

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

Katia Suemi Gozi

Médica veterinária

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

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

Katia Suemi Gozi

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Pilarski

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

Jaboticabal, SP
2016

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

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

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

CDU 639.3.09

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

AUTORA: KATIA SUEMI GOZI

ORIENTADORA: FABIANA PILARSKI

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



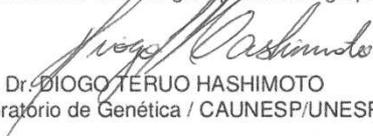
Profa. Dra. FABIANA PILARSKI

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



Prof. Dr. MANOEL VICTOR FRANCO LEMOS

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



Prof. Dr. DIOGO TERUO HASHIMOTO

Laboratório de Genética / CAUNESP/UNESP

Jaboticabal, 30 de junho de 2016

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida!

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Aos membros da banca pelas orientações e correções concedidas.

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

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

Muito, muito, muito Obrigada!

SUMÁRIO

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

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

LISTA DE TABELAS

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

LISTA DE FIGURAS

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

RESUMO

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

Palavras-chave: Antimicrobiano, resistência, bactéria, peixe

ABSTRACT

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

Keywords: Antimicrobial, resistance, bacteria, fish

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A produção aquícola

Considerada como uma das soluções para suprir a demanda mundial de alimentos, a aquicultura é responsável por 40,1% de toda produção mundial de pescado, com 62,7 milhões de toneladas em 2011 (FAO, 2013).

Em 2010, a produção nacional foi de 479.399 toneladas, representando 18,6% da produção total das Américas (FAO, 2012). Ao comparar a produção de pescado em 2009 (415.686 toneladas) com a de 2011 (629.309 toneladas) (FAO,

2013), verifica-se um aumento de 51,39% na produção durante esse triênio; o que corrobora o destaque que o país vem apresentando no cenário mundial.

A tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) está entre as espécies mais cultivadas mundialmente (Kubitza, 2000; Watanabe *et al.*, 2002; Josupeit, 2005; FAO,2013), devido a suas características tais como: rápido crescimento; tolerância a alta densidade; capacidade de alimentar-se dos itens básicos da cadeia trófica, aceitando grande variedade de alimentos; ausência de mioespinhas; rusticidade; pacote tecnológico consolidado e carne saborosa. No Brasil, sua criação é realizada em tanques-redes, de maneira intensiva, nos grandes reservatórios hidroelétricos (Scorvo Filho *et al.*, 2010; Garcia *et al.*, 2014a), assumindo o primeiro lugar das espécies mais produzidas pela aquicultura continental (MAPA, 2012).

2.2. Doenças em tilápias

Durante a criação de peixes, fatores estressantes como alterações da qualidade da água, manejo inadequado, altas densidades (Pavanelli *et al.*, 2008), uso de ração deficiente em micro ou macronutriente e interação biológica (Oba *et al.*, 2009) são comuns e, embora os peixes tenham a capacidade natural de responder fisiologicamente adaptando-se às alterações provocadas por essas condições estressantes, em casos de estresse crônico, o animal perde a capacidade de adaptabilidade, tornando-se mais susceptível às doenças e, em casos mais extremos, a morte é inevitável (Merighe *et al.*,2004).

As bactérias constituem o grupo de agentes etiológicos economicamente mais significantes para a aquicultura, pois todas as espécies de peixes são susceptíveis às infecções, além da fácil propagação, uma vez que estes microorganismos ocorrem naturalmente no ambiente aquático (Costa, 2004).

Entre os principais patógenos que acometem a criação de tilápia-do-Nilo, bactérias do gênero *Aeromonas* e *Streptococcus* são consideradas as mais importantes.

Pertencente à família Aeromonadaceae, o gênero *Aeromonas* compreende bastonetes Gram-negativos, possuem flagelos polares quando móveis, são anaeróbicos facultativos, catalase e oxidase positivos, reduzem de nitrato a nitrito

e fermentam glicose (Quinn *et al.*, 2005; Kamble *et al.*; 2012). São encontrados em vários tipos de ambientes aquáticos: marinho; doce; água potável, mesmo clorada; poluída (Monfort & Baleux, 1991; Krovacek *et al.*, 1994, Seshadri *et al.*, 2006; Trabulsi & Alterthum, 2008) e no solo (Brandi *et al.*, 2008; Samie, *et al.*, 2012). Janda e Abbott (2010) relataram a presença de bactérias deste gênero em animais domésticos, aves, invertebrados, insetos; no conteúdo gastrointestinal de ovelhas, gado e cavalo saudáveis; em alimentos como frutos do mar, leite cru, frango e carnes de cordeiro, vitela, porco, carne moída e peixes.

Tais bactérias podem ser organizadas em dois grupos: o primeiro grupo é caracterizado pelas psicrófilas e não móveis, representado pela *Aeromonas salmonicida*, agente causador da furunculose em peixes; o segundo inclui as demais espécies de *Aeromonas*, caracterizadas por serem mesófilas, móveis, causadoras de doenças tanto em humanos como em animais (Austin & Austin, 2007; Seshadri *et al.*, 2006; Janda & Abbott, 2010; Furmanek-Blaszczak, 2013).

Embora outras *Aeromonas* móveis também causem doenças em peixes, como a *Aeromonas caviae* (Kozłowska, 2007; Martins *et al.*, 2008), *Aeromonas veronii* (Kozłowska, 2007; Nawaz *et al.*, 2006;), *Aeromonas sobria* (Kozłowska, 2007, Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010), *Aeromonas jandaei* (Kozłowska, 2007) entre outras, a *Aeromonas hydrophila* é a mais referenciada (Joseph & Carnahan, 1994; Nielsen *et al.*, 2001; Deng *et al.*, 2014). É um patógeno oportunista, responsável pela septicemia hemorrágica, caracterizado por pequenas lesões hemorrágicas na superfície corpórea que progredem para úlceras hemorrágicas; outros sinais clínicos associados incluem exoftalmia, ascite, necrose das nadadeiras e cauda, perda de escamas e hemorragia em brânquias, (Cipriano, 2001; Pavanelli *et al.*, 2008).

A. caviae, *A. hydrophila* e *A. veronii* bv *sobria*, estão recebendo maior atenção por estarem associadas a uma variedade de doenças humanas tais como: infecções cutâneas, gastroenterite a septicemia (WHO, 1993; Figueras *et al.*, 2005; Skwor *et al.*, 2014).

O gênero *Streptococcus* engloba cocos Gram-positivos, que formam cadeias de diferentes comprimentos, anaeróbios facultativos, catalase negativo, imóveis e fastidiosos (Quinn *et al.*, 2005). São classificados pela sua atividade hemolítica (Facklam, 2002) e nas reações sorológicas com anticorpos de Lancefield (Lancefield, 1933).

Streptococcus agalactiae, também conhecido como grupo B *Streptococcus* (GBS) ou grupo B de Lancefield, é responsável por altas mortalidades em peixes, provocando quadros de septicemia e meningoencefalite, ocorrendo na forma de abscessos multifocais na musculatura do animal (Figueiredo & Leal, 2008, Li *et al.*, 2013b). Outros sinais clínicos incluem: natação errática, escurecimento do corpo, exoftalmia, opacidade da córnea, hemorragias no opérculo e base das nadadeiras, ulcerações hemorrágicas mais superficiais que as provocadas por *Aeromonas* (Pavanelli *et al.*, 2008, Li *et al.*, 2013b).

Em *O. niloticus*, tal bactéria foi isolada de encéfalo, fígado, rim, raspado de pele, líquido ascítico e olho, cultivados em sistema de tanque-rede em viveiros de terra no norte do Paraná (Salvador *et al.*, 2005) e em surtos de meningoencefalite em pisciculturas no estado de Minas Gerais e Espírito Santo (Figueiredo *et al.*, 2006).

Peixes de cultivo, selvagens e marinhos (Yi *et al.*, 2014), vacas, cães, gatos, mamíferos marinhos, crocodilos, rãs e seres humanos também podem ser acometidos por esta bactéria (Delannoy *et al.*, 2013).

Embora estudos genéticos concluam que as cepas de *S. agalactiae* de origem humana e bovina são populações geneticamente distintas com transmissão interespecie limitada, a habilidade deste patógeno de cruzar tal barreira e permitir que cepas derivadas de humanos infectem animais ou vice-versa é pouco compreendida. Entretanto, algumas cepas derivadas de bovinos e de humanos podem infectar e causar doença em tilápias-do-Nilo (Pereira *et al.*, 2009; Evans *et al.*, 2009).

O *Streptococcus iniae* é um patógeno de peixes de ampla distribuição mundial, responsável pelo prejuízo estimado em mais de 100 milhões de dólares por ano em todo mundo (Shoemaker *et al.*, 2001).

Além das características referentes ao gênero bacteriano, pode-se acrescentar a presença de beta-hemólise e a ausência das reações sorológicas de Lancefield (Pier *et al.*, 1976, Weinstein *et al.*, 1997).

Em estudo sobre a prevalência da bactéria em *Oreochromis* spp, híbridos de robalo (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) e o bagre-americano (*Ictalurus punctatus*), a bactéria apresentou maiores prevalências na fase de crescimento tanto para tilápia (7,96%) como para o híbrido (9,56%) de robalo (Shoemaker *et al.*, 2001).

Em peixes, *S. iniae* é responsável por quadros de meningoencefalite e septicemia, com altas taxas de morbidade e mortalidade. Os sinais clínicos são os mesmos para infecção por *S. agalactiae*: natação errática, exoftalmia, opacidade da córnea, escurecimento da pele, rigidez vertebral e pontos hemorrágicos nas inserções das nadadeiras (Bromage & Owens, 2002; Pretto-Giordano *et al.*, 2015).

A utilização de testes bioquímicos comerciais para a identificação de *S. iniae* não é eficaz, sendo necessária a identificação por técnicas moleculares. Erros ou impossibilidades de identificação são relatados para esta espécie bacteriana devido a sua inexistência nas bases de dados empregadas para interpretar os resultados de tais kits (Lau *et al* 2006, Facklam *et al* 2005).

