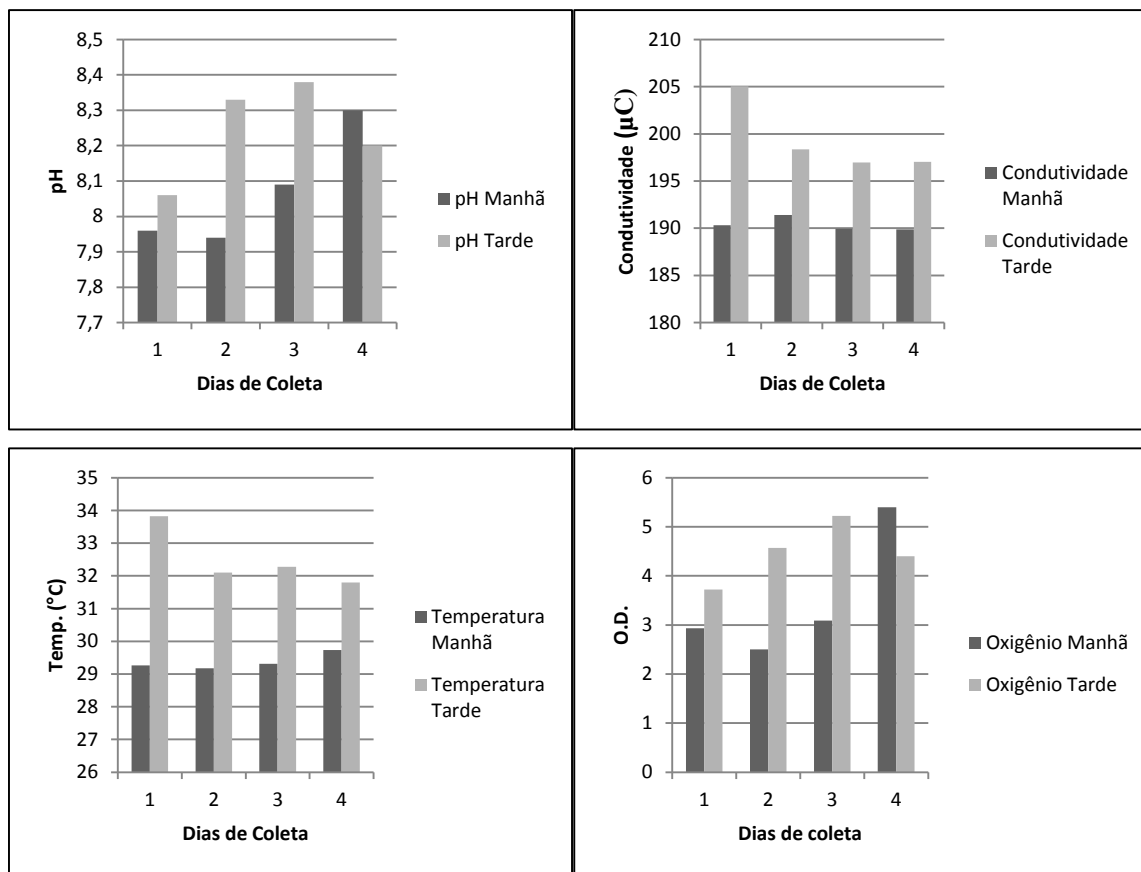


Fig 6. Valores médios observados no estudo de qualidade de água de tilápias tratadas com fosfomicina.

5. CONCLUSÃO

Apesar de não causar mortalidade a formulação Fosfomicin C® nas doses testadas causou alterações nos parâmetros fisiológicos dos peixes. Portanto, serão necessários novos estudos para avaliar o efeito da fosfomicina pura no organismo dos peixes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agius, C., Roberts, R.J. 2003. Melano-Macrophage Centers and Their Role in Fish Pathology. J of Fish Dis, 26: 499-509.

Agius, C. 1985. The Melano-Macrophage Centres In Fish: A Review. In: Manning, M. J.; Tatner, M. F. (Ed.). Fish Immunology. London: Academic Press, 85-105.

Arunkumar, R.I., Rajasekaran, P., Michael, R.D. 2000. Differential effect of chromium compounds on the immune response of the african mouth breeder *Oreochromis mossambicus* (Peters). Fish Shellfish Immunol. 10: 667-676.

Baylan, O. 2010. Fosfomicin: Past, Present And Future. Mikrobiyol Bul, 44: 311-321.

- Belo, M.A.A., Soares, V.E., Souza, L.M., Sobreira, M.F.R., Cassol, D.M.S., Toma, S.B. 2012. Hepatoprotective treatment attenuates oxidative damages induced by carbon tetrachloride in rats. *Exp Toxicol Pathol*, 64: 155-165.
- Belo, M. A. A., Souza, D. G. F., Faria, V.P., Prado, E. J. R., Moraes, F. R., Onaka, E. M. 2013. Haematological response of curimbas *prochilodus lineatus*, naturally infected with *Neoechinorhynchus curemai*. *J Fish Biol*, 82: 1403-1410.
- Bergogne-Berezin E., Muller-Serieys C., Joly-Guillou M.L., Dronne N. 1987. Trometamol-Fosfomicin (Monuril). bioavailability and food-drug interactions. *Eur Urol*; 13 (Suppl): 64–68.
- Brown, E.D., Vivas, E.I., Walsh, C.T., Kolter, R. Mura (Murz), 1995. The enzyme that catalyzes the first committed step in peptidoglycan biosynthesis, is essential in *Escherichia coli*". *J Of Bacteriol*. 177(14): 4194–4197.
- Carneiro, P.C.F., Urbinati, E.C. 2001. Salt as stress response mitigator of matrinxã *Brycon cephalus* during transport. *Aquac Res*, 32: 297-304.
- Conroy, G., Conroy, D.A. 2004. Patología de Tilápias: Una Reseña General. In M.J.T. Ranzani-Paiva; R.M. Takemoto; M.A.P. Lizama, Editores. San De Org Aquat, Livraria Varela, São Paulo, Brasil, Sp. 221-253.
- El-Sayed Y.S., Saad T.T., El-Bahr S.M. 2007. Acute intoxication of deltamethrin in monosex Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* with special reference to the clinical, biochemical and haematological effects, *Envir Toxicol Pharmacol*, 24: 212–217.
- FAO (Food And Agriculture Organization). El Estado Mundial De La Pesca Y La Acuicultura 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Roma.
- Fatima M.I., Ahmad I., Siddiqu R. I, Raisuddin S. 2001. Paper and pulp mill effluent-induced immunotoxicity in freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch), *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 40: 271–276.
- FDA – Food and Drug Administration. Animal and Veterinary: Approved Drugs 2012. [Http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/DevelopmentApprovalProcess/Aquaculture/Ucm132954.htm](http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/DevelopmentApprovalProcess/Aquaculture/Ucm132954.htm)
- Fitzsimmons, K. 2000. *Tilapia: "The most important aquaculture species in the 21st century"*. In K. Fitzsimmons And J. Carvalho, Editors. *Tilapia Aquaculture In The 21 St Century: Proceedings From The 5th International Symposium On Tilapia Aquaculture*. American Tilapia association society, Rio De Janeiro, Brasil.
- Fournier M., Cyr D., Blakley B., Boermans H., Rousseau P. 2000. Phagocytosis as a biomarker of immunotoxicity in wildlife species exposed to environmental xenobiotics, *Am. Zool.*, 40: 412–420.
- Glaxo Wellcome Inc. Zinacef (Cefuroxime) Package Insert. Research Triangle Park, Nc; 1999.
- Grif, K., Dierich, M.P., Pfaller, K., Miglioli, P.A., Allerberger, F. 2001. "In vitro activity of fosfomicin in combination with various antistaphylococcal substances". *J Ant Chem*, 48(2): 209–17.
- Gutierrez, L., Ocampo, L., Rosario, C., Sumano, H. 2010. Pharmacokinetics of disodium fosfomicin in broilers and dose strategies to comply with its pharmacodynamics versus *Escherichia coli*. *Poultry Science*, 89(10): 2106-2115.
- Hempel, E. 2002. Tilapia, the new whitefish. *seafood international*, Agra Europe, London, 17(10):16-20.

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

Kashanian, J., Hakimian, P., Blute, M. Jr. Et Al. Nitrofurantoin: The return of an old friend in the wake of growing resistance. *Bju Int* 2008(102): 1634–1637.

Klaassen, C. D. 2006. Princípios de toxicologia e tratamento do envenenamento. in: Brunton, L.L., Lazo, J. S., Parker, K. L. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 11ª Ed., Mc.Grall Hill, Rio De Janeiro, 1573-1584.

Kuter D. J., Phil M.D., Tillotson G. S., 2001. Hematologic effects of antimicrobials: focus on the oxazolidinone linezolid. *Pharmacotherapy*, 21(8):1010–1013.

Leknes, I. L. 2007. Melano-macrophage centres and endocytic cells in kidney and spleen of pearl gouramy and platy fish (Anabantidae, Poeciliidae: Teleostei). *Acta Histochemica*, Munich, 109(2): 164-168.

Mommsen, T.P., Vijaiian, M.M., Moon, T.W. 1999. Cortisol in teleost: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews In Fish Biology And Fisheries*, 9: 211-268.

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

Myers, M. S., Stehr C.M., Olson O. P., Johnson L. L., Mccain B. B., Chan S. L. and Varanasi U. 1993. National benthic surveillance project: pacific coast-fish histopathology and relationships between toxicopathic lesions and exposure to chemical contaminants for cycles i to v (1984-88). *National Techn Inform Serv*, U.S. 1-47.

Natt, M. P., Herrick, C. A. A 1952.new blood diluents for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. *Poultry Science*, 31: 735-738.

Nayak, A. K., Dasb, B. K., Kohlia, M. P. S., Mukherje, S.C. 2004. The immunosuppressive effect of α -permethrin on indian major carp, Rohu (*Labeo rohita*) *Fish Shellfish Immunol.*, 16: 41–50.

Neu, H. C. 1992. Side effects of antimicrobial therapy. In: Gorbach Sl, Bartlett Jg, Blackwell Nr, Eds. *Infectious Disease*. Philadelphia: Wb Saunders, 340–348.

Oba, E. T. Mariano, W. S., Santos, L. R. B. 2009. Estresse em peixes cultivados: Agravantes e atenuantes para o manejo rentável. *Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo*, , Embrapa Amapá, Macapá Capítulo 8.

OIE – World Organization For Animal Health. OIE list of antimicrobials of veterinary importance (2007). [Http://Web.OIE.Int/Downld/Antimicrobials/OIE_List_Antimicrobials.Pdf](http://Web.OIE.Int/Downld/Antimicrobials/OIE_List_Antimicrobials.Pdf).

Patel, S. S., Balfour, J. A., Bryson, H. M. "Fosfomicin Tromethamine: 1997. "A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy as a single-dose oral treatment for acute uncomplicated lower urinary tract infections". *Drugs*, 53(4): 637–656.

Pirarat, N., Katagiri, T., Chansue N., Ponpornpisit, A., Endo, M., Maita, M. 2012. The pathological effects of melamine and cyanuric acid in the diet of walking catfish (*Clarius Batrachus*) *J Comparat Pathol* 147: 259–266.

Raz R., 2012. Fosfomicin: An old—new antibiotic infectious diseases unit, Ha'emek Medical Centre, Afula, Israel, *Clin Microbiol Infect* 18: 4–7.

Shelton, W.L. 2002. Tilapia culture in the 21st century. In R.D. Guerrero Iii, Editor. *Proccedings Of The International Forum On Tilapia Farming In The 21st Century*, Los Baños, Laguna, Philippines 1-28.

- Singh, M., Reddy, T.V. 1990. Effect of copper sulfate on hematology, blood chemistry, and hepato-somatic index of an indian catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch), and its recovery. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, Orlando, 20: 30-35.
- Snedecor, G.W., Cochran, G. 1980. *Statistical Methods*. Iowa State University Press. Ames.
- Soraci, A.L., Perez, D.S., Martinez, G., Dieguez, S., Tapia, M.O., Amanto, F., Harkes, R., Romano, O. 2011. Disodium-fosfomycin pharmacokinetics and bioavailability in post weaning piglets. *Research In Vet Sci*, 90(3): 498-502.
- Venkateswara, Rao. J. 2006. Biochemical alterations in euryhaline fish, *Oreochromis Mossambicus* Exposed to sub-lethal concentrations of an organophosphorus insecticide, monocrotophos, *Chemosphere*, 65: 1814-1820.
- Wedemeyer, G. 1970. Stress of anesthesia with ms-222 and benzocaine in rainbow trout (*Salmo Gairdneri*). *J. Fisher. Res. Board Can.* V.22, N.5,
- Williams, G.J, Wei L, L.E.E A., Craig, J.C. 2006. Long-term antibiotics for preventing recurrent urinary tract infection in children. *Cochrane Database Syst Rev*; 3: CD001534.
- Wills, P.J., Asha, V.V. 2006. preventive and curative effect of *Lygodium flexuosum* (L.) sw. on carbon tetrachloride induced hepatic fibrosis in rats *J. Ethnopharmacol*, 107: 7-11.
- Yousefian, M., Amiri, M.S. 2009. A Review Of The Use Of Prebiotic In Aquaculture For Fish And Shrimp. *African J Of Biotechnol.* 8(25): 7313-7318.
- Zimmermann, S., Fitzsimmons, K. *Tilapicultura Intensive.*, In J.E.P.Cyrino; E.C. Urbinati; D.M. Fracalossi; N. Castagnolli, 2004. Editores. *Tóp Espec Em Piscic De Água Doce Tropic Intens*, Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, Jaboticabal , Brasil, SP, 239-266.

