

**AVALIAÇÃO DO REISOLAMENTO BACTERIANO APÓS INFECÇÃO
EXPERIMENTAL DE TILÁPIAS DO NILO POR *Streptococcus agalactiae* E
Aeromonas hydrophila, TRATADAS COM DOXICICLINA**

BIANKA ALVES ROCHA KLINGER; LUAN HEITOR SIMÕES TAROSI; SUSANA
LUPORINI DE OLIVEIRA

RESUMO

O presente estudo teve por objetivo avaliar a influência no tratamento via oral com doxiciclina no reisolamento bacteriano, em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) infectadas experimentalmente com *Streptococcus agalactiae* e *Aeromonas hydrophila*. Para tal, foram delineados dois ensaios experimentais e dois testes para estabelecimento da DL50 (*S. agalactiae* e *A. hydrophila*). Ao todo foram utilizadas 320 tilápias, ± 100 g cada, acondicionadas em 32 tanques de 100L (n=10), sendo realizado a seguinte distribuição: 60 tilápias foram submetidos a testes para estabelecimento da DL50, em que 30 tilápias (3 tanques, n=10) foram infectadas com diferentes concentrações de *A. hydrophila* ($1,24 \times 10^7$; $4,93 \times 10^6$ e $8,40 \times 10^5$ UFC/mL) e 30 tilápias para *S. agalactiae* ($3,60 \times 10^7$; $1,80 \times 10^7$ e $0,90 \times 10^6$ UFC/mL). Para os ensaios experimentais foi realizado a seguinte distribuição: 130 tilápias para desafio experimental com *S. agalactiae* e 130 tilápias para *A. hydrophila*, sendo constituído os seguintes tratamentos: *S. agalactiae* \rightarrow S0 (controle, infecção e não tratado com Doxiciclina); S1, S2 S3 (infecção e tratados com 20, 40 e 80mg/kg de p.v. de Doxiciclina, respectivamente) e PF (padrão fisiológico, valores de referências, sem tratamento e sem infecção, n=10); *A. hydrophila* \rightarrow A0 (controle, infecção e não tratado com Doxiciclina); A1, A2 e A3 (infecção e tratados com 20, 40 e 80mg/kg de p.v. de Doxiciclina, respectivamente) e PF (padrão fisiológico, valores de referências, sem tratamento e sem infecção, n=10). Animais que sobreviveram ao estímulo infeccioso foram amostrados no 11º dia de infecção e 4 dias após o término do tratamento (15º dia) para avaliação de recuperação clínica e microbiológica. Amostras de cérebro e rim cranial foram coletados para estudo microbiológico de reisolamento dos patógenos. Os estudos revelaram efeito dose-resposta para o controle da infecção experimental aos estímulos de DL50 para *S. agalactiae* e *A. hydrophila*, principalmente na dose de 80mg/kg, confirmando a hipótese de que a ação antimicrobiana da doxiciclina auxiliou os mecanismos de defesa das tilápias tratadas em ambos os estudos quando comparadas aos animais do grupo controle, sugerindo o potencial deste antimicrobiano para uso na tilapicultura, por apresentar eficácia terapêutica no controle de patógenos com significativa importância sanitária e econômica desses animais.

Palavras-chave: Aeromonose; antimicrobiano; estreptococose; tetraciclina, tilapicultura.

1 INTRODUÇÃO

Os antimicrobianos são amplamente utilizados na piscicultura para tratar doenças, porém há escassez de estudos farmacológicos em peixes. A comparação de dados é complexa devido às variações nas condições experimentais, como espécie de peixe, temperatura da água e salinidade. Poucos medicamentos são aprovados pela FDA para uso em peixes. A otimização da dose requer compreensão de parâmetros como farmacodinâmica e farmacocinética. (Assane

et al., 2019; Costa et al., 2022; FDA, 2022; Oliveira et al., 2021).

O aumento da criação de animais aquáticos para consumo humano tem levado ao surgimento de doenças bacterianas, como estreptococose e septicemia por aeromonas, representando grandes desafios para a indústria da tilápia. Estudos farmacológicos são essenciais para orientar decisões terapêuticas, garantindo a eficácia e segurança do tratamento, além de minimizar o impacto ambiental. Essa abordagem reduz custos, riscos de resistência bacteriana e a presença de resíduos de drogas nos tecidos animais e no ambiente. (Nafiqoh et al., 2022; Rigos e Smith, 2015).