Em humanos, o *S. iniae* está principalmente relacionado com a celulite bacteriana dos membros superiores, após manipulação de peixes, cometendo idosos e pessoas imunocomprometidas (Weinstein *et al.*, 1997; Shoemaker, *et al.*, 2001; Lau *et al*, 2006).

2.3. Antimicrobianos na produção aquícola

Quando epizootias ocorrem, a utilização de antimicrobianos e quimioterápicos é a maneira mais efetiva de controlar as enfermidades e reduzir a oportunidade de transmissão de patógenos para todo o plantel.

Todavia, a utilização dessas substâncias na piscicultura pode contaminar o corpo hídrico, contribuir para o aparecimento de microorganismos resistentes e provocar impactos adversos em espécies não-alvo, colocando em risco toda a cadeia trófica e também a saúde do ser humano (Midlen & Redding, 1998; Treves-Brown, 2000; Cabello *et al.*, 2013). Assim, a utilização de antimicrobianos tem sido criticada, porque a via de administração é oral, com a incorporação do antimicrobiano na ração, contaminando a água e sedimentos com a sobra da ração não consumida, uma vez que peixes enfermos apresentam redução no apetite (Jacobsen & Berglind, 1988; Björklund *et al.*, 1990), além do efeito acumulativo da molécula no ambiente por fezes e excretas (Cabello *et al.*, 2013).

Segundo informações da Secretaria de Defesa Animal do MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), no Brasil existem apenas três produtos

licenciados para uso na aquicultura brasileira, dois antibióticos (florfenicol e oxitetraciclina) e um parasiticida (triclorfon).

A oxitetraciclina é um antimicrobiano pertence ao grupo das tetraciclina, caracterizado por apresentar na sua estrutura química quatro anéis aromáticos com vários grupos funcionais em cada anel, incluindo o fenol, álcool, cetona e amino (Gao *et al.*, 2012). Seu modo de ação está na inibição da síntese protéica, por se ligar à subunidade ribossomal 30S e bloquear a entrada do aminoacil tRNA no sítio acceptor do ribossomo (Borghini & Palma, 2014; Yáñez *et al.*, 2014). É um antimicrobiano considerado de amplo espectro, que engloba uma ampla variedade de bactérias gram-positivas e gram-negativas, além de organismos atípicos como clamídia, micoplasma, rickettsias (Roberts, 2003; Hussain *et al.*, 2015) e protozoários (Chopra & Roberts, 2001).

Por ser eficaz no tratamento de bacterioses, com baixa toxicidade e baixo custo, é um dos antimicrobianos mais utilizados tanto na clínica médica de humanos e animais (Pereira-Maia *et al.*, 2010).

Na aquicultura, a oxitetraciclina é principalmente utilizada no tratamento de infecções por bactérias Gram-negativas (Rigos *et al.*, 2006), como septicemia hemorrágica por *A. liquefaciens* e doenças por *Pseudomonas* em bagres; úlceras, furunculoses, septicemia hemorrágica, causadas por *A. salmonicida* e *A. liquefaciens* e doenças por *Pseudomonas* em salmonídeos.

O florfenicol é um fluorato derivado do tianfenicol e tem amplo espectro de ação que é similar ao do cloranfenicol e a atividade antimicrobiana maior que a do tianfenicol (Graham *et al.*, 1988). Devido à alta toxicidade e dada a sua importância no tratamento da febre tifóide, o cloranfenicol foi estritamente proibido para uso em animais em muitos países na década de 90, fato que contribuiu com a difusão do uso do florfenicol na criação de animais (Michel *et al.*, 2003).

Seu mecanismo de ação está na inibição da síntese protéica da bactéria. A droga fixa-se na fração 50S do ribossomo, inibindo a ação da enzima peptidil-transferase (Yáñez *et al.*, 2014; Lysnyansky & Ayling, 2016).

No Brasil, seu uso está permitido no tratamento de infecções em tilápia e truta, provocados por *Aeromonas* móveis, *Streptococcus agalactiae* e *Yersinia ruckerii*.

2.4. Resistência bacteriana à antimicrobianos

Os mecanismos de resistência bacteriana podem ocorrer por mutação ou por aquisição de elementos genéticos.

A mutação espontânea ocorre de forma rara, com frequência de uma célula bacteriana em um bilhão, mas em condições de alta pressão de seleção antimicrobiana, podem selecionar bactérias que apresentem maiores taxas de mutação (Rodríguez-Rojas *et al.*, 2013). Entre as consequências provocadas por este mecanismo estão as várias alterações: da permeabilidade via porinas, do sítio de ação do antimicrobiano, da bomba de efluxo e de mecanismos enzimáticos de degradação (Livermore, 2003). Esse tipo de resistência é transferido verticalmente, sendo adquirida pelas progênes somente pela aquisição dos genes de resistência durante a divisão celular bacteriana, quando o material genético da célula mãe duplica-se dando origem às células filhas.

A resistência mediada por aquisição de elementos genéticos ocorre por meio de plasmídios, transposons e integrons.

Plasmídios são moléculas extracromossomais circulares de DNA, com replicação própria ou em conjunto com a célula hospedeira. São dispensáveis para a bactéria, mas podem conferir vantagens seletivas, como por exemplo a resistência a um antimicrobiano (Carattoli, 2013). Transposons são elementos genéticos móveis capazes de mudar de posição dentro do genoma, independente da homologia entre a região onde se encontram inseridos e o local ao qual se destinam (Trabulsi & Alterthum, 2008). Integrons caracterizam-se como um sistema de expressão que incorporam open reading frames (ORFs) por recombinação sítio-específica e as convertem em genes funcionais devido a presença de uma sequência promotora nestes elementos (Mazel, 2006).

Esse tipo de resistência é transferido via horizontal, ocorrendo por meio dos processos de transformação, conjugação ou transdução, pelos quais as bactérias podem adquirir e incorporar aos seus materiais genéticos genes de resistência carregados por elementos móveis de transferência como os plasmídeos, transposons e/ou fagos (Davison, 1999). De modo geral, os genes de resistência podem ser transferidos entre bactérias da mesma espécie, de espécies diferentes ou de gêneros diferentes (Meays *et al.*, 2004; Eede *et al.*, 2004). Nesse contexto

torna-se preocupante a transferência de genes entre bactérias comensais e patogênicas (Davison *et al.*, 2000). Ainda as bactérias podem permutar simultaneamente genes de resistência a diversos antibióticos, estabelecendo o fenômeno da multirresistência (Radu *et al.*, 2003, Livermore, 2003).

2.4.1 Genes de resistência à oxitetraciclina

Os mecanismos de resistência à tetraciclina são efluxo das moléculas de tetraciclina, proteção ribossômica e inativação da droga.

O efluxo de tetraciclina é o principal mecanismo de resistência e é codificado pelos genes *tet* ou *otr*, encontrados em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Consiste no bombeamento das moléculas de tetraciclina para o exterior da célula bacteriana, por meio de proteínas associadas à membrana (proteínas Tet), com gasto de energia, impedindo que o antibiótico se ligue ao ribossomo. Na proteção ribossômica, as proteínas codificadas pelos genes de resistência se ligam à subunidade 30S do ribossomo, alterando a estrutura do sítio de ligação da tetraciclina e, conseqüentemente, impedindo sua ligação. Esse mecanismo não afeta a síntese protéica. A inativação da droga é um mecanismo ainda pouco esclarecido, no qual uma proteína citoplasmática é responsável pela modificação da tetraciclina na presença de oxigênio e NADPH e foi encontrada apenas em bactérias aeróbicas. Esta proteína possui uma seqüência de aminoácidos homóloga a outras oxiredutases que requerem NADPH (Speer *et al.*, 1992; Chopra & Roberts, 2001; Michalova *et al.*, 2004; Roberts, 2005). Recentemente, Forsberg *et al.* (2015), por meio da família das flavoenzimas, conseguiram a degradação da tetraciclina por via enzimática.

Diversas classes de determinantes de resistência à tetraciclina são transferidas por plasmídeos R, transposons, transposons conjugativos e integrons de classe 1. Podem ser transferidos de forma horizontal, entre bactérias com origem filogenética distante (Rhodes *et al.*, 2000; Chopra & Roberts, 2001; Schmidt *et al.*, 2001; Sørum & L'Abée-Lund, 2002; Butaye *et al.*, 2003; Michalova *et al.*, 2004; Roberts, 2005).

2.4.2 Verificação da resistência bacteriana

A organização internacional Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) é a responsável pela padronização das metodologias de determinação da susceptibilidade bacteriana a antimicrobianos, como também fornece os parâmetros de avaliação de resistência pelos métodos de disco difusão (antibiograma) e da concentração mínima inibitória (MIC). Entretanto, para bactérias provenientes de animais aquáticos, os parâmetros ainda não estão bem definidos, sendo *Aeromonas salmonicida* a única a possuir um valor de corte epidemiológico para MIC (Smith & Kronvall, 2014).

A determinação de um ponto de corte epidemiológico está baseada somente na distribuição da frequência obtida no teste de susceptibilidade *in vitro*, sem considerar valores farmacocinéticos e farmacodinâmicos do antimicrobiano no organismo (Miller & Reimschuessel, 2006). Sua função está em evidenciar e monitorar o fenômeno da resistência antimicrobiana em uma população bacteriana (Kahlmeter *et al.*, 2003; Miller & Reimschuessel, 2006; Turnidge & Paterson, 2007). É o primeiro requisito a ser exigido, entre quatro, para a determinação dos parâmetros clínicos que classificam uma bactéria, a um dado antimicrobiano, em: sensível, intermediário ou resistente (Turnidge & Paterson, 2007).

Na ausência dos parâmetros clínicos, o valor de corte epidemiológico pode ser utilizado como uma referência, por distinguir bactérias não-selvagens (non-wild type – NWT), isto é, as que apresentam algum mecanismo de resistência, das selvagens (wild-type – WT) em uma dada população. No presente trabalho, as não-selvagens serão referenciadas como resistentes e as selvagens como sensíveis.