CAPÍTULO 4 - Avaliação da eficácia terapêutica do antimicrobiano fosfomicina, para o tratamento de *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae* em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

¹Roberto Barbuio, ¹Vanessa Pavesi de Faria, ²Marco Antonio de Andrade Belo, ³Claudinei da Cruz

ABSTRACT - Barbuio R., Faria V.P., Belo M.A.A. & Cruz C., 2016. Estudo da segurança clínica da fosfomicina para tilápia (*Oreochromis niloticus*). Universidade Estadual Paulista, Rodovia Paulo Donato Castellane s/n, Jaboticabal, SP 14884-900, Brasil. E-mail: betobarbuio@gmail.com

The objective of this study was to evaluate the therapeutic efficacy of the antimicrobial fosfomycin, administered orally incorporated in the diet, for the treatment of aeromonose and streptococcosis in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). For this, two experimental trials with the therapeutic dose of 10 mg fosfomycin / kg were conducted on experimentally challenged fish with live inoculations of *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus agalactiae* and treated via feed for seven days, with material collections being carried out in 2, 4, 8 and 12 days, thus obtaining two collections during administration and two after administration of the drug. Ten healthy tilapia collected on day 2 of each study were used as baseline. In the studies, 200 tilapia (\pm 200g) were used, packed in 400 L tanks (n = 10 / tank). Both studies of therapeutic efficacy of aeromonose and streptococcus demonstrated the effectiveness of this antimicrobial administered through the ration, since in the analyzes of reisolamento of these microorganisms after the experimental infections did not occur growth of them in liver, kidney, spleen and brain samples of the fish treated with This drug when compared to infected and untreated groups in which the number of colony forming units (CFU) were greater than 10 per plaque. Tilapia with *A. hydrophila* infection showed microcytosis and lymphopenia, as well as thrombocytosis in the initial phase of infection followed by thrombocytopenia. Liver and renal tissue damage corroborated the changes in serum enzyme activity of ALT, AST, FA and creatinine, cholesterol and triglyceride levels. Tilapia with *S. agalactiae* infection showed a decrease in the number of erythrocytes and percentage values of hematocrit characterizing hemolysis, associated with lymphopenia, thrombocytopenia and neutrophilia in the initial phase of infection. There was no correlation between liver and kidney tissue damage to serum ALT, AST, AF, and creatinine levels. There was an increase in cholesterol and triglycerides, but in both studies the pathological alterations were attenuated in fish treated with fosfomycin. However, the results of these studies demonstrate the feasibility of using fosfomycin at a dose of 10 mg / kg for the control of streptococcosis and aeromonose in tilapicultura.

INDEX TERMS: tilapicultura, antimicrobiano, aeromonose, streptococose

RESUMO

Objetivou-se com o presente estudo avaliar a eficácia terapêutica do antimicrobiano fosfomicina, administrado via oral incorporado na ração, para o tratamento de aeromonose e streptococose em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Para tal, foram delineados dois ensaios experimentais com a dose terapêutica de 10 mg de fosfomicina/kg, foram conduzidos em peixes desafiados experimentalmente com inóculos vivos de *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae* e tratados via ração durante sete dias, sendo as coletas de material realizadas em 2, 4, 8 e 12 dias, obtendo-se assim duas coletas durante a administração e duas após encerrada a administração do fármaco. Como padrão basal foram utilizadas 10 tilápias sadias coletadas no dia 2 de cada estudo. Nos estudos foram utilizadas 200 tilápias ($\pm 200g$), acondicionadas em tanques de 400 L ($n=10/\text{tanque}$). Ambos os estudos de eficácia terapêutica para aeromonose e streptococose demonstraram a eficácia deste antimicrobiano administrado através da ração, pois nas análises de reisolamento destes microrganismos após as infecções experimentais não ocorreram crescimento dos mesmos em amostras de fígado, rim, baço e cérebro dos peixes tratados quando comparados aos grupos infectados e não tratados nos quais o número de unidades formadoras de colônias (UFC) foi de $7,6 \pm 2,4$ por placa. Tilápias com infecção por *A. hydrophila* apresentaram microcitose e linfopenia, assim como, trombocitose na fase inicial da infecção seguida de trombocitopenia. Lesões nos tecidos hepáticos e renais corroboraram as alterações da atividade enzimática sérica de ALT, AST, FA e nos níveis de creatinina, colesterol e triglicerídeos. Tilápias com infecção por *S. agalactiae* apresentaram diminuição do número de eritrócitos e dos valores percentuais de hematócrito caracterizando quadro de hemólise, associado à linfopenia, trombocitopenia e neutrofilia na fase inicial da infecção. Não se verificou correlação entre as lesões nos tecidos hepáticos e renais aos valores séricos de ALT, AST, FA e nos níveis de creatinina. Houve aumento de colesterol e triglicerídeos, porém em ambos os estudos as alterações patológicas foram atenuadas em peixes tratados com fosfomicina. Contudo, os resultados destes estudos demonstram a viabilidade do uso da fosfomicina na dose 10 mg/kg para controle da estreptococose e aeromonose na tilapicultura.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: tilapicultura, antimicrobiano, aeromonose, estreptococose.

¹Departamento de Patologia Veterinária, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Rodovia de Acesso Paulo Donato Castellane s/n, Zona Rural, Jaboticabal, SP 14884-012.

²Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Rodovia de Acesso Paulo Donato Castellane s/n, Zona Rural, Jaboticabal, SP 14884-012.

³Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais em Matologia (Nepeam) da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Rodovia de Acesso Paulo Donato Castellane s/n, Zona Rural, Jaboticabal, SP 14884-012.

1. INTRODUÇÃO

A aquicultura tem cada vez mais adquirido importância no mercado mundial e em 2014 um marco foi alcançado quando a contribuição da aquicultura para o fornecimento de peixe para consumo humano ultrapassou pela primeira vez os peixes capturados na natureza (FAO, 2016).

Dada a produção estável de pesca de captura, desde o final dos anos 1980, a aquicultura tem sido o gatilho para o impressionante crescimento da oferta de peixe para consumo humano. Enquanto a aquicultura fornecia apenas 7% dos peixes para consumo humano, em 1974, esse percentual aumentou para 26% em 1994 e 39% em 2004 (FAO, 2016).

O consumo de peixe per capita no mundo registrou um aumento de uma média de 9,9 kg em 1960 para 19,7 kg em 2013, com estimativas preliminares apontando para aumentar para mais de 20 kg, em 2014 e 2015 (FAO, 2016).

Em 2014, a produção aquícola totalizou 73,8 milhões de toneladas, com um valor estimado de 160.200 milhões de dólares. Deste total, 49,8 milhões de toneladas foram de peixes ósseos (FAO, 2016).

O potencial do Brasil para o desenvolvimento da aquicultura é imenso, constituído por 8.400 Km de costa marítima, 5.500.000 hectares de reservatórios de águas doces, aproximadamente 12% da água doce disponível no planeta, além de clima extremamente favorável, mão-de-obra abundante e crescente demanda por pescado no mercado interno (MPA, 2010). Neste contexto, o cultivo mundial de algumas espécies de peixes vem crescendo significativamente nos últimos anos. Dentre estas, destacam-se as tilápias, pois apresentam elevada precocidade e rusticidade, além também da sua carne ser altamente apreciada pelo consumidor (MPA, 2010).

A biomaniplulação dos ecossistemas aquáticos com a maximização dos recursos produtivos traz consigo inúmeros desafios, dentre os quais se destaca o basal sanitário das populações de peixes. Em geral, o aumento de espécimes por área, somado às práticas de manejo, resulta na ocorrência do estresse, condição fisiológica responsável por imunossuprimir os sistemas de defesa dos peixes, predispondo-os a mais diversas enfermidades (Hirsch et al, 2006). Neste preceito, agentes etiológicos que causam aparentemente poucos danos às populações de peixes em seu habitat natural, podem tornar-se agentes precursores de doenças de grande importância econômica quando submetidos às condições de criação (Yousefian & Amiri, 2009).

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

De acordo com a Resolução XXVIII da 75ª sessão geral da comissão internacional da OIE (Organização Mundial de Sanidade Animal) que define a lista de antimicrobianos de importância na Medicina Veterinária, a fosfomicina pode ser empregada no basal bacteriano de aves, suínos e bovinos, apresentando grande potencial para o uso em peixes, no entanto, necessitando do delineamento de protocolos terapêuticos eficazes para seu uso em organismos aquáticos (OIE, 2007). A fosfomicina é um antimicrobiano que vem sendo empregado com sucesso na avicultura e suinocultura, administrado na água ou na ração dos animais, apresentando amplo espectro de ação antimicrobiana (Gutierrez et al., 2010). No entanto, outro fator extremamente relevante, quando se estuda a administração exógena de compostos farmacológicos, relaciona-se a inocuidade dos mesmos.

Partindo-se da importância patogênica da aeromonose e estreptococose para a tilapicultura, associado à necessidade de desenvolvimento de programas sanitários eficazes para controlar estas enfermidades em plantéis aquícolas, o presente estudo tem por objetivos avaliar a eficácia terapêutica, do antimicrobiano fosfomicina, para o tratamento de *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae* em tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Fosfomicina - A fosfomicina é um antimicrobiano de largo espectro, tendo sido isolado pela primeira vez por triagem de culturas em caldo de *Streptomyces fradiae* provenientes de amostras de solo (Grif et al., 2001). A fosfomicina é bactericida e inibe a biogênese da parede celular bacteriana por inativar

a enzima UDP-N-acetilglucosamina-3-enolpiruviltransferase, também conhecida como mura (Brown et al., 1995).

Esta enzima catalisa importante passo na biossíntese de peptidoglicano, mediando a ligação de fosfoenolpiruvato (PEP) para o grupo 3'-hidroxila de UDP-N-acetilglucosamina. Esta porção de piruvato fornece o ligante que uni a porção glicano ao peptídeo na molécula do peptidoglicano. Portanto, a fosfomicina é um análogo que inibe a PEP Mura por alquilação de um resíduo de cisteína do centro ativo e este fármaco entra na célula bacteriana por meio do transportador de glicerofosfato (Brown et al., 1995).

A fosfomicina é utilizada para o tratamento de infecções bacterianas resistentes a múltiplas drogas e isso tem chamado a atenção para este medicamento (Baylan, 2010). É razoavelmente solúvel em água (Bergogne-Berezin, 1987), fortemente polar e estável em condições de armazenamento (Raz, 2012).

A fosfomicina é principalmente excretada na urina por filtração glomerular e seu pico na urina ocorre dentro de 4 horas após a administração. Esta droga tem boa penetração nos rins, parede da bexiga, próstata, vesículas seminais e no líquido cefalorraquidiano (Kashanian et al., 2008; Williams et al., 2006).

Este antimicrobiano possui atividade antibacteriana ampla contra agentes patogênicos Gram-positivos e Gram-negativos, sendo indicado para o tratamento de *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* sp. em aves de postura e de corte (Gutierrez et al., 2010) e em suínos (Soraci et al., 2011). Em outros mamíferos inclusive nos seres humanos, é indicada também para o tratamento de infecções por *Citrobacter*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Enterococcus* spp. (Patel et al., 1997).

2.2. Tilapicultura intensiva no Brasil - O crescente aumento na comercialização mundial das tilápias, espécies de teleósteos do gênero *Oreochromis*, especialmente pelo aumento da produção na China e outros países em desenvolvimento, como o Brasil (Hempel, 2002), transformou este grupo de peixes no segundo mais importante para a aquicultura e o terceiro mais importado pelos EUA e Europa, depois somente dos camarões marinhos e salmões (Conroy e Conroy, 2004). Tal fato é resultante do potencial fisiológico reprodutivo e de adaptação destes animais, que apresentam elevada rusticidade, fácil domesticação e excelente valor agregado para a comercialização, gerando perspectivas de se tornarem o mais importante grupo de espécies aquícolas do século XXI (Fitzsimmons, 2000; Shelton, 2002).

De acordo com as estatísticas do Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA), a produção de tilápias representou cerca de 38% da produção de pescado continental no Brasil no ano de 2010, sendo este ciclídeo o grupo de peixes mais criado. Neste contexto, destaca-se a espécie *Oreochromis niloticus*, comumente chamada de "tilápia do Nilo", de origem africana, oriunda da bacia do Rio Nilo, pertencente à família Cichlidae.

Para Zimmermann e Fitzsimmons (2004), no Brasil, a tilapicultura segue a mesma tendência mundial, com predomínio de tilápias nilóticas ao invés de tilápias vermelhas, pois estas apresentam crescimento mais rápido e um rendimento de filé superior quando comparadas às demais espécies de tilápias.

