

**CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE  
OXITETRACICLINA E ÁCIDO OXOLÍNICO  
FRENTE ÀS AEROMONAS MÓVEIS NA  
AQUICULTURA**

**GLÁUCIA FRASNELLI MIAN**

**2006**

**GLÁUCIA FRASNELLI MIAN**

**CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE  
OXITETRACICLINA E ÁCIDO OXOLÍNICO  
FRENTE ÀS AEROMONAS MÓVEIS NA  
AQUICULTURA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação “Stricto Sensu” em Ciências Veterinárias para a obtenção do título de “Mestre”.

**Orientador**

**Prof. Dr. Henrique César Pereira Figueiredo**

**LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2006**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos  
Técnicos da**

**Biblioteca Central da UFLA**

Mian, Gláucia Frasnelli

Concentração inibitória mínima de antibióticos usados em aquicultura frente às aeromonas móveis / Gláucia Frasnelli Mian. – Lavras : UFLA, 2006.

65 p. : il.

Orientador: Henrique César Pereira Figueiredo

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Peixe. 2. MIC. 3. Antibiótico. 4. Resistência. 5. Aeromonas móveis. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-639.3

**GLÁUCIA FRASNELLI MIAN**

**CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE  
OXITETRACICLINA E ÁCIDO OXOLÍNICO FRENTE ÀS  
AEROMONAS MÓVEIS NA AQUICULTURA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação “Stricto Sensu” em Ciências Veterinárias para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 17 de fevereiro de 2006

Prof. Dr. Rômulo Cerqueira Leite	UFMG
Profa. Dr. Rosane Freitas Schwan	UFLA
Prof. Dr. Rodrigo Costa Mattos	UFRGS
Prof. Dr. Antônio Marcos Guimarães	UFLA

**Prof. Dr. Henrique César Pereira Figueiredo**  
**UFLA**  
**(Orientador)**

**LAVRAS**  
**MINAS GERAIS - BRASIL**

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que sempre foram essenciais em minha vida. Ao meu esposo, Guilherme pela compreensão, paciência e colaboração e a minha filha, Bianca que mudou nossas vidas.

Ao Professor Henrique César Pereira Figueiredo, pela confiança e orientações, passando ensinamentos que levaram à execução deste trabalho, bem como pela amizade e paciência.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Aos Professores Rômulo Cerqueira Leite, Rodrigo Costa Mattos, Rosane Freitas Schwan, Antônio Marcos Guimarães, pelas sugestões e correções.

Ao AQUAVET-Laboratório de Doenças de Animais Aquáticos, da Universidade Federal de Lavras, pelo apoio incondicional na execução do experimento.

Aos Professores da Universidade Federal de Lavras, Gabriela Rodrigues Sampaio, Geraldo Márcio da Costa e Adriana Mello Garcia Rabelo, pelos conselhos, ensinamentos e amizade.

À aluna de pós-graduação Daniela Tupy Godoy, à aluna de graduação Thaís Yumi Yuhara e à técnica de laboratório Dirceia Aparecida Costa Custódio, pela colaboração e grande ajuda na execução da parte prática dessa dissertação.

Aos amigos Daniela Carvalho, Miriam de Andrade Pereira, Daniela Tupy Godoy, Halan Deny Dal Pupo, Delton José Pereira Júnior, Fernanda Lourenço, Rejeana Lima e Daniela Oliveira, pela amizade e companheirismo.

## SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Situação da aqüicultura no Brasil.....	3
2.2 Aeromonas móveis.....	4
2.2.1 Infecção por aeromonas móveis em peixes.....	6
2.3 Principais antibióticos utilizados em piscicultura.....	7
2.3.1 Tetraciclina: modo de ação.....	8
2.3.2 Quinolonas: modo de ação.....	10
2.4 Resistência bacteriana aos antibióticos em ambientes aquáticos.....	12
2.4.1 Resistência a tetraciclina.....	15
2.4.2 Resistência a quinolonas.....	17
2.5 Concentração inibitória mínima (MIC): conceitos e métodos.....	17
2.5.1 Interpretação dos valores de MIC.....	20
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1 Bactérias utilizadas.....	22
3.2 Antibióticos.....	23
3.2.1 Oxitetraciclina.....	23
3.2.2 Ácido oxolínico.....	23
3.3 Concentração inibitória mínima.....	24
3.3.1 Meio de cultura.....	24
3.3.2 Inóculo.....	24
3.3.3 Determinação da concentração inibitória mínima de oxitetraciclina e ácido oxolínico.....	25
3.4 Observação dos resultados.....	25
3.5 Controle de qualidade e validação dos testes.....	26
3.6 Interpretação dos valores MIC obtidos.....	26
4 RESULTADOS.....	28
4.1 Controle de qualidade dos testes de MIC.....	28
4.2 Concentração inibitória mínima de oxitetraciclina para aeromonas móveis.....	28
4.3 Concentração inibitória mínima de ácido oxolínico para aeromonas móveis.....	39
5 DISCUSSÃO.....	50
5.1 Perfil de resistência para as variáveis analisadas.....	51
5.2 Potenciais dos antibióticos avaliados para a piscicultura.....	54
6 CONCLUSÃO.....	56

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
-----------------------------------	----

## ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 Isolados de <i>Aeromonas</i> spp. selecionados para determinação da concentração inibitória mínima por origem geográfica.....	22
TABELA 2 Concentração inibitória mínima (MIC) de oxitetraciclina para os isolados de aeromonas móveis oriundos de água e de casos clínicos de septicemia em peixes, de diferentes regiões geográficas.....	29
TABELA 3 Concentração Inibitória Mínima (MIC) de ácido oxolínico para os isolados de aeromonas móveis oriundos de água e de casos clínicos de septicemia hemorrágica, de diferentes regiões geográficas.....	40

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 Estrutura química das tetraciclínas.....	09
FIGURA 2 Estrutura química das principais quinolonas.....	11
FIGURA 3 Distribuição de concentrações inibitórias mínimas de oxitetraciclina para isolados de aeromonas móveis.....	34
FIGURA 4 Distribuição de concentrações inibitórias mínimas de oxitetraciclina para isolados de aeromonas móveis oriundas de águas de cultivo e casos clínicos de septicemia hemorrágica....	35
FIGURA 5 Distribuição de concentrações inibitórias mínimas de oxitetraciclina para isolados de <i>Aeromonas caviae</i> .....	36
FIGURA 6 Distribuição de concentrações inibitórias mínimas de oxitetraciclina para isolados de <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	37
FIGURA 7 Distribuição de concentrações inibitórias mínimas de oxitetraciclina para isolados de <i>Aeromonas sobria</i> .....	37
FIGURA 8 Distribuição de concentrações inibitórias mínimas de oxitetraciclina para isolados de aeromonas móveis em relação aos valores simulados de “Breakpoints” .....	38
FIGURA 9 Distribuição de concentrações inibitórias mínimas de ácido oxolínico para isolados de aeromonas móveis.....	45

FIGURA 10 Distribuição de concentrações inibitórias mínimas de ácido oxolínico para isolados aeromonas móveis oriundos de águas de cultivo e casos clínicos de septicemia hemorrágica.....	46
FIGURA 11 Distribuição de concentrações inibitórias mínimas de ácido oxolínico para isolados de <i>Aeromonas caviae</i> .....	47
FIGURA 12 Distribuição de concentrações inibitórias mínimas de ácido oxolínico para isolados de <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	47
FIGURA 13 Distribuição de concentrações inibitórias mínimas de ácido oxolínico para isolados de <i>Aeromonas sobria</i> .....	48
FIGURA 14 Distribuição das concentrações inibitórias mínimas de ácido oxolínico para isolados de aeromonas móveis em relação aos valores de simulação de “Breakpoints” .....	49

## RESUMO

MIAN, Gláucia Frasnelli. **Concentração inibitória mínima de antibióticos usados em aqüicultura frente as aeromonas móveis** 2006. 66 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG\*.

As bactérias do gênero *Aeromonas* são ubíquas em ambientes aquáticos, associadas a doenças em peixes e seres humanos. São bastonetes Gram-negativos, pertencentes à família Vibrionaceae podendo também servir de fonte de elementos genéticos móveis carreadores de genes de resistência a antibióticos. No Brasil, não se conhece o nível de resistência à oxitetraciclina e ao ácido oxolínico nas aeromonas móveis. O objetivo deste trabalho foi determinar a concentração inibitória mínima (MIC) de antibióticos para isolados de aeromonas móveis (*Aeromonas hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria*) oriundos de água de cultivo de peixes e de casos clínicos de septicemia hemorrágica. Para a determinação do MIC, 120 isolados de aeromonas móveis foram utilizados. A metodologia empregada foi a microdiluição em caldo, de acordo com as recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute, (CLSI, 2005). Para a oxitetraciclina 83,33% dos isolados agruparam-se em valores de MIC  $\leq 0,97\mu\text{g/mL}$ , sendo considerados sensíveis, enquanto 16,67% agruparam-se nos valores de MIC  $\geq 31,25\mu\text{g/mL}$  (resistentes). Já para o ácido oxolínico, foram encontrados isolados resistentes com MIC  $\geq 0,195\mu\text{g/mL}$  (10,8% dos isolados). Os valores de MIC frente à oxitetraciclina apresentaram uma distribuição bimodal em todas variáveis estudadas. Já para o ácido oxolínico, a distribuição foi polimodal na análise dos isolados em conjunto, na comparação das fontes e para as espécies *A. hydrophila* e *A. caviae*, sendo bimodal para *A. sobria*.

---

\*Comitê Orientador: Henrique César Pereira Figueiredo – UFLA (Orientador),  
Adriana Mello Garcia Rabelo - UFLA (Co-orientadora)

## ABSTRACT

MIAN, Gláucia Frasnelli. Minimal inhibitory concentration of antibiotics used in aquaculture in face of Motile Aeromonads. 2006. 66p. Dissertation (Master in Veterinary Sciences) - Federal University of Lavras, Lavras, MG\*

The bacteria of the genus *Aeromonas* are ubiquitous in aquatic environments and associated with diseases in fishes and human beings. Are Gram-negative rods, belong to the family Vibrionaceae and can be a source of the mobile genetic elements carrying antibiotics resistance genes. In Brazil, the profile of resistance to oxytetracycline and to oxolinic acid in motile aeromonads is unknown. The objective of this work was to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) for isolates of motile aeromonads (*Aeromonas hydrophyla*, *A. caviae*, *A. sobria*) obtained from fish culture water and from clinical cases of hemorrhagic septicaemia. For determination of MIC, 120 isolates of motile aeromonads were used. The methodology utilized for determination of MIC was the broth microdilution in according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2005). For oxytetracycline, 83,33% those isolates were grouped in MIC values  $\leq 0.97 \mu\text{g/mL}$ , and were considered sensitive, whereas 16.67% were grouped in MIC values  $\geq 31.25 \mu\text{g/mL}$  (considered as resistant). For the oxolinic acid, resistant isolates with MIC  $\geq 0.195 \mu\text{g/mL}$  (10.8% of the isolates) were found. The MIC values for oxytetracycline presented bimodal distribution for all sources analyzed. For the oxolinic acid, the MIC values presented a polymodal distribution for all sources and species analyzed, except for *A. sobria*, which presented a bimodal profile.

---

\*Guidance Committee: Henrique César Pereira Figueiredo – UFLA (Adviser),  
Adriana Mello Garcia Rabelo - UFLA (Co-adviser)

## 1 INTRODUÇÃO

A aqüicultura brasileira e as atividades comerciais ligadas a ela vêm apresentando um crescimento acelerado nos últimos anos, devido às condições climáticas e geográficas que favorecem o cultivo de peixes em nosso país, sendo apontadas como mercados estratégicos para o desenvolvimento sustentável.

Observa-se, cada vez mais, o aumento de espécies de peixes cultivadas no Brasil, sendo os cultivos semi-intensivo e extensivo os tipos de sistemas predominantes. O uso do sistema intensivo tem aumentado nos últimos anos, sendo empregado em altas densidades populacionais, favorecendo o aparecimento de doenças nos peixes.

Entre os microrganismos patogênicos aos peixes, as aeromonas móveis têm assumido, nos últimos anos, uma posição importante, devido à sua ocorrência como emergente agente causador de doenças e pelo fato de estarem envolvidas em relatos de resistência a antibióticos. São microrganismos ubíquos em água doce, sendo a antibioticoterapia a forma mais eficiente e disponível até o momento para o controle da doença.

O número de antibióticos usados na piscicultura é limitado devido ao custo das drogas para o tratamento de grandes populações, bem como à forma de administração. A via oral é a mais comumente utilizada com o antibiótico incorporado à ração, o qual não deve alterar a palatabilidade do alimento. Assim, a oxitetraciclina e o ácido oxolínico são drogas muito utilizadas na piscicultura por atenderem a estes critérios.

É crescente a preocupação com o aumento da resistência bacteriana aos antibióticos usados na piscicultura e com a transferência de genes de resistência em ecossistemas aquáticos. Não se conhecem, no Brasil, os níveis de resistência ao ácido oxolínico e à oxitetraciclina em aeromonas móveis.

O presente estudo teve por objetivo determinar a concentração inibitória mínima (MIC) de oxitetraciclina e ácido oxolínico para espécies de aeromonas móveis, isoladas de casos clínicos de septicemia hemorrágica em peixes e de ambientes aquáticos, de diversas origens geográficas, no Brasil.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Situação da aqüicultura no Brasil**

As atividades relacionadas com a aqüicultura no Brasil, hoje, são praticadas em todos estados do país, sendo realizadas tanto em água doce como água salgada. Elas abrangem as seguintes modalidades: o cultivo de peixes (piscicultura), de camarões (carcinocultura), de rãs (ranicultura) e a criação de moluscos, como ostras, mexilhões e escargot (malacocultura). A piscicultura é a produção predominante, com destaque para sistemas de cultivo em água doce.

Desde 1990, a aqüicultura mundial vem apresentando crescimento acelerado, com aumento, entre os anos de 1999 e 2001, de 187,6%. Dados publicados pela FAO em 2003 indicam que a produção da aqüicultura em 2001 foi de 48,4 milhões de toneladas, gerando uma receita de US\$ 61,5 bilhões. Desse total produzido, a piscicultura contribuiu com 24,4 milhões de toneladas.

O Brasil ficou na 19<sup>a</sup> posição no ranking mundial da produção de pescado, com 210 mil toneladas e um aumento de 925% em relação a 1990. A piscicultura continental respondeu por 78,1% desse total (164 mil toneladas), sendo a carpa o peixe mais cultivado, com 64,8 mil toneladas, seguida pela tilápia, com 38,53 mil toneladas (FAO, 2003). Destaca-se que a maioria das atividades da piscicultura no país é de água doce.

De acordo com informações mais recentes levantadas pelo Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), a piscicultura, em 2002, apresentou produção de 158.058 toneladas, correspondendo a 67,1% da produção total da aqüicultura no país.

A falta de censo agropecuário na produção relacionada às atividades da aqüicultura no Brasil gera dados conflitantes na literatura sobre valores exatos da produção brasileira.

Dados indicam que a atividade no país tem potencial de expansão, atrelada às campanhas de estímulo ao consumo, diminuição do custo do produto ao consumidor e melhoria da renda média da população (FAO, 2002). O consumo per capita de pescado no país é baixo, cerca de 6 kg ao ano, quando comparado ao de outras fontes de proteína de origem animal, como aves (33,90 kg/ano), bovino (37,71 kg/ano) e suíno (12,10 kg/ano) (MAPA, 2004).