3. OJBETIVOS

3.1. Objetivo geral

Verificar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana em dois principais gêneros bacterianos que acometem a criação de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) e detectar a presença de genes de resistência à oxitetraciclina.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a resistência *in vitro* das bactérias dos gêneros *Aeromonas* e *Streptococcus* aos antimicrobianos florfenicol e oxitetraciclina;
- Verificar a presença de genes de resistência à oxitetraciclina em cepas fenotipicamente resistentes.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Bactérias

Foram utilizadas 108 bactérias, isoladas de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) apresentando sinais clínicos sugestivos de aeromonose ou estreptococose, sendo 55 isolados e 27 cepas pertencentes ao banco do Laboratório de Microbiologia e Parasitologia em Organismos Aquáticos e 26 isolados pertencentes ao Laboratório de Enfermidades de Animais Aquáticos – Lenaq, cedidos pela Pesquisadora Científica Dra. Fabiana Garcia do Instituto de Pesca, de São José do Rio Preto – SP.

As bactérias estavam armazenadas em criotubos contendo 2 mL de caldo Brain Heart Infusion (BHI) com 20% (v/v) de glicerina. Os criotubos foram mantidos a -80°C e descongelados somente para a formação da primeira coleção de réplicas.

As Tabelas 1 e 2 apresentam a relação de bactérias utilizadas neste estudo.

Tabela 1. Isolados bacterianos de *Oreochromis niloticus* com sinais clínicos de aeromonose ou estreptococose.

Local	Ano de isolamento	Órgão	Total
Rio Paranapanema – SP/PR	2012	Rim	3
	2013	Rim	6
	2014	Encéfalo	1
		Rim	2
	2015	Encéfalo	3
		Rim	4
	2016	Encéfalo	4
		Rim	5
Rio Paraná - SP/MS	2011	Encéfalo	1
		Rim	3
	2013	Rim	10
	2014	Rim	3
	2016	Encéfalo	8
		Rim	4
Rio Tietê – SP	2014	Encéfalo	1
		Rim	2
	2015	Rim	3
	2016	Encéfalo	12
		Rim	6

Tabela 2. Cepas obtidas de *Oreochromis niloticus* com sinais clínicos de aeromonose ou estreptococose, identificadas pelo sequenciamento do gene 16S rRNA por estudo anterior.

Cepa	Local	Órgão	Ano de isolamento	Espécie	Nº de acesso
14DP	Porto Ferreira - SP	Rim	2013	<i>Aeromonas jandaei</i>	KJ561032
41FG	Rio Paranapanema –SP/PR	Rim	2012	<i>Aeromonas hydrophila</i>	KJ561023
76FG	Rio Paranapanema –SP/PR	Encéfalo	2012	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KJ561058
78FG	Rio Paranapanema –SP/PR	Encéfalo	2012	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KJ561053
79GG	Rio Paranapanema –SP/PR	Encéfalo	2012	<i>Streptococcus iniae</i>	KJ561075
81FG	Rio Paraná – SP/MS	Encéfalo	2012	<i>Streptococcus iniae</i>	KJ561076
99FG	Rio Paranapanema –SP/PR	Encéfalo	2012	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KJ561054
102FG	Rio Paranapanema –SP/PR	Encéfalo	2012	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KJ561062
103FG	Rio Paranapanema –SP/PR	Encéfalo	2012	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KJ561055
104FG	Rio Paranapanema –SP/PR	Encéfalo	2012	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KJ561057
105FG	Rio Paranapanema –SP/PR	Encéfalo	2012	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KJ561059
106FG	Rio Paranapanema –SP/PR	Encéfalo	2012	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KJ561061
110FG	Rio Paranapanema –SP/PR	Encéfalo	2012	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KJ561069
112FG	Rio Paranapanema –SP/PR	Encéfalo	2012	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KJ561072
117FG	Rio Paranapanema –SP/PR	Rim	2012	<i>Aeromonas hydrophila</i>	KJ561026
125FG	Rio Paranapanema –SP/PR	Rim	2012	<i>Aeromonas hydrophila</i>	KJ561029
128FG	Rio Paranapanema –SP/PR	Rim	2012	<i>Aeromonas hydrophila</i>	KJ561031
43P	Itambaracá - PR	Encéfalo	2011	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KJ561068
45P	Itambaracá - PR	Rim	2011	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KJ561066
64P	Itambaracá - PR	Encéfalo	2011	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KJ561071
74P	Itambaracá - PR	Encéfalo	2011	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KJ561064
A124	Arealva - SP	Encéfalo	2011	<i>Aeromonas jandaei</i>	KJ561033
A129	Arealva - SP	Rim	2011	<i>Aeromonas hydrophila</i>	KJ561018
Zo4	Guaira - SP	Encéfalo	2014	<i>Streptococcus iniae</i>	KJ561073
Zo5	Guaira- SP	Encéfalo	2014	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KJ561051
Zo7	Guaira – SP	Encéfalo	2014	<i>Streptococcus iniae</i>	KJ561074
Zo9s	Guaira – SP	Encéfalo	2014	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KJ561052

4.2. Meios de cultura

O preparo dos meios de cultura seguiu as recomendações de seus fabricantes, utilizando água destilada com pH ajustado em 7 (Adwa – AD111), com soluções de ácido clorídrico (HCl) e hidróxido de sódio (NaOH), ambas a 0,5 M. Para o processo de esterilização, os meios foram acondicionados em recipientes de vidro com tampa de rosca parcialmente abertos e submetidos a 121°C por 15 min, na pressão constante de 1 atm. As manipulações dos meios estéreis ocorreram dentro de uma cabine de fluxo laminar, previamente limpa com álcool 70% e luz ultravioleta por 30 min.

A confecção de meio ágar em placas de Petri, ocorreu com a distribuição do meio estéril em tais placas de 15mm x 90mm, estéreis e descartáveis, que permaneceram parcialmente abertas por 40 min na cabine de fluxo laminar para a completa solidificação. Posteriormente, as placas foram fechadas, agrupadas e envolvidas com filme plástico. Para meios líquidos estéreis, os tubos de ensaio foram fechados e arrefecidos dentro da cabine de fluxo laminar em temperatura ambiente. Os meios de cultura prontos para o uso foram estocados em ambiente refrigerado. Um dia anterior ao uso, esses materiais foram previamente incubados a 29°C por 24 h para assegurar a qualidade do material a ser utilizado. Na presença de alterações sugestivas de contaminação, o material era considerado impróprio e descartado.

Os detalhes da preparação de cada meio utilizado são encontrados no Apêndice A – Meios de cultura.

4.3. Cultivo bacteriano para formação de réplicas

Os criotubos das bactérias foram descongelados a 4°C. Com a alça de inoculação previamente flambada, uma amostra do caldo bacteriano foi colhida para ser semeada, pela técnica de esgotamento em estrias, em placas contendo ágar Brain Heart Infusion acrescido com 5% de sangue ovino desfibrinado (BHI-sangue). As placas semeadas foram incubadas a 29°C por 24 a 48 h.

Com o crescimento de colônias isoladas, uma a três colônias foram colhidas e inoculadas em caldo Brain Heart Infusion com glicerina a 10% (v/v), o qual

estava acondicionado em criotubos estéreis, com capacidade de 2 mL. O conteúdo de cada criotubo foi homogeneizado para a dissolução da massa bacteriana. As cópias foram congeladas a -20°C até o momento de sua utilização.

Trimestralmente, uma nova coleção era realizada, a partir da coleção anterior, para a manutenção das bactérias até o término deste estudo.

4.4. Identificação dos isolados bacterianos

Após o cultivo das 81 isolados em ágar BHI-sangue, as colônias isoladas foram submetidas a coloração de Gram. As bactérias Gram-negativas e com forma de cocos-bacilos foram submetidas ao teste da oxidase. As oxidase-positivas foram plaqueadas em ágar fenol-amido-ampicilina (Palumbo *et al.*, 1985; Silva *et al.*, 2014) pelo método de esgotamento em estrias e incubadas por 24 h a 28°C. As colônias que se apresentaram amareladas devido a hidrólise do amido foram cultivadas em ágar Triple Sugar Iron (HiMedia™) e incubadas por 24 h a 28°C (Silva *et al.*, 2014) Confirmada a formação de bisel amarelo, devido a fermentação da glicose, tais bactérias foram consideradas do gênero *Aeromonas* (Carnahan *et al.*, 1991).

Já as bactérias que se apresentaram Gram-positivas em arranjo de diplococos ou cocos em cadeia, foram submetidas ao teste da catalase. Os cultivos negativos a esse teste foram considerados do gênero *Streptococcus*.

A identificação molecular foi realizada pela reação cadeia de polimerase (PCR) diretamente de colônia, com iniciadores específicos para o gene 16S-rRNA, conforme Sebastião *et al.* (2015) (Tabela 3).

A presença dos produtos amplificados foi verificada pela eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com Nancy-520 (Sigma®), e visualizado sob luz ultravioleta. A corrida eletroforética seguiu as recomendações de Sambrook *et al.* (2001). A captura da imagem foi realizada pelo sistema usando o Transilluminator (Loccus Biotecnologia) e o programa LPIX imagem (Loccus Biotecnologia).

Tabela 3. Sequência de iniciadores para identificação das espécies, produto e temperatura de anelamento.

Gene	Iniciadores (5' – 3')	Tamanho do Produto (pb)	Temperatura de Anelamento (°C)
16S-rRNA	8F AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG 907R CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT	899	54°C

O sequenciamento foi realizado em aparelho ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems, Foster City, CA). As sequências obtidas foram visualizadas e manipuladas no programa Sequencher 5.0 (Gene Codes Corporation), no Crebio (UNESP, Jaboticabal, SP).

As sequências obtidas foram visualizadas no programa BioEdit Sequence Alignment Editor (versão 7.2.5). Por meio da ferramenta BLASTn (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PRORGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome), o formato FASTA de cada sequência foi comparado com as existentes no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), admitindo uma cobertura de 100% e identidade igual ou superior a 98%, e no RDP - Ribossomal DataBase Project II (<http://rdp.cme.msu.edu/>) (Sebastião *et al.*, 2015). As sequências deste estudo foram depositadas no banco de dados do NCBI sob os números de acesso KU605541-KU605582 e KX385275-KX385321.