Da mesma forma, as disputas por novos mercados, a concorrência com outros países neste início das exportações, a necessidade de se desenvolver um mercado interno mais forte, bem como as novas oportunidades de uma aquicultura intensiva, deverão considerar os aspectos sanitários na produção das tilápias, através de manejos eficientes do sistema aquático que visem melhorar não somente a produtividade, mas também proteger o consumidor e o meio ambiente (Zimmermann & Fitzsimmons, 2004).

2.3. *Aeromonas hydrophila* - A *Aeromonas hydrophila* é um bacilo gram-negativo aeróbico que possui flagelo móvel, apresentando crescimento em meios simples e as colônias crescem de um a três milímetros de diâmetro a 25°C, durante 48 horas, sendo arredondadas brilhantes e de coloração creme (Alexandrino et al., 2000).

Consideradas oportunistas, se manifestam em hospedeiros debilitados ou infectados por outros patógenos (Dooley & Trust, 1988; Merino et al., 1995). Neste caso, o estresse, principalmente provocado por condições ambientais e fisiológicas adversas, é considerado um fator predisponente ao aparecimento da doença causada por esta bactéria (Merino et al., 1995).

Fatores de risco predisponentes incluem alterações bruscas de temperatura, elevadas densidades de estocagem, poluição orgânica, hipóxia, entre outros. As aeromonas móveis geralmente invadem feridas na pele e estão comumente associadas com infecções por fungos ou ectoparasitos (Noga, 1986). Fatores produzidos pela bactéria, que podem facilitar o contágio, são importantes elementos de virulência

bacteriana. Dentre estes destacam-se as fimbrias, que facilitam a adesão às células do hospedeiro (Cipriano, 2001).

Os sinais clínicos característicos da aeromonose são a septicemia hemorrágica, petéquias distribuídas por toda a superfície corporal do animal, anemia, corrosão de nadadeira, ulcerações oculares, eritrodermatite, escamas protusas, exoftalmia e distensão abdominal por ascite (Austin & Austin, 1999; Kirov et al., 2002).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, *A. hydrophila* é considerada uma doença de veiculação hídrica para os seres humanos, apresentando grande importância para a saúde pública (Merino et al., 1995). Em seres humanos, esta bactéria pode causar febre, dor abdominal, vômito, diarreias, meningite, endocardite, septicemia, inflamação do tecido conjuntivo e síndrome urêmica, além de infecções respiratórias e intestinais, especialmente em indivíduos imunossuprimidos (Janda & Abbott, 1998).

2.4. *Streptococcus agalactiae* - O *Streptococcus agalactiae* é classificado como do grupo B Lancefield apresentando células esféricas ou cubóides. Esta bactéria é Gram-positiva, catalase negativa e unem-se em forma de pares ou cadeias. É imóvel, não esporulada e anaeróbia facultativa. Obtém energia por meio da fermentação de carboidratos como a glicose (Hardie & Whiley, 1997).

Seu papel mais importante esta na capacidade de seus polissacarídeos inibirem a fagocitose por macrófagos e neutrófilos do hospedeiro (Nizet, 2002), sendo o ácido siálico fator essencial para a patogenicidade, pois impede a deposição do componente C3b do sistema complemento, inibindo a fagocitose (Jarva et al., 2003).

São bactérias oportunistas amplamente distribuídas no ambiente aquático associadas à má qualidade da água, manejo inadequado e condições de criação intensiva, causando prejuízos importantes para a aquicultura mundial (Bunch & Bejerano, 1997).

Nos peixes, o quadro clínico principal é a meningoencefalite acompanhada de anorexia, natação errática com movimentos giratórios na superfície da água e escurecimento da pele. Macroscopicamente encontram-se hemorragias cutâneas difusas em todo o corpo. Outras consequências são esplenomegalia, ascite e septicemia (Shoemaker & Klesius, 1997; Plumb, 1999). Histologicamente ocorre severa inflamação granulomatosa, necrose, vacuolização de hepatócitos e congestão esplênica (Evans et al., 2000).

3. OBJETIVOS

Objetivou-se com o presente estudo avaliar a eficácia terapêutica do antimicrobiano fosfomicina, para o tratamento de aeromonose e streptococose em tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus*, com a dose terapêutica de 10 mg de fosfomicina/kg.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Peixes e acondicionamento - Para o presente estudo, foram utilizadas tilápias do Nilo com aproximadamente 200g de p.v. acondicionadas em tanques de alvenaria, com capacidade de 400L de água, abastecidos com água corrente desprovida de cloro, proveniente de poço artesiano, com vazão de 1 L/min. Após o transporte para os tanques, os peixes foram aclimatados durante 15 dias para que a concentração plasmática de cortisol e a osmolaridade voltassem aos níveis basais. Nos primeiros três dias de aclimação, os animais foram submetidos a banhos em solução de NaCl na concentração de 6,0 g/L conforme descrito por Carneiro e Urbinati (2001). Receberam ração comercial peletizada (32% de proteína bruta). O arraçoamento dos animais foi feito duas vezes ao dia, pela manhã e tarde, correspondendo a 3% da biomassa dos tanques. A qualidade da água foi determinada nos momentos da alimentação, sendo a temperatura e concentração de oxigênio dissolvido medidos pelo aparelho YSI, modelo 55, e o pH e a condutividade elétrica pelo aparelho YSI, modelo 63.

Para o estudo de eficácia terapêutica foram utilizadas 200 tilápias do Nilo oriundas da mesma desova, sendo acondicionadas 10 tilápias por tanque em 20 tanques, sendo 100 tilápias para o desafio com *S. agalactiae* e 100 tilápias para o desafio com *A. hydrophila*.

4.2. Delineamento experimental - Os peixes foram distribuídos aleatoriamente em 20 tanques, constituindo os dois ensaios experimentais, sendo amostrados 10 animais por grupo em diferentes períodos conforme Tabela 1. No estudo de eficácia terapêutica, as tilápias foram anestesiadas para o desafio bacteriano 24 horas após o início do tratamento com fosfomicina.

Tabela 1. Distribuição das tilápias no estudo de eficácia terapêutica

Grupos	Ensaio de Segurança Clínica Tratamentos	Horas pós-início do tratamento			
		2 dias	4 dias	8 dias	12 dias
T0	Basal	n= 10			
T1	A. hydrophila + não tratado	n= 10	n= 10	n= 10	n= 10
T2	A. hydrophila + tratado com 10mg de fosfomicina/Kg	n= 10	n= 10	n= 10	n= 10
T3	S. agalactiae + não tratado	n= 10	n= 10	n= 10	n= 10
T4	S. agalactiae + tratado com 10mg de fosfomicina/Kg	n= 10	n= 10	n= 10	n= 10

T0 - inoculação de solução fisiológica 0,65%, T1, T2, T3 e T4 - 10mg de fosfomicina/Kg que equivale a 2000g de Fosfomicin C®/tonelada de ração,

4.3. Padronização da ração com a adição de fosfomicina - As tilápias foram alimentadas com dieta basal comercial (Fri Acqua Crescimento Tilápias), contendo 32% de proteína bruta. Nas dietas dos animais dos tratamentos T2 e T4 foram adicionadas o antimicrobiano na proporção 2000g de Fosfomicina C® (Empresa OuroFino Agronegócio) por tonelada de ração. Para o preparo das dietas, a ração comercial foi pesada e adicionou-se 2% de óleo vegetal acrescido das respectivas quantidades de Fosfomicina C®, e armazenada em sacos plásticos escuros, mantida a -16°C, até o momento do uso.

4.4. Anestesia dos peixes - Os peixes foram anestesiados por imersão em solução aquosa de benzocaína na proporção de 1:10.000 para sedação dos animais para captura no momento do desafio bacteriano (estudo de eficácia) e 1:500 no momento da eutanásia. Inicialmente, a benzocaína foi diluída em álcool 98° (0,1 g/mL), completando-se o volume para 1L conforme descrito por Wedemeyer (1970). Após o manuseio experimental, os animais foram novamente colocados em tanque com fluxo de água contínuo e aeração.

4.5. Isolamento da *Aeromonas hydrophila* e infecção experimental - A cepa de *Aeromonas hydrophila* que foi utilizada neste trabalho foi isolada de peixes naturalmente infectados.

Utilizou-se o meio de cultura TSB para crescimento da bactéria. Após o crescimento, as colônias características foram repicadas em ágar vermelho de fenol amido ampicilina para obtenção de colônias puras e submetidas às provas bioquímicas para identificação da espécie. Após estas foram semeadas em meio líquido TSB e incubadas por 24 horas a 28°C, o material foi centrifugado a 3.000 rpm/10 minutos, em centrífuga clínica, desprezando-se o sobrenadante e a massa bacteriana precipitada foi diluída seriadamente em solução salina (0,65%) esterilizada, até a obtenção da concentração 3×10^9 unidades formadoras de colônia (UFC) de *Aeromonas hydrophila*, utilizando-se contagem em placas das diluições para chegar a tal valor. Foram realizados ensaios para estabelecimento da DL50 (dose letal que causa a mortalidade de 50% dos animais) utilizando as concentrações de 10^3 - 10^{15} UFC por peixe, sendo a DL50 estabelecida em 3×10^9 unidades formadoras de colônia (UFC). Com os peixes anestesiados, foi injetado 1 mL do inóculo de *A. hydrophila* na cavidade celomática (Figura 1).

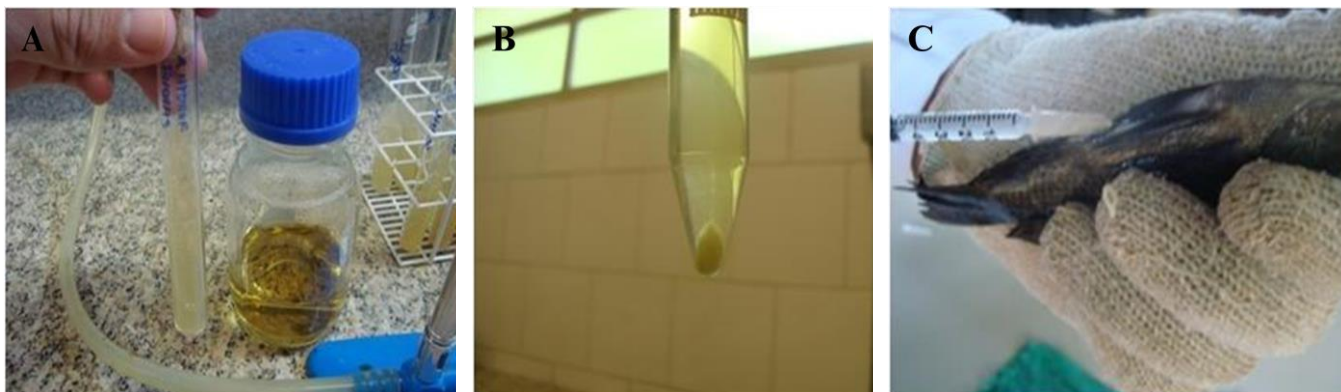


Fig 1. Semeadura em meio de cultura (A), obtenção do "pellet" por centrifugação (B) e inóculo (C)

4.6. Isolamento do *Streptococcus agalactiae* e infecção experimental - A cepa de *S. agalactiae* utilizada neste estudo foi isolada de peixes naturalmente infectados. A cepa foi mantida congelada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e no momento do uso, uma alíquota do isolado foi descongelada e o material semeado em caldo BHI (Brain Heart Infusion) em duplicata para incubação a 28°C , durante 48 horas.

Ensaio para estabelecimento da DL50 (dose letal que causa a mortalidade de 50% dos animais) foram conduzidos da mesma forma que a utilizada para a *A. hydrophila* utilizando as concentrações de 10^3 - 10^{12} UFC por peixe, sendo a DL50 estabelecida em $1,0 \times 10^8$ UFC. Com os peixes anestesiados, foi injetado o inóculo de *S. agalactiae* na cavidade celomática na dose de $1,0 \times 10^8$ UFC.

4.7. Avaliações comportamentais, sinais clínicos e mortalidade - Diariamente, os animais foram examinados nos tanques quanto ao eventual aparecimento de alterações comportamentais, sinais clínicos e mortalidade que pudessem resultar do desafio bacteriano, como: excitabilidade, letargia, frequência respiratória (batimento opercular), desorientação, hemorragias cutâneas, corrosão de nadadeira, ulcerações oculares, exoftalmia, distensão abdominal, alteração na pigmentação dos tecidos, entre outros.

4.8. Avaliação hematológica - Foram colhidas amostras de sangue dos peixes por punção de vaso caudal 2, 4, 8 e 12 dias após o desafio bacteriano.

A determinação da contagem global de células vermelhas e brancas foram realizadas em câmara de Neubauer, utilizando a solução de Natt e Herrick (1952) com diluente na proporção de 1:100. Foram realizadas a determinação do percentual de hematócrito em microcentrifuga e da quantidade de hemoglobina circulante com reagente de Drabkin's para leitura em comprimento de onda de 540nm e os valores de volume corpuscular médio (VCM) foram obtidos pelo cálculo $\text{VCM} = (\text{HT}/\text{HE}) \times 10$ e concentração hemoglobina corpuscular média (CHCM) pelo cálculo $\text{CHCM} = (\text{HG}/\text{HT}) \times 10$.

