

**SUSCEPTIBILIDADE *IN VITRO* E EFICÁCIA
DA TERAPIA COM OXITETRACICLINA EM
INFECCÇÕES POR *Streptococcus agalactiae* EM
TILÁPIA DO NILO**

FLAVIANE CASTRO DE FARIA

2009

FLAVIANE CASTRO DE FARIA

**SUSCEPTIBILIDADE *IN VITRO* E EFICÁCIA DA TERAPIA
COM OXITETRACICLINA EM INFECÇÕES POR
Streptococcus agalactiae EM TILÁPIA DO NILO**

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

Orientador

Prof. Dr. Henrique César Pereira Figueiredo

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2009

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Faria, Flaviane Castro de.

Susceptibilidade *in vitro* e eficácia da terapia com oxitetraciclina em infecções por *Streptococcus agalactiae* em tilápia do Nilo / Flaviane Castro de Faria. – Lavras : UFLA, 2009.

35 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: Henrique César Pereira Figueiredo.

Bibliografia.

1. *Streptococcus agalactiae*. 2. Oxitetraciclina. 3. Testes de susceptibilidade. 4. Terapia antimicrobiana. 5. Tilápia do Nilo. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 639.3758042322

FLAVIANE CASTRO DE FARIA

**SUSCEPTIBILIDADE *IN VITRO* E EFICÁCIA DA TERAPIA COM
OXITETRACICLINA EM INFECÇÕES POR *Streptococcus agalactiae* EM
TILÁPIA DO NILO**

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

APROVADA em 27 de fevereiro de 2009

Prof. Dr. Roney Santos Coimbra

FIOCRUZ

Prof. Dr. Geraldo Márcio da Costa

UFLA

Profa. Dra. Mary Suzan Varaschin

UFLA

Prof. Dr. Henrique César Pereira Figueiredo

UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

Aos meus pais pelo amor e compreensão incondicionais

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais por todo apoio e amor incondicional. As minhas irmãs e toda minha família muito querida e que sempre tiveram uma palavra de incentivo. Ao Esmar pelo companheirismo, compreensão e força em todas as horas. A Julieta, pela acolhida em Lavras me fazendo sentir sempre em casa.

A Universidade Federal de Lavras pela a oportunidade e acolhimento durante todos estes anos.

Ao Departamento de Medicina Veterinária, em especial o Laboratório de Doenças de Animais Aquáticos (AQUAVET) pela aprendizagem.

Ao professor Henrique César Pereira Figueiredo pelos ensinamentos e dedicação.

Aos professores Dr. Roney Santos Coimbra, Dr. Geraldo Márcio da Costa e Dra. Mary Suzan Varaschin, membros da comissão examinadora, pela contribuição no trabalho que certamente serão de grande valor.

Aos novos e antigos amigos e colegas formados durante a jornada no AQUAVET, com um carinho especial ao Carlos, Gleí e Carina que foram mais que colaboradores neste trabalho e a Dircéia sempre tão prestativa e companheira.

Aos amigos, colegas e chefes do Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal (IDAF) pela compreensão e apoio.

Aos funcionários da Biblioteca Central da Universidade Federal de Lavras, pelas orientações na formatação da dissertação.

E acima de tudo, a Deus, pelas oportunidades e bênçãos colocadas em meu caminho, sendo a maior e mais importante delas meus pais.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
CAPÍTULO 1.....	1
1 Introdução geral	2
2 Referências bibliográficas.....	7
CAPÍTULO 2: Susceptibilidade <i>in vitro</i> e eficácia da terapia com oxitetraciclina no tratamento de infecções por <i>Streptococcus agalactiae</i> em tilápia do Nilo	11
RESUMO	12
ABSTRACT	13
1 Introdução	14
2 Material e métodos.....	16
2.1 Bactéria e condições de cultivo	16
2.2 Teste difusão em ágar	18
2.3 Concentração inibitória mínima.....	18
2.4 Eficiência terapêutica.....	19
2.5 Análise estatística	21
3 Resultados.....	21
4 Discussão	25
5 Conclusão	29
6 Referências bibliográficas.....	30
CONCLUSÃO GERAL.....	35

RESUMO

FARIA, Flaviane Castro de. **Susceptibilidade *in vitro* e eficácia da terapia com oxitetraciclina em infecções por *Streptococcus agalactiae* em tilápia do Nilo.** 2009. 35 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Os objetivos do trabalho foram determinar a sensibilidade *in vitro* de diferentes isolados de *Streptococcus agalactiae* a oxitetraciclina (OTC) e verificar a eficiência terapêutica do antibiótico no tratamento da estreptococose em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Para a determinação do diâmetro do halo de inibição e da concentração inibitória mínima (CIM) da OTC foram utilizadas 29 amostras de *S. agalactiae* isoladas de surtos de meningoencefalite e septicemia em tilápia do Nilo. Os isolados foram classificados como sensíveis (wild-type - WT) ou resistentes (non-wild-type - NWT), de acordo com as distribuições de frequência dos valores de CIM e diâmetro da zona de inibição. As amostras foram divididas em dois grupos: sensível a OTC, com diâmetro de halo de inibição ≥ 28 mm e o valor de CIM $< 1,95$ $\mu\text{g/mL}$ composto por 27 isolados e resistente a OTC, composto por apenas dois isolados, com o diâmetro do halo de inibição igual a 12 mm e valor de CIM igual a 31,25 $\mu\text{g/mL}$. A eficiência terapêutica da OTC foi determinada pela infecção experimental em tilápia do Nilo com *S. agalactiae* e tratamento com OTC (ração medicada) antes ou após o desafio. A dose de OTC utilizada foi de 100 mg por kg de peso vivo, durante dez dias. Três protocolos terapêuticos foram testados: 1- tratamento com OTC, iniciado 24h antes do desafio; 2- tratamento com OTC, iniciado 1h após o desafio e 3- tratamento com OTC, iniciado 24h após o desafio. A utilização de OTC no tratamento de infecções por *S. agalactiae* em tilápia do Nilo foi eficaz na redução da mortalidade, mas pode colaborar na manutenção do agente no plantel, em virtude dos portadores assintomáticos.

Palavras-chave: *Streptococcus agalactiae*, oxitetraciclina, testes de susceptibilidade, terapia antimicrobiana, tilápia do Nilo

* Orientador: Prof. Dr. Henrique César Pereira Figueiredo - UFLA

ABSTRACT

FARIA, Flaviane Castro de. **Susceptibility *in vitro* and efficiency of therapy with oxytetracycline in infections by *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia.** 2009. 35 p. Dissertation (Master in Veterinary Science) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

The aims of this work were to determine the *in vitro* sensitivity of different isolates of *Streptococcus agalactiae* to oxytetracycline (OTC) and verify the effectiveness of antibiotic therapy in the treatment of streptococcal disease in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). To determine the diameter of the halo of inhibition and minimum inhibitory concentration (MIC) of OTC were used 29 *S. agalactiae* strains isolates from outbreaks of meningoencephalitis and septicemia in the Nile tilapia. The isolates were classified as sensitive (wild-type - WT) or resistant (non-wild-type - NWT) according to the frequency distributions of the values of MIC and diameter of the zone of inhibition. The strains were divided into two groups: sensitive to OTC diameter of the zone of inhibition of ≥ 28 mm and the MIC value of < 1.95 mg/mL composed of 27 isolates, and resistant to OTC, composed of only two isolated, with the diameter of the zone of inhibition equal to 12 mm and MIC value of equal to 31.25 mg/mL. The therapeutic efficiency of OTC was determined by experimental infection in Nile tilapia with *S. agalactiae* and treatment with OTC (medicated feed) before or after the challenge. The dose of OTC used was 100 mg per kg body weight for ten days. Three therapeutic models were tested: 1 - treatment with OTC initiated 24 hours before the challenge; 2 - treatment with OTC started 1h after the challenge and 3 - treatment with OTC started 24h after the challenge. The use of OTC in the treatment of infections by *S. agalactiae* in Nile tilapia was effective in reducing mortality, but it can collaborate in the maintenance of the agent in the breeding because of asymptomatic carriers.

Keywords: *Streptococcus agalactiae*, oxytetracycline, testes of susceptibility, antimicrobial therapy, Nile tilapia.

* Advisor: Prof. Dr. Henrique César Pereira Figueiredo

CAPÍTULO 1

1 Introdução geral

A piscicultura é um dos crescentes segmentos da produção animal no mundo (Kohler, 2000). A produção aquícola brasileira tem crescido acima da média mundial desde 1995. Progressivamente, o Brasil vem ganhando posições no ranking internacional estabelecido pela Food Agricultural Organization (FAO), sendo atualmente o segundo país em importância na produção aquícola na América do Sul, ficando abaixo do somente do Chile. Comparada com outras atividades nacionais, a aquicultura apresenta resultados de crescimento superiores aos da pesca extrativa e também se sobressai com relação à produção de aves, suínos e bovinos que, nos últimos anos, apresentaram taxas de crescimento dificilmente superiores a 5% ao ano (Ostrensky et al., 2008).

