

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

Thaís Ferreira de Oliveira

**RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS, EFICIÊNCIA TERAPÊUTICA DE
FÁRMACOS E DESENVOLVIMENTO DE VACINA PARA O CONTROLE
DA INFECÇÃO POR *Francisella orientalis* EM TILÁPIA DO NILO
(*Oreochromis niloticus* L.)**

Belo Horizonte
2022

Thaís Ferreira de Oliveira

RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS, EFICIÊNCIA TERAPÊUTICA DE FÁRMACOS E DESENVOLVIMENTO DE VACINA PARA O CONTROLE DA INFECÇÃO POR *Francisella orientalis* EM TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus* L.)

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.

Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Carlos Augusto Gomes Leal

Coorientadores: Henrique C.P. Figueiredo
Francisco C.F. Lobato

Belo Horizonte
2022

O48r Oliveira, Thais Ferreira de ,1983 -
Resistência a antimicrobianos, eficiência terapêutica de fármacos e desenvolvimento de vacina para o controle da infecção por *Francisella orientalis* em Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus L.*) / Thais Ferreira de Oliveira. -2022.
103f.:il.

Orientador: Carlos Augusto Gomes Leal
Coorientadores: Henrique C.P. Figueiredo
Francisco C. Lobato

Tese (Doutorado) apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do título de Doutora em Ciência animal.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva.

Bibliografia: f. 26 a 36; f. 53 a 58; f.83 a 88

Anexo: f. 90.

Apêndice: f. 92.

1. Tilápia (peixe) - Teses - 2. Bacterioses - Teses - 3. Veterinária - Teses
I. Ribeiro, Paula Adriane Perez – II. Costa, Leandro Santos - III. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – IV. Título.

CDD – 639.3



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

THAIS FERREIRA DE OLIVEIRA

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva.

Aprovada em 31 de maio de 2022, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Carlos Augusto Gomes Leal
Presidente – Orientador(a)

Dr.(a). Frederico Augusto de Alcântara Costa

Dr.(a). Felipe Pierezan

Dr.(a). Fabiana Pilarski

Dr.(a). Marcia Pimenta Leibowitz



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Augusto Gomes Leal, Coordenador(a) de curso**, em 01/06/2022, às 14:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabiana Pilarski, Usuário Externo**, em 06/06/2022, às 10:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Márcia Pimenta Leibowitz, Usuário Externo**, em 06/06/2022, às 11:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Felipe Pierezan, Professor do Magistério Superior**, em 08/06/2022, às 14:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Frederico Augusto de Alcântara Costa, Usuário Externo**, em 10/06/2022, às 11:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1464462** e o código CRC **EF8D790F**.

Aos meus pais, Tânia e Sergio e minha avó Mercedes (*in memoriam*), por todo amor e apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, porque definitivamente sem ele nada seria possível.

Aos meus pais, Tânia e Sergio, vocês como sempre são a base de tudo....nunca vou poder agradecer o suficiente pelo amor, apoio incondicional, pela força que me manteve no eixo, por acreditarem em mim quando eu mesma já não conseguia mais, por estarem ao meu lado, mesmo distantes nas minhas horas mais escuras.... esses anos em que estive no Doutorado foram muito difíceis e vocês foram um dos principais dos diversos motivos pelos quais eu não desisti. Amo vocês!

Ao meu orientador, Prof. Carlos A. G. Leal, por toda a jornada de ensinamentos desde o mestrado, você é e sempre será parte do que eu me tornei como profissional. Você foi o motivo pelo qual no segundo dia de estágio obrigatório em outubro de 2012, eu decidi que o meu lugar era na UFMG. Desde estar ao meu lado na bancada de trabalho quando cheguei, durante todo percurso cobrando e esperando sempre que eu sempre fosse/fizesse melhor, na ajuda do desenvolvimento de pensamento crítico e identificar um estudo “Mandrake” assim que eu o lê-se, por ter me ajudado no âmbito pessoal quando precisei. Os percalços ocorridos, creio que fazem parte do longo período de convivência (quase 9 anos). O meu Muito Obrigada!

Ao meu co-orientador, Prof. Henrique C.P. Figueiredo, foi muito bom ter mais tempo de convivência com você. Também é responsável pela profissional que me tornei. Me ensinou que é possível que os estudos executados possam sempre ser analisados de outro ângulo ou desenvolvidos de maneira diferente, ampliando os horizontes do conhecimento em tudo que fazemos. Obrigada pelo acolhimento e entendimento, por não ter deixado de acreditar em mim e confiar no meu trabalho, pela força, pelas palavras de apoio, também pelas broncas. Tudo isso é de extrema importância para mim. Muito Obrigada!

Ao meu co-orientador, Prof. Francisco Lobato, pelo conhecimento compartilhado, pela confiança em mim e no meu trabalho, e principalmente por todo apoio, acolhimento, ajuda sempre de maneira terna e companheira. Sou muito grata!!! Muito Obrigada!

Ao Prof. Rodrigo Silva, por ter contribuído agregando conhecimento e ajudando a melhorar este trabalho, pelo entendimento de minhas adversidades. Ao Rodrigo, pelas nossas longas conversas, pelos seus conselhos. Muito Obrigada!

A Beatrice, que mesmo de longe se fez presente, foi meu amparo e socorro durante meus momentos mais difíceis. Sinto falta da minha truta da faculdade, sempre. Serei eternamente grata por tudo e estarei sempre aqui por você também.