A doxiciclina é um derivado semissintético da tetraciclina, antimicrobiano altamente eficaz, barato e com um amplo espectro contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas aeróbias e anaeróbicas, Rickettsias, Chlamydiae, Mycoplasmas e alguns protozoários (Soliman et al., 2015). Além disso, as propriedades farmacocinéticas da doxiciclina são superiores quando comparadas as tetraciclinas mais antigas, possui lipofilicidade relativa mais alta, incluindo alta absorção oral, amplo volume de distribuição tecidual, meia-vida de eliminação mais longa e menor afinidade pelo cálcio (Sartini et al., 2021).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Peixes e acondicionamento

Foram utilizadas 320 tilápias do Nilo, pesando em média 100g e provenientes da mesma desova, distribuídas em 32 tanques de 100L de água cada. Seis tanques foram destinados à determinação da DL50 para cada microrganismo. Durante os três primeiros dias de aclimação, os peixes foram submetidos a banhos com solução de NaCl a 6,0g/L (Carneiro e Urbinati, 2001). Os parâmetros da qualidade da água foram monitorados constantemente, mantendo-se adequados para o bem-estar dos peixes tropicais (Boyd, 1990). Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UNESP/FCAV.

2.2. Design experimental

Para o estudo, foram utilizado ao todo 32 tanques (100L de água cada, n=10), destes 32 tanques, 26 foram destinados aos desafios bacterianos experimentais, sendo que, 13 tanques foram utilizados para o estudo de *A. hydrophila* e 13 para *S. agalactiae*, conforme a Tabela 1:

Tabela 1. Distribuição das tilápias.

Grupos	Infecção experimental com <i>A. hydrophila</i>	Repetições (totalizando 30 animais para cada grupo)		
		R1	R2	R3
A0	Controle (infectado e não tratado)	N=10	N=10	N=10
A1	Infectado e tratado com 20mg de Doxiciclina	N=10	N=10	N=10
A2	Infectado e tratado com 40mg de Doxiciclina	N=10	N=10	N=10
A3	Infectado e tratado com 80mg de Doxiciclina	N=10	N=10	N=10
A4	Padrão fisiológico (valor de referência)	N=10		
Grupos	Infecção experimental com <i>S. agalactiae</i>	Repetições (totalizando 30 animais para cada grupo)		
		R1	R2	R3

S0	Controle (infectado e não tratado)	N=10	N=10	N=10
S1	Infectado e tratado com 20mg de Doxiciclina	N=10	N=10	N=10
S2	Infectado e tratado com 40mg de Doxiciclina	N=10	N=10	N=10
S3	Infectado e tratado com 80mg de Doxiciclina	N=10	N=10	N=10
S4	Padrão fisiológico (valor de referência)	N=10		

Todos os animais tratados com doxiciclina (A1, A2, A3, S1, S2, S3) receberam o tratamento um dia antes da inoculação de cada um dos dois patógenos bacterianos. Após 11 dias das infecções experimentais, metade dos animais sobreviventes foi coletada. Os animais restantes foram tratados apenas com ração comercial até o 15º dia, chamado de período de recuperação (4 dias). Amostras de cérebro e rim caudal foram coletadas para isolamento da bactéria inoculada nos animais.

Os 6 tanques restantes, foram destinados à determinação da DL50 de cada bacteriose, ou seja, 3 tanques para *A. hydrophila* e 3 tanques para *S. agalactiae*, conforme Tabela 2:

Tabela 2. Distribuição das tilápias para determinação da DL50 de cada bacteriose.