Em relação ao tipo de cultivo no Brasil, os sistemas semi-intensivo e extensivo continuam amplamente difundidos. Porém, com o desenvolvimento da aqüicultura nos últimos anos, há uma tendência mundial na intensificação dos cultivos (FAO, 2002). Com isso, aumento nas taxas de estocagem, conseqüentemente, qualquer alteração na qualidade da água ou falha no manejo empregado acarretam no aparecimento de enfermidades e, conseqüentemente, no aumento da mortalidade e em perdas econômicas para o produtor.

## **2.2 *Aeromonas* móveis**

As bactérias do gênero *Aeromonas* são microrganismos de ampla distribuição no ambiente aquático, sendo adaptadas ao crescimento em temperaturas que variam de 5°C a 37°C (Hänninen et al., 1997; Hatha et al., 2005). São cocobastonetes Gram-negativos, não formadores de esporos, oxidase positivos, anaeróbicos facultativos (Kirov et al., 2002; WHO, 2004).

A taxonomia do gênero *Aeromonas* é complexa e sofreu alterações nas últimas décadas, com a descrição de muitas espécies, mas, correntemente são descritas 14 espécies: *A. caviae*, *A. sobria*, *A. hydrophila*, *A. jandaei*, *A. trota*, *A. veronii*, *A. media*, *A. eucrenophila*, *A. schubertii*, *A. salmonicida*, *A. bestiarum*, *A. allosacharophila*, *A. encheleia* e *A. popoffii* (NCBI, 2006).

Pertencem à família Vibrionaceae, mas, alguns autores as consideram pertencentes a uma família denominada Aeromonadaceae (Colwell et al., 1986). As *Aeromonas* spp. são divididas em dois grupos baseados nas características de motilidade e temperatura de crescimento: o grupo das não móveis e psicrotróficas e outro que engloba espécies de aeromonas móveis e mesofílicas (Janda & Abbott., 1998). Como representante das não móveis, tem-se a *Aeromonas salmonicida*, que é um agente patogênico primário em peixes, causando uma doença chamada furunculose (Nikoskelainen et al., 2005). As aeromonas móveis são assim chamadas, pois apresentam motilidade por flagelos polares e laterais. As espécies *A. caviae*, *A. sobria*, *A. hydrophila*, *A. bestiarum* e *A. veronii* são agentes patogênicos aos peixes e as três primeiras de maior importância (Bizani & Brandelli, 2001; Kozinska & Guz, 2004; Vazquez-Juarez et al., 2005)

*Aeromonas* spp. produzem potentes fatores de virulência, incluindo hemolisinas extracelulares, citotoxinas, proteases e enterotoxinas. Flagelos, pili e antígeno O também são descritos (Massa et al., 2001; Wahli et al., 2005). Numerosos estudos têm sido conduzidos na prevalência de fatores de virulência nas diversas espécies de *Aeromonas*, mas, poucos investigam o papel destes fatores na patogenicidade da doença em peixes. Estudo recente sobre a virulência em *Aeromonas* spp. identificou o aparato de secreção do Tipo III em *A. sobria*, sendo responsável pela translocação de uma toxina bacteriana para dentro da célula alvo no hospedeiro. Um aparato semelhante de secreção

também foi identificado em *A. hydrophila*, mostrando-se ser requerido para a virulência (Wahli et al., 2005).

Os microrganismos deste grupo são relacionados como agente causal em uma variedade de doenças em mamíferos, répteis e peixes. São considerados agentes emergentes para os seres humanos, causando gastroenterite e septicemia (WHO, 2004). Entre as espécies, a *A. hydrophila* é considerada a mais patogênica aos seres humanos e peixes de água doce (Hatha et al., 2005).

Além dos atributos de patogenicidade, essas bactérias são fontes de elementos genéticos móveis carreadores de genes de resistência a antibióticos, como plasmídeos R, integrons e transposons (Sorum & L'Abée-Lund, 2002).

### **2.2.1 Infecção por aeromonas móveis em peixes**

De ocorrência mundial, as aeromonas móveis causam a doença mais comum em peixes de água doce, a septicemia hemorrágica bacteriana, tendo um curso rápido e levando a uma grande taxa de mortalidade em peixes acometidos (Noga, 1996).

As infecções por esses microrganismos manifestam-se em hospedeiros enfraquecidos e acometidos por outros agentes etiológicos, possuindo, como fatores predisponentes, condições como: excesso de matéria orgânica e de produtos da excreção na água, oxigênio dissolvido abaixo das concentrações adequadas, alta densidade animal, manipulações, desinfecções, transporte, temperatura da água e reprodução artificial (Irie et al., 2005). Estes fatores que predispoem os peixes estão associados com o aumento do uso de sistemas de

cultivo tipo intensivo, ocasionando surtos da enfermidade (Brown, 1993; Vivekanandahan et al., 2005; Wahli et al., 2005).

Os sinais clínicos de infecção podem variar de lesões de pele, superficiais ou profundas, a quadros típicos de septicemia. As lesões de pele se apresentam como áreas de hemorragia e necrose de extensão variada, que podem progredir para úlceras, geralmente em tecido muscular (Saha & Pal, 2002; Wahli et al., 2005). Nos quadros de infecção sistêmica é observada a presença de petéquias viscerais hemorrágicas e pode ser encontrada a exoftalmia, abdômen distendido com líquido serosanguinolento (Pavanelli et al., 2002).

Para controlar surtos da doença, parâmetros envolvidos com o manejo destes animais devem ser sempre monitorados. Porém, a medida de controle que tem sido mais eficiente é a antibioticoterapia.

### **2.3 Principais antibióticos utilizados na piscicultura**

As formas de administração de antibióticos nos peixes são a via injetável, os tratamentos de imersão e a via oral, sendo esta última a mais utilizada. Um antibiótico utilizável em piscicultura deve ser de baixo custo, de fácil aquisição no mercado, preferencialmente pouco solúvel em água e palatável, quando incorporado à ração. Como diversos antibióticos são termossensíveis, estes não podem ser incorporados às rações de peixe durante a sua produção (premix) devido ao processo de extrusão aos quais os pelets de ração são submetidos. Desse modo, a incorporação é feita, geralmente, pela adição de antibióticos a pequenos volumes de óleo de soja (30 a 50ml) e, então, aos pelets.

Devido a esses fatores existem poucas escolhas de antibióticos para o tratamento de doenças bacterianas na piscicultura e os mais usados são a oxitetraciclina, o ácido oxolínico e a norfloxacina (outra quinolona). Está previsto, para o ano de 2006, o lançamento no mercado brasileiro de dois antibióticos para uso em piscicultura, o florfenicol e a bicozamicina.

### **2.3.1 Tetraciclina: modo de ação**

O grupo das tetraciclina é assim denominado por possuir uma estrutura química básica formada por quatro anéis cíclicos fundidos. São agentes quelantes de íons metálicos (por exemplo, cálcio, magnésio e ferro) formando complexos estáveis e suas propriedades antimicrobiana e farmacocinética são influenciadas por esta ação (Huber, 1992).

Os principais antibióticos representantes do grupo, mostrados na Figura 1, incluem os de primeira geração como a oxitetraciclina e clortetraciclina, os semi-sintéticos da segunda geração, como a doxiciclina, minociclina e metaciclina e os semi-sintéticos da terceira geração, como a glicilciclina (Spinosa, 1996). São antibióticos bacteriostáticos de amplo espectro, possuindo atividade contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, clamídias, micoplasmas, rickettsias e protozoários. A ausência de maiores efeitos adversos leva ao extensivo uso na terapia de infecções em seres humanos e em animais (Chopra & Roberts, 2001; Huber, 1992; Speer et al., 1992).

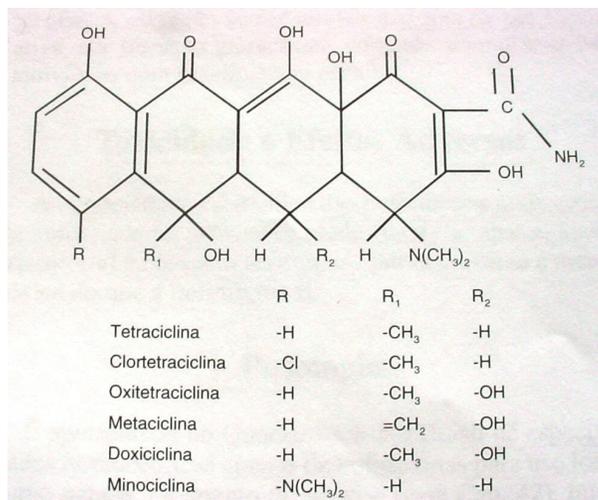


FIGURA 1 – Estrutura química das tetraciclina (Spinosa, 1996).

O mecanismo de ação das tetraciclina consiste, basicamente, em impedir a ligação do tRNA (RNA transportador) ao ribossomo bacteriano, interferindo na síntese protéica (Chopra, 2002; Miranda & Zemelman, 2002; Sorum & L' Abée-Lund, 2002; Spinosa, 1996). As moléculas deste antibiótico atravessam a membrana externa de bactérias Gram-negativas por canais de porinas OmpF e OmpC, por meio da ligação destas drogas a íons carregados positivamente (provavelmente magnésio), formando um complexo (tetraciclina-cátion). Este complexo atravessa a membrana e acumula-se no periplasma onde ocorrem a dissociação do íon e o acúmulo da molécula de tetraciclina. Como são moléculas lipofílicas, difundem-se através das regiões lipídicas da bicamada da membrana interna (citoplasmática) para o citoplasma bacteriano, dependendo de energia. Após a entrada na célula bacteriana, liga-se reversivelmente à

subunidade 30S do ribossomo, o que, provavelmente, explica sua atividade bacteriostática (Chopra & Roberts, 2001; Speer et al., 1992).

Em países, como Estados Unidos e Brasil, as tetraciclinas são adicionadas em níveis subterapêuticos a rações de animais. Devido à facilidade de manipulação da droga, ao baixo custo e à eficácia do tratamento, a oxitetraciclina tem sido amplamente utilizada em ambientes aquáticos. Embora tenha um papel importante na medicina veterinária e humana, a emergência da resistência tem limitado o seu efeito (Speer et al., 1992; Chopra & Roberts, 2001).

### **2.3.2 Quinolonas: modo de ação**

As quinolonas são antibióticos que apresentam atividade bactericida, sendo um grupo com grande aplicação na medicina. A base estrutural das quinolonas é o anel 4-quinolona, que pode ser modificado para se obter drogas com espectro de ação aumentado (Figura 2). Como representantes, têm-se: as quinolonas de primeira geração como o ácido nalidíxico, flumequina e o ácido oxolínico e as de segunda geração ou fluorquinolonas, como enrofloxacina, norfloxacina, ciprofloxacina e perfloxacina (Górniak, 1996).

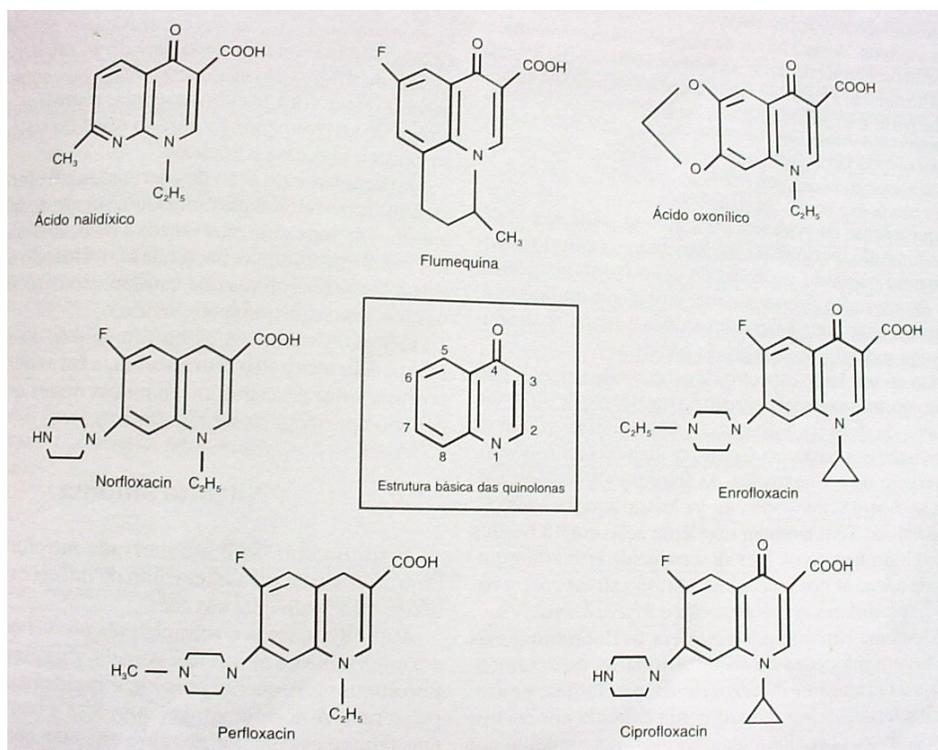


FIGURA 2: Estrutura química das principais quinolonas (Górniak, 1996).

Quinolonas de primeira geração têm, cada vez mais, o seu uso limitado, pois possuem pequeno espectro de ação. Já as fluorquinolonas possuem largo espectro de ação, agindo sobre bactérias Gram positivas e Gram-negativas, como *Mycoplasma* e *Chlamydia* (Górniak, 1996).

A atividade das quinolonas se relaciona à inibição das topoisomerasas bacterianas que são enzimas que controlam a direção e a extensão do espiralamento das cadeias de DNA, resultando em uma configuração estável e impedindo o superenrolamento da hélice de DNA durante a divisão celular

(Ellingsen et al., 2002). Dessa forma, as quinolonas impedem a ocorrência da divisão celular bacteriana.

O ácido oxolínico foi testado em peixes em 1973, no Japão e nas últimas décadas tem sido empregado rotineiramente em sistemas de cultivo de peixes em vários países (Ellingsen et al., 2002). É amplamente usado na Noruega, em aquicultura, devido à sua excelente atividade contra patógenos de peixes, seguido do florfenicol (Samuelsen & Bergh, 2004).

#### **2.4 Resistência bacteriana aos antibióticos em ambientes aquáticos**

Nas últimas décadas, tem sido de grande repercussão o debate sobre a resistência bacteriana frente aos antibióticos. Isso é devido ao grande uso dessas drogas, tanto na medicina humana, como em animais e na agricultura.

Nos animais, os antibióticos são usados tanto para fins terapêuticos ou como promotores de crescimento, ou seja, administrados por meio de ração para aumentar a eficiência do ganho de peso (Constanzo et al., 2005; Davison, 1999; Dias-Cruz et al., 2003; Mateu & Martin, 2001; Miranda & Zemelman, 2002; Petersen & Dalsgaard et al., 2003; Sorum & L' Abee-Lund., 2002).

No contexto clínico, a resistência bacteriana aos antibióticos é definida como a capacidade da bactéria de crescer, *in vitro*, na presença da concentração sérica que uma determinada droga atinge, conforme recomendações terapêuticas. Já em termos epidemiológicos, a definição de susceptibilidade e resistência de um microrganismo a um determinado antibiótico leva em consideração as diferenças existentes em relação aos hospedeiros, os vários agentes infecciosos e

as diferentes regiões geográficas onde se encontram (Smith, 1998; Bruun et al., 2000; Coyne et al., 2004a, b).