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) passou a ser a espécie de peixe mais cultivada no Brasil a partir do ano de 2002. Em 2004, a sua produção representou 26% do total produzido pela aquicultura nacional, representando um total de 69.078 toneladas (Food Agricultural Organization - FAO, 2006). O cultivo da tilápia desenvolveu-se de forma bastante significativa no Brasil a partir de 1996, tendo, em 2004, sido registrado um incremento na produção de 6,5% em nível nacional. O seu cultivo é desenvolvido principalmente nas regiões nordeste, sul e sudeste, tendo a maior produção sido verificada na região nordeste, responsável, em 2004, por 41% produção total da espécie no país. Esta região vem liderando o cultivo da espécie desde 2003, indicando claramente uma tendência de crescimento ancorada nas suas condições climáticas, na disponibilidade de tecnologia de cultivo e em um mercado crescente de consumo dessa espécie em nível regional e nacional (Ostrensky et al., 2008).

A intensificação da piscicultura resultou em problemas crescentes de doenças bacterianas que, por sua vez, levaram à utilização generalizada de antibiótico para seu tratamento e prevenção. Dentre as doenças que acometem as

tilápias, a estreptococose tem assumido posição importante em todo o mundo (Pasnik et al., 2005).

Streptococcus agalactiae é uma bactéria gram positiva e o único representante do grupo B de Lancefield, sendo também denominado de GBS. *S. agalactiae* é uma das espécies de estreptococos mais frequentemente associada à doença, acometendo uma grande variedade de hospedeiros, dentre eles seres humanos, cães, vacas, cavalos, cobaias e peixes (Johri et al., 2006). Em seres humanos, é a principal causa de infecções bacterianas em neonatos, ocasionando pneumonia, septicemia e meningite (Spellerberg, 2000; Yen-Hsi Liu & Nizet, 2004; Maione et al., 2005). Em bovino, está associado a quadros de mamite clínica e subclínica (Keefe, 1997).

Em peixes, infecções com *Streptococcus* foram associadas à morbidade e mortalidade significativas entre espécies de peixe de água doce, estuários e marinhos (Evans et al., 2002), mostrando a grande adaptabilidade do patógeno (Evans et al., 2006). Atualmente, existem relatos de casos de meningoencefalite e septicemia, causadas por *S. agalactiae* em cerca de 20 espécies de peixes (Evans et al., 2002; Duremdez et al., 2004; Salvador et al., 2005; Figueiredo et al., 2006; Suanyuk et al., 2008).

A distribuição geográfica de *S. agalactiae* está associada às regiões de clima temperado e tropical que cultivam peixes de água quente. A ocorrência de surtos (Evans et al., 2006) já foi relatada em seis países: Estados Unidos, Japão, Kuwait, Israel, Tailândia e Brasil.

A patogênese das infecções causadas por *S. agalactiae* em peixes envolve septicemia e colonização de numerosos órgãos, como narinas, cérebro, rim e intestino. Os principais sinais clínicos da doença são letargia, anorexia, exoftalmia, ascite, postura do corpo em forma de C, natação errática e em rodopios e morte. As lesões observadas na necropsia são hemorragias na pele, ascite, hepatomegalia e esplenomegalia e fígado pálido. As lesões oculares

incluem opacidade de córnea, hemorragia periorbital e intraocular, exudato purulento e exoftalmia. Hemorragia e hiperemia são achados comuns no sistema tegumentar e muscular. Áreas hemorrágicas são encontradas na superfície do corpo, principalmente na região da boca, opérculo e nadadeiras (Evans et al., 2002; Pasnik et al., 2005). Fatores ambientais, como aumento de temperatura da água, aumento do nível de amônia e redução do oxigênio dissolvido, predis põem à ocorrência da enfermidade (Evans et al., 2002; Mian et al., 2009).

O principal tratamento utilizado em casos de surtos de estreptococose é a antibioticoterapia oral dos animais. A oxitetraciclina (OTC) é uma das drogas mais utilizadas para o tratamento de doenças bacterianas em pisciculturas em todo o mundo, devido à sua eficiência e baixo custo (Rigos et al., 2003; Rigos et al., 2004), sendo eficiente no tratamento de doenças causadas por bactérias gram negativas e gram positivas (Miranda & Zemelman, 2002). O mecanismo de ação da OTC consiste em impedir a ligação do RNA transportador ao ribossomo bacteriano, interferindo na síntese proteica (Chopra & Roberts, 2001). Contudo, o uso intensivo da OTC resultou em uma crescente seleção de microrganismos resistentes. Os mecanismos de resistência à tetraciclina são efluxo ativo da droga, proteção ribossômica e inativação do antibiótico (Chopra & Roberts, 2001; Miranda & Zemelman, 2002; Roberts, 2005).

A OTC é pouco absorvida através do trato gastrointestinal dos peixes e é administrada em uma alta dosagem (100-150 mg/kg de peso vivo por um período de 10 a 15 dias), provocando, conseqüentemente, uma lenta excreção de grandes quantidades da droga (Rogstad et al., 1991). Estes fatores podem favorecer o aumento da pressão seletiva que poderá levar a uma seleção de bactérias resistentes presentes na microflora gastrointestinal e nas fezes após a terapia oral com OTC. É provável que o trato gastrointestinal de peixes sirva também como um nicho em que a seleção de microrganismos resistentes ocorra

devido à elevada concentração de antibióticos neste ambiente, durante o período do tratamento (Miranda & Zemelman, 2002).

O uso de OTC na aquicultura pode produzir um impacto negativo no tratamento de infecções humanas, como consequência da transmissão direta da resistência por meio de agentes patogênicos aos seres humanos ou indiretamente, pela transferência de genes de resistência de bactérias ambientais às bactérias patogênicas ao homem (Smith et al., 1994). O surgimento de bactérias resistentes é um dos principais fatores que limita a utilização de agentes antimicrobianos no tratamento das doenças. Assim, o perfil de resistência de uma bactéria representa um dos elementos críticos para a aplicação racional e adequada de terapias antimicrobianas (Coyne et al., 2004).

Diversos métodos laboratoriais podem ser utilizados para mensurar a sensibilidade *in vitro* das bactérias aos agentes antimicrobianos (Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI, 2006). O *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) elaborou, em 2005, um conjunto de normas para os testes de difusão em ágar e o teste de concentração inibitória mínima (CIM) para bactérias isoladas de animais aquáticos, estabelecendo amostras bacterianas utilizadas como controle de qualidade, harmonizando os protocolos utilizados por todos os laboratórios e possibilitando comparações entre os resultados e dados encontrados.

Os valores da concentração inibitória mínima e o diâmetro dos halos de inibição são importantes para determinar as frequências de distribuição e valores de ponto de corte epidemiológicos dos isolados. Estes valores podem ser utilizados para classificar as amostras como sensíveis (wild-type - WT) ou resistentes (non-wild-type - NWT) (Kahlmeter et al., 2003; Miller & Reimschuessel, 2006). Os dados obtidos nos ensaios de susceptibilidade *in vitro* devem ser interpretados a partir de características farmacocinéticas e farmacodinâmicas da droga, a fim de determinar a probabilidade de o fármaco

atingir uma concentração satisfatória nos órgãos de eleição do patógeno (Miller, 2007).

Este trabalho foi realizado com os objetivos de determinar a sensibilidade *in vitro* de diferentes isolados de *S. agalactiae* a oxitetraciclina e verificar a eficiência terapêutica do antibiótico no tratamento da estreptocose em tilápia do Nilo.

2 Referências bibliográficas

- 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, June 2001.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for antimicrobial disk susceptibility testing of bacterial isolated from aquatic animals**: approved guideline M42-A. Wayne, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006.
- COYNE, R.; SAMUELSEN, O.; BERGH, O.; ANDERSEN, K.; PURSELL, L.; DALSGAARD, I.; SMITH, P. On the validity of setting breakpoint minimum inhibitory concentration at one quarter of the plasma concentration achieved following oral administration of oxytetracycline. **Aquaculture**, Amsterdam, n. 239, n. 1-4, p. 23-35, Sept. 2004.
- DUREMDEZ, R.; AL-MARZOUK, A.; QASEM, J. A.; AL-HARBI, A.; GHARABALLY, H. Isolation of *Streptococcus agalactiae* from cultured silver pomfret, *Pampus argenteus* (Euphrasen), in Kuwait. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 27, n. 5, p. 307-310, May 2004.
- EVANS, J. J.; KLESIUS, P. H.; GILBERT, P. M.; SHOEMAKER, C. A.; AL-SARAWI, M. A.; LANDSBERG, J.; DUREMDEZ, R.; AL MARZOUK, A.; AL ZENKI, S. Characterization of β -haemolytic Group B *Streptococcus agalactiae* in cultured seabream, *Sparus auratus* L., and wild mullet, *Liza klunzingeri* (Day), in Kuwait. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, n. 25, n. 9, p. 505-513, Sept. 2002.
- EVANS, J. J.; KLESIUS, P. H.; SHOEMAKER, C. A. Streptococcus in warm-water. **Aquaculture Health International**, Auckland, v. 7, p. 10-13, Nov. 2006.
- FIGUEIREDO, H. C. P.; CARNEIRO, D. O.; FARIA, F. C.; COSTA, G. M. *Streptococcus agalactiae* associado à meningoencefalite e infecção sistêmica em tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 4, p. 678-680, ago. 2006.