Grupos	Dose letal (DL50) (Infecção experimental com <i>A. hydrophila</i>)	Número de animais avaliados por 15 dias para DL50
DL501	1,24x10 ⁷ UFC/mL	N= 10
DL502	4,93x10 ⁶ UFC/mL	N= 10
DL503	8,40x10 ⁵ UFC/mL	N= 10
Grupos	Dose letal (DL50) (Infecção experimental com <i>S. agalactiae</i>)	Número de animais avaliados por 15 dias para DL50
DL501	3,60x10 ⁷ UFC/mL	N= 10
DL502	1,80x10 ⁷ UFC/mL	N= 10
DL503	0,90x10 ⁶ UFC/mL	N= 10

2.3. Dieta experimental

A ração comercial extrusada, contendo 36% de proteína bruta (Nutripiscis® - Empresa Presence). A alimentação foi realizada duas vezes ao dia (8h e 17h), com administração de 2% da biomassa dos tanques. A Doxiciclina utilizada foi da Sandoz do Brasil Indústria Farmacêutica Ltda., tendo sido enviada para farmácia de manipulação “DermoFlora” em Jaboticabal/SP que preparou cápsulas de 20 mg cada uma.

Para o preparo das dietas, diariamente a ração foi pesada proporcionalmente ao peso médio das tilápias de cada tanque. Em seguida, foram determinadas as doses de 20, 40 e 80mg de doxiciclina/kg p.v., compondo as dietas de A1/S1, A2/S2 e A3/S3 respectivamente, as quais foram previamente homogeneizadas em 2% de óleo vegetal, para depois serem misturadas na ração. Para padronização das dietas e balanço nutricional, foi adicionado 2% de óleo vegetal à dieta do grupo controle (A0 e S0).

2.4. Anestesia dos peixes

As tilápias foram anestesiadas por imersão em solução aquosa de benzocaína na proporção de 1:10.000 para coleta de sangue e 1:500 no momento da eutanásia. A benzocaína foi diluída em álcool 98° (0,1 g/mL), completando o volume para 1L (Wedemeyer, 1970). Inicialmente foi realizado pré-anestesia, procedimento este que o nível de água dos tanques era reduzido até um volume de 10L adicionando-se 0,1g de benzocaína já diluída em álcool 98°. Logo após, cada peixe era transferido para um recipiente contendo 1L de água com 0,1g de benzocaína, ambos os procedimentos eram realizados com aeração para minimizar estresse

ocasionado pela manipulação. Por fim, o animal era transferido para outro recipiente contendo 0,5g de benzocaína diluída em 1L de água para eutanásia.

2.5. Produção dos inóculos de *A. hydrophila* e *S. agalactiae*

A cepa de *A. hydrophila* utilizada neste trabalho foi mantida congelada em freezer -80°C e no momento do uso, uma alíquota foi descongelada e o material colocado em 400mL de caldo Tryptic Soy Broth (TSB) (Difco), homogeneizado e mantidos em estufa por 24h à 28°C para o crescimento da bactéria. Após seu crescimento, foram preparadas as diluições seriadas da suspensão dessa bactéria em água peptonada (0,1%) e as diluições foram semeadas as diluições em placas de petri contendo Tryptic Soy Agar (TSA), através do método por superfície, e mantidos em incubação por 24h à 28°C. Na etapa seguinte, foi realizada a contagem das colônias em placa e os resultados foram expressos em UFC/ml da suspensão bacteriana. Através de vários testes pilotos, a DL50 foi definida em $8,43 \times 10^6$ UFC/mL⁻¹, com isso foi realizado o mesmo procedimento descrito acima, para chegar na concentração estabelecida. Em seguida, a suspensão bacteriana foi centrifugada a 4.000 rpm por 20 minutos e a 4°C, em centrifuga clínica refrigerada, desprezando-se o sobrenadante e a massa bacteriana sedimentada foi diluída ou concentrada em PBS esterilizado, obtendo então a concentração desejada em termos de DL50, e imediatamente foi realizada a inoculação nos animais. No estabelecimento da DL50 (dose letal que causa a mortalidade de 50% dos animais) utilizaram-se concentrações de 10^3 à 10^{15} UFC por peixe.

O mesmo foi feito para a cepa de *S. agalactiae*, sendo preparada uma cepa em caldo BHI e diluída para determinar sua concentração. A DL50 foi estabelecida em $1,1 \times 10^6$ UFC/mL. A suspensão bacteriana foi centrifugada e concentrada em PBS esterilizado para atingir essa concentração. Nos testes com peixes, foram utilizadas concentrações de 10^3 a 10^{15} UFC por peixe.