A resistência bacteriana aos antibióticos pode ser transferida verticalmente e horizontalmente. A vertical é cromossômica, 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. Este tipo de resistência só é detectado quando há um aumento de clones da população bacteriana. A horizontal ocorre pela transferência de genes de resistência por três mecanismos: a transformação, a conjugação e a transdução pelos quais as bactérias podem adquirir e incorporar aos seus materiais genéticos genes de resistência carregados por elementos móveis de transferência como os plamídeos e transposons (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; Van Den Eede et al., 2004). Nesse contexto torna-se preocupante a transferência de genes entre bactérias comensais e patogênicas (Davison et al., 2000). A resistência a antibióticos pode resultar no aumento da severidade e da duração das doenças, grande custo com tratamentos e o ressurgimento de agentes já conhecidos que se tornam refratários à terapia (AliAbadi & Lees, 2000; Cohen & Tartasky, 1997; Coyne et al., 2004a). Ainda, as bactérias podem permutar simultaneamente genes de resistência a diversos antibióticos, estabelecendo o fenômeno da multirresistência (Radu et al., 2003).

Em termos ecológicos, a transferência de resistência entre bactérias tem dois aspectos importantes. O primeiro refere-se à propagação de genes de resistência pela transferência horizontal entre bactérias de alimentos contaminados e a microbiota natural de consumidores (Ishihara et al., 2004). O

segundo refere-se à transferência reversa, o esgoto humano veiculador de genes de resistência às bactérias ubíquas da água, exercendo aí uma pressão seletiva que pode depender de uma série de fatores, como região geográfica, fonte de água e de hospedeiro (Pathak & Gopal, 2005; Wegener & Frimodt-Moller, 2000).

Tanto os antibióticos quanto as bactérias resistentes podem ser excretados pelos animais e homem se distribuindo pelo ambiente (AliAbadi & Lees, 2000). Para a maioria dos antibióticos, 30% a 90% da dose administrada são excretados pela urina como substâncias ativas (Constanzo et al., 2005). Estas substâncias e bactérias resistentes poluem o ambiente, exercendo pressão seletiva em bactérias naturais dos ambientes aquáticos ( Pathak & Gopal, 2005; Rooklidge, 2004).

Vários estudos têm mostrado que a medicação direta aos peixes pode levar a um aumento no nível de resistência bacteriana aos antibióticos, seja pelo uso incorreto ou pela grande permanência do produto na água (Miranda & Zemelman, 2002; Petersen & Dalsgaard, 2003). Muitos antibióticos utilizados em lagoas de ambientes lânticos podem ficar na água ou no sedimento por tempo indeterminado, dependendo da droga utilizada (Holmström et al., 2003).

De forma geral, as espécies do gênero *Aeromonas* possuem resistência à ampicilina e apresentam um perfil de resistência a outras drogas diversificado, variando de acordo com a região geográfica (Noga, 1996). Essas bactérias podem desenvolver resistência simples ou múltipla aos antibióticos e plamídeos são comumentemente encontrados nessas espécies (Petersen & Dalsgaard, 2003; Schmidt et al., 2001).

Com o crescente problema, torna-se necessário o estabelecimento do uso racional dos antibióticos, baseado no conhecimento do mecanismo de ação das

drogas e sua farmacocinética nos peixes, além do perfil de resistência das bactérias e a transferência de genes de resistência (AliAbadi & Lees, 2000).

#### **2.4.1 Resistência à tetraciclina**

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 *otc*, 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 oxirredutases que requerem NADPH (Chopra & Roberts, 2001; Chopra, 2002; Speer et al., 1992).

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 (Butaye et al., 2003; Rhodes et al., 2000; Schmidt et al., 2001; Sorum & L'Abée-Lund, 2002). Recentemente, novos genes *tet*, que

conferem resistência bacteriana às tetraciclinas, carregados por plamídeos e transposons, foram descobertos e caracterizados (Roberts, 2005).

Pouco se sabe sobre o perfil de resistência às tetraciclinas em aeromonas móveis no Brasil. Um estudo realizado por Hirsch (2004), utilizando 75 isolados de *Aeromonas* spp. provenientes de casos clínicos e águas de cultivo, identificou uma resistência à tetraciclina de 36%. Bizani & Brandelli (2001) analisaram 70 isolados de *Aeromonas* spp. de água de abatedouro e encontraram 100% de sensibilidade nos isolados de *A. hydrophila*.

Em outras regiões geográficas, a resistência às tetraciclinas em aeromonas móveis é mais relatada. Um trabalho realizado no Norte da Espanha por Goñi-Urriza et al. (2000) revelou que os níveis de resistência à tetraciclina e quinolonas aumentaram após o deságüe do esgoto no rio, indicando transferência de genes entre *Aeromonas* spp. e Enterobacteriaceae. Hatha et al. (2005), que conduziram um trabalho na Índia, relataram a presença de isolados de aeromonas móveis resistentes a antibióticos, como a oxitetraciclina. DePaola et al. (1995), em levantamento nos Estados Unidos, relataram a frequência de resistência à tetraciclina das amostras de *A. hydrophila* isoladas de conteúdo intestinal de channel catfish (*Ictalurus punctatus*) e água dos tanques de cultivo, de 21,7% e 45,7%, respectivamente.

Entretanto, outros trabalhos demonstram baixo nível de resistência das aeromonas móveis à tetraciclina. Ghenghesh et al. (2001) obtiveram apenas 5% de isolados de *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. sobria* resistentes à tetraciclina, em estudo realizado na Itália. Saha & Pal (2002) encontraram 75% de isolados de *A. hydrophila* sensíveis à tetraciclina na Índia.

#### **2.4.2 Resistência a quinolonas**

A resistência a quinolonas acontece em bactérias quando ocorrem mutações nos genes que codificam as topoisomerasas, alterando, por sua vez, a conformação destas enzimas, de modo que a atividade enzimática seja mantida e a afinidade pela quinolona seja perdida, impedindo a ação desta droga. Pode ocorrer também resistência, devido a uma propriedade de membrana alterada reduzindo a entrada do antibiótico na célula bacteriana. Esta característica é devido à resistência cruzada com antibióticos de outros grupos, como cefalosporina, cloranfenicol e tetraciclina (Górniak, 1996; Smith, 1998).

Há poucos relatos, disponíveis na literatura, sobre a resistência de bactérias ao ácido oxolínico por ser este um fenômeno pouco frequente na natureza, pois, nesta classe de drogas, a resistência é cromossômica, não podendo ser transmitida horizontalmente, ocorrendo de maneira vertical. As populações resistentes, neste caso, tendem a aumentar somente sob pressão de seleção (Smith, 1998). Guardabassi et al. (2000) encontraram amostras de bactérias resistentes a ácido oxolínico na água, após o tratamento de peixes com ração medicada por este fármaco na Dinamarca. Schmidt et al. (2000) encontraram 20% de amostras de aeromonas móveis resistentes a ácido oxolínico em fazendas de truta arco-íris.

#### **2.5 Concentração inibitória mínima (MIC): conceitos e métodos**

A função primária na determinação da susceptibilidade de uma bactéria é proporcionar informações que possam ser usadas na escolha de uma terapia (Smith, 2001).

Os testes de susceptibilidade podem ser feitos por diferentes métodos, os qualitativos e os quantitativos. Métodos qualitativos são aqueles que empregam a difusão do disco de antibiótico em meio sólido (Bauer Kirby), informando se os patógenos são resistentes ou sensíveis. Já os métodos quantitativos empregam a diluição da droga, que pode ser feita em meio sólido ou em caldo, fornecendo a concentração capaz de inibir o crescimento do microrganismo *in vitro*, a concentração inibitória mínima. Os testes em caldo podem ser realizados em micro ou macrodiluição.

Os resultados gerados pelos testes de diluição, além de serem quantitativos, podem ser qualitativos, aumentando o potencial de otimização do regime de dosagem baseado nos parâmetros farmacodinâmicos e farmacocinéticos da droga. Permitem, também, testar bactérias com características de crescimento que dificultem o teste pela difusão de disco (organismos fastidiosos) (Miller et al., 2005; Smith, 2001).

A importância da realização de testes de susceptibilidade em bactérias é a preconização de uma terapia ideal para o agente envolvido em uma doença e também para um levantamento epidemiológico do perfil de susceptibilidade e resistência de microrganismos em diferentes regiões geográficas.

Os testes de susceptibilidade em bactérias de animais aquáticos encontram, como maior problema, poucos trabalhos de padronização das metodologias para a realização de MIC, o que acarreta em diferentes interpretações, dificultando assim, comparações.

O Clinical and Laboratory Standards Institute, (CLSI, USA) é o responsável pela padronização das metodologias de determinação de resistência a antibióticos e fornece os parâmetros de avaliação de resistência pelos diversos métodos: disco de difusão (método qualitativo) ou determinação da

concentração inibitória mínima por microdiluição ou macrodiluição em caldo e diluição em meio sólido (quantitativo). Os valores de referência de MIC propostos pelo CLSI aplicam-se, principalmente, a bactérias de interesse clínico humano (CLSI, 1997).

Os métodos de determinação de MIC para bactérias de origem aquática têm sido discutidos e aprimorados nos últimos anos. Smith (2001) preconizou o uso de uma amostra padrão como referência para a realização de MIC de bactérias de organismos aquáticos, evitando, assim, interpretações distintas entre laboratórios.

Alderman & Smith (2001) propuseram o primeiro protocolo desenvolvido durante um workshop promovido pela União Européia na tentativa de padronização de métodos de referência para testes de susceptibilidade de bactérias associadas a doenças de peixes, mas, ainda, com a necessidade de validação e harmonização interlaboratorial.

Somente com Miller et al. (2005), muitas questões foram resolvidas. Estes autores, em concordância com o CLSI, conduziram um estudo multilaboratorial. Realizaram testes de susceptibilidade em caldo Mueller-Hinton pela técnica da microdiluição, testando 10 antibióticos e usando *Escherichia coli* ATCC25922 para a padronização da metodologia em diferentes temperaturas e tempos de incubação, preconizando a utilização desta bactéria para padronização de MIC de drogas utilizadas em aquicultura. Estabeleceram uma variação aceitável de valores de MIC, estabelecendo um controle de qualidade (CQ) como também a temperatura e o tempo ideal para a leitura dos resultados. O estudo conduzido por esses autores foi a base para o CLSI, que publicou um protocolo para a determinação de MIC de microrganismos de animais aquáticos (CLSI, 2005).

### 2.5.1 Interpretação de valores de MIC

Para a análise dos valores de MIC de uma dada espécie bacteriana, e sua classificação como sensível ou resistente, existem diferentes métodos propostos. Bruun et al. (2000) definem três prováveis formas de classificar a resistência de uma bactéria. São elas:

A – Resistência *in vitro*: a resistência é determinada pelos valores de MIC gerados em laboratório. Essa forma de interpretação é usada se os valores se dividem em dois (classificação bimodal) ou mais grupos (classificação polimodal) separados, sendo o grupo com menor MIC definido como sensível e o grupo com MIC maior resistente, sendo a característica de resistência adquirida por meio da transferência de genes;

B – Resistência aproximada *in vivo* ou eficácia teórica do tratamento: esta definição é dada de acordo com os valores de MIC aliados com dados farmacocinéticos do antimicrobiano em uma espécie (“breakpoint”). É aceito que o tratamento de uma doença sistêmica é possível quando a concentração no plasma de uma determinada droga é de duas a quatro vezes o valor do MIC determinado *in vitro*;

C – Resistência *in vivo*: seria a resistência real em um ambiente, sendo possível determiná-la somente se o tratamento de uma doença fosse avaliado sob condições similares às aquelas encontradas em uma unidade de piscicultura.

Considerando a designação B de Bruun et al. (2000), os dados de MIC gerados por laboratórios têm significância se associados com a concentração plasmática máxima (C<sub>máx.</sub>) que um antibiótico atinge em uma população infectada para a determinação de “breakpoints” (BP).

“Breakpoints” são valores discriminatórios de MIC para a classificação em sensível ou resistente, baseada em modelos matemáticos, em que se utiliza a  $C_{m\acute{a}x}$ . de uma droga e fatores de correção. O objetivo é prever se o valor de MIC alcançado por um dado isolado bacteriano estará abaixo ou acima da biodisponibilidade do antibiótico, quando administrado ao hospedeiro.

Os métodos para determinação de BP incluem modelos matemáticos como, o proposto pela British Society For Antimicrobial Chemotherapy (BP BSAC) (1991). O BP BSAC é um método paramétrico e sugere que o BP pode ser dado por meio da média da concentração plasmática máxima que uma determinada droga atinge, dividida pelo fator de correção 4 ( $BP = C_{m\acute{a}x} \div 4$ ). Contudo, deve-se lembrar que a metade da população tratada pode ter concentrações menores que a média e que, em propriedades comerciais, não é a metade da população que se deseja proteger, mas sim a quase totalidade.

Coyne et al. (2004a) sugerem, como valor de  $C_{m\acute{a}x}$ . a ser adotado, o percentil 80 (P80), em que o valor da concentração máxima da droga usada é aquela atingida em pelo menos 80% da população. Este método é não paramétrico e é mais robusto em relação à pequena amostragem da distribuição paramétrica, levando em consideração variações existentes de peixe a peixe. Para o cálculo do BP P80, pode-se utilizar a fórmula de BSAC, dividindo-se por 4 a concentração máxima de uma droga atingida no plasma calculada pelo P80 ( $BP = C_{m\acute{a}x}. P80 \div 4$ ).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Bactérias utilizadas

Os isolados bacterianos utilizados neste trabalho foram selecionados a partir do banco de culturas de bactérias do AQUAVET-Laboratório de Doenças de Animais Aquáticos, da Universidade Federal de Lavras (isolados dos anos 2002 a 2005), os quais foram oriundos de diversas localidades (tabela 1).

TABELA 1: Isolados de *Aeromonas* spp. selecionados de acordo com a fonte e origem geográfica para a determinação da concentração inibitória mínima.

Fonte	Origem geográfica (cidade/estado)	Número de amostras
Água <sup>1</sup>	Lavras, MG	4
Caso clínico <sup>2</sup>	Lavras, MG	8
Água <sup>1</sup>	Carmo da Cachoeira, MG	17
Caso clínico <sup>2</sup>	Esmeraldas, MG	17
Caso clínico <sup>2</sup>	Itutinga, MG	21
Água <sup>1</sup>	Itutinga, MG	4
Água <sup>1</sup>	Itutinga, MG	4
Caso clínico <sup>2</sup>	Paraíba do Sul, RJ	8
Caso clínico <sup>2</sup>	Passo Fundo, RS	15
Água <sup>1</sup>	Perdões, MG	6
Água <sup>1</sup>	Três Pontas, MG	10
Caso clínico <sup>2</sup>	Dourados, MS	6
Total		120

1- Bactérias isoladas de fontes ambientais, como água de tanques de criação e água de distribuição

2- Bactérias isoladas de peixes com septicemia hemorrágica

Os isolados foram obtidos de 12 pisciculturas diferentes, localizadas em 9 municípios distintos, dos estados de Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Rio Grande de Sul, sendo oriundos da água de cultivo e de casos de

septicemia hemorrágica em peixes. Os isolados testados são representativos das espécies *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. sobria*.

## **3.2 Antibióticos**

### **3.2.1 Oxitetraciclina**

A solução estoque de oxitetraciclina foi preparada segundo Miranda & Zemelman (2002). Preparou-se a solução a partir do dihidrato de oxitetraciclina (Sigma, USA) na concentração de 1mg/mL. O antibiótico foi dissolvido em 2mL HCl 1N (Merck, Brasil), 1mL de NaOH 1N para completa dissolução da droga. O pH foi ajustado para 7,0, com NaOH 1N e o volume final foi corrigido com água destilada. Esta solução estoque foi preparada para todos os dias de teste no momento do uso e protegida da luz.