FOOD AGRICULTURAL ORGANIZATION. **The state of world fisheries and aquaculture**. Rome: FAO, 2006. Disponível em: < ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0699e/a0699e.pdf>. Acesso em: 25 nov. 2008.

JOHRI, A. K.; PAOLETTI, L. C.; GLASER, P.; DUA, M.; SHARMA, P. K.; GRANDI, G.; RAPPUOLLI, R. Group B *Streptococcus*: global incidence and vaccine development. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 4, n. 12, p. 932-942, Dec. 2006.

KAHLMETER, G.; BROWN, D. F. J.; GOLDSTEIN, F. W.; MACGOWAN, A. P.; MOUTON, J. W.; ÖSTERLUND, A.; RODLOFF, A.; STEINBAKK, M.; URBASKOVA, P.; VATOPOULOS, A. European harmonization of MIC breakpoints for antimicrobial susceptibility testing bacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 52, n. 2, p. 145-148, Feb. 2003.

KEEFE, G. P. *Streptococcus agalactiae* mastitis: a review. **The Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 38, n. 7, p. 429-437, July 1997.

KOHLER, C. C. **A white paper on the status and needs of tilapia aquaculture in the North Central Region**. Southern Illinois: University-Carbondale, North Central Region Aquaculture Center, 2000. 11p.

MAIONE, D.; MARGARIT, I.; RINAUDO, C. D.; MASIGNANI, V.; MORA, M.; SCARSELLI, M.; TETTELIN, H.; BRETTONI, C.; IACOBINI, E.T.; ROSINI, R.; D'AGOSTINI, N.; MIORIN, L.; BUCATTO, S.; MARIANI, M.; GALLI, G.; NAGAROTTO, R.; DEI, V. N.; VEGNI, F.; FRASER, G.; MANCUSO, G.; TETI, G.; MADOFFI, L. C.; PAOLETTI, L. C.; RAPPULLI, R.; KASPER, D. L.; TELFORD, J. L.; GRANDI, G. Group B *Streptococcus* vaccine by multiple genome screen. **Science**, Chicago, v. 309, n. 5731, p. 148-150, July 2005.

MIAN, G. F.; GODOY, D. T.; LEAL, C. A. G.; YUHARA, T. Y.; COSTA, G.M.; FIGUEIREDO, H.C.P. Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 136, n. 1-2, p. 180-183, Apr. 2009.

MILLER, A.; REIMSCHUESSEL, R. Epidemiological cutoff values for antimicrobial agents against *Aeromonas salmonicida* isolates determined by frequency distributions of minimal inhibitory concentration and diameter of zone of inhibition data. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 67, n. 11, p. 1837-1843, 2006.

MILLER, R. A. **Development of standardized antimicrobial susceptibility testing methods and *Aeromonas salmonicida* epidemiologic cutoff values for antimicrobial agents used in aquaculture.** 2007. 186p. Tese (Doctor of Philosophy) – University of Maryland, Beltimore.

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

OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R.; SOTO, D. **Aqüicultura no Brasil: o desafio é crescer.** Brasília: Secretaria Especial de Aqüicultura e Pesca da Presidência da República, 2008. 276 p.

PASNIK, D. J.; EVANS, J. J.; PANAGALA, V. S.; KLESIUS, P. H.; SHELBY, R. A.; SHOEMAKER, C. A. Antigenicity of *Streptococcus agalactiae* extracellular products and vaccine efficacy. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 28, n. 4, p. 205-212, Apr. 2005.

RIGOS, G.; NENGAS, I.; TYRPENOU, A. E.; ALEXIS, M.; TROISI, G. M. Pharmacokinetics and bioavailability of oxytetracycline in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) after a single dose. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 221, n. 1-4, p. 75-83, May 2003.

RIGOS, G.; NENGAS, I.; ALEXIS, M.; ATHANASSOPOULOU, F. Bioavailability of oxytetracycline in sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 27, n. 2, p. 119-122, Feb. 2004.

ROBERTS, M. Update on acquired tetracycline resistance genes. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 245, n. 2, p. 195-203, Aug. 2005.

ROGSTAD, A.; HORMAZABAL, V.; ELLINGSEN, O.F.; RASMUSSEN, K.E. Pharmacokinetic study of oxytetracycline in fish: absorption, distribution and accumulation in Rainbow trout in fresh water. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 96, n. 3-4, p. 219-226, Aug. 1991.

SALVADOR, R.; MÜLLER, E. E.; LEONHARDT, J. H.; PRETTO-GIORDANO, L. G.; DIAS, J. A.; FREITAS, J. C.; MORENO, A. M. Isolamento de *Streptococcus spp* de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e qualidade da água de tanques rede na Região Norte do Estado do Paraná, Brasil. **Semina: ciências agrárias**, Londrina, v. 24, n. 1, p. 35-42, jan./jun. 2005.

SMITH, P.; HINEY, M. P.; SAMUELSEN, O. B. Bacterial resistance to antimicrobial agents used in fish farming: a critical evaluation of method and meaning. **Annual Review Fish Diseases**, Amsterdam, v. 4, p. 273-313, Jan./Dec. 1994.

SPELLERBERG, B. Pathogenesis of neonatal *Streptococcus agalactiae* infections. **Microbes and Infection**, Paris, v. 2, n. 4, p. 1733-1742, Nov. 2000.

SUANYUK, N.; KONG, F.; KO, D.; GILBERT, G. L.; SUPAMATTAYA, K. Occurrence of rare genotypes of *Streptococcus agalactiae* in cultured red tilapia *Oreochromis sp.* and Nile tilapia *O. niloticus* in Thailand-Relationship to human isolates? **Aquaculture**, Amsterdam, v. 284, n. 1-4, p. 35-40, Nov. 2008.

YEN-HSI LIU, G.; NIZET, V. Extracellular virulence factors of group B Streptococci. **Frontiers in Bioscience**, New York, v. 9, n. 1, p. 1794-802, Jan. 2004.

CAPÍTULO 2

Susceptibilidade *in vitro* e eficácia da terapia com oxitetraciclina em infecções por *Streptococcus agalactiae* em tilápia do Nilo.

O capítulo 2 será transcrito no formato do Periódico Científico Aquaculture e encaminhado para submissão

Flaviane C. Faria¹, Carlos A. Leal¹, Glei A. Carvalho-Castro¹, Carina O. Lopes¹, Henrique C. P. Figueiredo^{1*}

1 - AQUAVET, Laboratório de Doenças de Animais Aquáticos, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG 37200-000, Brasil.

*Autor para correspondência: Tel.: +55-35-38291714, Fax: +55-35-38291715, E-mail: henrique@ufla.br

RESUMO

Os objetivos do trabalho foram determinar a sensibilidade *in vitro* de diferentes isolados de *Streptococcus agalactiae* a oxitetraciclina (OTC) e verificar a eficiência terapêutica do antibiótico no tratamento da estreptococose em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Para a determinação do diâmetro do halo de inibição e da concentração inibitória mínima (CIM) da OTC foram utilizadas 29 amostras de *S. agalactiae* isoladas de surtos de meningoencefalite e septicemia em tilápia do Nilo. Os isolados foram classificados como sensíveis (wild-type - WT) ou resistentes (non-wild-type - NWT), de acordo com as distribuições de frequência dos valores de CIM e diâmetro da zona de inibição. As amostras foram divididas em dois grupos: sensível a OTC, com diâmetro de halo inibição ≥ 28 mm e o valor de CIM $< 1,95$ $\mu\text{g/mL}$ composto por 27 isolados e resistente a OTC, composto por apenas dois isolados, com o diâmetro do halo de inibição igual a 12 mm e valor de CIM igual a 31,25 $\mu\text{g/mL}$. A eficiência terapêutica da OTC foi determinada pela infecção experimental em tilápia do Nilo com *S. agalactiae* e tratamento com OTC (ração medicada) antes ou após o desafio. A dose de OTC utilizada foi de 100 mg por kg de peso vivo, durante dez dias. Três protocolos terapêuticos foram testados: 1- tratamento com OTC, iniciado 24h antes do desafio; 2- tratamento com OTC, iniciado 1h após o desafio e 3- tratamento com OTC, iniciado 24h após o desafio. A utilização de OTC no tratamento de infecções por *S. agalactiae* em tilápia do Nilo foi eficaz na redução da mortalidade, mas pode colaborar na manutenção do agente no plantel, em virtude dos portadores assintomáticos.