4.5. Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos oxitetraciclina e florfenicol

Nesta fase, as 108 cepas dos gêneros *Aeromonas* e *Streptococcus* foram submetidas aos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos oxitetraciclina e florfenicol, através da concentração mínima inibitória (MIC) pelo método da microdiluição, conforme a norma M07-A9 da Clinical Laboratory Standards Institute (2012).

4.5.1 Solução estoque

Soluções estoques foram elaboradas na concentração de 2048 ug/mL para cada antimicrobiano. Água destilada estéril, conforme recomendação do fabricante, e etanol 95% foram utilizados como solventes para oxitetraciclina e florfenicol respectivamente (Yáñez *et al.*, 2014). O pH foi aferido (Adwa – AD111) e ajustado para 7,2 a 7,4 com soluções de HCl ou NaOH a 0,5 M. O volume final foi ajustado com água destilada estéril. As soluções estoques foram preparadas para todos os dias de testes e mantidas em frascos de vidro âmbar com rosca, previamente esterilizados.

4.5.2 Inóculo

As cepas foram cultivadas em placas contendo ágar BHI sangue, pela técnica de esgotamento em estrias, a 29°C por 24 h. Conforme o método de suspensão direta de colônias, 3 a 5 colônias isoladas foram colhidas com swab estéril e suspendidas em tubos de ensaio contendo 3 mL de solução salina a 0,85%. A turbidez dessas suspensões foi ajustada para 0,5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL), utilizando o espectrofotômetro com 1cm de fonte de luz (Shimadzu – UV mini 1240) e cubetas de quartzo, admitindo uma faixa de absorbância de 0,08 a 0,13 a 625 nm.

Para garantir a concentração final de 5×10^5 UFC/mL nos poços das microplacas de ELISA, a suspensão foi diluída 1:100 em solução salina 0,85% antes de ser utilizada.

4.5.3 Determinação da concentração mínima inibitória (MIC)

Para a realização deste teste, microplacas estéreis contendo 96 poços foram utilizadas. Para cada microplaca foi testado um antimicrobiano para cada 3 cepas bacterianas mais a cepa padrão ATCC 25922, cedida pelo Fundação Oswaldo Cruz, totalizando 24 poços/cepa. Um grupo controle constituído pelo: controle negativo (somente o meio caldo), controle positivo (meio caldo com inóculo

bacteriano) e C-teste (meio caldo com o excedente da última concentração testada) também foi realizado para verificar a ocorrência de contaminação durante o processo de diluição.

Desta maneira, 100 µL de caldo Mueller-Hinton cátions ajustados foram adicionados em cada poço. Para *Streptococcus* sp., o mesmo caldo foi utilizado, mas, previamente suplementado com 2% de sangue lisado de equino.

No primeiro poço de cada cepa testada, também foi acrescido 100 µL da solução estoque do antimicrobiano a ser estudado, obtendo-se a concentração inicial 1024 µg/mL. Com auxílio de uma pipeta multicanal, diluições seriadas de base 2 foram realizadas a partir dos poços iniciais até o vigésimo poço, o qual teve seu conteúdo excedente adicionado no poço C-teste.

Por fim, alíquotas de 100µL da suspensão bacteriana foram inoculadas, inclusive o poço do controle positivo do grupo controle, resultando em concentrações decrescentes dos antimicrobianos, variando de 512 a 0,0009765 µg/mL para oxitetraciclina e florfenicol. As microplacas foram incubadas a 28°C por 24 h. Todos os testes foram realizados em triplicata.

Após período de incubação, o valor da MIC foi determinado como a menor concentração em que não foi verificado crescimento bacteriano a olho nu. No caso de cepas de *Streptococcus*, uma solução de trifeniltetrazolio foi utilizada para melhor visualização do crescimento bacteriano. As amostras foram classificadas como sensível ou resistente de acordo com a frequência de distribuição dos valores da MIC.

4.6. Genes de resistência

Identificadas as cepas não-selvagens, a próxima etapa foi a verificação da presença dos genes de resistência à oxitetraciclina realizada através da PCR. Os genes pesquisados foram: tetA; tetE, tetL e tetM, a partir do DNA total extraído, utilizando os iniciadores da Tabela 4.

Tabela 4. Sequência dos iniciadores utilizados para detecção dos genes de resistência à tetraciclina.

Gene		Iniciadores (5' – 3')	Referência
tetA	F	GTA ATT CTG AGC ACT GTC GC	Schmidt <i>et al.</i> , 2001
	R	CTG CCT GGA CAA CAT TGC TT	
tetE	F	GTG ATG ATG GCA CTG GTC AT	Schmidt <i>et al.</i> , 2001
	R	CTC TGC TGT ACA TCG CTC TT	
tetL	F	ATA AAT TGT TTC GGG TCG GTA AT	Trzcinski <i>et al.</i> ,2000
	R	AAC CAG CCA ACT AAT GAC AAT GAT	
tetM	F	AGT TTT AGC TCA TGT TGA TG	Trzcinski <i>et al.</i> ,2000
	R	TCC GAC TAT TTA GAC GAC GG	

4.6.1 Extração e purificação do DNA total

Primeiramente, as bactérias foram cultivadas em caldo Brain Heart Infusion (BHI) a 28°C por 24 horas. A quantificação bacteriana foi verificada via espectrofotômetro (Shimadzu – UV mini 1240) a 600 nm, utilizando cubetas de quartzo e o meio de cultura estéril, caldo BHI, como branco. Foram admitidos valores de absorvância entre 0,9 a 1,0. Havendo a necessidade de diluição, o diluente utilizado foi o meio de cultura estéril.

Em seguida, tubos tipo eppendorf® estéreis de 1,5 mL foram preenchidos com a cultura bacteriana já calibrada e centrifugados a 7.500 rpm por 10 minutos. Ao final, seus sobrenadantes foram descartados.

O processo de extração e purificação foram realizados com o kit comercial DNeasy Blood & Tissue (Qiagen®), seguindo protocolo do fabricante.

O DNA extraído foi mantido a -20°C até o momento de sua utilização.

4.6.2 Avaliação da qualidade do DNA

A integridade do DNA extraído foi verificada a partir da eletroforese em gel de agarose a 0,8%, corado com Nancy-520 (Sigma®), e visualizado sob luz

ultravioleta. A captura da imagem foi realizada pelo Transilluminator (Loccus Biotecnologia) e o programa LPIX imagem (Loccus Biotecnologia).

A pureza das amostras foi mensurada através do espectrofotômetro NanoDrop® (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). A concentração do DNA foi estimada pela absorbância no comprimento de onda A260, em relação a uma amostra negativa (branco). Foram avaliadas também as relações dos comprimentos de onda A260/280 e A260/230, com a primeira estimando a contaminação por proteínas e a segunda, por sais.

Em seguida, a quantificação foi realizada pelo Qubit® 2.0 Fluorometer, de acordo com a instrução do fabricante.

4.6.3 A PCR para a detecção dos genes procurados

Para as reações da PCR foram utilizados reagentes do kit Platinum™ DNA polymerase (Invitrogen™). As proporções foram calculadas, segundo as especificações dos autores dos artigos, bem como as condições para cada ciclo foram respeitadas conforme descrito pelos autores dos iniciadores. Como controle negativo das amostras, foi utilizado água MilliQ® estéril.

5. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Para a determinação dos pontos de corte epidemiológico, foi utilizado o programa ECOFFinder XL 2010, disponibilizada no próprio site da Clinical Laboratory Standards Institute (<http://clsi.org/standards/micro/ecoffinder/>), que por meio da frequência dos valores obtidos pela concentração mínima inibitória, calcula o melhor ponto de corte para separar as sensíveis (selvagens - WT) das resistentes (não-selvagens - NWT) (Turnidge *et al.*, 2006). Para este projeto, foi considerado como sensível uma população de até 97,5% e o restante, resistente.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Identificação das espécies

Do total de 81 isolados bacterianos oriundos de tilápias apresentando sinais clínicos de aeromonose ou estreptococose, 26 foram identificados, de forma presuntiva, como *Aeromonas* sp. e 55 como *Streptococcus* sp.

Em relação aos testes bioquímicos utilizados na identificação presuntiva de *Aeromonas* sp., todas hidrolisaram o amido em meio ágar fenol-amido-ampicilina, acidificação do meio ágar TSI com ou sem produção de gás e oxidase positiva, revelando conformidade com o proposto por Palumbo *et al.* (1985); Majeed *et al.* (1990) e Saad *et al.* (1995). Esses mesmos isolados, após a identificação molecular pelo 16S-rRNA, foram quantificados como 18 cepas de *Aeromonas hydrophila*; três de *A. jandaei*; três de *A. veronii*; uma de *A. caviae* e uma de *A. veronii* bv *sobria*.

Para as amostras presuntivas de *Streptococcus*, todas as colônias apresentaram forma mucóide, catalase negativa e gama-hemólise após 48 horas de incubação. Realizada a identificação pelo 16S-rRNA, dos 55 isolados, 51 cepas foram identificadas como *S. agalactiae* e quatro cepas como *S. iniae*. A relação das cepas identificadas encontra-se na Tabela 4. Embora a beta-hemólise seja uma característica intrínseca das espécies *Streptococcus agalactiae* e *S. iniae*, a ausência de hemólise pode ocorrer (Quinn *et al.*, 2005). Segundo Lerner *et al.* (1997), a formação de hemólise depende do tipo de sangue utilizado, a natureza do meio, pH e quantidade de glicose disponível, sugerindo a observação da hemólise com o auxílio de um microscópio. Durante as análises deste estudo, a presença de hemólise foi observada a olho nu. Entretanto, a característica mucóide da colônia descrita pelo mesmo autor esteve presente em todas as amostras deste trabalho. Pretto-Giordano (2015) também verificou ausência de beta-hemólise em suas amostras de *S. iniae*.

Tabela 5. Relação das bactérias identificadas neste trabalho, provenientes de *Oreochromis niloticus* com sinais clínicos de aeromonose ou estreptococose.