### **3.2.2 Ácido oxolínico**

A solução estoque do ácido oxolínico (Sigma, USA) foi preparada em água deionizada, na concentração de 0,1mg/mL, seguida de gotejamento de NaOH 0,1N até a completa dissolução da droga. O volume final foi ajustado com água deionizada. A solução foi esterilizada por meio de filtração em membranas 0,22µm e congelada em freezer a -20°C, até o momento da utilização (Milipore, USA) (Ho et al., 2000).

### **3.3 Concentração inibitória mínima (MIC)**

Para a padronização do MIC utilizou-se o protocolo estabelecido pelo CLSI (2005), utilizando-se a técnica de microdiluição em caldo, descrita a seguir.

#### **3.3.1 Meio de cultura**

Para a realização dos testes foi utilizado o caldo Müeller Hinton (Biolife, Itália) suplementado com cátions divalentes, cálcio e magnésio. Para a suplementação de 1 litro de caldo Müeller Hinton com cátions, foi adicionado 1,25 mL de solução estoque estéril de cloreto de magnésio (83,6mg/mL) e 1,25 mL da solução estoque estéril de cloreto de cálcio (73,6mg/mL).

#### **3.3.2 Inóculo**

Os isolados selecionados de *Aeromonas* spp., estocados em freezer a -70°C, foram descongelados no momento do uso à temperatura ambiente. Alíquotas de cada isolado foram inoculadas assepticamente em tubos de rosca (12 X 100mm) contendo 2,5 mL caldo Müeller Hinton suplementado. A incubação foi feita em estufa B.O.D. (Tecnal, Brasil), a 28°C, por 24 horas.

Após a incubação, as suspensões bacterianas foram preparadas em água destilada e a turbidez ajustada pela escala 0,5 de MacFarland (BioMérieux, França), o que corresponde a, aproximadamente,  $10^8$  unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitro (mL). Essa suspensão foi diluída 10 vezes em caldo Müeller Hinton suplementado, obtendo-se uma densidade aproximada de  $10^7$  UFC/mL.

### **3.3.3 Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) de oxitetraciclina e ácido oxolínico**

Microplacas de 96 poços estéreis e descartáveis (TPP, Suíça) foram utilizadas. Para cada dia de teste de susceptibilidade, as microplacas foram retiradas da embalagem e colocadas em capela de fluxo laminar.

A cada poço foram adicionados 100- $\mu$ l de caldo Mueller-Hinton suplementado. No primeiro poço de cada linha das microplacas também foi adicionado um volume de 100 $\mu$ L do respectivo antibiótico (solução estoque), obtendo-se a concentração inicial de cada droga. A partir dos poços iniciais, diluições seriadas de base 2 foram realizadas nos demais poços com o auxílio de pipeta automática multicanal, obtendo-se concentrações decrescentes, variando de 500 $\mu$ g/mL a 0,0037 $\mu$ g/mL para oxitetraciclina, 50  $\mu$ g/mL a 0,00037 $\mu$ g/mL para ácido oxolínico.

Alíquotas de 5 $\mu$ L de cada suspensão bacteriana foram inoculadas nos poços contendo o caldo Mueller-Hinton suplementado com cátions e a respectiva concentração dos antibióticos, sendo a população final de bactérias em cada poço de  $5 \times 10^4$  UFC. As microplacas foram seladas com filme selador (3M, Brasil), agitadas em um agitador orbital (IKA, Finlândia) com 400 rpm por 5 minutos e, em seguida, incubadas em estufa B.O.D., a 28° C, por 24 horas.

### **3.4 Observação dos resultados**

Após 24 horas de incubação, os filmes seladores foram retirados das placas e os resultados avaliados. O valor do MIC foi determinado com o auxílio

de um anteparo luminoso, como a menor diluição do antibiótico capaz de inibir totalmente o crescimento bacteriano visível a olho nu.

### **3.5 Controle de qualidade e validação dos testes**

Em todos os dias de testes, assim como para todas as microplacas utilizadas, determinou-se a concentração inibitória mínima da amostra de referência *Escherichia coli* ATCC 25922, utilizada para padronização conforme descrito por CLSI (2005), com o objetivo de evitar variações e de se obter a concentração inibitória mínima dos antibióticos utilizados erroneamente. Então, neste estudo, também foram avaliadas as variações intraplaca e interdica da amostra de referência utilizada.

Para cada isolado, prepararam-se poços controle de crescimento bacteriano, sem a presença da droga. Em todas as microplacas utilizadas foram preparados poços sem antibiótico e sem *Aeromonas* spp., para controle da esterilidade do meio de cultura, como também poços com meio de cultura e antibiótico para testar a esterilidade da droga. Os testes foram feitos em duplicata, para todos os isolados bacterianos utilizados.

### **3.6 Interpretação dos valores de MIC obtidos**

Para a interpretação dos valores de MIC obtidos neste estudo utilizou-se a classificação modal segundo Bruun et al. (2000).

Com o objetivo de simular possíveis BP para a classificação das *Aeromonas* spp., foi calculado o BP BSAC e o BP P80, utilizando-se dados

farmacocinéticos de oxitetraciclina e ácido oxolínico obtidos de salmão. Então, a  $C_{\text{máx}}$  de oxitetraciclina atingida em salmão foi de  $0,25\mu\text{g/mL}$  e de ácido oxolínico  $0,4\mu\text{g/mL}$ . Já o percentil 80 de oxitetraciclina alcançado no salmão foi de  $0,21\mu\text{g/mL}$  e de ácido oxolínico,  $0,12\mu\text{g/mL}$  (Coyne et al., 2004a,c).

Os cálculos dos BP utilizando o BSAC e o P80 são demonstrados a seguir: para oxitetraciclina BP BSAC=  $0,25\mu\text{g/mL} \div 4 = 0,06\mu\text{g/mL}$  e o BP P80=  $0,21\mu\text{g/mL} \div 4 = 0,05$ . Para ácido oxolínico BP BSAC=  $0,4\mu\text{g/mL} \div 4 = 0,1\mu\text{g/mL}$  e o BP P80=  $0,12\mu\text{g/mL} \div 4 = 0,03$ .

## **4 RESULTADOS**

### **4.1 Controle de qualidade dos testes de MIC**

Os valores de MIC da amostra de referência *Escherichia coli* ATCC 25922, em todos os dias de teste, bem como, para todas as placas utilizadas permaneceram dentro da variação de valores proposta pelo CLSI (2005). Para oxitetraciclina 0,5µg/mL – 2µg/mL e para o ácido oxolínico 0,06µg/mL – 0,25µg/mL.

### **4.2 Concentração inibitória mínima de oxitetraciclina para aeromonas móveis**

Foram determinados valores de MIC de 120 isolados de aeromonas móveis. Os resultados individuais das concentrações inibitórias mínimas de oxitetraciclina para os 120 microrganismos avaliados encontram-se na Tabela 2.

TABELA 2: Concentração inibitória mínima (MIC) de oxitetraciclina para os isolados de aeromonas móveis oriundos de água e de casos clínicos de septicemia em peixes, de diferentes regiões geográficas.

Amostras	Espécie	Fonte	Origem geográfica	Propriedade <sup>1</sup>	MIC (µg/mL)
AE 008-02	<i>A. caviae</i>	Caso clínico <sup>2</sup>	Lavras, MG	A	0,48
AE 074-02	<i>A. caviae</i>	Caso clínico	Lavras, MG		0,48
AE 080-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Lavras, MG		0,48
AE 081-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Lavras, MG		0,48
AE 092-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Lavras, MG		0,48
AE 049-02	<i>A. hydrophila</i>	Água <sup>3</sup>	Lavras, MG		0,24
AE 103-02	<i>A. hydrophila</i>	Água	Lavras, MG		0,24
AE 025-02	<i>A. hydrophila</i>	Água	Lavras, MG		0,24
AE 333-03	<i>A. hydrophila</i>	Água	Lavras, MG		0,24
AE 078-02	<i>A. sobria</i>	Caso clínico	Lavras, MG		0,24
AE 329-03	<i>A. sobria</i>	Caso clínico	Lavras, MG		125
AE 331-03	<i>A. sobria</i>	Caso clínico	Lavras, MG		62,5
AE 129-02	<i>A. caviae</i>	Caso clínico	Esmeraldas, MG	B	0,48
AE 130-02	<i>A. caviae</i>	Caso clínico	Esmeraldas, MG		0,48
AE 140-02	<i>A. caviae</i>	Caso clínico	Esmeraldas, MG		0,12
AE 152-02	<i>A. caviae</i>	Caso clínico	Esmeraldas, MG		0,48
AE 184-02	<i>A. caviae</i>	Caso clínico	Esmeraldas, MG		125
AE 110-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Esmeraldas, MG		0,48
AE 111-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Esmeraldas, MG		0,48
AE 112-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Esmeraldas, MG		0,48
AE 113-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Esmeraldas, MG		0,48
AE 114-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Esmeraldas, MG		0,48

Continua...

Tabela 2: cont.

AE 113-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Esmeraldas, MG		0,48
AE 114-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Esmeraldas, MG		0,48
AE 115-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Esmeraldas, MG		0,48
AE 116-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Esmeraldas, MG		0,48
AE 117-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Esmeraldas, MG		0,48
AE 118-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Esmeraldas, MG		0,24
AE 178-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Esmeraldas, MG		0,48
AE 179-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Esmeraldas, MG		0,12
AE 180-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Esmeraldas, MG		0,48
AE 301-03	<i>A. caviae</i>	Caso clínico	Itutinga, MG	C	0,12
AE 310-03	<i>A. caviae</i>	Caso clínico	Itutinga, MG		0,24
AE 312-03	<i>A. caviae</i>	Caso clínico	Itutinga, MG		0,24
AE 314-03	<i>A. caviae</i>	Caso clínico	Itutinga, MG		0,24
AE 288-03	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Itutinga, MG		0,48
AE 295-03	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Itutinga, MG		0,48
AE 298-03	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Itutinga, MG		0,48
AE 413-04	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Itutinga, MG		0,48
AE 414-04	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Itutinga, MG		125
AE 415-04	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Itutinga, MG		0,12
AE 411-04	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Itutinga, MG		0,24
AE 412-04	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Itutinga, MG		0,24
AE 416-04	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Itutinga, MG		0,48
AE 417-04	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Itutinga, MG		0,24
AE 284-03	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Itutinga, MG		0,48
AE 292-03	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Itutinga, MG		0,24

Continua...

Tabela 2: cont.

AE 305-03	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Itutinga, MG		0,97
AE 294-03	<i>A. sobria</i>	Caso clínico	Itutinga, MG		0,48
AE 296-03	<i>A. sobria</i>	Caso clínico	Itutinga, MG		0,48
AE 308-03	<i>A. sobria</i>	Caso clínico	Itutinga, MG		0,48
AE 315-03	<i>A. sobria</i>	Caso clínico	Itutinga, MG		0,48
AE 359-03	<i>A. caviae</i>	Água	Três Pontas, MG	D	62,5
AE 360-03	<i>A. caviae</i>	Água	Três Pontas, MG		125
AE 361-03	<i>A. caviae</i>	Água	Três Pontas, MG		125
AE 364-03	<i>A. caviae</i>	Água	Três Pontas, MG		125
AE 365-03	<i>A. caviae</i>	Água	Três Pontas, MG		125
AE 366-03	<i>A. hydrophila</i>	Água	Três Pontas, MG		62,5
AE 192-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Passo Fundo, RS	E	0,48
AE 195-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Passo Fundo, RS		0,48
AE 198-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Passo Fundo, RS		0,48
AE 201-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Passo Fundo, RS		0,48
AE 205-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Passo Fundo, RS		0,48
AE 190-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Passo Fundo, RS		0,12
AE 193-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Passo Fundo, RS		0,48
AE 196-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Passo Fundo, RS		0,24
AE 199-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Passo Fundo, RS		0,48
AE 202-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Passo Fundo, RS		0,48
AE 194-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Passo Fundo, RS		0,48
AE 197-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Passo Fundo, RS		0,48
AE 200-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Passo Fundo, RS		0,48
AE 203-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Passo Fundo, RS		0,48

Continua...

Tabela 2: cont.

AE 204-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Passo Fundo, RS		0,24
AE 405-04	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Paraíba do Sul, RJ	F	250
AE 406-04	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Paraíba do Sul, RJ		500
AE 407-04	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Paraíba do Sul, RJ		250
AE 408-04	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Paraíba do Sul, RJ		250
AE 409-04	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Paraíba do Sul, RJ		250
AE 410-04	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Paraíba do Sul, RJ		250
AE 403-04	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Paraíba do Sul, RJ		0,24
AE 404-04	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Paraíba do Sul, RJ		0,24
AE 262-03	<i>A. hydrophila</i>	Água	Perdões, MG	G	0,97
AE 264-03	<i>A. hydrophila</i>	Água	Perdões, MG		0,48
AE 265-03	<i>A. hydrophila</i>	Água	Perdões, MG		0,48
AE 266-03	<i>A. hydrophila</i>	Água	Perdões, MG		0,24
AE 267-03	<i>A. hydrophila</i>	Água	Perdões, MG		0,24
AE 255-03	<i>A. hydrophila</i>	Água	Perdões, MG		0,48
AE 372-03	<i>A. hydrophila</i>	Água	Itutinga, MG	H	0,24
AE 375-03	<i>A. hydrophila</i>	Água	Itutinga, MG		0,24
AE 376-03	<i>A. hydrophila</i>	Água	Itutinga, MG		0,48
AE 384-03	<i>A. hydrophila</i>	Água	Itutinga, MG		0,48
AE 389-03	<i>A. hydrophila</i>	Água	Itutinga, MG	I	0,48
AE 392-03	<i>A. hydrophila</i>	Água	Itutinga, MG		0,24
AE 401-03	<i>A. hydrophila</i>	Água	Itutinga, MG		0,48
AE 402-03	<i>A. hydrophila</i>	Água	Itutinga, MG		0,48
AE 344-03	<i>A. hydrophila</i>	Água	Três Pontas, MG	J	0,24
AE 345-03	<i>A. hydrophila</i>	Água	Três Pontas, MG		0,24

Continua...

Tabela 2: cont.