Palavras-chaves: *Streptococcus agalactiae*, oxitetraciclina, testes de susceptibilidade, terapia antimicrobiana, tilápia do Nilo

ABSTRACT

The aims of this work were to determine the *in vitro* sensitivity of different isolates of *Streptococcus agalactiae* to oxytetracycline (OTC) and verify the effectiveness of antibiotic therapy in the treatment of streptococcal disease in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). To determine the diameter of the halo of inhibition and minimum inhibitory concentration (MIC) of OTC were used 29 *S. agalactiae* strains isolates from outbreaks of meningoencephalitis and septicemia in the Nile tilapia. The isolates were classified as sensitive (wild-type - WT) or resistant (non-wild-type - NWT) according to the frequency distributions of the values of MIC and diameter of the zone of inhibition. The strains were divided into two groups: sensitive to OTC diameter of the zone of inhibition of ≥ 28 mm and the MIC value of < 1.95 mg/mL composed of 27 isolates, and resistant to OTC, composed of only two isolated, with the diameter of the zone of inhibition equal to 12 mm and MIC value of equal to 31.25 mg/mL. The therapeutic efficiency of OTC was determined by experimental infection in Nile tilapia with *S. agalactiae* and treatment with OTC (medicated feed) before or after the challenge. The dose of OTC used was 100 mg per kg body weight for ten days. Three therapeutic models were tested: 1 - treatment with OTC initiated 24 hours before the challenge; 2 - treatment with OTC started 1h after the challenge and 3 - treatment with OTC started 24h after the challenge. The use of OTC in the treatment of infections by *S. agalactiae* in Nile tilapia was effective in reducing mortality, but it can collaborate in the maintenance of the agent in the breeding because of asymptomatic carriers.

Keywords: *Streptococcus agalactiae*, oxytetracycline, testes of susceptibility, antimicrobial therapy, Nile tilapia.

1 Introdução

A aquicultura se expandiu de maneira significativa nas últimas décadas, no Brasil, atingindo níveis de crescimento acima da média mundial, que colocam o país em posição de destaque na produção de tilápia e camarão. De acordo com o último levantamento da FAO (2006), o Brasil é o sétimo maior produtor de tilápias, com produção total de 69.078 toneladas em 2004. Tal incremento é atribuído à disponibilidade das grandes reservas de água e a intensificação da produção de peixes no país. Apesar da melhora na produtividade, a utilização de sistemas de cultivo intensivos, como tanques-rede e “raceways”, predispõe a ocorrência de doenças infecciosas, devido às altas densidades de estocagem e manejo intenso dos animais. Nesse contexto, a bactéria *Streptococcus agalactiae* vem se destacando como um patógeno emergente na tilapicultura brasileira e mundial, ocasionando prejuízos significativos para a atividade todos os anos (Figueiredo et al., 2006; Mian et al., 2009).

S. agalactiae é uma bactéria gram positiva, também denominada estreptococos do grupo B (GBS), que acomete diversos hospedeiros, dentre eles seres humanos, cães, bovinos, cavalos, cobaias (Johri et al., 2006) e peixes (Evans et al., 2002; Duremdez et al., 2004; Salvador et al., 2005; Figueiredo et al., 2006; Suanyuk et al., 2008). Em seres humanos, *S. agalactiae* é a principal causa de pneumonia, septicemia e meningite em neonatos (Spellerberg, 2000; Yen-Hsi Liu & Nizet, 2004; Maione et al., 2005), enquanto em bovinos está associado a casos de mamite clínica e subclínica (Keefe, 1997). Casos de meningoencefalite e septicemia causados por *S. agalactiae* em peixes têm sido relatados em diversas regiões do planeta, tanto em peixes cultivados (Duremdez et al., 2004; Salvador et al., 2005; Figueiredo et al., 2006; Suanyuk et al., 2008) como de vida livre (Evans et al., 2002). Os principais sinais clínicos da doença

são letargia, anorexia, exoftalmia, ascite, postura do corpo em forma de C, natação errática e em rodopios e morte (Evans et al., 2002; Pasnik et al., 2005). Dados recentes sugerem que o aumento da temperatura, problemas de qualidade de água e altas densidades de estocagem são os principais fatores predisponentes para a ocorrência de surtos (Evans et al., 2002; Mian et al., 2009).

A principal conduta adotada em casos de surtos de estreptococose em peixes é a antibioticoterapia oral dos animais, contudo, diversos fatores influenciam a eficiência do tratamento. Sensibilidade da bactéria à droga e características farmacocinéticas e farmacodinâmicas das drogas, como concentração plasmática máxima (C_{max}) e distribuição tecidual nos órgãos de eleição do patógeno, são fatores que determinam o sucesso da terapia (Miller, 2007). Como *S. agalactiae* ultrapassa a barreira hematoencefálica (Kim, 2008) ocasionando quadros de meningoencefalite em peixes (Evans et al., 2002; Pasnik et al., 2005; Figueiredo et al., 2006; Suanyuk et al., 2008), uma premissa básica para a eficiência de qualquer substância empregada em seu tratamento é de possuir a capacidade de atingir o Sistema Nervoso Central (SNC).

A oxitetraciclina (OTC) é, atualmente, uma das drogas mais utilizada para o tratamento de doenças bacterianas em pisciculturas em todo o mundo, devido à sua relativa eficiência e baixo custo (Rigos et al., 2003; Rigos et al., 2004). Antibiótico de amplo espectro, a OTC tem sido descrita como eficaz no tratamento de doenças causadas por bactérias gram positivas em peixes (Miranda & Zemelman, 2002). Apesar disso, Chen et al. (2005) demonstraram que essa substância não apresenta boa distribuição tecidual no SNC de tilápias, atingindo baixas concentrações. Não existem relatos do efeito da terapia com OTC em casos de infecções causadas por *S. agalactiae* em tilápia do Nilo.

A utilização sistemática de antibióticos na aquicultura resultou no aparecimento de bactérias resistentes a muitos antimicrobianos. Em estudos prévios verificou-se esse fenômeno em amostras de *S. agalactiae* isoladas de

peixes, sendo essas resistentes ao ácido nalidíxico, gentamicina, neomicina, kanamicina, estreptomicina e sulfametoxazole-trimetoprim (Evans et al., 2002; Duremdez et al., 2004; Figueiredo et al., 2006). Existem também relatos de isolados de *S. agalactiae* de seres humanos e bovinos resistentes à tetraciclina (Figueira-Coelho et al., 2004; Duarte et al., 2005).

Os valores da concentração inibitória mínima e o diâmetro dos halos de inibição são importantes para determinar as frequências de distribuição e valores de ponto de corte epidemiológicos dos isolados. Estes valores podem ser utilizados para classificar as amostras como sensíveis (wild-type - WT) ou resistentes (non-wild-type - NWT) (Kahlmeter et al., 2003; Miller & Reimschuessel, 2006). Os valores de CIM gerados no laboratório são uma medida indireta da susceptibilidade que pode ser esperada no hospedeiro (Coyne et al., 2004b). Pontos de corte epidemiológicos têm sido estabelecidos para bactérias patogênicas aos peixes, como *Aeromonas salmonicida* (Smith et al., 2007) e aeromonas móveis (Godoy et al., 2008), utilizando diversos antibióticos. Contudo, para *S. agalactiae* não há relatos de pontos de corte epidemiológicos.

Este trabalho foi realizado com os objetivos de determinar a sensibilidade *in vitro* de diferentes amostras de *S. agalactiae* isoladas de peixes a oxitetraciclina e verificar a eficiência terapêutica desse antibiótico no tratamento da infecção causada por essa bactéria em tilápia do Nilo.

2 Material e métodos

2.1 Bactéria e condições de cultivo

Para a determinação da sensibilidade a OTC foram utilizadas 29 amostras de *Streptococcus agalactiae* (Tabela 1) oriundas de surtos de meningoencefalite e septicemia em tilápia do Nilo.

TABELA 1 Diâmetro do halo de inibição e concentração inibitória mínima da oxitetraciclina frente aos isolados de *Streptococcus agalactiae*.