ID CEPA	LOCAL	PERÍODO	ANO	ÓRGÃO	ID MOLECULAR	Nº DE ACESSO
D5R	Reservatório de Chavantes - SP	Primavera	2014	Rim	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KU605567
D6C	Reservatório de Chavantes - SP	Primavera	2014	Encéfalo	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KU605568
D6R	Reservatório de Chavantes - SP	Primavera	2014	Rim	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KU605569
D25R	Reservatório de Nova Avanhandava - SP	Primavera	2014	Rim	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KU605570
D115C	Reservatório de Nova Avanhandava - SP	Primavera	2014	Encéfalo	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KU605571
D115R	Reservatório de Nova Avanhandava - SP	Primavera	2014	Rim	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KU605572
D124R	Reservatório de Nova Avanhandava - SP	Primavera	2015	Rim	<i>Streptococcus iniae</i>	KU605573
D126R	Reservatório de Nova Avanhandava - SP	Primavera	2015	Rim	<i>Aeromonas hydrophila</i>	KU605574
D131R	Reservatório de Nova Avanhandava - SP	Primavera	2015	Rim	<i>Aeromonas hydrophila</i>	KU605575
D137R	Reservatório de Chavantes - SP	Primavera	2015	Rim	<i>Aeromonas hydrophila</i>	KU605576
D140R	Reservatório de Chavantes - SP	Primavera	2015	Rim	<i>Aeromonas veronii</i>	KU605577
D141C	Reservatório de Chavantes - SP	Primavera	2015	Encéfalo	<i>Aeromonas veronii</i>	KX385275
D142C	Reservatório de Chavantes - SP	Primavera	2015	Encéfalo	<i>Aeromonas hydrophila</i>	KU605578
D142R	Reservatório de Chavantes - SP	Primavera	2015	Rim	<i>Aeromonas hydrophila</i>	KU605579
D143C	Reservatório de Chavantes - SP	Primavera	2015	Encéfalo	<i>Aeromonas hydrophila</i>	KU605580
D143R	Reservatório de Chavantes - SP	Primavera	2015	Rim	<i>Aeromonas hydrophila</i>	KU605581
D144C	Reservatório de Chavantes - SP	Primavera	2016	Encéfalo	<i>Aeromonas hydrophila</i>	KU605582
D145C	Reservatório de Ilha Solteira - SP	Primavera	2016	Encéfalo	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KX385290
D145R	Reservatório de Ilha Solteira - SP	Outono	2016	Rim	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KX385291
D147C	Reservatório de Ilha Solteira - SP	Outono	2016	Encéfalo	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KX385292
D148C	Reservatório de Ilha Solteira - SP	Outono	2016	Encéfalo	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KX385293
D149C	Reservatório de Ilha Solteira - SP	Outono	2016	Encéfalo	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KX385294
D151C	Reservatório de Ilha Solteira - SP	Outono	2016	Encéfalo	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KX385295

ID CEPA	LOCAL	PERÍODO	ANO	ÓRGÃO	ID MOLECULAR	Nº DE ACESSO
D169C	Reservatório de Ilha Solteira - SP	Outono	2016	Encéfalo	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KX385296
D172R	Reservatório de Ilha Solteira - SP	Outono	2016	Rim	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KX385297
D174C	Reservatório de Ilha Solteira - SP	Outono	2016	Encéfalo	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KX385298
D175R1	Reservatório de Ilha Solteira - SP	Outono	2016	Rim	<i>Aeromonas veronii</i> bv <i>sobria</i>	KX385283
D177C	Reservatório de Ilha Solteira - SP	Outono	2016	Encéfalo	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KX385299
D180R	Reservatório de Ilha Solteira - SP	Outono	2016	Rim	<i>Aeromonas veronii</i>	KX385289
D187R	Reservatório de Chavantes - SP	Outono	2016	Rim	<i>Aeromonas hydrophila</i>	KX385279
D188R	Reservatório de Chavantes - SP	Outono	2016	Rim	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KX385300
D189C	Reservatório de Chavantes - SP	Outono	2016	Encéfalo	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KX385301
D189R	Reservatório de Chavantes - SP	Outono	2016	Rim	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KX385302
D191C	Reservatório de Chavantes - SP	Outono	2016	Encéfalo	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KX385303
D191R	Reservatório de Chavantes - SP	Outono	2016	Rim	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KX385304
D193C	Reservatório de Chavantes - SP	Outono	2016	Encéfalo	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KX385305
D193R	Reservatório de Chavantes - SP	Outono	2016	Rim	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KX385306
D201C	Reservatório de Nova Avanhandava - SP	Outono	2016	Encéfalo	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KX385307
D202C	Reservatório de Nova Avanhandava - SP	Outono	2016	Encéfalo	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KX385308
D202R	Reservatório de Nova Avanhandava - SP	Outono	2016	Rim	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KX385309
D203C	Reservatório de Nova Avanhandava - SP	Outono	2016	Encéfalo	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KX385310
D203R	Reservatório de Nova Avanhandava - SP	Outono	2016	Rim	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KX385311
D204C	Reservatório de Nova Avanhandava - SP	Outono	2016	Encéfalo	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KX385312
D204R	Reservatório de Nova Avanhandava - SP	Outono	2016	Rim	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KX385313
D207C	Reservatório de Nova Avanhandava - SP	Outono	2016	Encéfalo	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KX385314
D208C	Reservatório de Nova Avanhandava - SP	Outono	2016	Encéfalo	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KX385315
D209C	Reservatório de Nova Avanhandava - SP	Outono	2016	Encéfalo	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KX385316
D224C	Reservatório de Nova Avanhandava - SP	Outono	2016	Encéfalo	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KX385317

ID CEPA	LOCAL	PERÍODO	ANO	ÓRGÃO	ID MOLECULAR	Nº DE ACESSO
D234C	Reservatório de Nova Avanhandava - SP	Outono	2016	Encéfalo	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KX385318
D234R	Reservatório de Nova Avanhandava - SP	Outono	2016	Rim	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KX385319
D237C	Reservatório de Nova Avanhandava - SP	Outono	2016	Encéfalo	<i>Aeromonas hydrophila</i>	KX385277
D237R	Reservatório de Nova Avanhandava - SP	Outono	2016	Rim	<i>Aeromonas hydrophila</i>	KX385278
D239C	Reservatório de Nova Avanhandava - SP	Outono	2016	Encéfalo	<i>Aeromonas jandaei</i>	KX385284
D241C	Reservatório de Nova Avanhandava - SP	Outono	2016	Encéfalo	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KX385320
D241R	Reservatório de Nova Avanhandava - SP	Outono	2016	Rim	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KX385321
IP90.2	Reservatório de Ilha Solteira - SP	Outono	2011	Rim	<i>Aeromonas jandaei</i>	KU605541
IP101	Reservatório de Ilha Solteira - SP	Verão	2011	Encéfalo	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KU605542
IP107	Reservatório de Ilha Solteira - SP	Verão	2011	Rim	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KU605543
IP109	Reservatório de Ilha Solteira - SP	Verão	2011	Rim	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KU605544
IP113	Reservatório de Canoas II - SP	Inverno	2012	Rim	<i>Aeromonas jandaei</i>	KU605545
IP124	Reservatório de Canoas II - SP	Inverno	2012	Rim	<i>Aeromonas hydrophila</i>	KU605546
IP127	Reservatório de Canoas II - SP	Inverno	2012	Rim	<i>Aeromonas hydrophila</i>	KU605547
IP 152.2	Reservatório de Canoas II - SP	Verão	2013	Rim	<i>Aeromonas hydrophila</i>	KU605548
IP168.2	Reservatório de Canoas II - SP	Fevereiro	2013	Rim	<i>Aeromonas hydrophila</i>	KU605549
IP193	Reservatório de Canoas II - SP	Outono	2013	Rim	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KU605550
IP194.2	Reservatório de Canoas II - SP	Outono	2013	Rim	<i>Aeromonas hydrophila</i>	KU605551
IP195	Reservatório de Canoas II - SP	Outono	2013	Rim	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KU605552
IP196	Reservatório de Canoas II - SP	Outono	2013	Rim	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KU605553
IP202	Reservatório de Ilha Solteira - SP	Inverno	2013	Rim	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KU605554
IP205	Reservatório de Ilha Solteira - SP	Inverno	2013	Rim	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KU605555
IP206	Reservatório de Ilha Solteira - SP	Inverno	2013	Rim	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KU605556
IP207	Reservatório de Ilha Solteira - SP	Inverno	2013	Rim	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KU605557
IP212	Reservatório de Ilha Solteira - SP	Inverno	3013	Rim	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KU605558

ID CEPA	LOCAL	PERÍODO	ANO	ÓRGÃO	ID MOLECULAR	Nº DE ACESSO
IP213	Reservatório de Ilha Solteira - SP	Inverno	2013	Rim	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KU605559
IP214	Reservatório de Ilha Solteira - SP	Primavera	2013	Rim	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KU605560
IP215	Reservatório de Ilha Solteira - SP	Primavera	2013	Rim	<i>Streptococcus iniae</i>	KU605561
IP216	Reservatório de Ilha Solteira - SP	Primavera	2013	Rim	<i>Streptococcus iniae</i>	KU605562
IP219	Reservatório de Ilha Solteira - SP	Primavera	2013	Rim	<i>Streptococcus iniae</i>	KU605563
IP224.1	Reservatório de Ilha Solteira - SP	Verão	2014	Rim	<i>Aeromonas hydrophila</i>	KU605564
IP225.1	Reservatório de Ilha Solteira - SP	Verão	2014	Rim	<i>Aeromonas caviae</i>	KU605565
IP227	Reservatório de Ilha Solteira - SP	Verão	2014	Rim	<i>Aeromonas hydrophila</i>	KU605566

6.2. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana

Com o resultado da MIC dos antimicrobianos analisados, através da Figura 1, pode-se observar uma variação na MIC da oxitetraciclina nas cepas de *Aeromonas* entre 0,06 – 32 µg/mL, além da presença de dois grupos claramente discerníveis, evidenciando a existência do grupo mais susceptível ao antimicrobiano, concentrado na variação 0,06 - 2 µg/mL, abrangendo 90,9% do total de cepas analisadas, e do grupo menos susceptível representado pelas três cepas de concentração 32µg/mL.