AE 350-03	<i>A. hydrophila</i>	Água	Três Pontas, MG		0,24
AE 348-03	<i>A. sobria</i>	Água	Três Pontas, MG		0,24
AE 208-02	<i>A. hydrophila</i>	Água	Carmo da Cachoeira, MG	L	0,24
AE 209-02	<i>A. hydrophila</i>	Água	Carmo da Cachoeira, MG		0,24
AE 211-02	<i>A. hydrophila</i>	Água	Carmo da Cachoeira, MG		0,24
AE 212-02	<i>A. hydrophila</i>	Água	Carmo da Cachoeira, MG		0,97
AE 213-02	<i>A. hydrophila</i>	Água	Carmo da Cachoeira, MG		0,24
AE 214-02	<i>A. hydrophila</i>	Água	Carmo da Cachoeira, MG		0,97
AE 215-02	<i>A. hydrophila</i>	Água	Carmo da Cachoeira, MG		0,97
AE 217-02	<i>A. hydrophila</i>	Água	Carmo da Cachoeira, MG		0,24
AE 219-02	<i>A. hydrophila</i>	Água	Carmo da Cachoeira, MG		0,48
AE 220-02	<i>A. hydrophila</i>	Água	Carmo da Cachoeira, MG		0,97
AE 221-02	<i>A. hydrophila</i>	Água	Carmo da Cachoeira, MG		0,97
AE 222-02	<i>A. hydrophila</i>	Água	Carmo da Cachoeira, MG		0,48
AE 223-02	<i>A. hydrophila</i>	Água	Carmo da Cachoeira, MG		0,48
AE 224-02	<i>A. hydrophila</i>	Água	Carmo da Cachoeira, MG		0,48
AE 225-02	<i>A. hydrophila</i>	Água	Carmo da Cachoeira, MG		0,24
AE 226-02	<i>A. hydrophila</i>	Água	Carmo da Cachoeira, MG		0,24
AE 227-02	<i>A. hydrophila</i>	Água	Carmo da Cachoeira, MG		0,24
AE 418-05	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Dourados, MS	M	0,12
AE 419-05	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Dourados, MS		250
AE 420-05	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Dourados, MS		250
AE 421-05	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Dourados, MS		0,24
AE 422-05	<i>A. sobria</i>	Caso clínico	Dourados, MS		31,25
AE 423-05	<i>A. sobria</i>	Caso clínico	Dourados, MS		125

1-Diferentes unidades de piscicultura indicadas pelas letras A-L; 2- Bactérias isoladas de peixes com septicemia hemorrágica;  
3-Bactérias isoladas de água de abastecimento e de tanque de piscicultura

O gráfico da Figura 3 ilustra a frequência de isolados de aeromonas móveis, de acordo com diferentes concentrações de oxitetraciclina avaliadas nesse estudo. Como pode ser observado, houve uma separação das bactérias testadas em duas categorias: uma com valor de MIC  $\leq 0,97\mu\text{g/mL}$  e outra com valor de MIC  $\geq 31,25\mu\text{g/mL}$ . Das amostras testadas, 83,33% agruparam-se na categoria de concentração inferior, enquanto as demais (16,67%) agruparam-se na categoria de concentração superior. Não houve isolado com MIC de oxitetraciclina entre 1,95 e 15,6 $\mu\text{g/mL}$ .

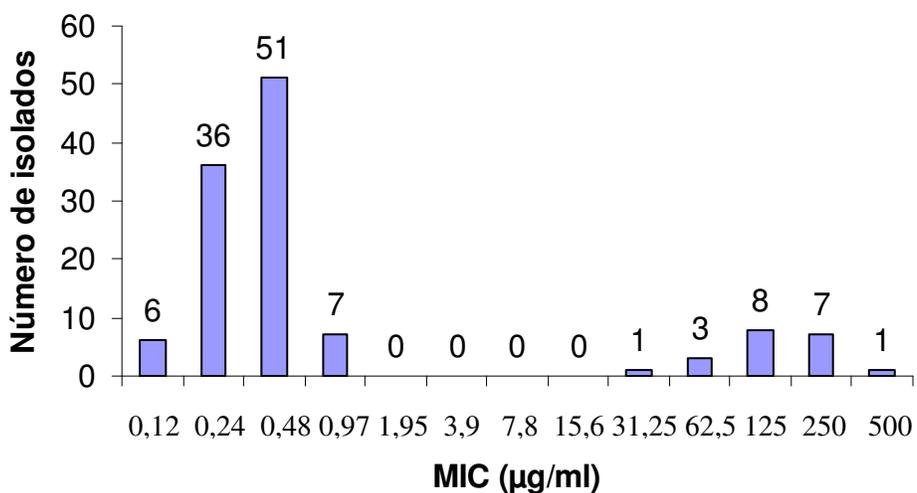


FIGURA 3: Distribuição de concentrações inibitórias mínimas de oxitetraciclina para isolados de aeromonas móveis.

De forma geral, as propriedades se assemelharam, no perfil de distribuição dos valores de MIC, em dois grupos frente aos dois antibióticos usados neste estudo. Entretanto, três propriedades, a “D”, “F” e “M”, localizadas em Três Pontas, MG, Paraíba do Sul, RJ e Dourados, MS, respectivamente, apresentaram os maiores valores de MIC para a oxitetraciclina.

O gráfico da Figura 4 exibe os valores de MIC separados pelas fontes analisadas (água de cultivo e caso clínico de septicemia hemorrágica em peixes). Não foi observada diferença na distribuição dos valores de MIC entre os dois grupos.

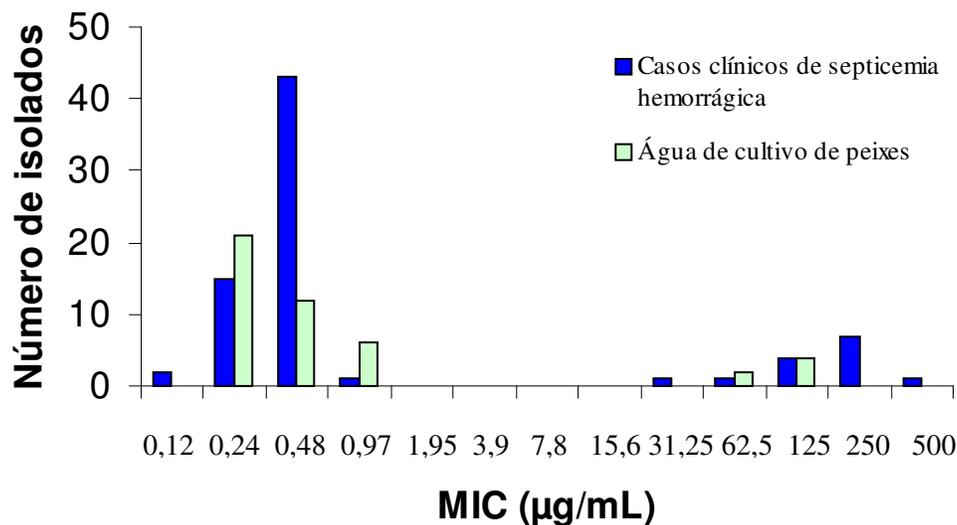


FIGURA 4: Distribuição de concentrações inibitórias mínimas de oxitetraciclina para isolados de aeromonas móveis oriundas de águas de cultivo e casos clínicos de septicemia hemorrágica.

Os gráficos das Figuras 5, 6 e 7 exibem os valores de MIC separados pelas espécies de *Aeromonas* analisadas. Não foi observada diferença na distribuição dos valores de MIC entre as espécies de aeromonas móveis.

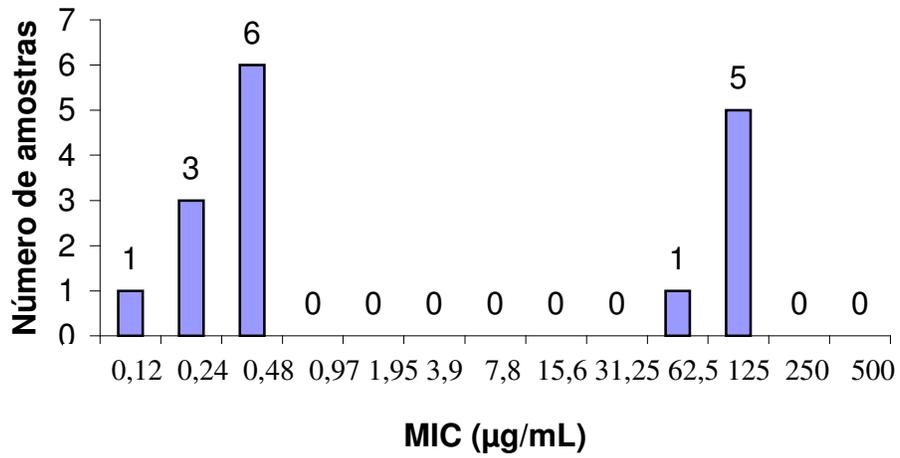


FIGURA 5: Distribuição de concentrações inibitórias mínimas de oxitetraciclina para isolados de *A. caviae*.

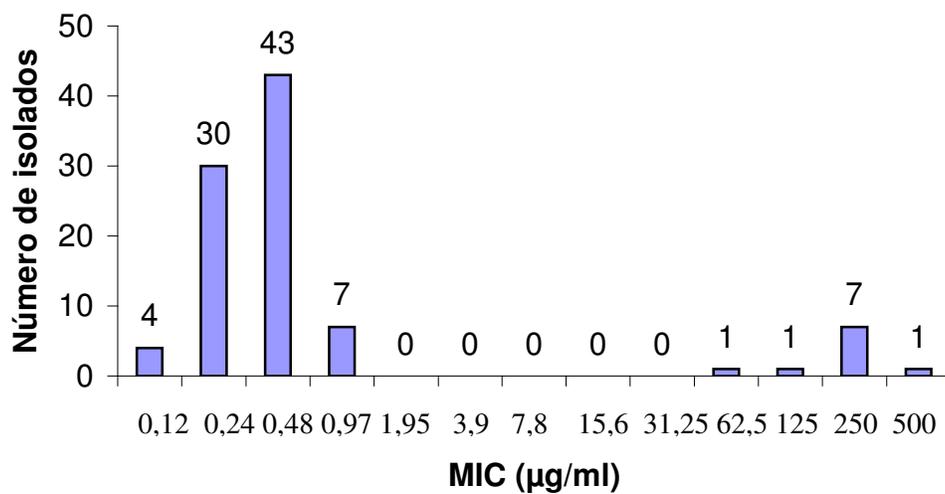


FIGURA 6: Distribuição de concentrações inibitórias mínimas de oxitetraciclina para isolados de *A. hydrophila*.

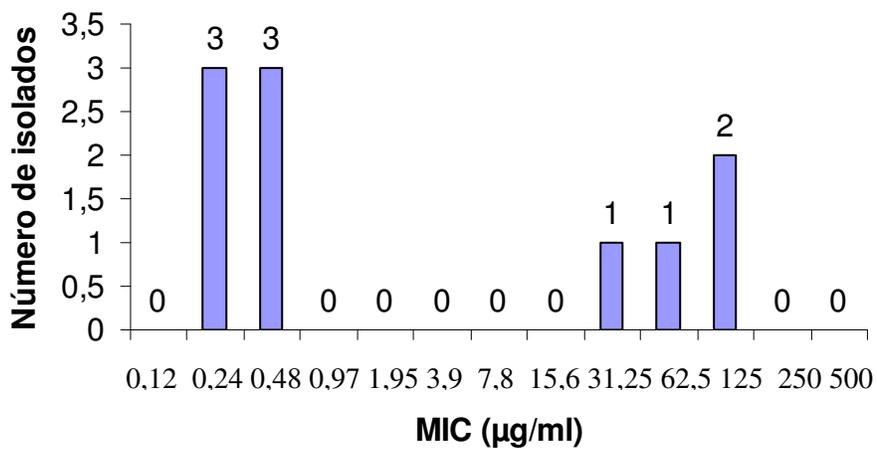


FIGURA 7: Distribuição de concentrações inibitórias mínimas de oxitetraciclina para isolados de *A. sobria*.

O gráfico da Figura 8 demonstra a simulação dos valores de BP para a interpretação dos valores de MIC de oxitetraciclina obtidos no presente estudo utilizando dados de  $C_{máx}$ . de salmão. Observa-se que todos os isolados testados seriam considerados resistentes, pelo cálculo do BP.

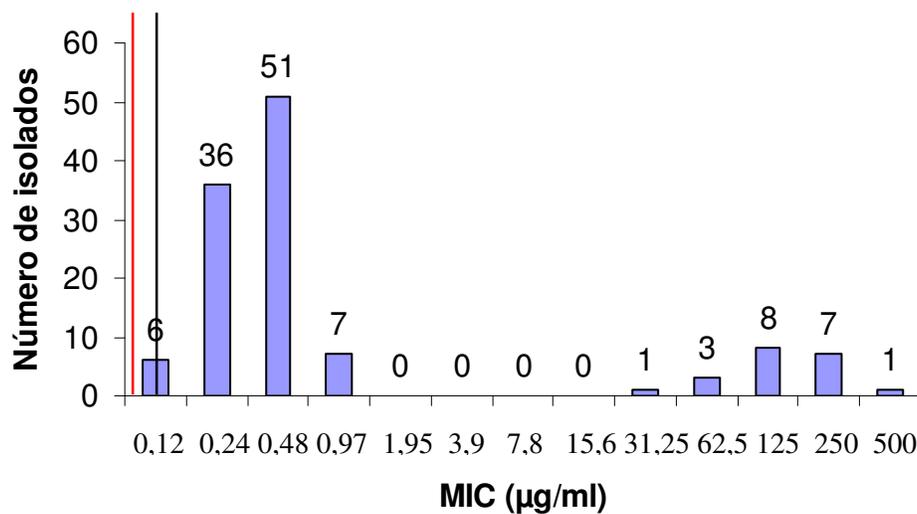


FIGURA 8: Distribuição de concentrações inibitórias mínimas de oxitetraciclina para isolados de aeromonas móveis em relação aos valores simulados de “Breakpoints” (A barra vermelha indica o BP calculado pelo método BSAC e a preta indica o BP calculado pelo método P80).

### **4.3 Concentração inibitória mínima de ácido oxolínico em aeromonas móveis**

Os mesmos isolados utilizados para determinação de MIC para oxitetraciclina também foram testados para o ácido oxolínico. Os resultados individuais das concentrações inibitórias mínimas de ácido oxolínico para os 120 isolados avaliados encontram-se na Tabela 3.

TABELA 3: Concentração inibitória mínima (MIC) de ácido oxolínico para os isolados de aeromonas móveis oriundos de água e de casos clínicos em peixes, de diferentes regiões geográficas.

Amostras	Espécie	Fonte	Origem geográfica	Propriedade <sup>1</sup>	MIC (µg/mL)	
AE 008-02	<i>A. caviae</i>	Caso clínico <sup>2</sup>	Lavras, MG	A	12,5	
AE 074-02	<i>A. caviae</i>	Caso clínico	Lavras, MG		0,048	
AE 080-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Lavras, MG		0,048	
AE 081-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Lavras, MG		0,048	
AE 092-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Lavras, MG		0,024	
AE 049-02	<i>A. hydrophila</i>	Água <sup>3</sup>	Lavras, MG		0,048	
AE 103-02	<i>A. hydrophila</i>	Água	Lavras, MG		0,024	
AE 025-02	<i>A. hydrophila</i>	Água	Lavras, MG		0,024	
AE 333-03	<i>A. hydrophila</i>	Água	Lavras, MG		0,024	
AE 078-02	<i>A. sobria</i>	Caso clínico	Lavras, MG		0,024	
AE 329-03	<i>A. sobria</i>	Caso clínico	Lavras, MG		0,024	
AE 331-03	<i>A. sobria</i>	Caso clínico	Lavras, MG		0,012	
AE 129-02	<i>A. caviae</i>	Caso clínico	Esmeraldas, MG		B	0,048
AE 130-02	<i>A. caviae</i>	Caso clínico	Esmeraldas, MG			0,048
AE 140-02	<i>A. caviae</i>	Caso clínico	Esmeraldas, MG	0,024		
AE 152-02	<i>A. caviae</i>	Caso clínico	Esmeraldas, MG	0,024		
AE 184-02	<i>A. caviae</i>	Caso clínico	Esmeraldas, MG	0,024		
AE 110-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Esmeraldas, MG	0,024		
AE 111-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Esmeraldas, MG	0,024		
AE 112-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Esmeraldas, MG	0,048		
AE 113-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Esmeraldas, MG	0,048		

Continua...

Tabela 3: cont.