Amostra	Estado	Piscicultura	Diâmetro halo inibição (mm)	CIM (µg/ mL)
SA 01-03	Minas Gerais	A	32	0,12
SA 02-03			32	0,12
SA 03-03			33	0,12
SA 04-03			33	0,06
SA 05-04	Espírito Santo	B	32	0,12
SA 06-04			33	0,12
SA 07-05	Bahia	C	12	31,25
SA 08-05			12	31,25
SA 09-05	Espírito Santo	D	33	0,12
SA 11-05			30	0,12
SA 13-05			30	0,24
SA 16-06	São Paulo	E	30	0,49
SA 18-06			31	0,49
SA 19-06			32	0,97
SA 30-06			32	0,12
SA 31-06	Paraná	F	29	0,24
SA 32-06			28	0,24
SA 17-06			31	0,24
SA 26-06			31	0,24
SA 20-06	São Paulo	G	30	0,24
SA 33-06			30	0,12
SA 34-06			32	0,12
SA 36-06			33	0,06
SA 37-06	Ceará	I	33	0,24
SA 38-06			28	0,06
SA 39-06			33	0,12
SA 53-07			29	0,49
SA 59-07	Ceará	I	28	0,49
SA 66-07			30	0,49

As amostras são provenientes de nove propriedades localizadas em seis Estados brasileiros, todas previamente isoladas e identificadas (Figueiredo et al., 2006; Mian et al., 2009). Os isolados foram mantidos em freezer, a -70°C até a realização dos testes. No momento do uso, foram descongelados, repicados em ágar sangue e cultivados por 24-48 horas, a 28°C.

2.2 Teste de difusão em ágar

O teste de difusão em ágar foi realizado de acordo com o manual *Methods for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing of Bacteria Isolated from Aquatic Animals*, do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2006a). Os testes foram realizados utilizando-se como meio padrão ágar Müeller-Hinton (Difco, EUA) suplementado com 10% de sangue equino. Para cada amostra, foram preparadas suspensões bacterianas em solução salina (0,85%), ajustadas à turbidez de 0,5 da escala de MacFarland. Essas foram individualmente distribuídas na superfície do ágar com suabe estéril e, em seguida, discos de OTC (30 µg) foram aplicados. As placas foram incubadas, por 24 horas, à 28°C e posteriormente os diâmetros dos halos de inibição aferidos com régua milimetrada. A amostra de referência *Escherichia coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle de qualidade em todos os testes (CLSI, 2006a). Os valores de pontos de corte epidemiológicos propostos para a OTC com base nos diâmetros dos halos de inibição foram determinados conforme recomendado pelo CLSI (CLSI, 2008).

2.3 Concentração inibitória mínima

O teste de concentração inibitória mínima (CIM) foi realizado de acordo com descrito no *Methods for Broth Dilution Susceptibility Testing of Bacteria Isolated from Aquatic Animals*, do CLSI (CLSI, 2006b). A CIM para OTC foi determinada pelo método de microdiluição em microplacas estéreis. Para tal foi

utilizado caldo Müeller-Hinton (Difco, EUA) suplementado com os cátions divalentes Ca^{+2} e Mg^{+2} (CAMHB) e 2,5% de sangue lisado de equino. Dihidrato de oxitetraciclina (Sigma-Aldrich, EUA) foi solubilizado em metanol P.A., diluído em água destilada até a concentração final de 1mg/mL e seriadamente diluído em CAMHB suplementado com sangue lisado de equino nas microplacas. As concentrações testadas variaram de 500 $\mu\text{g/mL}$ a 0,0002 $\mu\text{g/mL}$. A última coluna da microplaca foi utilizada como controle positivo contendo CAMHB suplementado com 2,5% de sangue lisado de equino e solução bacteriana.

As suspensões bacterianas, preparadas conforme descrito para os testes de difusão em ágar, foram diluídas na proporção 1:9 em CAMHB suplementado com sangue lisado de equino, obtendo-se uma concentração final aproximada de 10^7 UFC/mL. Em cada poço foram adicionados 5 μL da solução bacteriana, as placas agitadas e incubadas, por 24 horas, a 28°C. Todos os testes foram realizados em duplicata. Após o período de incubação, o valor da CIM foi determinado como a menor concentração de OTC em que não foi possível a detecção visual de crescimento bacteriano. *Escherichia coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle de qualidade em todos os testes, de acordo com preconizado (CLSI, 2006b).

As amostras foram classificadas como sensíveis (wild-type - WT) ou resistentes (non-wild-type - NWT), de acordo com a frequência de distribuição dos valores da CIM. Valores de pontos de corte epidemiológicos foram propostos utilizando-se os critérios da European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (Kahlmeter et al., 2003; Miller & Reimschuessel, 2006).

2.4 Eficiência terapêutica

A eficiência terapêutica da OTC foi determinada *in vivo*, pela infecção experimental em tilápia do Nilo com *S. agalactiae* e tratamento com o

antibiótico, antes ou após o desafio com a bactéria. Dois ensaios foram realizados em datas e lotes de tilápias diferentes. Em cada ensaio foram utilizados alevinos de tilápia do Nilo ($23,37\text{g} \pm 3,49\text{g}$) adquiridos de uma larvicultura comercial. Cada grupo experimental consistiu de dez peixes, que foram acondicionados em aquários de 57L, abastecidos com água declorada a taxa de renovação de 0,5L/h e temperatura média de 28°C. Os peixes foram alimentados, duas vezes ao dia, com ração comercial VITAFISH 32% PB (Matsuda, GO, Brasil) até a saciedade. Os animais foram climatizados durante sete dias antes do início do experimento.

Três protocolos terapêuticos, nos quais o tratamento com o antibiótico foi iniciado em momentos diferentes, foram testados. Esses consistiram de: 1- tratamento com OTC, iniciado 24h antes do desafio; 2- tratamento com OTC, iniciado 1h após o desafio e 3- tratamento com OTC, iniciado 24h após o desafio. O antibiótico, na forma de dihidrato de oxitetraciclina (Sigma-Aldrich, EUA), foi misturado à ração, homogeneizado e fornecido aos peixes duas vezes ao dia. A dose de OTC utilizada em todos os testes foi de 100 mg por kg de peso vivo (Rogstad et al., 1991; Darwish et al., 2002), durante dez dias. Foram realizados dois grupos controle: um negativo não desafiado que recebeu ração com OTC e um positivo desafiado com a bactéria e alimentado com ração sem OTC.

A amostra SA 20-06 considerada sensível a OTC (CIM de 0,24 $\mu\text{g/mL}$) foi utilizada para os ensaios de infecção experimental. Essa foi descongelada, repicada em ágar sangue e cultivada, por 24-48 horas, a 28°C. Posteriormente, a bactéria foi inoculada em caldo BHI e incubada a 28°C sob agitação até atingir a absorbância de 0,046 (λ 600 nm), correspondendo à concentração final de aproximadamente 10^6 UFC/mL no primeiro ensaio e uma absorbância de 0,052 e concentração final de aproximadamente 10^7 UFC/mL no segundo ensaio. Os peixes foram anestesiados por imersão em solução aquosa de benzocaína (10

mg/L) e desafiados com 0,1 mL do inóculo via i.p.. O grupo controle negativo foi inoculado com 0,1 mL de BHI estéril. Após a infecção, os peixes foram monitorados durante quinze dias quanto ao aparecimento de sintomatologia clínica e a ocorrência de mortalidade. Bacteriologia de cérebro e rim foi realizada nos animais que vieram a óbito para o reisolamento do patógeno. Após o período experimental, os peixes sobreviventes foram sacrificados e exames bacteriológicos de cérebro e rim foram realizados.

2.5 Análise estatística

O teste exato de Fisher foi utilizado para comparar o resultado observado no grupo controle positivo com os demais protocolos terapêuticos. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. O risco relativo, com intervalo de confiança de 95% e a redução do risco relativo (RRR), também foram calculados. Para a realização das análises estatísticas foi utilizado o programa Epi Info versão 3.5.1. Os dados analisados representam a média dos dois ensaios realizados em datas e lotes de tilápias diferentes.

3 Resultados

Na Tabela 1 são apresentados os diâmetros dos halos de inibição e as concentrações inibitórias mínimas (CIM) para OTC das 29 amostras de *S. agalactiae* testadas. Os halos de inibição variaram de 12 a 33 mm e os valores de CIM, entre 0,06 e 31,25 $\mu\text{g/mL}$. Os valores de pontos de corte epidemiológicos estimados foram WT $\leq 1,95 \mu\text{g/mL}$ e NWT $> 1,95 \mu\text{g/mL}$. Baseado na correlação entre diâmetro dos halos de inibição e os valores de CIM (Figura 1), os valores de ponto de corte foram WT $\geq 28 \text{ mm}$ e NWT $< 28 \text{ mm}$. A partir dos valores propostos, as amostras puderam ser divididas em dois grupos: sensível a OTC

com diâmetro de halo de inibição ≥ 28 mm e o valor de CIM $\leq 1,95$ $\mu\text{g/mL}$ composto por 27 isolados e resistente a OTC, composto por apenas dois isolados, com o diâmetro do halo de inibição igual a 12 mm e valor de CIM igual a 31,25 $\mu\text{g/mL}$. As duas amostras consideradas resistentes eram provenientes de uma mesma propriedade.