Do total de cepas de *A. hydrophila* 30,4% das cepas apresentaram uma MIC de 0,5 µg/mL. Ao comparar este resultado com os da literatura para peixes enfermos, este pode ser considerado baixo. Maisak *et al.* (2013), obtiveram uma MIC de 2 µg/mL. O mesmo foi observado por Pereira Júnior *et al.* (2006), com 1,56 µg/mL.

Ao confrontar este resultado com o padrão designado para humanos, segundo Norma M100–S22 da Clinical Laboratory Standards Institute (2012) para Enterobacteriaceae, 90,9% das cepas do gênero *Aeromonas* foram sensíveis à oxitetraciclina, por apresentar valor menor ou igual a 4 µg/mL. Por outro lado, o valor de corte epidemiológico para o mesmo grupo foi menor, com 2 µg/mL, ou seja, as cepas que apresentaram valor de MIC superior ao mencionado foram consideradas não-selvagens.

Ainda em relação às *Aeromonas*, este grupo apresentou uma variação menor quando submetido ao florfenicol, entre 0,125 – 1 µg/mL, como observado na Figura 2. Houve prevalência de cepas de *A. hydrophila* com MIC igual a 1 µg/mL. Essa concentração é considerada alta quando comparada com o valor obtido por Schrader *et al.* (2013), com 0,04 µg/mL. Entretanto, Godoy *et al.* (2008) obtiveram 65,2% das amostras analisadas prevalecendo na mesma concentração deste estudo.

Na análise com padrão humano, o valor de referência é maior que 32 µg/mL, caracterizando todas as amostras como sensíveis ao florfenicol. O valor de corte epidemiológico foi estimado em 4 µg/mL, porque não foi obtido uma distribuição logarítmica normalizada (Turnidge & Paterson, 2007), representado pelas crescentes frequências do gráfico.

Para as bactérias do gênero *Streptococcus*, pode-se observar na Figura 3, que a variação ocorreu entre 0,2 a 1 µg/mL de oxitetraciclina, com prevalência na concentração 0,06 µg/mL. Faria *et al.* (2014) obtiveram o dobro desse valor para isolados de *S. agalactiae*. Maisak *et al.* (2013) obtiveram um valor de MIC igual a 0,5 µg/mL.

Ao comparar com o padrão humano, todas as cepas deste estudo foram sensíveis à oxitetraciclina. Já os cálculos para o corte epidemiológico ficaram em 0,25 µg/mL.

Na Figura 4, observa-se variação para o grupo dos *Streptococcus* ao florfenicol entre 0,125 – 1 µg/mL, com maior prevalência bacteriana na concentração 0,5 µg/mL. A literatura à respeito da MIC para isolados de *Streptococcus* sp em peixes ainda é escassa, todavia, Godoy (2006) obteve variação entre 1 - 16 µg/mL, com maior prevalência ocorrendo na mesma concentração obtida neste trabalho. Em relação ao padrão humano, todas as bactérias deste grupo foram susceptíveis ao antimicrobiano testado, pois mostraram valores de MIC abaixo de 16 µg/mL. O padrão de corte epidemiológico foi mais uma vez estimado em 2 µg/mL, pelo mesmo motivo apresentado anteriormente, ou seja, a não normalização da distribuição das frequências (Turnidge & Paterson, 2007).

O comportamento normalizado verificado pela distribuição logarítmica das frequências para oxitetraciclina quando comparado ao florfenicol, para ambos os gêneros bacterianos do presente estudo, pode estar relacionado ao maior uso desse antimicrobiano, principalmente por ser um produto mais acessível economicamente.

Outro fator a ser considerado está no uso indiscriminado de antimicrobianos. De acordo com o histórico de cada antimicrobiano, o grupo das tetraciclina apresentou lançamento comercial entre 1950 a 1970 (Pereira-Maia *et al.*, 2010). Nos meados dos anos 1950, a maioria das bactérias comensais e patogênicas mostravam-se susceptíveis à tetraciclina, mas em 1953, foi isolada a primeira bactéria tetraciclina resistente, *Shigella dysenteriae*, e após 2 anos, a primeira *Shigella* multidroga resistente (Chopra & Roberts, 2001). No Chile, já há relatos de resistência bacteriana e multidroga resistente de isolados de salmão para oxitetraciclina (Miranda & Zemelman, 2002a,b). Em 1994, o florfenicol foi licenciado para tratamento de infecções bacterianas na produção de salmão do

Chile e, após 13 anos, já foi registrada a presença de bactéria resistente ao florfenicol oriundo da produção de salmão (Miranda & Rojas, 2007).

No Brasil, o uso da oxitetraciclina em aquicultura é direcionado às bactérias gram-negativas. Isso pode explicar a alta variação encontrada em *Aeromonas* para tal antimicrobiano no presente estudo. Estudos na área de ecotoxicologia vêm constatando a presença dessa molécula na água e sedimento de pisciculturas (Björklund *et al.*, 1990; Jacobsen & Berglind, 1998; Ding & He, 2010; Marshall & Levy, 2011; Monteiro *et al.*, 2016). Isso estaria elevando a pressão de seleção de cepas mais resistentes (Cabello *et al.*, 2013), conseqüentemente, maior será o aparecimento de bactérias resistentes com valor de concentração mínima inibitória alto.

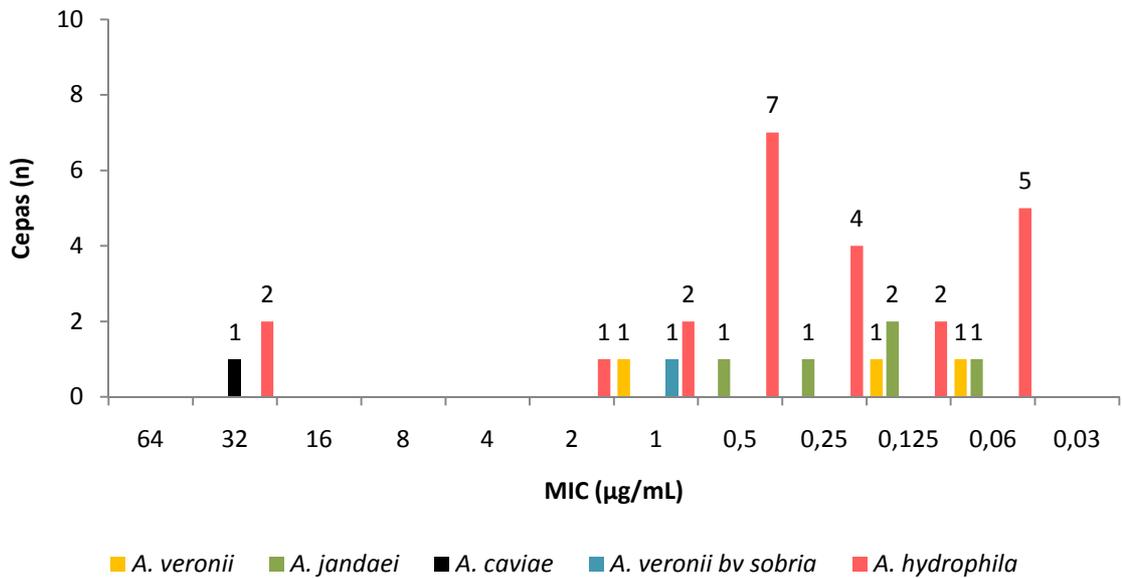


Figura 1. Distribuição da concentração mínima inibitória da oxitetraciclina para o grupo de *Aeromonas*.

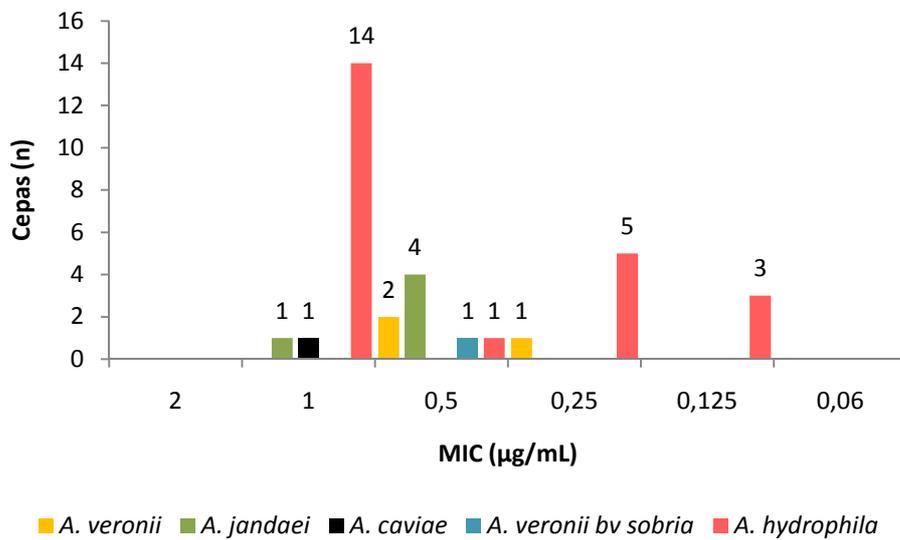


Figura 2. Distribuição da concentração mínima inibitória do florfenicol para o grupo de *Aeromonas*.