4.9. Avaliação do bioquímico sérico - Amostras de sangue colhidas sem anticoagulante foram centrifugadas a 5.000 rpm por cinco minutos para obtenção de soro. O estudo do bioquímico sérico de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), gama glutamiltransferase (GGT), proteínas totais, albumina, glicose, colesterol, triglicerídeos e creatinina foram determinadas enzimática e colorimetricamente em analisador bioquímico semi-automático (Modelo LabQuest – Bioplus).

4.10. Avaliação morfométrica e histopatológica dos órgãos - Após a necropsia o fígado, rim e baço foram coletados para avaliação morfométrica que foi realizada de acordo com Weibel et al. (1969), através da proporção entre peso do órgão (PO) e peso corporal (PC) expressos como índice somático hepático, renal e esplênico calculado pela fórmula: Índice somático (IS) = $\text{PO} \times 100/\text{PC}$.

Para os histopatológicos foram avaliados fígado, baço e rim. Imediatamente após coletar um fragmento de cada órgão, os mesmos foram fixados em formol a 10% e após 24 horas os mesmos foram transferidos para o álcool 70%. Foram, então, encaminhados para preparo das peças no Laboratório de Patologia Veterinária, onde foram emblocados em parafina, cortados em espessura de $3\mu\text{m}$, e foram corados em hematoxilina e eosina.

4.11. Reisolamento dos patógenos - Amostras de fígado, rim, baço e cérebro dos peixes foram coletadas de forma asséptica. Para reisolamento de *Streptococcus* sp. foram semeadas placas em ágar sangue, incubadas a 27°C por 24 a 48 h. As colônias obtidas foram caracterizadas presuntivamente pelos testes de Gram, catalase, oxidase e crescimento em ágar Mac Conkey. Para estudo de *Aeromonas* sp. as amostras foram incubadas em TSB e incubadas por 24 h a 28°C que foram repicadas em ágar vermelho de fenol-amido-ampicilina e selecionadas as colônias sugestivas para *Aeromonas* sp. Foram feitos esfregaços para coloração de Gram para seleção e repicadas em TSI (incubadas a 28°C por 24h). As culturas com reações ácidas tanto na base como no bisel, com coloração amarelada, foram repicadas em TSA e foram posteriormente submetidas às provas de motilidade e oxidase de acordo com Popoff (1984) (Figura 2).

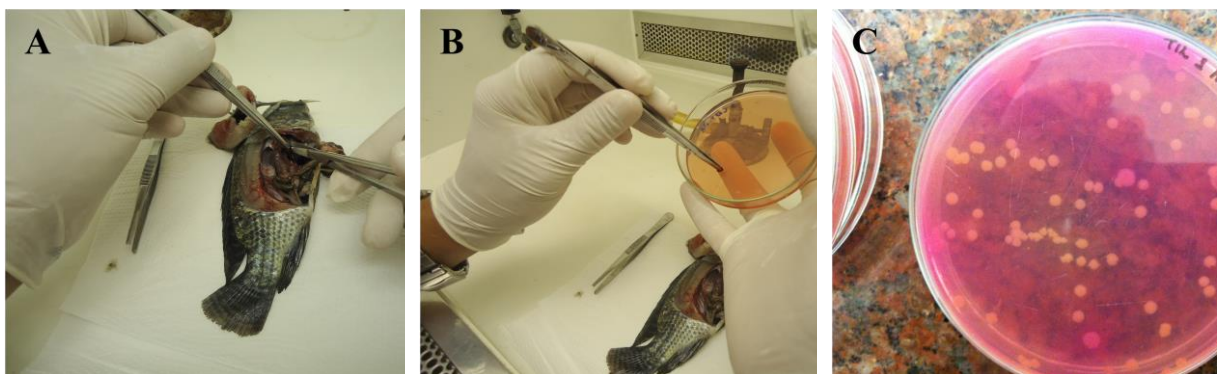


Fig 2. Necropsia dos peixes (A), "imprinting" dos órgãos nas placas (B) e crescimento colônias e seleção para testes bioquímicos (C).

4.12. Análise estatística - Os dados experimentais foram submetidos à análise de variância através de delineamento inteiramente casualizado em parcela subdividida no tempo "Split Plot Design", tendo como tratamentos principais os grupos experimentais e as subparcelas os períodos experimentais, utilizando-se o pacote estatístico SAS, pelo procedimento PROC GLM, versão 9.3 (SAS, 2012). As comparações múltiplas foram aferidas pelo Teste de Tukey ao nível de 95% de confiança de acordo com Snedecor e Cochran (1980).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Estudo de Eficácia Terapêutica com Desafio por *A. hydrophila* - Tilápias tratadas com fosfomicina e infectadas com *A. hydrophila* apresentaram melhora significativa no quadro hematológico, amenizando os efeitos deletérios da infecção (Tabela 2). A contagem global de eritrócitos aumentou significativamente ($p < 0,05$) nos peixes durante a aeromonose, porém este efeito foi amenizado pelo tratamento com fosfomicina (T2). Na análise do eritrograma, verificou-se que o hematócrito não apresentou alterações significativas com relação aos dois tratamentos (T1 – peixes não tratados e T2 – peixes tratados), em contrapartida, se observou diminuição no volume corpuscular médio (VCM) das hemácias dos peixes durante a aeromonose. Quando comparado aos animais basais apenas peixes não tratados com fosfomicina apresentaram diminuição significativa ($p < 0,05$) no VCM. Peixes com aeromonose apresentaram aumento não significativo na quantidade de hemoglobina e na concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).

Os resultados da contagem global de eritrócitos, VCM, hemoglobina e CHCM confirmam as alterações fisiopatológicas comumente observadas no quadro hematológico resultante da infecção por *A. hydrophila*. Alterações no equilíbrio líquido eletrolítico durante a aeromonose foi observada por Moraes et al. (2011).

Tabela 2. Valores médios observados no estudo hematológico de tilápias infectadas com *A. hydrophila* e tratadas com 10mg/Kg de p.v. de fosfomicina.

TEMPO	TTO ²	Eritrócitos (x10 ⁶ /μL)	Hematócrito (%)	Hemoglobina (g/dL)	VCM (fL)	CHCM (g/dL)
	T0(basal)	1,32 ^B	35,75 ^A	8,75 ^A	280,95 ^A	24,67 ^A
2 dias	T1	1,56 ^A	34,90 ^A	9,28 ^A	226,87 ^B	26,64 ^A
	T2	1,53 ^A	37,15 ^A	9,26 ^A	243,36 ^{AB}	25,11 ^A
4 dias	T1	1,46 ^A	35,55 ^A	8,90 ^A	246,59 ^{AB}	25,14 ^A
	T2	1,47 ^A	33,60 ^A	8,74 ^A	232,24 ^{AB}	26,10 ^A
8 dias	T1	1,55 ^A	33,50 ^A	8,56 ^A	220,29 ^B	25,62 ^A
	T2	1,45 ^A	34,45 ^A	9,02 ^A	239,13 ^{AB}	26,29 ^A
12 dias	T1	1,65 ^A	36,33 ^A	9,28 ^A	221,04 ^B	25,67 ^A
	T2	1,42 ^A	35,60 ^A	9,46 ^A	251,63 ^{AB}	26,78 ^A
TRAT		0.12NS	0,17NS	0,05NS	0,34NS	0,55NS
TEMPO		1.78NS	1,2NS	0,42NS	1,39NS	0,98NS
TRAT*TEMPO		2.04NS	1,8NS	4.58**	1,62NS	1,06NS
Coef. Variação		12.31	10,02	7,42	13,46	8

O leucograma das tilápias não apresentou variações significativas quando comparados aos animais basais (Tabela 3). Entretanto, peixes com aeromonose e não tratados com fosfomicina (T1) apresentaram aumento significativo no número de linfócitos com 2 DPI (Dias Pós Infecção). As populações de linfócitos assumem papel essencial na iniciação e regulação da resposta inflamatória, uma vez que participam na ativação de outras células através da liberação de citocinas. Estas atuam sobre os receptores específicos para a transmissão de sinais para determinar a sua atividade, proliferação, diferenciação, quimiotaxia e apoptose (Lieschke e Trede, 2009).

Tabela 3. Valores médios observados no estudo leucocitário de tilápias infectadas com *A. hydrophila* e tratadas com 10mg/Kg de p.v. de fosfomicina.

TEMPO	TTO ²	Leucócitos	Linfócito	Monócito	Neutrófilo	Trombócito
	T0(basal)	32199 ^A	29527 ^{AB}	505 ^A	2166 ^A	19935 ^{AB}
2 dias	T1	34201 ^A	32982 ^A	800 ^A	2036 ^A	22195 ^{AB}
	T2	27984 ^A	24504 ^{AB}	714 ^A	2765 ^A	31353 ^A
4 dias	T1	28295 ^A	25997 ^{AB}	670 ^A	1628 ^A	14873 ^B
	T2	29967 ^A	27210 ^{AB}	654 ^A	1754 ^A	16261 ^B
8 dias	T1	31213 ^A	27370 ^{AB}	1181 ^A	2457 ^A	23300 ^{AB}
	T2	26681 ^A	23341 ^{AB}	735 ^A	2604 ^A	24500 ^{AB}
12 dias	T1	22842 ^A	20297 ^B	546 ^A	1998 ^A	16638 ^{AB}
	T2	24581 ^A	22560 ^{AB}	567 ^A	1453 ^A	11698 ^B
TRAT		3,36ns	4,89*	0,11ns	0,06ns	0,99ns
TEMPO		2,32ns	2,75*	1,60ns	1,97ns	9,03**
TRAT*TEMPO		0,24ns	0,31ns	0,66ns	0,28ns	0,97ns
Coef. Variação		30,71	31,49	84,8	68,6	45,85

Segundo Belo et al., (2014) pacus (*Piaractus mesopotamicus*) criados em alta densidade mostraram uma significativa linfocitopenia, provavelmente devido ao estresse, tal como descrito por Fujimoto et al., 2005 e Fujimoto et al., 2007. Padgett e Glaser (2003) correlacionaram a contagem de baixa de linfócitos aos elevados níveis de cortisol.

Os trombócitos de peixes tratados com fosfomicina apresentaram um aumento 2 DPI e diminuição significativa em 4 e 12 DPI para os dois tratamentos. Os trombócitos nos peixes teleósteos apresentam funções importantes no processo de coagulação sanguínea (Belo et al., 2013) e segundo alguns autores estas células possuem capacidade fagocítica e teriam papel importante na imunidade inata (Tavares-Dias et al., 2007; Reque et al., 2010; Claudiano et al., 2013). Portanto o aumento de trombócitos circulantes pode ser devido ao fato de as lesões causadas pelas bactérias aumentarem a demanda desses para a cicatrização e a diminuição por estes terem migrado para os sítios inflamatórios.

Outro fato que justifica a trombocitopenia em peixes são os altos níveis de glucocorticóides (Clauss et al. 2008). Durante a fase aguda da resposta inflamatória, foi observada redução de trombócitos no exsudato de pacus tratados com dexametasona, que é classificada como um glucocorticóide de ação longa (Claudio et al., 2013).

O estudo bioquímico sérico das tilápias revelou alterações significativas nos níveis circulantes de albumina, triglicerídeos e colesterol nos peixes infectados com *A. hydrophila* e não tratados (T1) quando comparados aos animais tratados (T2) (Tabela 4).

Tabela 4. Valores médios observados no estudo bioquímico sanguíneo de tilápias infectadas com *A. hydrophila* e tratadas com 10mg/Kg de p.v. fosfomicina

TEMPO	TTO ²	Proteínas Totais	Albumina	Colesterol	Triglicerídeos	Glicemia
	T0(basal)	2,88 ^A	0,71 ^{BC}	87,40 ^B	86,22 ^C	65,80 ^A
2 dias	T1	3,23 ^A	0,84 ^{ABC}	100,80 ^{AB}	183,30 ^A	62,90 ^A
	T2	3,14 ^A	0,84 ^{ABC}	98,00 ^B	87,60 ^C	58,30 ^A
4 dias	T1	3,05 ^A	0,90 ^A	110,38 ^{AB}	145,50 ^{ABC}	61,60 ^A
	T2	3,03 ^A	0,80 ^{ABC}	98,63 ^{AB}	152,67 ^{ABC}	57,20 ^A
8 dias	T1	3,23 ^A	0,86 ^{AB}	89,44 ^B	148,22 ^{ABC}	77,00 ^A
	T2	2,92 ^A	0,70 ^C	88,30 ^B	95,70 ^{BC}	67,60 ^A
12 dias	T1	2,98 ^A	0,81 ^{ABC}	122,20 ^A	156,80 ^{AB}	61,00 ^A
	T2	3,19 ^A	0,79 ^{ABC}	87,60 ^B	120,78 ^{ABC}	57,60 ^A
TRAT		0,19ns	4,83*	1,88ns	1,22ns	2,78ns
TEMPO		1,81ns	2,69ns	9,07**	9,32**	2,27ns
TRAT*TEMPO		1,05ns	2,40ns	2,26ns	1,35ns	1,04ns
Coef. Variação		10,47	13,47	16,26	35,53	24,61

As análises de proteína total e glicemia não demonstraram variações significativas ($p > 0,05$) entre os peixes submetidos aos diferentes tratamentos quando comparados aos valores médios observados nas tilápias basais não infectadas. Tilápias não tratadas (T1) apresentaram aumento de albumina ao longo do estudo, tendo o seu pico 4 DPI e sendo significativo ($p < 0,05$) quando comparado aos valores séricos desta proteína em animais do grupo basal e peixes tratados com fosfomicina (8 DPI).