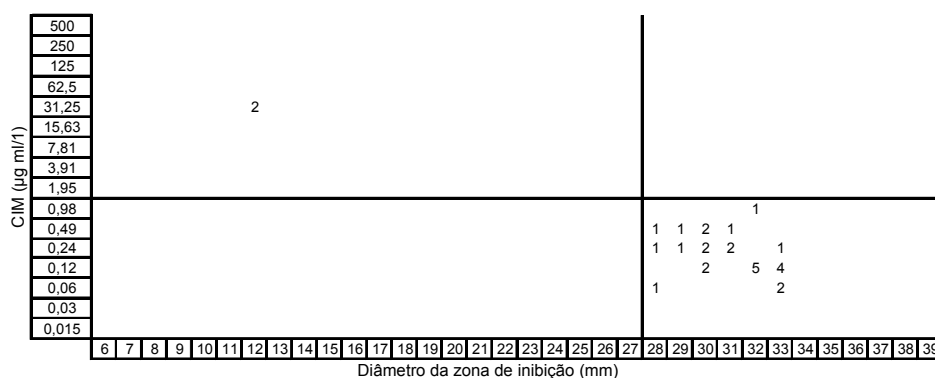


FIGURA 1 Frequência dos valores referentes a concentração inibitória mínima e diâmetro da zona de inibição para isolados de *Streptococcus agalactiae* frente à oxitetraciclina. Pontos de corte epidemiológicos para concentração inibitória mínima estão indicado na linha horizontal e para o diâmetro do halo de inibição, pela linha vertical.

O gráfico da Figura 2 apresenta a média das taxas de mortalidade cumulativa observada nos diferentes grupos experimentais, nos dois ensaios realizados. O grupo controle positivo apresentou mortalidade cumulativa média de 60%. Sinais clínicos característicos da doença, como letargia, natação errática, exoftalmia, opacidade de córnea, ascite, escurecimento do tegumento, foram observados em todos os animais que vieram a óbito, diferentemente dos sobreviventes, que permaneceram assintomáticos durante todo o período experimental. Os grupos tratados após o desafio apresentaram taxas de

mortalidade média de 20%. O grupo tratado 24 horas antes do desafio apresentou uma taxa de mortalidade média de 15%. No grupo controle negativo não foi observada mortalidade.

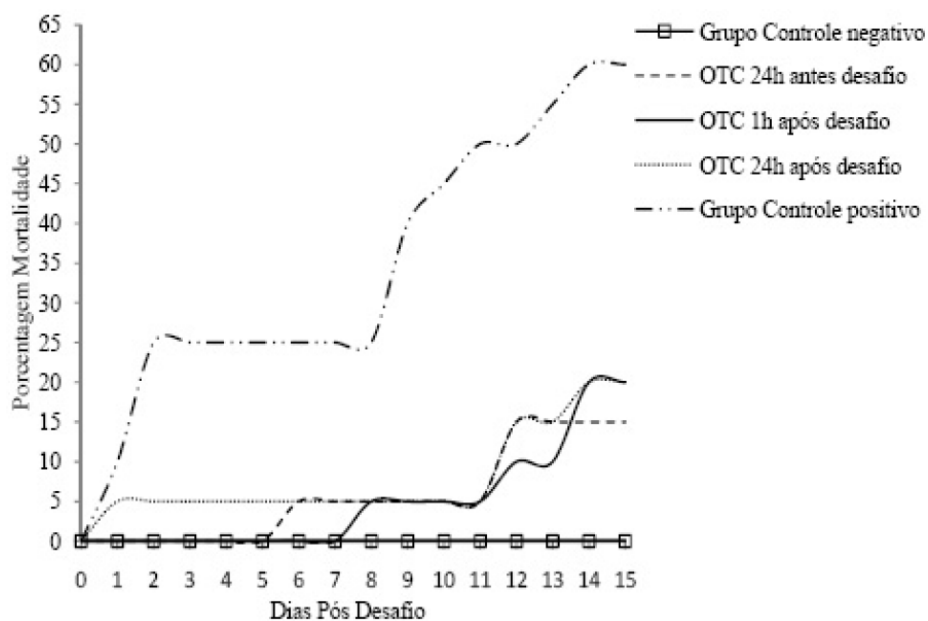


FIGURA 2 Mortalidade cumulativa média dos diferentes grupos experimentais desafiados com *Streptococcus agalactiae* e tratados com oxitetraciclina na ração (24h antes, 1h e 24h após o desafio).

Um declínio acentuado no risco de mortalidade foi observado nos três protocolos terapêuticos testados (Tabela 2), quando comparados com o grupo controle positivo. O grupo tratado com OTC 24h antes do desafio apresentou um risco ($RR = 0,25$) cuja magnitude equivale a 25% do risco encontrado para os peixes do grupo controle positivo. A eficácia, que representa a redução relativa do risco (RRR), obtida com a utilização da OTC foi de 75% no grupo que

recebeu a droga 24h antes do desafio ($p < 0,01$). Os grupos tratados com OTC após o desafio (1 e 24h depois) apresentaram RR de 0,33 e o risco de mortalidade reduzido em 67% (RRR).

TABELA 2 Mortalidade observada nos diferentes protocolos terapêuticos testados.

Tratamento	Mortalidade						RR ^a	IC _{95%} ^b	RRR % (Eficácia) ^c	Valor p ^d
	Sim		Não		Total					
	n	%	n	%	N	%				
OTC 24h antes desafio	3	15	17	85	20	100	0,25	0,08 - 0,75	75	< 0,01
OTC 1h após desafio	4	20	16	80	20	100	0,33	0,13 - 0,86	67	< 0,05
OTC 24h após desafio	4	20	16	80	20	100	0,33	0,13 - 0,86	67	< 0,05
Controle positivo	12	60	8	40	20	100	-	-	-	-

^a RR: Risco Relativo.

^b IC_{95%}: intervalo de confiança de 95%.

^c RRR % (Eficácia): Redução do Risco Relativo % (Eficácia).

^d Valor de p: Teste exato de Fisher.

Após o período experimental, os peixes sobreviventes ao desafio foram sacrificados e exames bacteriológicos de cérebro e rim foram realizados. Todos os peixes sobreviventes foram considerados clinicamente saudáveis. Os peixes nos quais foi possível o isolamento do patógeno foram considerados portadores assintomáticos. O grupo que recebeu OTC 24h antes do desafio apresentou RR de 0,24, reduzindo em 76% o risco de portadores assintomáticos entre os sobreviventes (Tabela 3). Nos grupos tratados após o desafio, não houve diferença estatística significativa, quando comparados com o grupo controle positivo ($p > 0,05$).

TABELA 3 Frequência de peixes portadores assintomáticos observados entre os animais sobreviventes ao final dos protocolos terapêuticos avaliados.

Tratamento	Mortalidade						RR ^a	IC _{95%} ^b	RRR % (Eficácia) ^c	Valor p ^d
	Sim		Não		Total					
	n	%	n	%	N	%				
OTC 24h antes desafio	3	18	14	82	17	100	0,24	0,08 - 0,71	76	< 0,01
OTC 1h após desafio	7	44	9	56	16	100	0,58	0,29 - 1,16	42	0,2108
OTC 24h após desafio	12	75	4	25	16	100	1	0,61 - 1,63	0	1
Controle positivo	6	75	2	25	8	100	-	-	-	-

^a RR: Risco Relativo.

^b IC_{95%}: intervalo de confiança de 95%.

^c RRR % (Eficácia): Redução do Risco Relativo % (Eficácia).

^d Valor de p: Teste exato de Fisher.

4 Discussão

A seleção de bactérias resistentes é um dos principais fatores que limitam a eficácia dos antimicrobianos no combate às doenças. Assim, a determinação da resistência ou sensibilidade de uma bactéria representa um dos elementos críticos no delineamento de terapias racionais e apropriadas. A susceptibilidade bacteriana aos antimicrobianos pode ser determinada por testes laboratoriais, mas os dados gerados devem ser utilizados de acordo com o contexto clínico de cada caso (Coyne et al., 2004a). Relatos sobre a resistência aos antibióticos em amostras de *S. agalactiae* isoladas de peixes são raras e limitadas às realizadas pelo método de disco difusão. Para alguns isolados já foi demonstrada a resistência ao ácido nalidíxico, gentamicina, neomicina, kanamicina, streptomina e sulfametoxazole-trimetoprim (Evans et al., 2002; Duremdez et al., 2004; Figueiredo et al., 2006). Neste estudo, foram estabelecidos pontos de corte epidemiológicos para a OTC (WT ≥ 28 mm e WT $\leq 1,95$ $\mu\text{g/mL}$; NWT < 28 mm e NWT $> 1,95$ $\mu\text{g/mL}$) para as 29 amostras de GBS isolados de peixes. A maioria das amostras (27 ou 93,10%) foi sensível a OTC,

sendo que apenas dois isolados, oriundos de uma mesma propriedade, foram resistentes a esse antibiótico. A ocorrência de resistência a OTC, mesmo que em poucos isolados, ressalta a importância do monitoramento quando se considera que a utilização deste antibiótico na piscicultura é relativamente recente no Brasil. Os valores de pontos de corte epidemiológicos propostos servirão como parâmetro para tal monitoramento. Em um estudo realizado no Chile, onde a utilização da OTC no cultivo de salmão já ocorre durante algumas décadas, Miranda & Zemelman (2002) observaram uma porcentagem maior de isolados resistentes a OTC.