AE 114-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Esmeraldas, MG		0,024
AE 115-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Esmeraldas, MG		0,024
AE 116-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Esmeraldas, MG		0,048
AE 117-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Esmeraldas, MG		0,024
AE 118-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Esmeraldas, MG		0,048
AE 178-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Esmeraldas, MG		0,048
AE 179-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Esmeraldas, MG		0,024
AE 180-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Esmeraldas, MG		0,048
AE 301-03	<i>A. caviae</i>	Caso clínico	Itutinga, MG	C	0,024
AE 310-03	<i>A. caviae</i>	Caso clínico	Itutinga, MG		0,024
AE 312-03	<i>A. caviae</i>	Caso clínico	Itutinga, MG		0,024
AE 314-03	<i>A. caviae</i>	Caso clínico	Itutinga, MG		0,19
AE 288-03	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Itutinga, MG		0,048
AE 295-03	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Itutinga, MG		0,048
AE 298-03	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Itutinga, MG		0,048
AE 413-04	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Itutinga, MG		0,048
AE 414-04	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Itutinga, MG		0,024
AE 415-04	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Itutinga, MG		0,048
AE 411-04	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Itutinga, MG		0,048
AE 412-04	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Itutinga, MG		0,048
AE 416-04	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Itutinga, MG		0,024
AE 417-04	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Itutinga, MG		0,048
AE 284-03	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Itutinga, MG		0,024
AE 292-03	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Itutinga, MG		0,048
AE 305-03	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Itutinga, MG		0,39

Continua...

Tabela 3: cont.

AE 294-03	<i>A. sobria</i>	Caso clínico	Itutinga, MG		0,048
AE 296-03	<i>A. sobria</i>	Caso clínico	Itutinga, MG		0,048
AE 308-03	<i>A. sobria</i>	Caso clínico	Itutinga, MG		0,048
AE 315-03	<i>A. sobria</i>	Caso clínico	Itutinga, MG		0,048
AE 359-03	<i>A. caviae</i>	Água	Três Pontas, MG	D	12,5
AE 360-03	<i>A. caviae</i>	Água	Três Pontas, MG		12,5
AE 361-03	<i>A. caviae</i>	Água	Três Pontas, MG		12,5
AE 364-03	<i>A. caviae</i>	Água	Três Pontas, MG		25
AE 365-03	<i>A. caviae</i>	Água	Três Pontas, MG		25
AE 366-03	<i>A. hydrophila</i>	Água	Três Pontas, MG		50
AE 192-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Passo Fundo, RS	E	0,048
AE 195-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Passo Fundo, RS		0,024
AE 198-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Passo Fundo, RS		0,048
AE 201-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Passo Fundo, RS		0,048
AE 205-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Passo Fundo, RS		0,048
AE 190-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Passo Fundo, RS		0,024
AE 193-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Passo Fundo, RS		0,048
AE 196-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Passo Fundo, RS		0,048
AE 199-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Passo Fundo, RS		0,048
AE 202-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Passo Fundo, RS		0,024
AE 194-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Passo Fundo, RS		0,024
AE 197-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Passo Fundo, RS		0,048
AE 200-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Passo Fundo, RS		0,024
AE 203-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Passo Fundo, RS		0,024
AE 204-02	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Passo Fundo, RS		0,024

Continua...

Tabela 3: cont.

AE 405-04	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Paraíba do Sul, RJ	F	0,024
AE 406-04	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Paraíba do Sul, RJ		0,048
AE 407-04	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Paraíba do Sul, RJ		0,024
AE 408-04	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Paraíba do Sul, RJ		0,048
AE 409-04	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Paraíba do Sul, RJ		0,048
AE 410-04	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Paraíba do Sul, RJ		0,024
AE 403-04	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Paraíba do Sul, RJ		0,024
AE 404-04	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Paraíba do Sul, RJ		0,024
AE 262-03	<i>A. hydrophila</i>	Água	Perdões, MG	G	0,39
AE 264-03	<i>A. hydrophila</i>	Água	Perdões, MG		0,024
AE 265-03	<i>A. hydrophila</i>	Água	Perdões, MG		0,048
AE 266-03	<i>A. hydrophila</i>	Água	Perdões, MG		0,024
AE 267-03	<i>A. hydrophila</i>	Água	Perdões, MG		0,024
AE 255-03	<i>A. hydrophila</i>	Água	Perdões, MG		0,048
AE 372-03	<i>A. hydrophila</i>	Água	Itutinga, MG	H	0,048
AE 375-03	<i>A. hydrophila</i>	Água	Itutinga, MG		0,012
AE 376-03	<i>A. hydrophila</i>	Água	Itutinga, MG		0,19
AE 384-03	<i>A. hydrophila</i>	Água	Itutinga, MG		0,012
AE 389-03	<i>A. hydrophila</i>	Água	Itutinga, MG	I	0,024
AE 392-03	<i>A. hydrophila</i>	Água	Itutinga, MG		0,024
AE 401-03	<i>A. hydrophila</i>	Água	Itutinga, MG		0,048
AE 402-03	<i>A. hydrophila</i>	Água	Itutinga, MG		0,048
AE 344-03	<i>A. hydrophila</i>	Água	Três Pontas, MG	J	0,024
AE 345-03	<i>A. hydrophila</i>	Água	Três Pontas, MG		0,048
AE 350-03	<i>A. hydrophila</i>	Água	Três Pontas, MG		0,048
AE 348-03	<i>A. sobria</i>	Água	Três Pontas, MG		0,012

Continua...

Tabela 3: cont.

AE 208-02	<i>A. hydrophila</i>	Água	Carmo da Cachoeira, MG	L	0,024
AE 209-02	<i>A. hydrophila</i>	Água	Carmo da Cachoeira, MG		0,048
AE 211-02	<i>A. hydrophila</i>	Água	Carmo da Cachoeira, MG		0,024
AE 212-02	<i>A. hydrophila</i>	Água	Carmo da Cachoeira, MG		0,048
AE 213-02	<i>A. hydrophila</i>	Água	Carmo da Cachoeira, MG		0,048
AE 214-02	<i>A. hydrophila</i>	Água	Carmo da Cachoeira, MG		0,048
AE 215-02	<i>A. hydrophila</i>	Água	Carmo da Cachoeira, MG		0,048
AE 217-02	<i>A. hydrophila</i>	Água	Carmo da Cachoeira, MG		0,048
AE 219-02	<i>A. hydrophila</i>	Água	Carmo da Cachoeira, MG		0,048
AE 220-02	<i>A. hydrophila</i>	Água	Carmo da Cachoeira, MG		0,024
AE 221-02	<i>A. hydrophila</i>	Água	Carmo da Cachoeira, MG		0,024
AE 222-02	<i>A. hydrophila</i>	Água	Carmo da Cachoeira, MG		0,024
AE 223-02	<i>A. hydrophila</i>	Água	Carmo da Cachoeira, MG		0,048
AE 224-02	<i>A. hydrophila</i>	Água	Carmo da Cachoeira, MG		0,024
AE 225-02	<i>A. hydrophila</i>	Água	Carmo da Cachoeira, MG		0,024
AE 226-02	<i>A. hydrophila</i>	Água	Carmo da Cachoeira, MG		0,024
AE 227-02	<i>A. hydrophila</i>	Água	Carmo da Cachoeira, MG		0,048
AE 418-05	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Dourados, MS	M	0,006
AE 419-05	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Dourados, MS		0,006
AE 420-05	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Dourados, MS		0,006
AE 421-05	<i>A. hydrophila</i>	Caso clínico	Dourados, MS		0,003
AE 422-05	<i>A. sobria</i>	Caso clínico	Dourados, MS		0,78
AE 423-05	<i>A. sobria</i>	Caso clínico	Dourados, MS		1,56

1- Diferentes unidades de piscicultura indicadas pelas letras A-L;

2- Bactérias isoladas de peixes com septicemia hemorrágica;

3- Bactérias isoladas de água de abastecimento e de tanque de pisciculturas.

Os valores de ácido oxolínico separaram-se em três grupos, de acordo com os valores de MIC. Como pode ser observado na Figura 9, houve uma separação das bactérias testadas em três categorias: uma com valor de MIC  $\leq 0,048\mu\text{g/mL}$  (89,17% dos isolados), outra com valor de MIC  $\geq 0,195\mu\text{g/mL}$  e  $\leq 1,56\mu\text{g/mL}$  (5% dos isolados) e uma terceira, com valor de MIC  $\geq 12,5\mu\text{g/mL}$  (5,8%). Não houve isolado com MIC de  $0,097\mu\text{g/mL}$  e entre  $3,125$  e  $6,25\mu\text{g/mL}$ . Foi observado que os isolados de aeromonas móveis da propriedade “D”, 100% mostraram valor de MIC alto para as duas drogas.

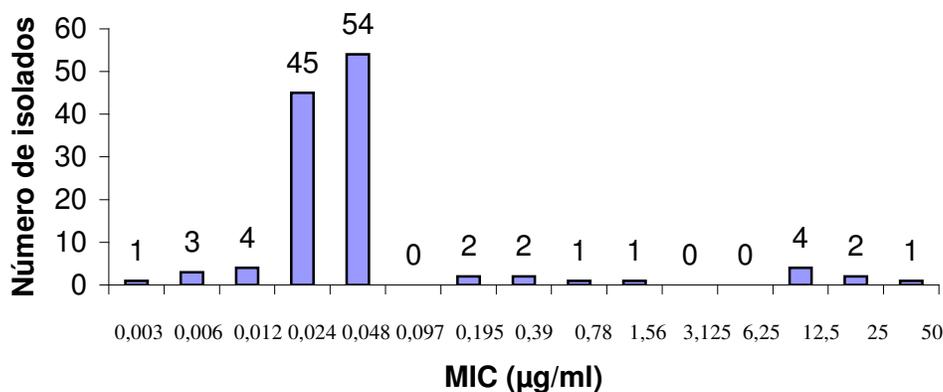


FIGURA 9: Distribuição de concentrações inibitórias mínimas de ácido oxolínico para isolados de aeromonas móveis.

O gráfico da Figura 10 apresenta os valores de MIC separados pelas diferentes fontes analisadas (água de cultivo e caso clínico de septicemia hemorrágica em peixes). Na avaliação das duas fontes de isolados frente ao ácido oxolínico, também não foi observada diferença na distribuição dos isolados.

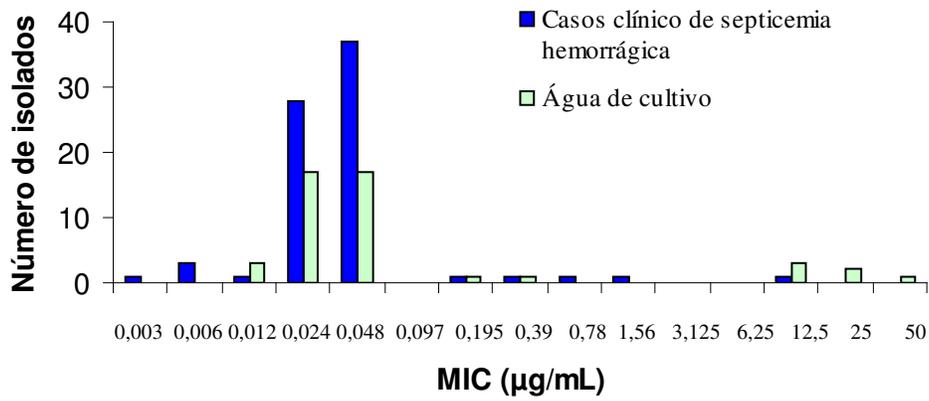


FIGURA 10: Distribuição de concentrações inibitórias mínimas de ácido oxolínico para aeromonas móveis oriundas de águas de cultivo e casos clínicos de septicemia hemorrágica.

As Figuras 11, 12 e 13 exibem os valores de MIC separados pelas espécies de *Aeromonas* analisadas frente ao ácido oxolínico. Não foi observada diferença na distribuição dos valores de MIC entre as espécies de aeromonas móveis analisadas.

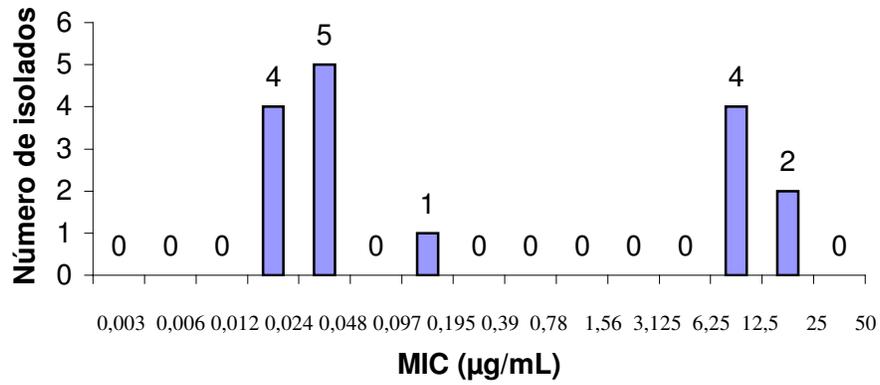


FIGURA 11: Distribuição de concentrações inibitórias mínimas de ácido oxolínico para isolados de *A. caviae*.

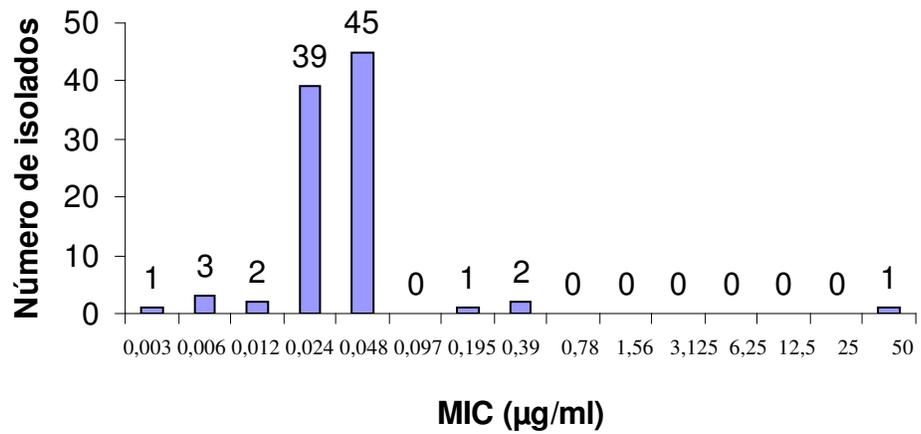


FIGURA 12: Distribuição de concentrações inibitórias mínimas de ácido oxolínico para isolados de *A. hydrophila*.

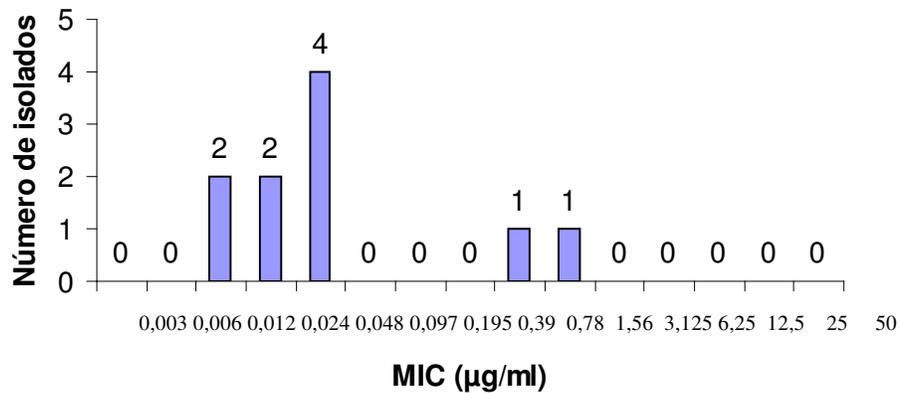


FIGURA 13: Distribuição de concentrações inibitórias mínimas de ácido oxolínico para isolados de *A.sobria*.