Segundo Belo et al. (2012b), a hiperalbuminemia é um achado comumente associado a alterações no equilíbrio líquido-eletrolítico. Estes resultados apresentam forte correlação aos achados do estudo do eritrograma, pois estes animais apresentaram diminuição no volume corpuscular médio das hemácias.

O tratamento com fosfomicina amenizou as alterações observadas nos níveis séricos de albumina dos peixes durante a aeromonose. Este antimicrobiano atenuou os efeitos da aeromonose sobre os níveis séricos de triglicerídeos e colesterol, mantendo valores circulantes próximos aos observados em animais basais não infectados.

O fígado exerce papel biológico importante no metabolismo destes lipídios (Belo et al., 2012b). As condições de estresse podem influenciar significativamente a concentração plasmática de triglicerídeos (Wandelaar-Bonga 1997). O incremento sérico de triglicerídeos podem decorrer da mobilização de reservas teciduais por favorecer o metabolismo energético, resultantes de processos neoglicogênicos.

A diminuição do colesterol circulante pode ser resultante da biossíntese de pregnenolona, que é precursora na síntese de cortisol, que por sua vez, estaria atuando sobre a fisiologia do animal promovendo alterações metabólicas (Oba et al., 2009). Nos peixes teleósteos, a biossíntese de cortisol nas células interrenais ocorre a partir da degradação metabólica do colesterol (Tort, 2011), justificando o aumento deste lipídeo durante a infecção por *A. hydrophila*.

Na análise da bioquímica sérica da atividade enzimática de ALT, AST e FA, verificou-se que a infecção por *A. hydrophila* em tilápias resultou em aumento significativo ($p < 0,05$) nos valores de FA, assim como, aumento nos níveis séricos de AST (Tabela 5), porém não se observou variações significativas na atividade enzimática de ALT.

O aumento da atividade enzimática de AST ocorre em casos de citotoxicidade hepática ou alterações de permeabilidade do hepatócito em lesões reversíveis ou irreversíveis (Belo et al., 2012b), enquanto casos de aumento de fosfatase alcalina são observados em alterações colestáticas (Wills & Asha, 2006).

Tabela 5. Valores médios observados no estudo bioquímico sanguíneo (dosagens de ALT, AST, FA e Creatinina) de tilápias infectadas com *A. hydrophila* e tratadas com 10mg/Kg de p.v. fosfomicina

TEMPO	TTO	ALT	AST	FA	Creatinina
	T0(basal)	11,1 ^A	26,0 ^A	35,60 ^C	0,84 ^{BC}
2 dias	T1	13,3 ^A	37,4 ^A	54,89 ^A	0,98 ^{ABC}
	T2	15,0 ^A	26,4 ^A	39,50 ^{BC}	0,82 ^C
4 dias	T1	15,0 ^A	40,3 ^A	47,29 ^{ABC}	1,03 ^{ABC}
	T2	13,3 ^A	18,9 ^A	52,00 ^A	0,80 ^C
8 dias	T1	17,0 ^A	34,7 ^A	54,88 ^A	1,10 ^{ABC}
	T2	11,1 ^A	20,0 ^A	39,67 ^{BC}	0,82 ^C
12 dias	T1	15,0 ^A	41,8 ^A	42,90 ^{ABC}	1,36 ^A
	T2	17,0 ^A	29,2 ^A	50,00 ^{AB}	1,34 ^{AB}
TRAT		0,38ns	0,02ns	0,63ns	9,35**
TEMPO		0,56ns	3,97*	11,80**	3,60*
TRAT*TEMPO		1,71ns	0,72ns	0,28ns	2,21ns
Coef. Variação		41,98	60,21	18,07	35,49

O estudo comparativo dos valores séricos de creatinina de animais com aeromonose e não tratados com fosfomicina revelou níveis séricos superiores aos observados nos peixes do grupo basal, demonstrando alteração da capacidade renal de eliminação da mesma.

De acordo com Pirarat et al. (2012) o aumento sérico da creatinina pode ocorrer em casos de alterações e lesões renais, associadas à perda da capacidade de filtração glomerular, portanto, a capacidade de eliminação deste metabólito endógeno é realizado para avaliação e determinação da funcionalidade dos rins. O estudo histopatológico dos tecidos hepáticos e renais corroboram as alterações bioquímicas séricas observadas nas tilápias com aeromonose (Figuras 3 e 4).

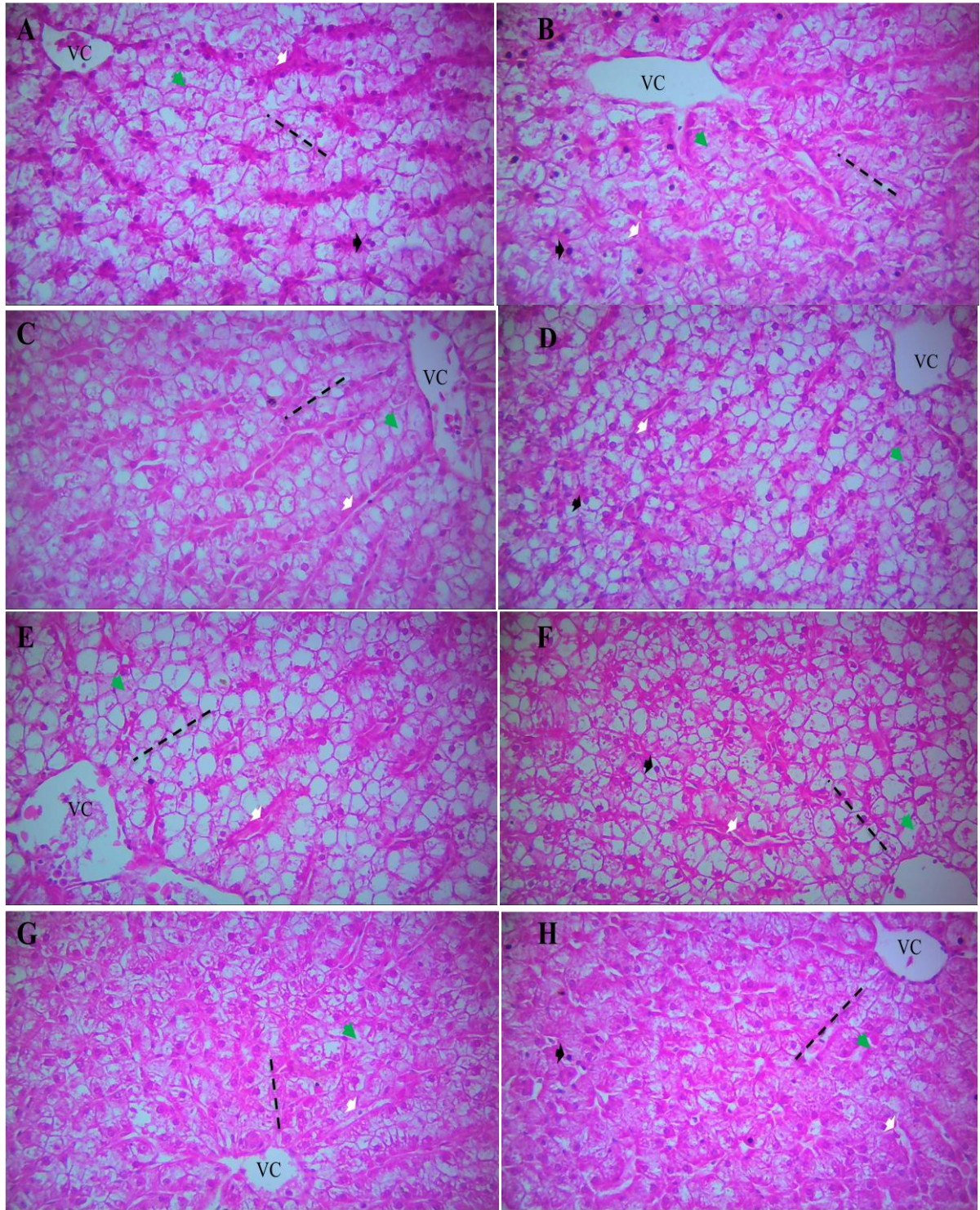


Fig 3. Fotomicrografia de corte histológico de fígado de tilápias, *O. niloticus*, desafiadas com *Aeromonas hydrophila* e tratadas com 10mg/p.v. fosfomicina. A. Tratamento T1, 2 dias, B. Tratamento T2, 2 dias, C. Tratamento T1, 4 dias, D. Tratamento T2, 4 dias, E. Tratamento T1, 8 dias, F. Tratamento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

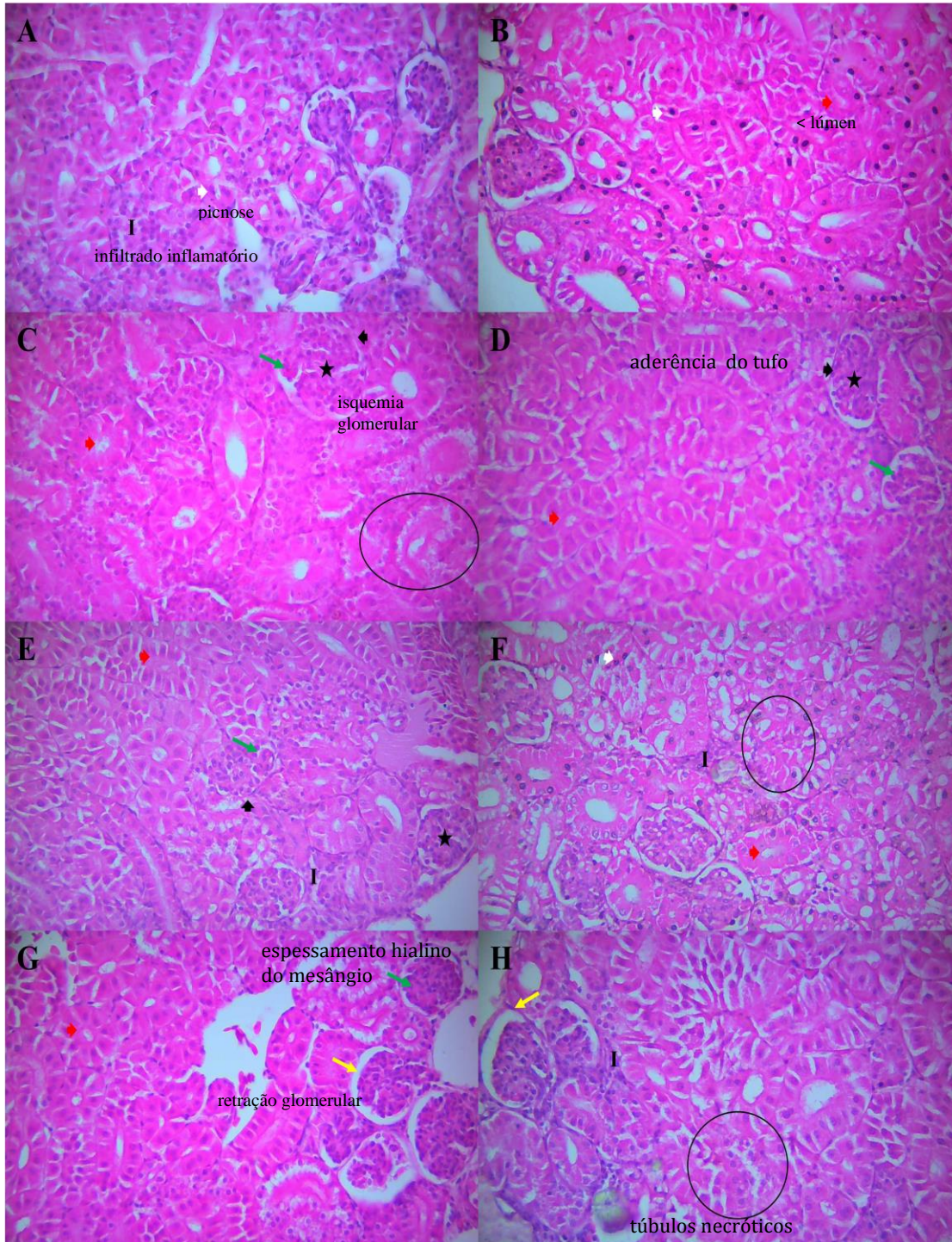


Fig 4. Fotomicrografia de corte histológico de rim de tilápias, *O. niloticus*, desafiadas com *Aeromonas hydrophila* e tratadas com 10mg/p.v. fosfomicina A. Tratamento T1, 2 dias, B. Tratamento T2, 2 dias, C. Tratamento T1, 4 dias, D. Tratamento T2, 4 dias, E. Tratamento T1, 8 dias, F. Tratamento T2,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

O estudo histopatológico do tecido hepático das tilápias com infecção por *A. hydrophila* revelou alterações na perda da arquitetura dos cordões hepáticos, hepatócitos com núcleo picnótico e degeneração hidrópica com necrose (Figura 3). Estas alterações foram amenizadas em peixes tratados com fosfomicina. Tais resultados confirmam as observações de alterações nas concentrações de atividade enzimática sérica de AST e FA. Da mesma forma, se constatou na análise histopatológica dos rins caudais isquemia glomerular, com túbulos necróticos e com redução do lúmen tubular e espessamento hialino de áreas mesangiais, associados a infiltrados de células inflamatórias (Figura 4). Tais achados corroboram as alterações de aumento significativo dos valores de creatinina destes animais.