2.6. Determinação da concentração bacteriana letal (DL50)

Para a determinação da concentração bacteriana letal para 50,0% dos peixes (DL) e 50 consequente determinação do inóculo de *A. hydrophila*, foram utilizados três tanques, com 10 peixes cada (n=30), com peso médio de 100g. Os peixes das caixas 1, 2 e 3 foram inoculados com as concentrações $1,24 \times 10^6$; $4,93 \times 10^6$ e $8,40 \times 10^6$ UFC/mL de *A. hydrophila*. Após 15 dias os resultados da mortalidade diária foram submetidos à análise estatística pelo programa estatístico Spearman-Kärber, (US EPA, Washington, DC, EUA), e a DL50 determinada foi de $8,43 \times 10^6$ UFC mL⁻¹. O mesmo procedimento foi realizado para determinação do inóculo de *S. agalactiae*. Para isso foram utilizados três tanques, com 10 peixes cada (n=30), com peso médio 77 de 100g, em que foram inoculados com as concentrações $3,6 \times 10^6$; $1,8 \times 10^6$ e $0,9 \times 10^6$ UFC/mL de *S. agalactiae*. Após 15 dias os resultados da mortalidade diária foram submetidos à análise estatística pelo programa estatístico Spearman-Kärber, (US EPA, Washington, DC, EUA), e a DL50 determinada foi de $1,1 \times 10^6$ UFC mL⁻¹.

2.7. Infecção experimental

Após a determinação da DL₅₀, foi realizada a inoculação nos grupos experimentais correspondentes por via intraperitoneal. Os sedimentos bacterianos foram diluídos em PBS estéril de modo a conter $8,43 \times 10^6$ para *A. hydrophila* e $1,1 \times 10^6$ para *S. agalactiae*. Com as soluções mantidas em gelo, alíquotas de 0,5 mL foram transferidas para seringas de 1 mL e administradas por via intraperitoneal nas tilápias, tendo sido realizadas a devida antisepsia com álcool antes do procedimento e, logo em seguida, foi administrado o inóculo na cavidade intraperitoneal.

2.8. Reisolamento dos patógenos

Amostras de cérebro e rim caudal dos peixes foram coletadas de forma asséptica próximo ao bico de Bunsen, lavadas com água destilada estéril e homogêneas em água peptonada a 0,1%. Na etapa seguinte, 1mL da amostra foi adicionada em meio Tryptic Soy Broth (TSB) (Difco), homogêneo e esta mistura foi incubada por 24 horas à 28°C para animais desafiados com *A. hydrophila* e em caldo Brain Heart Infusion broth (BHI broth), por 48 horas a 35°C para animais desafiados com *S. agalactiae*. Após os respectivos períodos de crescimento, foram semeados em ágar TSA e BHI respectivamente, tendo sido mantidos em incubação, nas condições referidas acima para cada uma dessas bactérias, para posteriormente ser realizada a contagem de colônias.