Para determinação do efeito da oxitetraciclina na infecção causada por *S. agalactiae* em peixes, alevinos de tilápia do Nilo foram experimentalmente infectados com a amostra SA 20-06 e tratados por via oral com o antibiótico em diferentes protocolos terapêuticos. Uma redução significativa na mortalidade ($p < 0,05$) foi verificada nos grupos que receberam a OTC em relação ao grupo controle positivo (alimentado com ração não-medicada). Resultados similares foram verificados por Darwish et al. (2002) que testaram a eficácia da OTC no controle da infecção de *Streptococcus iniae* em tilápias-azuis (*Oreochromis aureus*). Estes mesmos autores demonstraram que os animais tratados com 100 mg/kg peso vivo de OTC apresentaram uma taxa de sobrevivência de 98%, mas, apesar da diminuição nos índices de mortalidade, a antibioticoterapia não foi capaz de eliminar completamente a infecção, permitindo o reisolamento da bactéria a partir do cérebro e do rim dos peixes sobreviventes ao desafio. A farmacocinética da OTC pode ser diferente em alevinos e adultos, devido ao metabolismo mais acelerado dos alevinos. Caso a terapia com OTC seja feita em peixes adultos podem ocorrer pequenas diferenças no resultado. Na literatura não há dados sobre a eficiência terapêutica de antibióticos frente às infecções causadas por *S. agalactiae* em peixes e como essa deve ser determinada.

Nos grupos que foram tratados com a OTC após o desafio, apesar da redução significativa da mortalidade ($p < 0,05$), não houve diferença estatística significativa entre os grupos tratados 1h (RR = 0,58; IC_{95%} = 0,29 – 1,16; $p = 0,218$) e 24h (RR = 1; IC_{95%} = 0,61 – 1,63; $p = 1$) quando comparados ao grupo controle positivo. O emprego da OTC no tratamento de surtos de *S. agalactiae* em tilápias do Nilo foi eficaz na redução da mortalidade, mas sua utilização pode colaborar na manutenção do agente no plantel, em virtude dos portadores assintomáticos, sendo um fator negativo do ponto de vista epidemiológico.

Considera-se que, durante o período em que os peixes estão recebendo tratamento com ração medicada, haverá pelo menos três subpopulações: a primeira formada por animais que ainda não estão infectados e se alimentam normalmente; a segunda por animais infectados e que não estão se alimentando e a terceira composta por peixes infectados, mas que se alimentam a uma taxa normal ou reduzida (Smith, 2008). No presente estudo, no grupo tratado com OTC 24 horas após o desafio houve o reisolamento da bactéria no cérebro ou no rim de 75% dos sobreviventes. Esses não apresentaram sintomatologia clínica da doença, comportando-se inicialmente como subpopulação sadia e posteriormente como portadores assintomáticos. A OTC não foi eficiente em inibir a disseminação inicial da doença no organismo dos peixes, permitindo que o agente atingisse o SNC dos animais. Fenômeno similar tem sido relatado para *S. iniae* (Agnew & Barnes, 2007). O risco de ter portadores assintomáticos entre os sobreviventes nos grupos tratados com OTC após o desafio não foi significativamente reduzido ($p > 0,05$) pela OTC quando comparado com o grupo controle positivo. No grupo que foi tratado com OTC antes do desafio foi observada redução de 76% no risco de ter portadores assintomáticos entre os sobreviventes, quando comparado ao grupo controle positivo. Neste trabalho, não foram testadas doses mais elevadas de OTC no tratamento que poderiam induzir uma menor frequência de portadores assintomáticos. A presença de

portadores assintomáticos no plantel permite a disseminação da bactéria e dificulta o controle da doença. Trabalhos recentes com ensaios de coabitação demonstram que peixes saudáveis que tiveram contato direto com peixes infectados com *S. agalactiae* apresentaram sinais clínicos 24-72h após a introdução dos peixes doentes e que, após 10 dias de contato, 100% dos peixes morreram (Mian et al., 2009). Assim, a presença de portadores assintomáticos pode favorecer a permanência do agente no plantel e o surgimento de outra onda de mortalidade após o final do período de tratamento. Trabalhos com *Flavobacterium psychrophilum* também relatam o isolamento do agente no cérebro após tratamento com OTC, mostrando que esse órgão age como sítio potencial de proteção para manutenção de alguns patógenos no organismo (Brunn et al., 2003; Dalsgaard & Madsen, 2000).

Para atingir o SNC a partir da circulação sanguínea, as bactérias devem ter a capacidade de ultrapassar a barreira hematoencefálica ou a de o agente de sobreviver dentro de fagócitos para serem transportadas de forma passiva. Essa última confere uma vantagem no estabelecimento da infecção, pois a bactéria se protege da maioria dos mecanismos imunes do hospedeiro, principalmente os humorais (Agnew & Barnes, 2007). Em seres humanos foi descrito que *S. agalactiae* transpõe a barreira hematoencefálica por penetração ativa no endotélio vascular, mecanismo chamado de transcelular (Kim, 2008). Para *S. iniae* foi demonstrada que a incidência de infecção no SNC está relacionada com a concentração da bactéria no sangue (Zlotkin et al., 2003). Vários estudos em seres humanos e animais apontam para uma relação entre a magnitude da bacteremia e o desenvolvimento de meningite (Kim, 2008). No grupo tratado com OTC 24 horas antes do desafio, verificou-se que o risco relativo foi de 0,25, ocorrendo uma redução de 75% da mortalidade em relação ao grupo controle positivo. A utilização da OTC previamente à infecção pode ser uma forma de diminuir a bacteremia. Com isso, a concentração da droga no momento da

infecção seria suficiente para que a multiplicação bacteriana na corrente sanguínea não aconteça de forma exacerbada impedindo o surgimento da doença. De acordo com a literatura, a prevenção da bacteremia pode ser uma abordagem potencial para a prevenção da meningite bacteriana (Kim, 2008).

5 Conclusão

A maioria dos isolados de *Streptococcus agalactiae* foi sensível a OTC *in vitro* apresentado pontos de corte epidemiológicos ≥ 28 mm para o diâmetro do halo de inibição e $< 1,95$ $\mu\text{g/mL}$ para a CIM.

A utilização de OTC no tratamento de infecções por *S. agalactiae* em tilápia do Nilo foi eficaz na redução da mortalidade, mas pode colaborar na manutenção do agente no plantel, em virtude dos portadores assintomáticos.

6 Referências bibliográficas

AGNEW, W.; BARNES, A.C. *Streptococcus iniae*: an aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 122, n. 1-2, p. 1-15, Feb. 2007.

BRUNN, M. S.; MADSEN, L.; DALSGAARD, I. Efficiency of oxytetracycline treatment in rainbow trout experimentally infected with *Flavobacterium psychrophilum* strains having different in vitro antibiotic susceptibilities. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 215, n. 1-4, p. 11-20, Jan. 2003.

CHEN, C.; WOOSTER, G. A.; GETCHELL, R. G.; BOWSER, P. R. Distribution and depletion of oxytetracycline in two warmwater fish: tilapia and hybrid striped bass. **Journal World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v. 36, n. 4, p. 564-569, Dec. 2005.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for antimicrobial disk susceptibility testing of bacterial isolated from aquatic animals**: approved guideline M42-A. Wayne, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006a.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for broth dilution susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals**: approved guideline M49-A. Wayne, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006b.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Development of in vitro susceptibility testing criteria and quality control parameters for veterinary antimicrobial agents M37-A3**. Wayne, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.

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

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

DALSGAARD, I.; MADSEN, L. Bacterial pathogens in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), reared at Danish freshwater farms. **Journal Fish Diseases**, Oxford, v. 23, n. 3, p. 199-209, May 2000.

DARWISH, A. M.; RAWLES, S. D.; GRIFFIN, B. R. Laboratory efficacy of oxytetracycline for the control of *Streptococcus iniae* infection in blue tilapia. **Journal of Aquatic Animal Health**, New York, v. 14, p. 184-190, Jan./Dec. 2002.