Análises somáticas do tecido hepático demonstraram aumento significativo no tamanho do fígado dos peixes de animais com aeromonose quando comparados aos tamanhos dos fígados de peixes basais, porém o tratamento com fosfomicina atenuou estas alterações (Tabela 6). O INSC apresentou diminuição 12 DPI e não se observou alterações significativas no IES.

Tabela 6. Valores médios observados na análise somática renal cranial e caudal (INS), hepática (IHS) e esplênica (IES) de tilápias infectadas com *A. hydrophila* e tratadas com 10mg/Kg de p.v. fosfomicina.

TEMPO	TTO	IHS	IES	INS	INSC
	T0(basal)	2,00 ^B	0,063 ^A	0,194 ^{AB}	0,266 ^{AB}
2 dias	T1	2,88 ^A	0,063 ^A	0,179 ^{AB}	0,268 ^{AB}
	T2	2,61 ^{AB}	0,053 ^A	0,196 ^{AB}	0,249 ^{AB}
4 dias	T1	2,47 ^{AB}	0,065 ^A	0,187 ^{AB}	0,239 ^{AB}
	T2	2,15 ^B	0,069 ^A	0,181 ^{AB}	0,169 ^{BC}
8 dias	T1	2,44 ^{AB}	0,067 ^A	0,167 ^B	0,261 ^{AB}
	T2	2,43 ^{AB}	0,056 ^A	0,196 ^{AB}	0,281 ^A
12 dias	T1	2,42 ^{AB}	0,067 ^A	0,229 ^A	0,221 ^B
	T2	2,22 ^B	0,049 ^A	0,189 ^{AB}	0,161 ^C
TRAT		2,57 ^{ns}	0,25 ^{ns}	0,84 ^{ns}	0 ^{ns}
TEMPO		4,49 ^{**}	0,97 ^{ns}	2,08 ^{ns}	31,26 ^{**}
TRAT*TEMPO		1,36 ^{ns}	1,10 ^{ns}	1,24 ^{ns}	1,72 ^{ns}
Coef. Variação		17,66	39,98	24,34	16

O estudo histopatológico dos tecidos esplênicos apresentou alterações apenas na formação centros de melanomacrófagos (Figura 5) quando se compara os diferentes grupos experimentais, no entanto, análises morfométricas e colorimétricas devem ser realizadas para elucidar a diferença entre os mesmos.

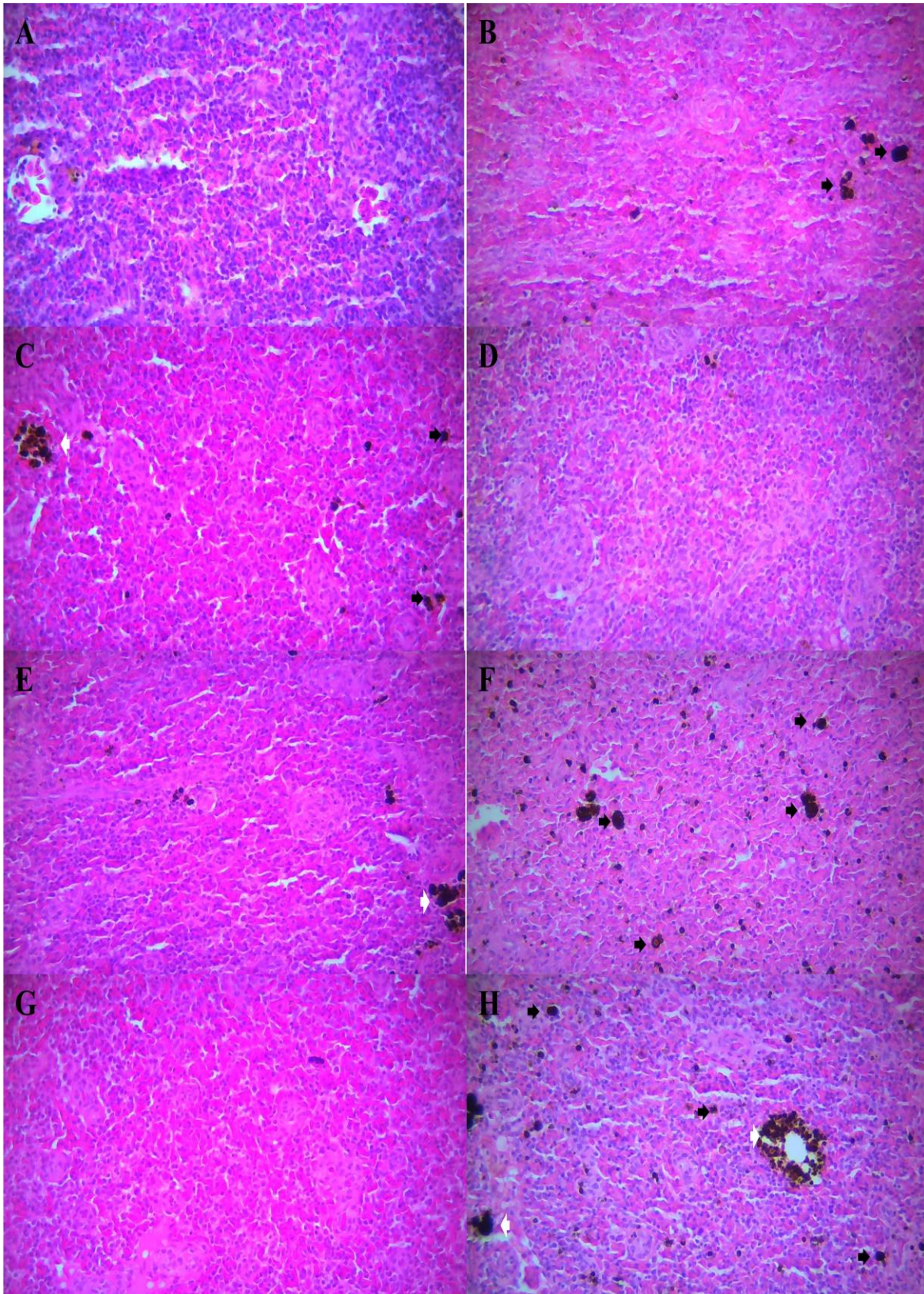


Fig 5. Fotomicrografia de corte histológico de baço de tilápias, *O. niloticus*, desafiadas com *Aeromonas hydrophila* e tratadas com 10mg/p.v. fosfomicina. A. Tratamento T1, 2 dias, B. Tratamento T2, 2 dias, C. Tratamento T1, 4 dias, D. Tratamento T2, 4 dias, E. Tratamento T1, 8 dias, F. Tratamento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

Em casos de alterações congestivas e inflamatórias agudas nos tecidos hepáticos podem resultar no aumento somático do fígado. Estes resultados corroboram os achados bioquímicos e histopatológicos, confirmando o comprometimento do fígado na patogenia da aeromonose, sendo que estes efeitos deletérios foram amenizados pelo tratamento com fosfomicina. Além do mais, o estudo de reisolamento bacteriano realizado após o período experimental comprovou a eficácia do antimicrobiano fosfomicina na dose de 10 mg/kg de peso vivo, pois não ocorreu crescimento de *A. hydrophila* em amostras de fígado, rim, baço e cérebro dos peixes tratados com este fármaco quando comparados aos grupos infectados e não tratados.

5. 2. Estudo de Eficácia Terapêutica com Desafio por *S. agalactiae* - Tilápias infectadas com *S. agalactiae* apresentaram alterações significativas no quadro hematológico na fase inicial da infecção 2 DPI, com diminuição do número de eritrócitos e diminuição do hematócrito, mantendo os valores de VCM e CHCM próximos aos observados em animais basais (Tabela 7). A contagem de eritrócitos diminuiu significativamente ($p < 0,05$) nos peixes durante a estreptococose, porém este efeito foi amenizado pelo tratamento com fosfomicina, já com 4 DPI. De acordo com Tille (2014), *Streptococcus agalactiae* (Estreptococos do grupo B) é beta-hemolítico e a produção do fator CAMP favorece sinergicamente a ação da β -hemolisina na indução de hemólise.

Entretanto, ocorreu diminuição do percentual de hematócrito associado à diminuição do volume corpuscular dos eritrócitos 8 DPI. A microcitose com normocromia tem sido relatada em casos de nefrite crônica, alterações do equilíbrio líquido-eletrolítico, deficiências proteicas, com o uso de antimicrobianos, doenças hemolíticas, entre outros (Kerr, 2003). Ambos os grupos de peixes infectados apresentaram melhora no quadro hematológico 12 DPI.

Tabela 7. Valores médios observados no estudo hematológico de tilápias infectadas com *S. agalactiae* e tratadas com 10mg/Kg de p.v. de fosfomicina.

TEMPO	TTO	Eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	Hematócrito (%)	Hemoglobina (g/dL)	VCM (fL)	CHCM (g/dL)
	T0 (basal)	2,54 ^{AB}	42,8 ^A	8,93 ^{AB}	168,7 ^{AB}	21,38 ^B
2 dias	T3	2,31 ^{AB}	35,3 ^B	8,26 ^B	154,1 ^{AB}	23,45 ^{AB}
	T4	2,21 ^B	34,8 ^B	8,5 ^{AB}	161,0 ^{AB}	24,51 ^{AB}
4 dias	T3	2,56 ^{AB}	43,9 ^A	8,79 ^{AB}	173,2 ^A	20,95 ^B
	T4	2,61 ^A	37,7 ^{AB}	9,98 ^A	144,3 ^{AB}	27,68 ^A
8 dias	T3	2,23 ^{AB}	32,3 ^B	8,05 ^B	147,0 ^{AB}	25,03 ^{AB}
	T4	2,48 ^{AB}	33 ^B	8,39 ^B	134,4 ^B	25,43 ^{AB}
12 dias	T3	2,53 ^{AB}	38 ^{AB}	9,32 ^{AB}	157,0 ^{AB}	24,57 ^{AB}
	T4	2,36 ^{AB}	37,8 ^{AB}	9,16 ^{AB}	163,4 ^{AB}	24,36 ^{AB}
TRAT		0,09 ^{ns}	5,27 [*]	0,38 ^{ns}	1,38 ^{ns}	0,68 ^{ns}
TEMPO		3,99 [*]	8,70 ^{**}	6,59 ^{**}	1,32 ^{ns}	2,50 ^{ns}
TRAT*TEMPO		2,97 [*]	1,10 ^{ns}	1,26 ^{ns}	2,17 ^{ns}	2,82 [*]
Coef. Variação		11,65	13,5	12,49	18,25	15,24

O leucograma das tilápias apresentou variações significativas quando comparados aos animais basais, pois os peixes infectados por *S. agalactiae* apresentaram diminuição significativa no número total de leucócitos 2 DPI, sendo estes achados fortemente influenciados pela diminuição do número de linfócitos circulantes (Tabela 8). Entretanto, peixes com estreptococose e tratados com fosfomicina (T4) apresentaram aumento significativo no número de linfócitos com 4 DPI. As populações de linfócitos assumem papel essencial na iniciação e regulação da resposta inflamatória, uma vez que participam na ativação de outras células através da liberação de citocinas. Estas atuam sobre os receptores específicos para a transmissão de sinais para determinar a sua atividade, proliferação, diferenciação, quimiotaxia e apoptose (Lieschke e Trede, 2009).

Padgett e Glaser (2003) correlacionaram a baixa contagem de linfócitos aos elevados níveis de cortisol em peixes submetidos a estresse.

Tabela 8. Valores médios observados no estudo leucocitário de tilápias infectadas com *S. agalactiae* e tratadas com 10mg/Kg de p.v. fosfomicina.

TEMPO	TTO ²	Leucócitos	Linfócitos	Monócitos	Neutrófilos	Trombócitos
	T0 (basal)	65984 ^{AB}	63789 ^{AB}	1134 ^A	1060 ^B	24417 ^{AB}
2 dias	T3	29504 ^D	26360 ^D	466 ^A	2677 ^{AB}	15949 ^B
	T4	37653 ^{CD}	34359 ^{CD}	1079 ^A	2214 ^{AB}	18405 ^B
4 dias	T3	54270 ^{BC}	52168 ^{ABC}	631 ^A	1470 ^B	22374 ^{AB}
	T4	75523 ^A	70285 ^A	1049 ^A	4188 ^A	32325 ^{AB}
8 dias	T3	40178 ^{CD}	36339 ^{CD}	623 ^A	3215 ^{AB}	22802 ^{AB}
	T4	51308 ^{BC}	47977 ^{BC}	949 ^A	2381 ^{AB}	36209 ^A
12 dias	T3	55397 ^{ABC}	52781 ^{ABC}	1111 ^A	1504 ^{AB}	23337 ^{AB}
	T4	49547 ^{BCD}	47025 ^{BCD}	584 ^A	1938 ^{AB}	24941 ^{AB}
TRAT		0,00ns	0,01ns	0,00ns	0,96ns	2,70ns
TEMPO		13,35**	14,37**	1,39ns	3,54*	2,33ns
TRAT*TEMPO		7,33**	6,64**	1,43ns	2,64ns	3,60*
Coef. Variação		28,74	29,64	88,03	73,9	50,27

Não se observou variações significativas nas populações circulantes de monócitos entre os diferentes grupos de peixes durante todo o estudo. No entanto, verificou-se aumento no número de neutrófilos em todos os períodos analisados, sendo estatisticamente superiores aos valores médios observados nas contagens dos animais basais 4 DPI. Peixes com estreptococose apresentaram diminuição do número de trombócitos circulantes 2 DPI, e recuperação dos valores basais nos outros períodos analisados (4, 8 e 12 DPI). A trombocitopenia foi descrita em peixes com altos níveis de glucocorticóides (Clauss et al., 2008) e segundo Claudiano et al. (2013), durante a fase aguda da resposta inflamatória, foi observada redução de trombócitos no exsudato de pacus tratados com dexametasona, que é classificada como um glucocorticóide de ação longa.