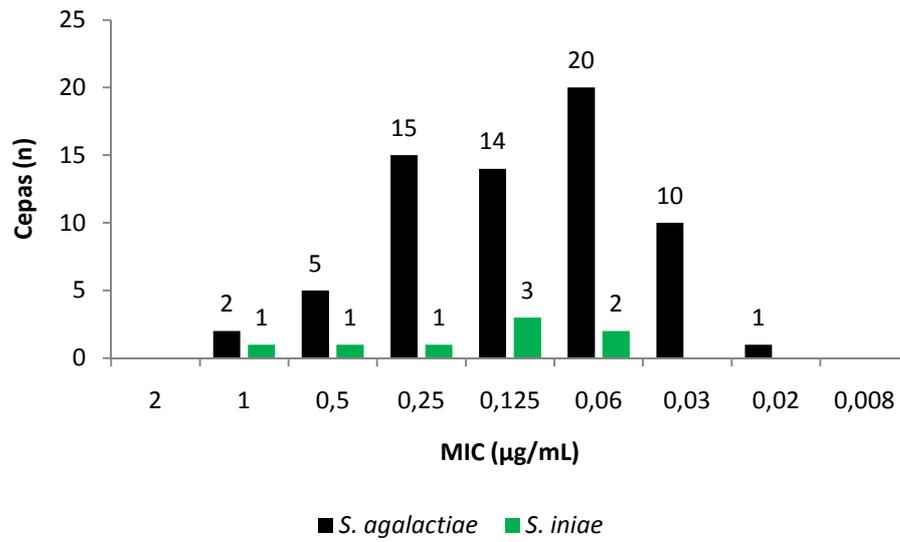


Figura 3. Distribuição da concentração mínima inibitória da oxitetraciclina para o grupo de *Streptococcus*

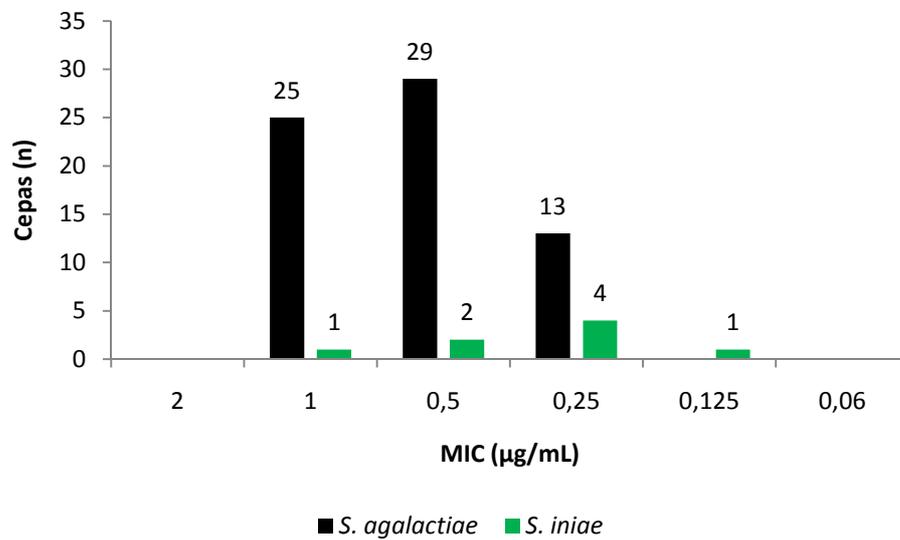


Figura 4. Distribuição da concentração mínima inibitória do florfenicol para o grupo de *Streptococcus*.

6.3. Detecção de genes de resistência

Uma vez estabelecido o ponto de corte epidemiológico das *Aeromonas* para o antimicrobiano oxitetraciclina, as cepas IP 225, FG125 e FG 128 foram escolhidas para a detecção dos genes de resistência tetA e tetE.

Nas três amostras analisadas, todas apresentaram amplificação para os iniciadores tetA, conforme observado na Figura 5, como relatado por Akinbowale *et al.* (2007), com a formação de bandas ao redor dos 1000 pares de base.

Do mesmo modo, as cepas de *Streptococcus* 79FG, 103FG, IP193, IP207, IP212, IP214, D201C, 43P e Z04, definidas pelo seu respectivo ponto de corte epidemiológico para oxitetraciclina como cepas resistentes, foram selecionadas para a detecção dos genes de resistência tetL e tetM. No total, das nove cepas, 6 apresentaram amplificação para os iniciadores tetL (Figura 6), ao redor de 1077 pares de base, conforme Trzcinski *et al.*(2000).

Os genes tetE e tetM não foram detectados neste estudo.

De acordo com e Schmidt *et al.*, (2001), Balassiano *et al.*, (2007), os genes tetA e tetE são os mais encontrados em *Aeromonas*, assim como o tetL e tetM, em *Streptococcus* (Chopra & Roberts, 2001, Roberts, 2005).

A provável detecção dos genes tetA e tetL em peixes é mais uma evidência das consequências da presença da oxitetraciclina no ambiente, aumentando da pressão de seleção (Buschman *et al.*, 2012, Cabello *et al.*, 2013). A presença da molécula no ambiente aquático pode ocorrer pelo próprio tratamento, uma vez que o antimicrobiano é incorporado na ração e ofertado aos peixes (Jacobsen & Berglund, 1988; Björklund *et al.*, 1990), além de uma fração entre 80% do total de ração consumido pelo peixe não ser absorvido, sendo excretada de forma inalterada pelo animal (Cabello *et al.*, 2013). No Brasil, a oxitetraciclina também é utilizada como bactericida em diversas cultivares como tomate, batata, feijão, pepino, café, pêssego, ameixa e pimenta (ANVISA, 1985), além de ser muito utilizada no tratamento de infecções bacterianas em animais de produção. Nesse contexto, a molécula pode contaminar o solo e alcançar a água subterrânea e conferir resistência aos microorganismos da água (Liu *et al.*, 2009; Boxall *et al.*, 2006).

Tais genes estão relacionados com proteínas de efluxo da superfamília dos facilitadores maioritários (Major facilitator superfamily - MFS) e ambos são transmitidos via plasmídio (Chopra & Roberts, 2001), possibilitando a transmissão horizontal, tornando vulnerável o setor da saúde pública (L'abée-Rhodes & Sørum, 2001; Miranda *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2012; Miranda *et al.*, 2013; Hedayatianfard *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2014).

Outro fator que também deve ser exposto é o questionamento da prática empregada na produção de tilápia-do-Nilo. Atualmente, a tendência de utilização de tanques-rede de grande volume estaria propiciando uma maior densidade de estocagem por tanque. Entretanto, Resende (2009) já ressaltava a importância de formas alternativas de prevenção para contribuir com a resistência do animal, reduzindo o uso de antimicrobianos e quimioterápicos. Como exemplo, Garcia *et al.* (2013) ao diminuírem a densidade de estocagem de tilápias criadas em tanques-rede de 6m³ obtiveram resultados satisfatórios como a diminuição de incidência de bacterioses e do tempo de cultivo.

Diante o exposto, medidas que mitiguem a utilização de antimicrobianos não só na aquicultura, mas também em outras áreas de produção devem ser mais pesquisadas. A questão de resistência bacteriana mostra-se como uma atividade multidisciplinar, sendo a parte mais beneficiada, com a redução de resistência, a própria espécie humana.

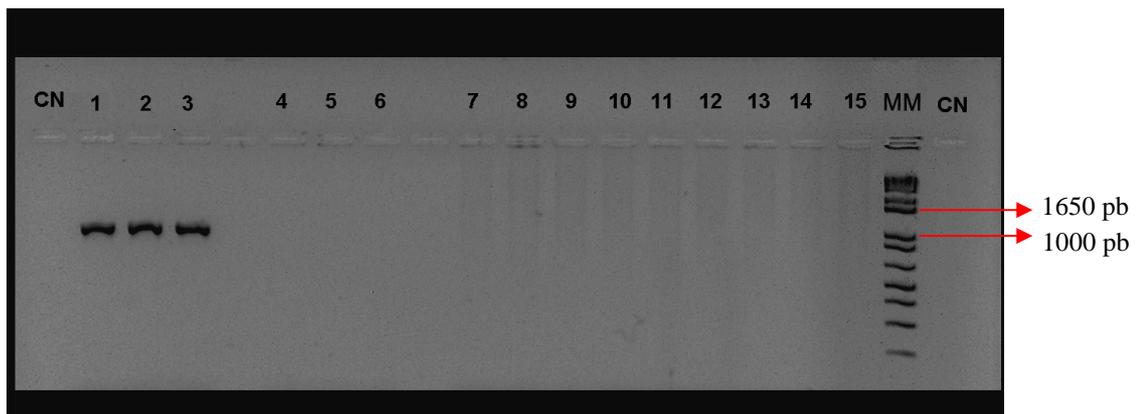


Figura 5. Produto da PCR positivo para o gene tetA e negativo para tetE e tetM. CN: Controle Negativo; 1: IP225; 2: FG125, 3: FG128; 4: IP225 para tetE; 5: FG125 para tetE; 6: FG128 para tetE. 7: D201C para tetM; 8: IP193 para tetM; 9: FG103 para tetM; 10: IP214 para tet M; 11: IP207 para tetM ; 12: IP212 para tet M ; 13: FG79 para tetM;14: 43P para tetM; 15: Z04 para tetM; MM: Marcador de peso molecular 1000 pb.

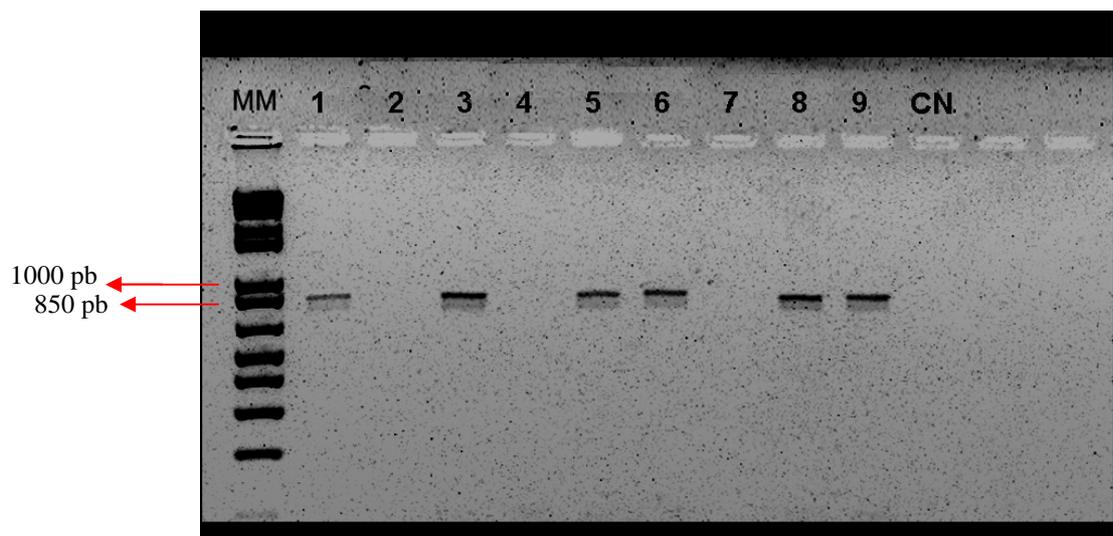


Figura 6. Produto da PCR positivo para o gene tetL. MM: Marcador de peso molecular 1000pb; 1: D201C; 2: IP193; 3: FG103; 4: IP214; 5: IP207; 6: IP212; 7: FG79; 8: 43P; 9: Z04; CN: Controle Negativo.