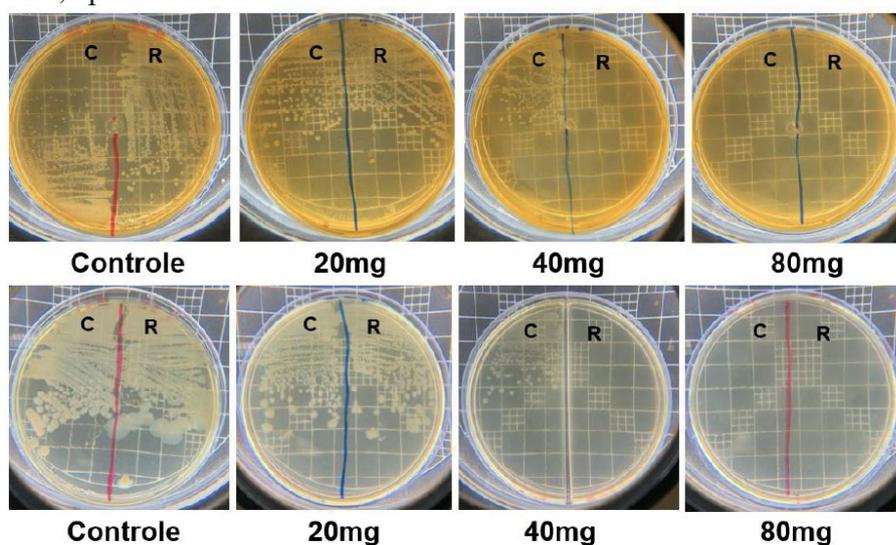
2.9. Análise estatística

Foi randomizado em esquema fatorial 5 x 2 (cinco tratamentos: 20, 40, 80, controle e padrão fisiológico X dois períodos de avaliação: 12 e 16 dias após desafio). As análises de variância para comparar os diferentes grupos experimentais foram realizadas utilizando o procedimento GLM (General Linear Model) do programa SAS, versão 9.3 (Statistical Analysis Software, 2012). Diferenças significativas ($P < 0,05$) foram estimadas com base no teste de Tukey ao nível de confiança de 95%. O modelo de Kaplan-Meier foi utilizado para calcular a probabilidade de sobrevivência específica em função do tempo de Tilápias do Nilo tratadas ou não e submetidas a infecção experimental com *S. agalactiae* e *A. hydrophila*.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo de reisolamento demonstrou efeito dose-resposta para a ausência de *A. hydrophila* e *S. agalactiae* no rim caudal e cérebro de tilápias (Figura 1). Esses resultados foram estatisticamente significativos ($P < 0,05$) nas análises realizadas 15 dias pós-infecção para tilápias tratadas com 40 e 80 mg de doxiciclina quando comparadas aos peixes tratados com 0 ou 20 mg.

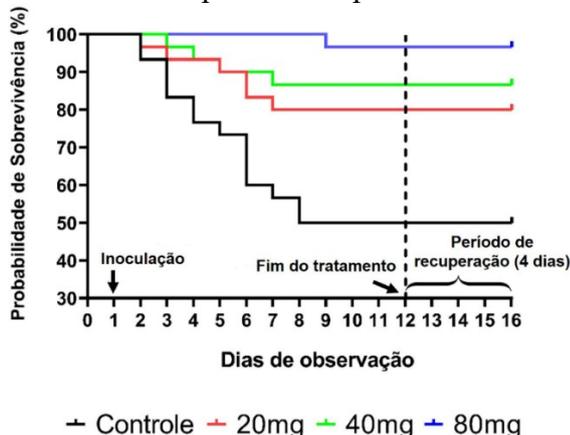
Figura 1. Resultado do reisolamento bacteriano de *A. hydrophila* e *S. agalactiae*, respectivamente, após tratamento com diferentes doses de doxiciclina.



Os peixes tratados com doxiciclina (20, 40 e 80 mg) submetidos ao desafio com *A. hydrophila* apresentaram mortalidade significativamente menor ($p < 0,05$) comparado ao grupo controle (Figura 2). As tilápias do grupo controle apresentaram razão de risco de mortalidade de 2,95 (1,22; 6,91), 4,53 (1,83; 11,17) e 8,52 (3,11; 23,36) maior comparado aos tratamentos

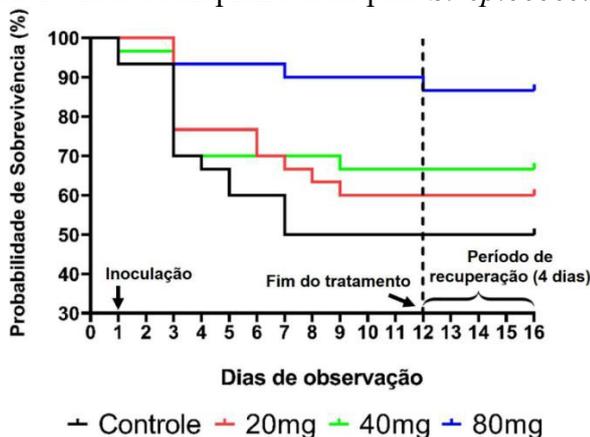
20, 40 e 80 mg respectivamente. Ainda, as tilápias tratadas com 20 mg apresentaram significativamente mais morte ($p < 0.05$) e risco de morte 6,65 (1,51; 29,31) maior quando comparadas as tilápias que receberam 80 mg de doxiciclina.

Figura 2. Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier para *Aeromonas hydrophila*.