Tilápias tratadas com fosfomicina apresentaram maior número de trombócitos ao longo de todo o estudo. De acordo com Belo et al (2013), os trombócitos nos peixes teleósteos apresentam funções importantes no processo de coagulação sanguínea, além de possuir capacidade fagocítica, exercendo papel importante na imunidade inata (Tavares-Dias et al., 2007; Reque et al., 2010; Claudiano et al., 2013). Estudos que buscam compreender a fisiopatologia da reação inflamatória na aerocistite infecciosa por *S. agalactiae* tem observado aumento circulante de trombócitos e o seu acúmulo no sítio inflamado na fase mais aguda da resposta de defesa (Castro et al., 2014).

O estudo bioquímico sérico das tilápias revelou alterações significativas nos níveis circulantes de albumina, triglicerídeos e colesterol nos peixes infectados com *S. agalactiae* e não tratados (T3) quando comparados aos animais tratados (T4) (Tabela 9).

Tabela 9. Valores médios observados no estudo bioquímico sanguíneo de tilápias infectadas com *S. agalactiae* e tratadas com 10mg/Kg de p.v. fosfomicina.

TEMPO	TTO	Proteínas Totais	Albumina	Colesterol	Triglicerídeos	Glicemia
	T0 (basal)	3,70 ^{ABC}	0,92 ^B	147,2 ^{BC}	45,1 ^C	64,3 ^A
2 dias	T3	3,44 ^{BC}	0,99 ^{AB}	118,2 ^{CD}	122,5 ^{AB}	56,4 ^A
	T4	3,85 ^{ABC}	1,03 ^{AB}	136,0 ^{BC}	89,0 ^{ABC}	56,8 ^A
4 dias	T3	3,98 ^A	1,04 ^{AB}	185,0 ^A	100,6 ^{ABC}	58,7 ^A
	T4	3,62 ^{ABC}	1,00 ^{AB}	98,0 ^D	76,3 ^{BC}	62,9 ^A
8 dias	T3	3,28 ^C	0,99 ^{AB}	124,2 ^{BCD}	145,7 ^{AB}	57,6 ^A
	T4	3,30 ^C	1,01 ^{AB}	116,1 ^{CD}	125,7 ^{AB}	63,2 ^A
12 dias	T3	3,96 ^{AB}	1,16 ^A	160,3 ^{AB}	155,3 ^A	60,1 ^A
	T4	3,69 ^{ABC}	1,01 ^{AB}	112,7 ^{CD}	100,6 ^{ABC}	61,5 ^A
TRAT		3,20 ^{ns}	0,44 ^{ns}	1,04 ^{ns}	10,18 ^{**}	0,33 ^{ns}
TEMPO		7,61 ^{**}	1,72 ^{ns}	23,13 ^{**}	3,78 [*]	0,45 ^{ns}
TRAT*TEMPO		2,05 ^{ns}	0,69 ^{ns}	2,79 [*]	0,44 ^{ns}	0,25 ^{ns}
Coef. Variação		10,9	17,1	18,04	44,27	22,68

As análises de proteína total e glicemia não demonstraram variações significativas ($p > 0,05$) entre os peixes submetidos aos diferentes tratamentos quando comparados aos valores médios observados nas tilápias basais não infectadas. Diminuição nos valores séricos de proteína total foi observado em peixes com estreptococose 8 DPI. Tilápias não tratadas com fosfomicina (T3) apresentaram aumento ($p < 0,05$) significativo de albumina 12 DPI quando comparados aos valores séricos em animais do grupo basal. A hiperalbuminemia é um achado clínico comumente associado a alterações do equilíbrio líquido-eletrolítico (Belo et al., 2012).

O tratamento com fosfomicina atenuou os efeitos da estreptococose sobre os níveis séricos de triglicerídeos e colesterol, mantendo valores circulantes mais próximos aos observados em animais basais (Tabela 9). Segundo Belo et al. (2012a), o fígado exerce papel biológico importante no metabolismo destes lipídeos. Durante o estresse, picos de catecolaminas e cortisol participam de processos gliconeogênicos importantes para o aumento da disponibilidade de energia, através de estímulos de lipólise mediadas por receptores beta-adrenérgicos ocorre incremento sérico de triglicerídeos (Wandelaar-Bonga 1997; Jaines et al., 2015b).

O fígado participa do processo de biossíntese do colesterol circulante, e de acordo com Tort (2011) as células interrenais produzem cortisol a partir da degradação metabólica do colesterol, que por sua vez, estaria atuando sobre a fisiologia do animal promovendo alterações metabólicas (Oba et al., 2009), justificando o aumento deste lipídeo durante a infecção por *S. agalactiae*.

Na análise da bioquímica sérica da atividade enzimática de ALT, AST e FA, não se observou alterações significativas resultantes da infecção por *S. agalactiae* e/ou resultantes do tratamento com fosfomicina quando comparadas aos peixes basais (Tabela 10), Esses resultados sugerem que não ocorreu citotoxicidade hepática e colestase, pois de acordo com Belo et al. (2012b), nos casos de ocorrência dessas patologias, ocorre o aumento da atividade enzimática sérica de ALT, AST

O estudo comparativo dos valores de creatinina de animais com estreptococose revelou níveis séricos inferiores aos observados nos peixes do grupo basal (Tabela 10), não demonstrando alterações na funcionalidade e capacidade renal. Tendo em vista que a creatinina é utilizada para avaliação e determinação da funcionalidade dos rins, e de acordo com Pirarat et al. (2012).

Tabela 10. Valores médios observados no estudo bioquímico sanguíneo (dosagens de ALT, AST, FA e Creatinina) de tilápias infectadas com *S. agalactiae* e tratadas com 10mg/Kg de p.v. fosfomicina

TEMPO	TTO ²	ALT	AST	FA	Creatinina
	T0 (basal)	16,1 ^A	40,6 ^A	58,2 ^A	2,38 ^{AB}
2 dias	T3	12,2 ^A	34,7 ^A	44,5 ^{AB}	1,49 ^C
	T4	10,9 ^A	29,3 ^A	40 ^{AB}	2,04 ^{ABC}
4 dias	T3	16,1 ^A	35,1 ^A	30,5 ^B	2,48 ^A
	T4	11,9 ^A	22,2 ^A	53,3 ^{AB}	1,56 ^{BC}
8 dias	T3	13,7 ^A	24,2 ^A	42,5 ^{AB}	1,50 ^C
	T4	10,2 ^A	17,7 ^A	47,6 ^{AB}	1,74 ^{ABC}
12 dias	T3	11,1 ^A	33,4 ^A	31,5 ^B	2,22 ^{ABC}
	T4	12,9 ^A	23,0 ^A	58,9 ^A	1,51 ^C
TRAT		0,45ns	2,01ns	0,74ns	1,39ns
TEMPO		1,27ns	1,92ns	8,17**	9,49**
TRAT*TEMPO		1,62ns	0,59ns	0,38ns	0,34ns
Coef. Variação		39,6	58,83	33,74	30,75

O estudo histopatológico do tecido hepático das tilápias com infecção por *S. agalactiae* revelou alterações na perda da arquitetura dos cordões hepáticos, hepatócitos com núcleo picnótico e degeneração hidrópica com necrose (Figura 6). Estas alterações foram amenizadas em peixes tratados com fosfomicina. Da mesma forma, se constatou na análise histopatológica dos rins caudais isquemia glomerular, com túbulos necróticos e com redução do lúmen tubular e espessamento hialino de áreas mesangiais, associados a infiltrados de células inflamatórias (Figura 7). Diferentemente do estudo da infecção por *A. hydrophila*, as lesões hepáticas e renais observadas no fígado e rins caudais de peixes infectados com *S. agalactiae* não apresentaram correlação aos achados bioquímicos.

O estudo histopatológico dos tecidos esplênicos apresentou alterações apenas na formação centros de melanomacrófagos (Figura 8).

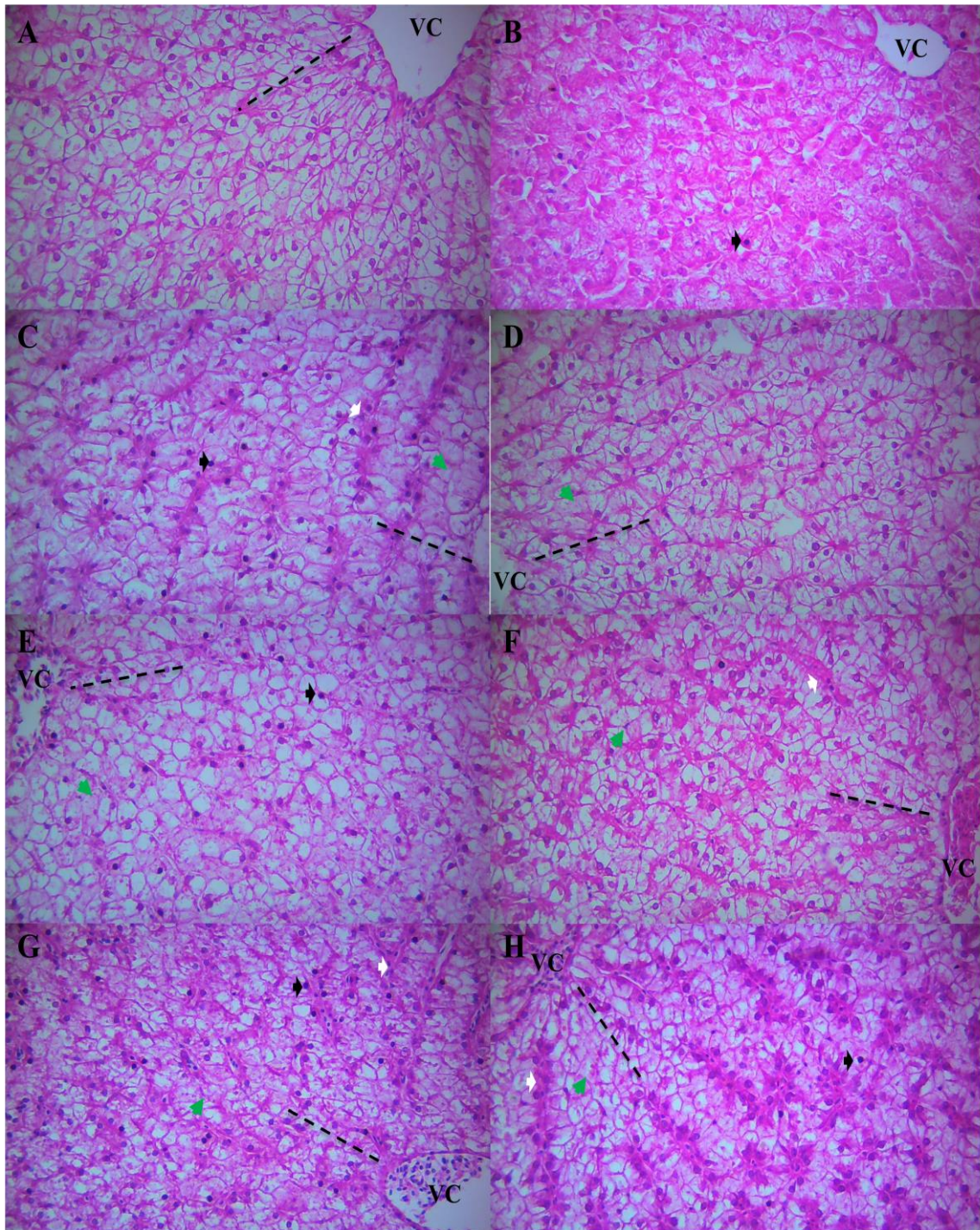


Fig 6. Fotomicrografia de corte histológico de fígado de tilápias, *O. niloticus*, desafiadas com *Streptococcus agalactiae* e tratadas com 10mg/p.v. fosfomicina. A. Tratamento T3, 2 dias, B. Tratamento T4, 2 dias, C. Tratamento T3, 4 dias, D. Tratamento T4, 4 dias, E. Tratamento T3, 8 dias, F. Tratamento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