DUARTE, R. S.; BELLEI, B. C.; MIRANDA, O. P.; BRITO, M. A. V. P.; TEIXEIRA, L. M. Distribution of antimicrobial resistance and virulence-related genes among brazilian group B streptococci recovered from bovine and human sources. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Houston, v. 49, n. 1, p. 97-103, Jan. 2005.

DUREMDEZ, R.; AL-MARZOUK, A.; QASEM, J. A.; AL-HARBI, A.; GHARABALLY, H. Isolation of *Streptococcus agalactiae* from cultured silver pomfret, *Pampus argenteus* (Euphrasen), in Kuwait. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 27, n. 5, p. 307-310, May 2004.

EVANS, J. J.; KLESZIUS, P. H.; GILBERT, P. M.; SHOEMAKER, C. A.; AL-SARAWI, M. A.; LANDSBERG, J.; DUREMDEZ, R.; AL MARZOUK, A.; AL ZENKI, S. Characterization of β -haemolytic Group B *Streptococcus agalactiae* in cultured seabream, *Sparus auratus* L., and wild mullet, *Liza klunzingeri* (Day), in Kuwait. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, n. 25, n. 9, p. 505-513, Sept. 2002.

FIGUEIRA-COELHO, J.; RAMIREZ, M.; SALGADO, M. J.; MELO-CRISTINO, J. *Streptococcus agalactiae* in a large portuguese teaching hospital: antimicrobial susceptibility, serotype distribution, and clonal analysis of macrolide-resistant isolates. **Microbial Drug Resistance**, New York, v. 10, n. 1, p. 31-36, Mar. 2004.

FIGUEIREDO, H. C. P.; CARNEIRO, D. O.; FARIA, F. C.; COSTA, G. M. *Streptococcus agalactiae* associado à meningoencefalite e infecção sistêmica em tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 4, p. 678-680, ago. 2006.

FOOD AGRICULTURAL ORGANIZATION. **The state of world fisheries and aquaculture**. Rome: FAO, 2006. Disponível em: < <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0699e/a0699e.pdf>>. Acesso em: 25 nov. 2008.

GODOY, D. T.; MIAN, G. F.; ZANOLO, R.; YUHARA, T. Y.; FARIA, F. C.; FIGUEIREDO, H. C. P. Patterns of resistance to florfenicol and bicyclomycin in Brazilian strains of motile aeromonads. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 285, n. 2-4, p. 255-259, Dec. 2008.

JOHRI, A. K.; PAOLETTI, L. C.; GLASER, P.; DUA, M.; SHARMA, P. K.; GRANDI, G.; RAPPUOLLI, R. Group B *Streptococcus*: global incidence and vaccine development. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 4, n. 12, p. 932-942, Dec. 2006.

KAHLMETER, G.; BROWN, D. F. J.; GOLDSTEIN, F. W.; MACGOWAN, A. P.; MOUTON, J. W.; ÖSTERLUND, A.; RODLOFF, A.; STEINBAKK, M.; URBASKOVA, P.; VATOPOULOS, A. European harmonization of MIC breakpoints for antimicrobial susceptibility testing bacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 52, n. 2, p. 145-148, Aug. 2003.

KEEFE, G. P. *Streptococcus agalactiae* mastitis: a review. **The Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 38, n. 7, p. 429-437, July 1997.

KIM, K.S. Mechanisms of microbial traversal of the blood-brain barrier. **Nature Reviews**, London, v. 6, p. 625-634, Aug. 2008.

MAIONE, D.; MARGARIT, I.; RINAUDO, C. D.; MASIGNANI, V.; MORA, M.; SCARSELLI, M.; TETTELIN, H.; BRETTONI, C.; IACOBINI, E.T.; ROSINI, R.; D'AGOSTINI, N.; MIORIN, L.; BUCATTO, S.; MARIANI, M.; GALLI, G.; NAGAROTTO, R.; DEI, V. N.; VEGNI, F.; FRASER, G.; MANCUSO, G.; TETI, G.; MADOFFI, L. C.; PAOLETTI, L. C.; RAPPULLI, R.; KASPER, D. L.; TELFORD, J. L.; GRANDI, G. Group B *Streptococcus* vaccine by multiple genome screen. **Science**, Chicago, v. 309, n. 5731, p. 148-150, July 2005.

MIAN, G. F.; GODOY, D. T.; LEAL, C. A. G.; YUHARA, T. Y.; COSTA, G.M.; FIGUEIREDO, H.C.P. Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 136, n. 1-2, p. 180-183, Apr. 2009.

MILLER, A.; REIMSCHUESSEL, R. Epidemiological cutoff values for antimicrobial agents against *Aeromonas salmonicida* isolates determined by frequency distributions of minimal inhibitory concentration and diameter of zone of inhibition data. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 67, n. 11, p. 1837-1843, 2006.

MILLER, R. A. **Development of standardized antimicrobial susceptibility testing methods and *Aeromonas salmonicida* epidemiologic cutoff values for antimicrobial agents used in aquaculture**. 2007. 186p. Tese (Doctor of Philosophy) – University of Maryland, Beltime.

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

PASNIK, D. J.; EVANS, J. J.; PANAGALA, V. S.; KLESIOUS, P. H.; SHELBY, R. A.; SHOEMAKER, C. A. Antigenicity of *Streptococcus agalactiae* extracellular products and vaccine efficacy. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 28, n. 4, p. 205-212, Apr. 2005.

RIGOS, G.; NENGAS, I.; ALEXIS, M.; ATHANASSOPOULOU, F. Bioavailability of oxytetracycline in sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 27, n. 2, p. 119-122, Feb. 2004.

RIGOS, G.; NENGAS, I.; TYRPENOU, A. E.; ALEXIS, M.; TROISI, G. M. Pharmacokinetics and bioavailability of oxytetracycline in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) after a single dose. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 221, n. 1-4, p. 75-83, May 2003.

ROGSTAD, A.; HORMAZABAL, V.; ELLINGSEN, O.F.; RASMUSSEN, K.E. Pharmacokinetic study of oxytetracycline in fish: absorption, distribution and accumulation in Rainbow trout in fresh water. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 96, n. 3-4, p. 219-226, Aug. 1991.

SALVADOR, R.; MÜLLER, E. E.; LEONHARDT, J. H.; PRETTO-GIORDANO, L. G.; DIAS, J. A.; FREITAS, J. C.; MORENO, A. M. Isolamento de *Streptococcus spp* de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e qualidade da água de tanques rede na Região Norte do Estado do Paraná, Brasil. **Semina: ciências agrárias**, Londrina, v. 24, n. 1, p. 35-42, jan./jun. 2005.

SMITH, P. A cost-benefit analysis of the application of pharmacokinetic/pharmacodynamic-based approaches to setting disc diffusion breakpoints in aquaculture: A case study of oxolinic acid and *Aeromonas salmonicida*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 284, n. 1-4, p. 2-18, Nov. 2008.

SMITH, P.; RUANE, N. M.; DOUGLAS, I.; CARROLL, C.; KRONVALL, G.; FLEMING, G. T. A. Impact of inter-lab variation on the estimation of epidemiological cut-off values for disc diffusion susceptibility test data for *Aeromonas salmonicida*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 272, n. 1-4, p. 168-179, Oct. 2007.

SPELLERBERG, B. Pathogenesis of neonatal *Streptococcus agalactiae* infections. **Microbes and Infection**, Paris, v. 2, n. 15, p. 1733-1742, Dec. 2000.

SUANYUK, N.; KONG, F.; KO, D.; GILBERT, G. L.; SUPAMATTAYA, K. Occurrence of rare genotypes of *Streptococcus agalactiae* in cultured red tilapia *Oreochromis sp.* and Nile tilapia *O. niloticus* in Thailand-Relationship to human isolates? **Aquaculture**, Amsterdam, v. 284, n. 1-4, p. 35-40, Nov. 2008.

YEN-HSI LIU, G.; NIZET, V. Extracellular virulence factors of group B Streptococci. **Frontiers in Bioscience**, New York, v. 9, n. 1, p. 1794-802, Jan. 2004.

ZLOTKIN, A.; CHIMONCZYK, S.; EYNGOR, M.; HURVITZ, A.; GHITTINO, C.; ELDAR, A. Trojan horse effect: phagocyte-mediated *Streptococcus iniae* infection of fish. **Infection and Immunity**, Oxford, v. 71, n. 4, p. 2318-2325, Apr. 2003.

CONCLUSÃO GERAL

A maioria dos isolados de *Streptococcus agalactiae* foi sensível a OTC *in vitro* apresentado pontos de corte epidemiológicos ≥ 28 mm para o diâmetro do halo de inibição e $< 1,95$ $\mu\text{g/mL}$ para a CIM.

A utilização de OTC no tratamento de infecções por *S. agalactiae* em tilápia do Nilo foi eficaz na redução da mortalidade, mas pode colaborar na manutenção do agente no plantel, em virtude dos portadores assintomáticos.