As tilápias tratadas com 80 mg de doxiciclina e desafiadas com *S. agalactiae* apresentaram mortalidade significativamente menor ($P < 0.05$) comparado aos tratamentos 20, 40 mg e controle (Figura 3). A razão de risco de morte dos peixes não tratados (controle) é 4,60 (1,86; 11,37) maior comparado aos peixes que receberam 80 mg de doxiciclina. Ainda os animais tratados com 20 mg e 40 mg apresentam 3,40 (1,27; 9,08) e 2,72 (0,95; 7,76) risco de morte, respectivamente, em comparação ao tratamento com 80 mg de doxiciclina.

Figura 3. Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier para *Streptococcus agalactiae*



4 CONCLUSÃO

O estudo forneceu resultados convincentes da eficácia da doxiciclina em tilápias do Nilo frente a duas importantes bacterioses (*S. agalactiae* e *A. hydrophila*), revelando efeito dose-resposta para o controle das infecções experimentais, confirmando a hipótese de que a ação antimicrobiana da doxiciclina, principalmente na dose de 80mg/kg, auxiliou os mecanismos de defesa das tilápias, exercendo efeitos positivos sobre esses animais.

REFERÊNCIAS

ASSANE, I. M.; GOZI, K. S.; VALLADÃO, G. M. R.; PILARSKI, F. Combination of antimicrobials as an approach to reduce their application in aquaculture: Emphasis on the use

of thiamphenicol/florfenicol against *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture**. . v. 507, p. 238-245, 2019.

BOYD, CLAUDE E. Water Quality in Ponds for Aquaculture, Alabama Agricultural Experiment 416 Station, Auburn University, AL, USA, 1990.

CARNEIRO, P. C. F.; URBINATI, E. C. Salt as stress response mitigator of matrinxã *Brycon cephalus* during transport. **Aquaculture Research**. v.32, p. 297-304, 2001.

COSTA, C.; OLIVEIRA, S.; ARACATI, M.; RODRIGUES, L.; COLTURATO, L.; MONTASSIER, H.; BELO, M. Clinical safety of treatment with zileuton, 5-lox inhibitor, during acute inflammatory reaction in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Ars Veterinaria**. v. 38, n. 1, p. 23-30, 2022.

NAFIQOH, N.; NOVITA, H.; SUGIANI, D.; GARDENIA, L.; TAUKHID, T.; WIDYANINGRUM, A.; SUSANTI, D. R. *Aeromonas hydrophila* AHL 0905-2 and *Streptococcus agalactiae* N14G as Combined Vaccine Candidates for Nile Tilapia. **HAYATI Journal of Biosciences**. v. 29, n. 2, p. 137-145, 2022.

OLIVEIRA, S. L.; ARACATI, M. F.; RODRIGUES, L. F.; COSTA, C. C.; CONDE, G.; MORAES, A. C.; MANRIQUE, W. G.; CHARLIE-SILVA, I.; BELO, M. A. A. Clinical safety of zafirlukast treatment during a foreign body inflammatory reaction in Nile tilapias, *Oreochromis niloticus*. **International Journal of Development Research**. v.11, p. 47914-47919, 2021.

RIGOS, G.; SMITH, P. A critical approach on pharmacokinetics, pharmacodynamics, dose optimisation and withdrawal times of oxytetracycline in aquaculture. **Reviews in Aquaculture**. v. 7n. 2, p. 77-106, 2015.

SARTINI, I.; ŁEBKOWSKA-WIERUSZEWSKA, B.; LISOWSKI, A.; POAPOLATHEP, A.; SITOVS, A.; GIORGI, M. Doxycycline pharmacokinetics in geese. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**. v. 44, n. 6, p. 975-981, 2021.

SAS Institute Inc. **SAS/STAT software changes and enhancements through computer program**. Release 8.9.3. Cary: SAS Institute, 2012.

SOLIMAN, A. M.; ABOUBAKR, M.; EL-HEWAITY, M. Bioequivalence study of two oral doxycycline formulations (Doxysol® and Doxymed®) in healthy broiler chickens. **Pharmacology & Pharmacy**. v. 6, n. 01, p. 1, 2015.

WEDEMEYER, G. Stress of anesthesia with MS-222 and benzocaine in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, v.22, n.5, 1970.

YANG, F.; LI, Z. L.; SHAN, Q.; ZENG, Z. L. Pharmacokinetics of doxycycline in tilapia (*Oreochromis aureus* × *Oreochromis niloticus*) after intravenous and oral administration. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**. v. 37, n. 4, p. 388-393, 2014.