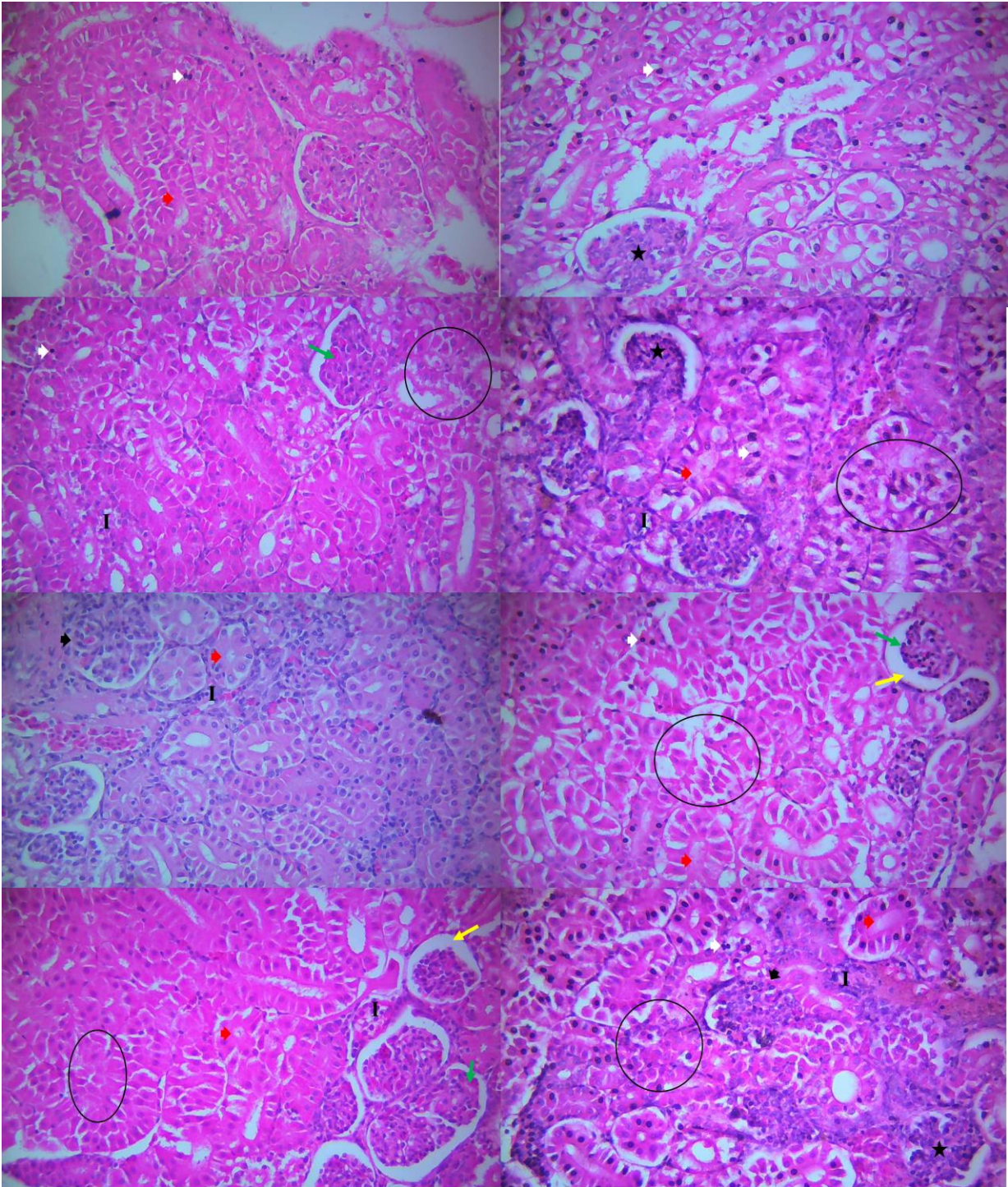


Fig 7: Fotomicrografia de corte histológico de rim de tilápias, *O. niloticus*, desafiadas com *Streptococcus agalactiae* e tratadas com 10mg/p.v. fosfomicina. A. Tratamento T3, 2 dias, B. Tratamento T4, 2 dias, C. Tratamento T3, 4 dias, D. Tratamento T4, 4 dias, E. Tratamento T3, 8 dias, F. Tratamento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

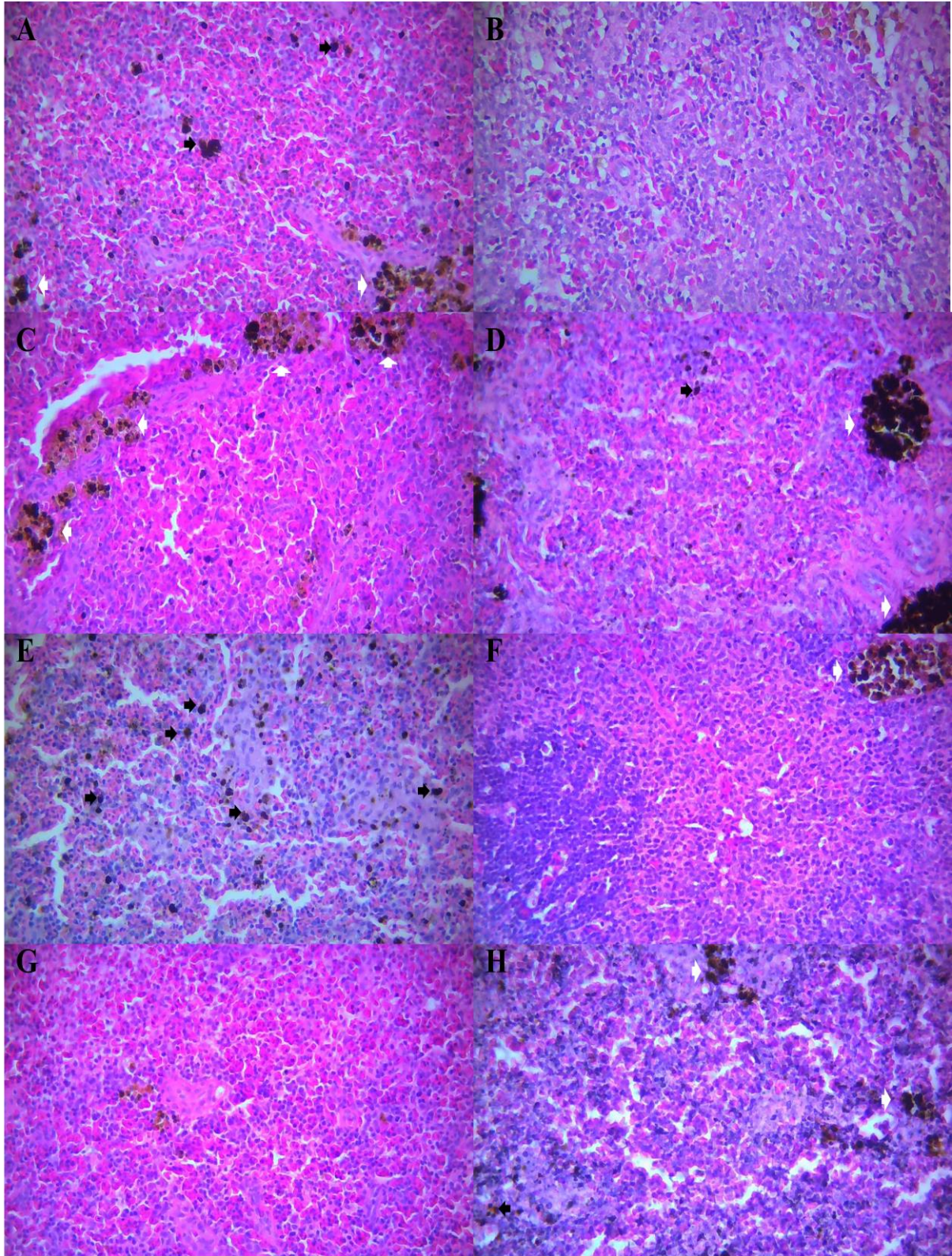


Fig 8: Fotomicrografia de corte histológico de baço de tilápias, *O. niloticus*, desafiadas com *Streptococcus agalactiae* e tratadas com 10mg/p.v. fosfomicina. A. Tratamento T3, 2 dias, B. Tratamento T4, 2 dias, C. Tratamento T3, 4 dias, D. Tratamento T4, 4 dias, E. Tratamento T3, 8 dias, F. Tratamento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

Os valores observados no estudo dos índices nefrossomáticos craniais (INSC), índices hepatossomáticos (IHS) e índices esplenossomáticos (IES) das tilápias tratadas com estreptococose não diferiram significativamente ($p>0,05$) quando comparados aos observados nos animais do grupo basal (Tabela 11). O único índice somático que apresentou alteração significativa foi os índices nefrossomáticos (INS) que mostraram redução 2 DPI e aumento com 4 DPI quando comparado aos valores obtidos de animais basais.

Tabela 11. Valores médios observados na análise somática renal cranial e caudal (INS), hepática (IHS) e esplênica (IES) de tilápias infectadas com *S. agalactiae* e tratadas com 10mg/Kg de p.v. fosfomicina.

TEMPO	TTO ²	IHS	IES	INS	INSC
	T0 (basal)	2,00 ^A	0,15 ^A	0,27 ^{AB}	0,20 ^A
2 dias	T3	2,14 ^A	0,08 ^A	0,17 ^C	0,18 ^A
	T4	2,30 ^A	0,07 ^A	0,19 ^{BC}	0,22 ^A
4 dias	T3	2,30 ^A	0,16 ^A	0,29 ^A	0,21 ^A
	T4	2,12 ^A	0,08 ^A	0,23 ^{ABC}	0,21 ^A
8 dias	T3	2,26 ^A	0,11 ^A	0,18 ^{BC}	0,19 ^A
	T4	2,47 ^A	0,06 ^A	0,21 ^{ABC}	0,21 ^A
12 dias	T3	2,42 ^A	0,09 ^A	0,19 ^{BC}	0,20 ^A
	T4	2,41 ^A	0,09 ^A	0,18 ^{BC}	0,20 ^A
TRAT		3,05ns	0,14ns	3,80ns	0,07ns
TEMPO		0,72ns	1,92ns	3,48*	0,93ns
TRAT*TEMPO		0,16ns	1,64ns	3,24*	0,09ns
Coef. Variação		19,67	81,36	31,73	20,51

Em casos de alterações congestivas e inflamatórias agudas nos tecidos renais podem resultar no aumento somático deste órgão. Estes resultados corroboram os achados histopatológicos, confirmando o comprometimento renal na patogenia da estreptococose, sendo que estes efeitos deletérios foram amenizados pelo tratamento com fosfomicina. Além do mais, o estudo de reisolamento bacteriano realizado após o período experimental comprovou a eficácia do antimicrobiano fosfomicina na dose de 10 mg/kg de peso vivo, pois não ocorreu crescimento de *S. agalactiae* em amostras de fígado, rim, baço e cérebro dos peixes tratados com este fármaco quando comparados aos grupos infectados e não tratados.

6. CONCLUSÃO

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

7. REFERÊNCIAS

- Abeyta Jr, C., Kaysner C.A., Wekell M.M., Sullivan Stelma, G.N. 1989. Recovery of *Aeromonas hydrophila* from oysters implicated in an outbreak of foodborne illness. Journal of Food Protection, 49: 643-646.
- Alexandrino, A.C., Okumuro M.P.M., Baldassi, L, Araujo, A.P., Kurodo, C.K., Araujo, K., Walkasa, Y.S. 2000. Ocorrência de *Aeromonas hydrophila* em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) em cultivo intense-relato de caso. Bol. Inst. Pesca, 26(1): 111-117.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

MPA, 2010 MPA - Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2010. [Http://Www.Mpa.Gov.Br/Images/Docs/Informacoes_E_Estatisticas/Boletim%20estat%3%Adstico%20mpa%202010.Pdf](http://www.mpa.gov.br/Images/Docs/Informacoes_E_Estatisticas/Boletim%20estat%3%Adstico%20mpa%202010.Pdf)

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

- Tort, L., 2011. Stress and immune modulation in fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 35: 1366-1375.
- Wendelaar-Bonga, S.E. 1997. The stress response in fish. *Physiological Review*, 77(3): 591-625.
- Wedemeyer, G. 1970. Stress of anesthesia with MS-222 and benzocaine in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fisher. Res. Board Can.* 22(5).
- Weibel, E.R., Staubli, W., Gnagi, H.R., Hess, F.A. 1969. Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. *J of Cell Biol.* 68-91.
- Williams, G.J, Wei L, L.E.E A., Craig, J.C. 2006. Long-term antibiotics for preventing recurrent urinary tract infection in children. *Cochrane Database Syst Rev*, 3: CD001534.
- Wills, P.J., Asha, V.V. 2006. preventive and curative effect of *Lygodium flexuosum* (L.) sw. on carbon tetrachloride induced hepatic fibrosis in rats *J. Ethnopharmacol*, 107: 7-11.
- Yousefian, M., Amiri, M.S. 2009. A Review Of The Use Of Prebiotic In Aquaculture For Fish And Shrimp. *African J Of Biotechnol.* 8(25): 7313-7318.
- Zimmermann, S., Fitzsimmons, K. Tilapicultura Intensive., In J.E.P.Cyrino, E.C. Urbinati, D.M. Fracalossi, N. Castagnoli, 2004. Editores. *Tóp Espec Em Piscic De Água Doce Tropic Intens*, Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, Jaboticabal , Brasil, SP, 239-266.