7. CONCLUSÕES

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

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

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

8. REFERÊNCIAS

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

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

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

- Deng YT, Wu YL, Tan AP, Huang YP, Jiang L, Xue HJ, Wang WL, Zhao F (2014) Analysis of antimicrobial resistance genes in *Aeromonas* spp. isolated from cultured freshwater animals in China. *Microb Drug Resist* 4:350-356.
- Ding C, He J (2010) Effect of antibiotics in the environment on microbial populations. *Appl Microbiol Biotechnol* 87:925-941.
- Eede G van den, Aarts H, Buhk HJ, Corthier G, Flinte HJ, Hammes W, Jacobsen B, Midtvedt T, Vossen J van der, Wright A, Wackernabel W, Wilcks A (2004) The relevance of gene transfer to the safety of food and feed derived from genetically modified (GM) plants. *Food Chem Toxicol* 42:1127-1156.
- Evans JJ, Klesius PH, Pasnik D, Bohnsack J.F (2009) Human *Streptococcus agalactiae* isolate in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Emerg Infect Dis* 15:774-776.
- Facklam R (2002) What happened to the *Streptococci*: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin Microbiol Ver* 15:613-630.
- Facklam R, Elliott J, Shewmaker L, Reingold A (2005) Identification and characterization of sporadic isolates of *Streptococcus iniae* isolated from humans. *J Clin Microbiol* 43:933-937.
- Faria FC, Leal CAG, Carvalho-Castro GA, Leite RC, Figueiredo HCP (2014) Carrier state induced by ocytetracycline therapy against streptococcosis in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *J Fish Dis* 37:853-857.
- Figueiras MJ, Suarez-Franquet A, Chacon MR, Soler L, Navarro M, Alejandre C, Grasa B, Martinez-Murcia AJ, Guarro J (2005) First Record of the rare species *Aeromonas culicicola* from a drinking water supply. *Appl Environ Microbiol* 7:538-541.
- Figueiredo HCP, Carneiro DO, Faria FC, Costa GM (2006) *Streptococcus agalactiae* associado à meningoencefalite e infecção sistêmica em tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil. *Arq Bras Med Vet Zootec* 58: 678-680.
- Figueiredo HCP, Leal CAG (2008) Tecnologias aplicadas em sanidades de peixes. *R Bras Zootec* 37:8-14.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO (2013) Fishery and aquaculture statistics 2011 FAO, Rome, Italy.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO (2012) The state of world fisheries and aquaculture 2012 FAO, Rome, Italy.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

APÊNDICES

Apêndice A – Meios de Cultura

1. Brain Heart Infusion (BHI)

Por ser considerado um meio rico, o caldo Brain Heart Infusion (HiMedia™) foi empregado no cultivo de cepas do gênero *Streptococcus* (Meher Shahi, 2015) para a extração do DNA. Seu preparo ocorreu de acordo com as normas do fabricante. Os meios prontos foram embalados com filme plástico e armazenados sob refrigeração.

2. Brain Heart Infusion Sangue (BHI-Sangue)

Para a obtenção de réplicas bacterianas, o ágar Brain Heart Infusion (BHI) (HiMedia™), acrescido com 5% de sangue ovino desfibrinado (BHI-sangue) foi utilizado. O sangue foi colhido de ovinos saudáveis, com a anti-sepsia prévia do local com álcool 70%, via punção jugular com agulhas 1,20x40mm e seringas com capacidade de 60 mL, todas descartáveis e estéreis (BD™). Uma garrafa de vidro com tampa, contendo pérolas de vidro na proporção de 0,16 g/L de sangue, anteriormente esterilizada, foi utilizada para receber o material colhido e manualmente agitada, após seu fechamento, por 15 minutos para a desfibrinação (Barbosa *et al.*, 2002). O recipiente contendo o ágar BHI, já preparado e estéril, foi fechado para ser arrefecido em temperatura ambiente até 45°C em cabine de fluxo laminar. Em seguida, ocorreu a adição do sangue desfibrinado, na proporção de 5 mL para cada 100 mL de meio ágar BHI preparado. Após a homogeneização, iniciou-se o processo de confecção de placas de Petri.

3. Fenol-Amido-Ampicilina

No processo de identificação presuntiva dos isolados bacterianos do gênero *Aeromonas*, um dos meios empregados foi o ágar fenol-amido-ampicilina (Palumbo *et al.*, 1985).

Para a elaboração de 1000 mL do meio fenol-amido-ampicilina, o mesmo volume foi utilizado de caldo Red Phenol (HiMedia™) preparado de acordo as instruções do fabricante, acrescido de 10 g de Amido P.A. (Nuclear) e 13 g de ágar-ágar (Merck™). Após o processo de esterilização, o recipiente contendo o ágar Red Phenol foi fechado e o meio arrefecido em temperatura ambiente até 45°C em cabine de fluxo laminar. Posteriormente, foi adicionado o antimicrobiano ampicilina (Sigma™), preparado segundo instruções do fabricante, na concentração 10µg/mL. Por fim, placas de Petri contendo o meio elaborado foram preparadas, conforme explicado nos procedimentos gerais.

4. Triple Sugar Iron (TSI)

Este meio foi útil no processo de identificação presuntiva dos isolados sugestivos de *Aeromonas* sp. (Palumbo *et al.*, 1985; Silva *et al.*, 2014).

Após o preparo do meio TSI, conforme orientação do fabricante, 5 mL foram acondicionados em tubos de ensaio com tampa, parcialmente fechados, que foram submetidos ao processo de esterilização. Em seguida, os tubos de ensaio foram inclinados para a solidificação do ágar em forma de bisel na cabine de fluxo laminar e, após 1 hora, os recipientes foram fechados e armazenados em ambiente refrigerado.

5. Mueller-Hinton com cátions ajustados (CAMBH)

Para verificar a concentração mínima inibitória dos antimicrobianos testados, o meio caldo Mueller-Hinton (Difco™) com cátions ajustados (CAMBH) foi utilizado (CLSI, 2012).

Soluções padrão de íons magnésio e íons cálcio, ambas na concentração de 10 mg de íon/mL, foram preparadas, da seguinte forma: para 100 mL de água destilada estéril em pH 7, foram adicionando 8,36 g de cloreto de magnésio hexahidratado (MgCl₂.6H₂O) (Synth®) para a solução padrão de íons magnésio e 3,68g de cloreto de cálcio dihidratado (CaCl₂.2H₂O) (Synth®) para a solução

padrão de íons cálcio . As soluções foram filtradas e armazenadas em recipientes de vidro com tampa de rosca e mantidas em ambiente refrigerado até o momento de serem utilizadas.

Em seguida, foram ajustados os íons cálcio e magnésio na seguinte proporção: 0,1mL de solução padrão fria de cálcio ou magnésio por litro de caldo, para cada incremento de 1 mg/L desejado na concentração final do caldo Mueller-Hinton ajustado. O produto final homogeneizado e mantido refrigerado até o momento de sua utilização.

6. Mueller-Hinton com cátions ajustados com sangue (CAMHB-Sangue)

O meio CAMHB suplementado com 2,5% de sangue de equino lisado (CAMHB-sangue) foi utilizado no para verificar a concentração mínima inibitória de cepas de *Streptococcus* sp. (CLSI, 2012).

Para a obtenção do sangue lisado, primeiramente, o sangue equino foi colhido e defibrinado conforme o processo já descrito anteriormente para sangue ovino. O produto final foi congelado a -20°C e descongelado em temperatura ambiente por cinco vezes, para a lise das hemácias. Com o sangue descongelado e homogeneizado, 25 mL foram depositados em tubos tipo Falcon® estéreis de 50 mL para, em seguida, serem adicionados mais 25 mL de água destilada estéril. Essa mistura foi homogeneizada e os tubos centrifugados a 5000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi retirado por meio de pipeta com ponteira estéril e armazenado em tubos tipo Falcon® estéreis de 50 mL a -20°C por até 2 meses.

Após o preparo do meio caldo CAMHB, já esterilizado e esfriado a 45°C, o sangue lisado de equino, já descongelado a temperatura ambiente, foi adicionado na proporção de 2,5 mL de sangue lisado para cada 100 mL de caldo CAMHB preparado. O meio CAMHB-sangue era preparado para ser utilizado no mesmo dia.

7. Tryptone Soya Agar (TSA) ou Tryptone Soya Broth (TSB)

O meio tryptone soya tanto em sua forma em ágar (TSA) como em caldo (TSB) (HiMedia™) foi empregado somente para crescimento de cepas do gênero *Aeromonas* (Zhang *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2013a) e sua elaboração seguiu as recomendações do fabricante. Os meios prontos foram então envoltos com filme plástico e armazenados em ambiente refrigerado.

Apêndice B – Aprovação do Comitê de Ética



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “**Perfil de resistência à antimicrobianos de *Aeromonas sp.* e *Streptococcus sp.* isolados de tilápia-do-Nilo e detecção dos genes envolvidos na resistência à tetraciclina**”, protocolo nº 6.265/16, sob a responsabilidade da Prof.^a Dr.^a Fabiana Pilarski, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 04 de maio de 2016.

Vigência do Projeto	12/05/2016 a 10/03/2017
Espécie / Linhagem	Bactérias dos gêneros <i>Aeromonas</i> e <i>Streptococcus</i>
Nº de animais	124 isolados bacterianos
Peso / Idade	-
Sexo	-
Origem	Do próprio banco de cepas do laboratório

Jaboticabal, 04 de maio de 2016.


Profª Drª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n - 14884-900 - Jaboticabal - SP - Brasil
tel 16 3209 2600 fax 3202 4275 www.fcav.unesp.br