O gráfico da Figura 14 demonstra a simulação dos valores de BP para a interpretação dos valores de MIC de ácido oxolínico obtidos no presente estudo utilizando dados de  $C_{máx.}$  de salmão. Observa-se que todos os isolados testados seriam considerados resistentes, pelo cálculo do BP BSAC, com valores de MIC acima de 0,1µg/mL e pelo BP P80 acima de 0,03 µg/mL.

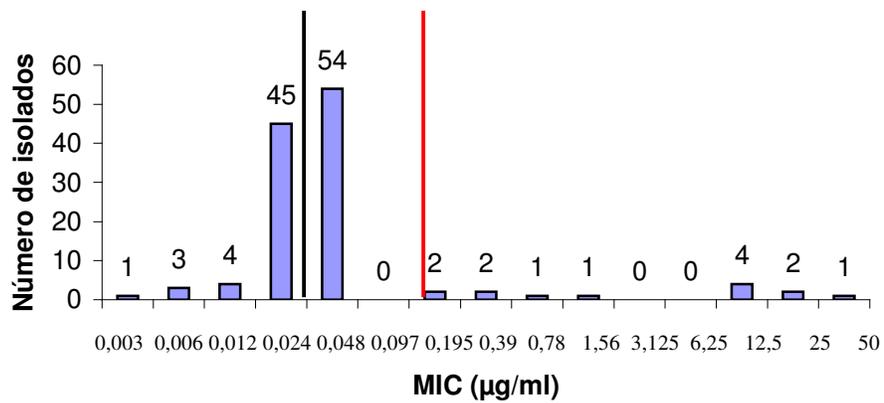


FIGURA 14: Distribuição de concentrações inibitórias mínimas de ácido oxolínico para isolados de aeromonas móveis em relação aos valores simulados de “Breakpoints” (A barra vermelha indica o BP calculado pelo método BSAC e a preta indica o BP calculado pelo método P80).

## 5 DISCUSSÃO

No Brasil, não há informações precisas sobre a quantidade de oxitetraciclina e ácido oxolínico utilizados em aqüicultura. Até o momento, o país não dispõe de antibióticos licenciados especificamente para a aqüicultura pelo Ministério da Agricultura, mas, pela experiência do AQUAVET em consultoria no Brasil, o uso de oxitetraciclina é comum e o de ácido oxolínico é ocasional.

Em muitos países há uma ampla utilização do ácido oxolínico na aqüicultura. Bruun et al. (2000) encontraram 66% de *Flavobacterium psychrophilum* resistentes ao ácido oxolínico em 387 isolados provenientes de surto clínico e ambiente, na Dinamarca. Izumi & Aranishi (2004) relataram 51,8% de resistência ao ácido oxolínico em *Flavobacterium psychrophilum* no Japão, onde este antibiótico é amplamente utilizado. Avendaño-Herrera et al. (2005), analisando 32 isolados de *Tenacibaculum maritimum* na Espanha, encontraram 100% de resistência ao ácido oxolínico.

Em um estudo, prévio Pereira Júnior (2005) determinou o MIC de isolados de *A. hydrophila* do banco de culturas de bactérias AQUAVET (UFLA, Brasil). Alguns isolados usados pelo autor também foram incluídos no presente estudo e os valores de MIC encontrados tiveram a mesma distribuição modal, porém, com maiores valores. No trabalho citado foi utilizada a microdiluição e o tempo e a temperatura de incubação foram, respectivamente, de 48 horas e 30°C.

A metodologia empregada no presente estudo foi a proposta pelo CLSI (2005). Deve-se registrar que, antes da realização do mesmo, que não existiam

dados prévios em relação ao MIC de aeromonas móveis, utilizando-se um protocolo adequado.

### **5.1 Perfil de resistência para as variáveis analisadas**

A determinação de resistência ou sensibilidade de uma bactéria representa um elemento crítico para uma terapia antimicrobiana racional e apropriada (Coyne et al., 2004a,b,c, 2005).

Neste estudo, observou-se diferença no perfil de resistência dos 120 isolados testados, obtendo-se bactérias sensíveis e resistentes. Esta diferença pode estar associada à presença de genes de resistência que conferem esta propriedade às bactérias (Butaye et al., 2003).

Para a interpretação dos valores de MIC dos isolados testados, utilizou-se o modelo de distribuição modal, para a classificação em sensível e resistente Bruun et al. (2000). Nesse estudo, foi observada uma nítida distribuição bimodal das concentrações inibitórias mínimas de oxitetraciclina nas variáveis analisadas (Fig. 3, 4, 5, 6 e 7). Para o ácido oxolínico, houve perfis diferenciados, uma distribuição polimodal quando os isolados foram comparados em conjunto (Fig. 9), na análise referente as fontes (Fig. 10) e para as espécies *A.caviae* e *A. hydrophila* (Fig. 11 e 12) e uma distribuição bimodal para a espécie *A. sobria*. A distribuição polimodal para o ácido oxolínico pode ser devido a um amplo uso de norfloxacin na propriedade “M” que também é uma quinolona e apresenta o mesmo mecanismo de ação do ácido nalidíxico, o qual é precursor do ácido oxolínico. Nesta propriedade há um histórico de uso de norfloxacin por dois anos.

Observaram-se diferenças nas propriedades avaliadas, reforçando a idéia de que a resistência a antibióticos é variada entre ambientes e regiões. As propriedades “D”, “F” e “M”, localizadas em Três Pontas, MG, Paraíba do Sul, RJ e Dourados, MS, respectivamente, apresentaram os maiores valores de MIC para a oxitetraciclina. As pisciculturas “F” e “M” têm histórico de amplo uso desta droga, o que pode ter selecionado isolados mais resistentes.

Quanto à análise feita separando-se as fontes (água e caso clínico), o padrão de distribuição foi o mesmo: bactérias resistentes e sensíveis nas duas fontes analisadas frente aos antibióticos testados (Figuras 4 e 10), o que pode ser devido à mesma origem destas bactérias. Porém, aqueles isolados presentes em peixes doentes podem ser mais resistentes devido à pressão de seleção exercida sobre os mesmos, com o uso do antibiótico nos animais acometidos, o que não foi observado neste estudo. Isso demonstra que os isolados que causam a doença nos peixes não são mais patogênicos por apresentarem genes de resistência a antibióticos, pois foram encontrados tanto isolados sensíveis como resistentes, em peixes acometidos.

As espécies de aeromonas móveis, quando comparadas separadamente, mostraram um mesmo padrão de distribuição de valores de MIC para a oxitetraciclina (Figuras 5, 6 e 7). No ácido oxolínico, o padrão foi diferente, polimodal em *A. hydrophila* e *A. caviae* e bimodal para *A. sobria* (Figuras 11, 12 e 13). De seis isolados de *A. caviae*, cinco apresentaram resistência às duas drogas testadas (AE 359-03, AE 360-03, AE 361-03, AE 364-03 e AE 365-03). Já em *A. sobria*, os isolados resistentes à oxitetraciclina não foram os mesmos resistentes ao ácido oxolínico, e para a *A. hydrophila*, somente um (AE 366-03) apresentou resistência aos dois antibióticos.

Uma limitação na interpretação dos valores MIC utilizando o modelo de distribuição bimodal ou polimodal é que, mesmo os isolados classificados como sensíveis podem se comportar como resistentes em condições de infecção nos hospedeiros (Bruun et al., 2000). Uma alternativa seria a interpretação dos valores de MIC utilizando os “breakpoints”, por meio da  $C_{m\acute{a}x}$  plasmática de um antibiótico em peixes.

Alguns problemas são encontrados para determinar a concentração plasmática máxima de uma droga pela terapia oral em peixes. Primeiro, é a inapetência associada ao quadro clínico nas infecções, tendo consequência potencial na fração da população que apresenta a doença e, conseqüentemente, é aquela que ingere menos antibiótico. Segundo problema está associado com a grande população em um tanque onde existem significantes variações na captura do alimento. Outros fatores que também podem interferir são: diferenças existentes de peixe a peixe, tipo de alimento, estratégia alimentar, taxa de ganho de peso, ambiente da propriedade, fatores ecológicos e época do ano.

Os levantamentos farmacocinéticos são predominantemente realizados em animais saudáveis e de uma pequena parcela amostral, freqüentemente realizados em laboratório. Como conseqüências, geram poucas informações sobre a eficácia de um tratamento em condições naturais. Além de todos os fatores citados, existem ainda variações entre cada espécie de peixe.

No Brasil, não existem trabalhos determinando a concentração plasmática máxima dos antibióticos usados em piscicultura para as espécies nativas e exóticas cultiváveis, como a Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Na literatura, há relatos de valores em espécies de peixes de clima temperado, como o salmão (*Salmo salar*) e truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*).

No presente estudo houve diferença comparando-se as interpretações dos valores de MIC usando o cálculo de BP e a distribuição modal. Para a oxitetraciclina todos os isolados seriam considerados resistentes pelo cálculo do BP, tanto pelo BSAC, como pelo P80. Já para o ácido oxolínico, 89,17% dos isolados seriam considerados sensíveis pelo cálculo do BP BSAC e 35,8%, pelo BP P80. Considera-se a distribuição modal a mais eficiente na avaliação dos resultados de MIC. Em uma das propriedades avaliadas neste estudo (“C”), a maioria das aeromonas móveis isoladas foram classificadas como sensíveis pela distribuição modal e resistentes pelo cálculo de BP (BSAC e P80). A terapia empregada nesta piscicultura pelo AQUAVET, baseada na distribuição modal, foi eficaz.

São necessários mais estudos sobre a farmacocinética e farmacodinâmica dos antibióticos utilizados em peixes no Brasil para que sejam estabelecidos “breakpoints”.

## **5.2 Potenciais dos antibióticos avaliados para a piscicultura**

Neste estudo, observou-se um pequeno número de isolados resistentes ao ácido oxolínico. Isso, provavelmente, advém do pouco uso desta droga no Brasil. Contudo, o uso freqüente de ácido oxolínico na Europa, USA e Japão pode ser relacionado ao aumento de populações bacterianas resistentes nesses países.

A oxitetraciclina e o ácido oxolínico diferem em seu modo de ação, sendo o primeiro bacteriostático e o segundo bactericida. De modo geral, as drogas bactericidas tendem a apresentar maior eficiência terapêutica pela eliminação mais rápida da bactéria infectante. Já os antibióticos bacteriostáticos

demandam um período de terapia mais prolongado para o alcance do efeito desejado.

A resistência aos antibióticos, em termos ambientais, é um problema muito discutido. No ácido oxolínico, a resistência só é expressiva com o aumento do número de clones da população no ambiente. Como a resistência a esta droga é cromossômica, a bactéria dificilmente perderá esta característica e pode declinar com a diminuição do uso de antibióticos somente quando a população diminuir no ambiente. Já para oxitetraciclina, onde a resistência é determinada por genes transferidos por elementos móveis, ela pode diminuir nas bactérias com a perda dos elementos móveis de transferência. O fator preocupante para as tetraciclina é a transferência de genes para bactérias de espécies diferentes, até mesmo de não patogênicas para patogênicas. A temperatura ambiental, além de interferir no comportamento dos peixes e na farmacocinética dos antibióticos, também pode influenciar características de resistência bacteriana.

Como a frequência de resistência à oxitetraciclina (16,67%) e ao ácido oxolínico (5,83%) observada foi baixa, ambas as drogas apresentam bom potencial para uso na piscicultura.

## 6 CONCLUSÃO

Segundo a metodologia utilizada, os isolados de aeromonas móveis testados apresentaram valores de MIC distintos. Frente à oxitetraciclina, os isolados dividiram-se em sensíveis (83,33%,  $MIC \leq 0,97 \mu\text{g/mL}$ ) e resistentes (16,67%,  $MIC \geq 31,25 \mu\text{g/mL}$ ). Já para o ácido oxolínico, os isolados distribuíram-se em três grupos: sensíveis (89,17%,  $MIC \leq 0,048 \mu\text{g/mL}$ ), intermediários (5%,  $0,195 \mu\text{g/mL} \leq MIC \leq 1,56 \mu\text{g/mL}$ ) e resistentes (5,8%,  $MIC \geq 12,5 \mu\text{g/mL}$ ).

Para as fontes analisadas, o perfil de resistência encontrado foi semelhante, tanto para isolados de água como de casos clínicos de septicemia hemorrágica. Quando os isolados provenientes de água foram comparados frente à oxitetraciclina, constatou-se que 86,66% foram sensíveis e, para o ácido oxolínico, 82,22%. Já comparando isolados de caso clínico, para a oxitetraciclina obtiveram-se 81,33% e ácido oxolínico, 93,33% isolados sensíveis.

Quando se comparou as espécies de aeromonas móveis, os valores de MIC de oxitetraciclina apresentaram uma distribuição bimodal e para o ácido oxolínico, polimodal e bimodal, sendo a maioria sensível. Para a oxitetraciclina, 62,5% dos isolados de *A. caviae*, 89,36% de *A. hydrophila* e 60% de *A. sobria* foram sensíveis. Em ácido oxolínico, 56,25% dos isolados de *A. caviae*, 95,74% de *A. hydrophila* e 80% de *A. sobria* foram sensíveis.

Ao avaliar pisciculturas de diferentes origens geográficas, nove apresentaram maior frequência de isolados sensíveis e três exibiram um número maior de isolados resistentes.

A ocorrência, mesmo em pequena quantidade, de isolados resistentes aos antibióticos testados, indica risco na utilização destas drogas na piscicultura, com chance de seleção de bactérias resistentes.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDERMAN, D. J.; SMITH, P. Development of draft protocols of standard reference methods for antimicrobial agent susceptibility testing of bacteria associated with fish diseases. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 196, n. 3/4, p. 211-243, May 2001.
- ALIABADI, F. S.; LEES, P. Antibiotic treatment for animals: effect on bacterial population and dosage regimen optimisation. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 14, n. 4, p. 307-313, May 2000.
- AVENDANÕ-HERRERA, R.; IRGANG, R.; NÚÑEZ, S.; ROMALDE, J. L.; TORANZO, A. E. Recommendation of an appropriate medium for *in vitro* drug susceptibility testing of the fish pathogen *Tenacibaculum maritimum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 49, n. 1, p. 82-87, Jan. 2005.
- BIZANI, D.; BRANDELLI, A. Antimicrobial susceptibility, hemolysis, and hemagglutination among *Aeromonas* spp. isolated from water of a bovine abattoir. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 334-339, Oct./Dec. 2001.
- BROWN, L. Aquaculture for Veterinarians: fish husbandry and medicine. **Pergammon Press**, Oxford, 1993. 447 p.
- BRUUN, M. S.; SCHMIDT, A. S.; MADSEN, L.; DALSGAARD, I. Antimicrobial resistance patterns in Danish isolates of *Flavobacterium psychrophilum*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 187, n. 3/4, p. 201-212, July 2000.
- BSAC. Aguide to sensitivity testing. Report of the working party on antibiotic sensitivity testing of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 23, n. 1, p. 1-47, 1991.
- BUTAYE, P.; CLOECKAERT, A.; SCWARZ, S. Mobile genes coding for efflux-mediated antimicrobial resistance in Gram-positive and Gram-negative bacteria. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 22, n. 3, p. 205-210, Sept. 2003.

CHOPRA, I. New developments in tetracycline antibiotics: glycylicyclines and tetracycline efflux pump inhibitors. **Drug Resistance Updates**, Edinburgh, v. 5, n. 3/4, p. 119-125, June/Aug. 2002.

CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 65, n. 2, p. 232-260, 2001.

CLSI, 1997. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. 4. ed. Approved Standard. CLSI document M7-A4, Clinical and Laboratory Standards Institute, Villanova.

CLSI, 2005. **Methods for Broth Dilution Susceptibility Testing of Bacteria Isolated From Aquatic Animals**; Proposed Guideline (1th ed). CLSI document M49-P, v. 25, n. 22, Clinical and Laboratory Standards Institute, Villanova

COHEN, F. L.; TARTASKY, D. State of the science: Microbial resistance to drug therapy: A review. **American Journal of Infection Control**, St. Louis, v. 25, n. 1, p. 51-64, Feb. 1997.

COLWELL, R. R.; MACDONELL, M. R.; DE LEY, J. Proposal to recognize the family *Aeromonadaceae* fam. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Amsterdam, v. 36, n. 3, p. 473-477, July 1986.

CONSTANZO, S. D.; MURBY, J.; BATES, J. Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 51, n. 1/4, p. 218-223, 2005.

COYNE, R.; BERGH, Ø.; SAMUELSEN, K. A.; LUNESTAD, B. T.; NILSEN, H.; DALSGAARD, I.; SMITH, P. Attempt to validate breakpoint MIC values estimated from pharmacokinetic data obtained during oxolinic acid therapy of winter ulcer disease in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 238, n. 1/4, p. 51-66, Sept. 2004a.

COYNE, R.; SAMUELSEN, O.; BERGH, Ø; ANDERSEN, K.; PURSELL, L.; DALSGAARD, I.; SMITH, P. On the validity of setting breakpoint minimum inhibition concentration achieved following oral administration of oxytetracycline. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 239, n. 1/4, p. 23-35, Sept. 2004b.

COYNE, R.; SAMUELSEN, O.; KONGSHAUG, H.; ANDERSEN, K.; DALSGAARD, I.; SMITH, P.; BERGH, Ø. A comparison of oxolinic acid concentrations in farmed and laboratory held rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following oral therapy. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 239, n. 1/4, p. 1-13, Sept. 2004c.

COYNE, R.; BERGH, Ø.; SMITH, P.; SAMUELSEN, O. A question of temperature related differences in plasma oxolinic acid concentrations achieved in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under laboratory conditions following multiple oral dosing. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 245, n. 1/4, p. 13-17, Mar. 2005.

DAVISON, J. Genetic Exchange between Bacteria in the Environment. **Plasmid**, San Diego, v. 42, n. 2, p. 73-91, Sept. 1999.

DAVISON, H. C.; LOW, J. C.; WOOLHOUSE, M. E. J. What is antibiotic resistance and how can we measure it? **Trends in Microbiology**, London, v. 8, n. 12, p. 554-559, Dec. 2000.

DePAOLA, A.; PEELER, J. T.; RODRICK, G. E. Effect of oxytetracycline-medicated feed on antibiotic resistance of Gram-negative bacteria in catfish ponds. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 6, p. 2335-2340, June 1995.

DÍAZ-CRUZ, M. S.; ALDA, M. J. L.; BARCELÓ, D. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soil, sediments and sludge. **Trends in Analytical Chemistry**, London, v. 22, n. 6, p. 340-351, 2003.

ELLINGSEN, O. F.; MIDTTUN, B.; ROGSTAD, A.; SYVERTSEN, C.; SAMUELSEN, O. B. Dosage regime experiments with oxolinic acid and flumequine in Atlantic salmon (*Salmo salar* L) held in seawater. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 209, n. 1/4, p. 19-34, June 2002.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **The State of World Fisheries and Aquaculture**. Washington, 2002.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **The State of World Fisheries and Aquaculture**. Washington, 2003.

GHENGHESH, K. S.; EL-GHODBAN, A.; DKAKNI, R.; ABEID, S.; ALTOMI, A.; TARHUNI, A.; MARIALIGETI, K. Prevalence, species differentiation, haemolytic activity, and antibiotic susceptibility of aeromonads in untreated well water. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Brazil, v. 96, n. 2, p. 169-173, Feb. 2001.

GUARDABASSI, L.; DALSGAARD, A.; RAFFATELLU, M.; OLSEN, J. E. Increase in the prevalence of oxolinic acid resistant *Acinetobacter* spp. observed in a stream receiving the effluent from a freshwater trout farm following the treatment with oxolinic acid-medicated feed. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 188, n. 3/4, p. 205-218, Sept. 2000.

GOÑI-URRIZA, M.; CAPDEPUY, M.; ARPIN, C.; RAYMOND, N.; CAUMETTE, P.; QUENTIN, C. Impact of a urban effluent on antibiotic resistance of riverine Enterobacteriaceae and *Aeromonas* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 1, p. 125-132, Jan. 2000.

GÓRNIK, S. L. Quimioterápicos. In: SPINOSA, H. S. , GÓRNIK, S. L. , BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. Cap. 36, p. 348-356.

HÄNNINEN, M. L.; OIVANEN, P.; HIRVELÄ-KOSKI, V. *Aeromonas* species in fish, fish-eggs, shrimp and freshwater. **International Journal of Food Microbiology**, Washington, v. 34, n. 1, p. 17-26, Jan. 1997.

HATHA, M. A. A.; VIVEKANANDHAN, G.; CHRISTOL, J. J. Antibiotic resistance pattern of motile aeromonads from farmed raised fresh water fish. **International Journal of Food Microbiology**, Washington, v. 98, n. 2, p. 131-134, Feb. 2005.

HIRSCH, D. **Identificação e resistência antimicrobiana de aeromonas móveis provenientes de peixes e ambientes aquáticos**. 2004. 42p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

HO, S-P.; HSU, T. Y.; CHEN, M. H.; WANG, W. S. Antibacterial effect of chloramphenicol, thiamphenicol and florfenicol against aquatic animal bacteria. **Journal Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 62, n. 5, p. 479-485, May 2000.

HOLMSTRÖM, K.; GRÄSLUND, S.; WAHLSTRÖM, A.;  
POUNSHOMPOO, S.; BENGTSSON, B. - E.; KAUTSKY, N. Antibiotic use  
in shrimp farming and implications for environmental impacts and human  
health. **International Journal of Food Science and Tecnology, Oxford**, v. 38,  
n. 3, p. 255-266, Mar. 2003.

HUBER, W. G. Tetraciclina. In: BOOTH, N. H. , McDONALD, L. E.  
**Farmacologia e terapêutica em veterinária**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara  
Koogan, 1992. Cap. 50, p. 655-661.

IRIE, T.; WATARAI, S.; IWASAKI, T.; KODAMA, H. Protection against  
experimental *Aeromonas salmonicida* infection in carp by oral immunization  
with bacterial antigen entrapped liposomes. **Fish and Shellfish Immunology**,  
London, v. 18, n. 3, p. 235-242, Mar. 2005.

ISHIHARA, K.; KIRA, T.; OGIKUBO, K.; MORIOKA, A.; KOJIMA, A.;  
KIJIMA-TANAKA, M.; TAKAHASHI, T.; TAMURA, Y. Antimicrobial  
susceptibilities of *Campylobacter* isolated from food-producing animals on  
farms (1999–2001): results from the Japanese Veterinary Antimicrobial  
Resistance Monitoring Program. **International Journal of Antimicrobial  
Agents**, Amsterdam, v. 24, n. 3, p. 63-69, Sept. 2004.

IZUMI, S.; ARANISHI, F. Relationship between *gyrA* and quinolone resistance  
in *Flavobacterium psychrophilum* isolates. **Applied and Environmental  
Microbiology**, Washington, v. 70, n. 7, p. 3968-3972, July 2004.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. Evolving concepts regarding the genus  
*Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease presentations, and  
unanswered questions. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 27, n. 2, p.  
332-344, Aug. 1998.

KIROV, S. M.; TASSELL, B. C.; SEMMLER, A. B. T.; O'DONOVAN, L. A.;  
RABAAN, A. A.; SHAW, J. G. Lateral flagella and swarming motility in  
*Aeromonas* species. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 184, n. 2, p. 547-  
555, Jan. 2002.

KOZINSKA, A.; GUZ, L. The effect of various *Aeromonas bestiarum* vaccines  
on non-specific immune parameters and protection of carp (*Cyprinus carpio* L.).  
**Fish & Shellfish Immunology**, London, v. 16, n. 3, p. 437-445, Mar. 2004.

MASSA, S.; ALTIERI, C.; D'ANGELA, A. The occurrence of *Aeromonas* spp. in natural mineral water and well water. **International Journal of Food Microbiology**, Washington, v. 63, n. 1/2, p. 169-173, Jan. 2001.

MATEU, E.; MARTIN, M. Why is anti-microbial resistance a veterinary problem As Well?. **Journal of Veterinary Medicine B**, Berlin, v. 48, n. 8, p. 569-58, Oct. 2001.

MEAYS, C. L.; BROERSMA, K.; NORDIN, R.; MAZUMDER, A. Source tracking fecal bacteria in water: a critical review of current methods. **Journal of Environmental Management**, London, v. 73, n. 1, p. 71-79, Oct. 2004.

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

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

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 03 jan. 2006.

MIRANDA, C. D.; ZEMELMAN, R. Bacterial resistance to oxytetracycline in Chilean salmon farming. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 212, 1/4, p. 31-47, Sept. 2002.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Taxonomy Browser. Disponível em : <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/TAXONOMY?Browser/wwwtax.cgi?mode=Undef&id=84642&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>>. Acesso em : 20 jan. 2006.

NIKOSKELAINEN, S.; VERHO, S.; AIRAS, K.; LILIUS, E. -M. Adhesion and ingestion activities of fish phagocytes induced by bacterium *Aeromonas salmonicida* can be distinguished and directly measured from highly diluted whole blood of fish. **Developmental & Comparative Immunology**, Oxford, v. 29, n. 6, p. 525-537, 2005.

NOGA, E. J. **Fish disease: diagnosis and treatment**. St. Louis: Mosby-Year Book, 1996. 367 p.

PATHAK, S. P.; GOPAL, K. Occurrence of antibiotic and metal resistance in bacteria from organs of river fish. **Environmental Research**, San Diego, v. 98, n. 1, p. 100-103, May 2005.

PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M. **Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento**. 2. ed. Maringá: Editora da UEM, 2002. Cap. IV, p. 149-206, 2002.

PEREIRA JÚNIOR, D. J. **Concentração inibitória mínima de oxitetraciclina para aeromonas móveis isoladas de pescado**. 2005. 44 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PETERSEN, A.; DALSGAARD, A. Antimicrobial resistance of intestinal *Aeromonas* spp. and *Enterococcus* spp. in fish cultured in integrated broiler-fish farms in Thailand. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 219, n. 1/4, p. 71-82, Apr. 2003.

RADU, S.; AHMAD, N.; LING, F. H.; REEZAL, A. Prevalence and resistance to antibiotics for *Aeromonas* species from retail fish in Malaysia. **International Journal of Food Microbiology**, Washington, v. 81, n. 3, p. 261-266, Mar. 2003.

RASGUIDO, J. E. A.; ALBANEZ, J. R. Piscicultura em Minas Gerais. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 21, n. 203, p. 32-37, mar./abr. 2000.

RHODES, G.; HUYS, G.; SWINGS, J.; MCGANN, P.; HINEY, M.; SMITH, P.; PICKUP, R. W. Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between *Aeromonads* in hospital and aquaculture environments: implication of Tn1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant Tet A. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 9, p. 3883-3890, Sept. 2000.

ROBERTS, M. Update on acquired tetracycline resistance genes. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 245, p. 195-203, 2005.

ROOKLIDGE, S. Environmental antimicrobial contamination from terraccumulation and diffuse pollution pathways. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 325, n. 1/3, p. 1-13, June 2004.

SAHA, D.; PAL, J. *In vitro* antibiotic susceptibility of bacteria isolated from EUS-affected fishes in India. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 34, n. 5, p. 311-316, 2002.

SAMUELSEN, O. B.; BERGH, Ø. Efficacy of orally administered florfenicol and oxolinic acid for the treatment of vibriosis in cod (*Gadus morhua*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 235, n. 1/4, p. 27-35, June 2004.

SCHMIDT, A. S.; MORTEN, S.; BRUNN, I. D. Occurrence of antimicrobial resistance in fish-pathogenic bacteria associated with four Danish rainbow trout farms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 11, p. 4908-4915, Nov. 2000.

SCHMIDT, A. S.; BRUUN, M. S.; DALSGAARD, I.; LARSEN, J. L. Incidence, distribution, and spread of tetracycline resistance determinants and integron-associated antibiotic resistance genes among Motile Aeromonads from a fish farming environment. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 12, p. 5675-5682, Dec. 2001.

SMITH, P. Towards the establishment of a breakpoint concentration for the determination of resistance to oxolinic acid in marine microflora. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 166, n. 3/4, p. 229-239, May 1998.

SMITH, P. Accuracy, precision and meaning of antimicrobial agent susceptibility testing of bacteria associated with fish diseases. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 196, n. 3/4, p. 253-266, May 2001.

SORUM, H.; L'ABEÉ-LUND, T. M. Antibiotic resistance in food-related bacteria – a result of interfering with the global web of bacterial genetics. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 78, n. 1/2, p. 43-56, Sept. 2002.

SPINOSA, H. S. Antibióticos: tetraciclina e cloranfenicol. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. Cap. 39, p. 368-371.

SPEER, B. S.; SHOEMAKER, N. B.; SALYERS, A. A. Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 5, n. 4, p. 387-399, Oct. 1992.

VAN DEN EEDE, G.; AARTS, H; BUHK, H. J.; CORTHER, G.; FLINTE, H. J.; HAMMES, W.; JACOBSEN, B.; MIDTVEDT, T.; VAN DER VOSSEN, J.; VON WRIGHT, A.; WACKERNAGEL, W.; WILCKES, A. The relevance of gene transfer to the safety of food and feed derived from genetically modified (GM) plants. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 42, n. 7, p. 1127–1156, July 2004.

VAZQUEZ-JUAREZ, R. C.; GOMEZ-CHIARRI, M.; BARRERA-SALDANA, H.; HERNANDEZ-SAAVEDRA, N.; DUMAS, S.; ASCENCIO, F. Evaluation of DNA vaccination of spotted sand bass (*Paralabrax maculatofasciatus*) with two major outer-membrane protein-encoding genes from *Aeromonas veronii*. **Fish & Shellfish Immunology**, London, v. 19, n. 2, p. 153-163, Aug. 2005.

VIVEKANANDAHAN G. , HATHA A. A. M.;  
LAKSHMANAPERUMALSAMY P. Prevalence of *Aeromonas hydrophila* in fish and from the seafood market of Coimbatore, South India. **Food Microbiology**, London, v. 22, n. 1, p. 133-137, Feb. 2005.

WAHLI, T.; BUUR, S. E.; PUGOVKIN, D.; MUELLER, O.; FREY, J. *Aeromonas sobria*, a causative agent of disease in farmed perch, *Perca fluviatilis* L. **Journal of Fish Disease**, Oxford, v. 28, n. 3, p. 141-150, Mar. 2005.

WEGENER, H. C.; FRIMODT-MOLLER, N. Reducing the use of antimicrobial agents in animals and man. **Journal of Medical Microbiology**, Philadelphia, v. 49, n. 2, p. 111-113, Feb. 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Microbial Fact Sheets. In: \_\_\_\_\_. **Guidelines for drinking-water quality**. 3. ed. . Geneva, 2004. v. 1. Recommendations.