Ao casal vinte Guilherme e Aila, GRATIDÃO é a palavra que define. Aila, sem você e a ajuda da sua família “naquele dia” nós estaríamos perdidos e mais sem chão....eu e minha família seremos eternamente gratos pelo que vocês fizeram. Gui, meu parceiro de fluxo, experimento, faxina de aquário, de trabalho nos finais de semana, mudanças, incontáveis risadas e perrengues. Obrigada pelo seu companheirismo, por estar ao meu lado ajudando e apoiando naqueles vários dias péssimos. Muito Obrigada!!

A Juliano e Paulo, não tenho como quantificar a importância de vocês para mim..... foram duas luzes que me acharam num lugar muito escuro e que a pequenos passos foram me ajudando a sair de lá e suportar o que eu achei que não conseguiria. Apoiaram, escutaram, acudiram, ajudaram, conheceram, uma pessoa na sua pior versão.....e mesmo assim, continuaram e continuam ao meu lado (a versão deu uma melhorada...rsrs). São inúmeras risadas, poucas

fotos, pizzas, coca colas, cervejas, fofocas e muito estudo, que acabaram tornando as coisas um pouco mais leves. São mais dois motivos pelos quais eu não desisti. AhhhPaulo, obrigada pela ajuda na segunda qualificação... você foi essencial. Muito Obrigada!!

A Jordana, melhor escolha que fiz aquele dia!! Obrigada por ter devolvido um lugar que eu achei que havia perdido, por me dar um sobrinho mais lindo de suéter, o Thor e pelo apoio. Muito Obrigada!

A Agda, trazida pela loucura do cultivo de células de um hibridoma.....uma pessoa que adorei conhecer e se tornou próxima rapidamente. Obrigada não só por compartilhar seu conhecimento e aprender coisas novas comigo, mas também pelo acolhimento, apoio recebido. Muito Obrigada!

O meu agradecimento também a Ana Fraiha, Brendhal Silva, Salene Colombo, Nathália Vieira, Prof. Guilherme Campos, Profa. Érica Costa, Hamilton Rodrigues, Dra. Cláudia Maciel e Sueli Vasconcellos.

E por último, mas não menos importante, meu fiel escudeiro do qual eu senti muita falta durante esse período e que eu amo mais que tudo, meu “princeso” Theodoro.

MUITO OBRIGADA!!!

Eu andarei vestido e armado com as armas de São Jorge para que meus inimigos, tendo pés não me alcancem, tendo mãos não me toquem, tendo olhos não me vejam, e nem em mesmo em pensamentos eles possam me fazer mal.

Armas de fogo o meu corpo não alcançarão, facas e lanças se quebrem sem o meu corpo tocar, cordas e correntes se arrebentem sem o meu corpo amarrar.

Glorioso São Jorge, em nome de Deus, estenda-me o seu escudo e as suas poderosas armas, defendendo-me com a sua força e com a sua grandeza, e que debaixo das patas de seu fiel ginete meus inimigos fiquem humildes e submissos a vós...”

Oração de São Jorge

RESUMO

A infecção por *Francisella orientalis* (FO) vem sendo considerada uma grande adversidade no cultivo de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) no cenário mundial. Apesar do severo impacto econômico, não existem vacinas comerciais e o controle dá-se pela antibioticoterapia via oral. Para que esta apresente melhor eficácia é necessário conhecer o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos dos isolados circulantes, a fim de selecionar a droga mais adequada para o tratamento. Não há padronização pelo CLSI de testes de susceptibilidade a antimicrobianos para FO. Adicionalmente, existem relatos de produtores quanto a recidiva da enfermidade com o uso de oxitetraciclina (OTC) e o emprego eficiente de enrofloxacin (ENR), de modo *off-label*, para o tratamento da franciselose em tilápias do Nilo. Os objetivos deste estudo foram: padronizar o teste de disco difusão para determinar o perfil de susceptibilidade de isolados Brasileiros de *F. orientalis* para florfenicol (FLO), oxitetraciclina (OTC), enrofloxacin (ENR), ampicilina (AMP), amoxicilina (AMO), eritromicina (ERI), norfloxacin (NOR) e doxiciclina (DOX); avaliar a eficácia terapêutica da OTC e ENR no tratamento da franciselose; e desenvolver vacina inativada via imersão para a profilaxia de alevinos e juvenis de tilápia. A amostra FNO-12 foi utilizada em todos os ensaios. O primeiro experimento consistiu em determinar o meio de cultivo mais adequado ágar cisteína coração modificado (CHAM) e ágar Mueller-Hinton modificado (MHAM), período de incubação para leitura dos halos de inibição. Posteriormente, 89 isolados de FO de 6 estados brasileiros foram avaliados e os pontos de corte epidemiológicos (CO_{WT}) calculados pela metodologia *Normalized Resistance Interpretation-NRI*. O segundo experimento, a eficácia terapêutica foi avaliada através da infecção experimental de juvenis de tilápia que em seguida foram tratados por via oral com ENR na dose de 10mg/Kg e OTC nas doses de 100 e 300mg/Kg. O terceiro experimento, foi composto por dois ensaios vacinais para grupos compostos de alevinos e juvenis. Esses foram imersos nas soluções de: bacterina e adjuvante, bacterina e adjuvante, e experimentalmente desafiados após 30 dias. Os resultados obtidos no primeiro experimento determinaram que para o teste de disco difusão para FO, o meio propício foi o CHAM com período de incubação de 48 hrs para mensuração dos halos. Além disso, 100% e 96,7% dos isolados foram classificados com *WT* para FLO, OTC, ERI, DOX e AMO, AMP, ENR e NOR, respectivamente; enquanto 3,3% foram classificados como *NWT* para ENR, NOR, AMO e AMP. Já, no segundo experimento a eficácia terapêutica da OTC em ambas as doses foi capaz de impedir a mortalidade, contudo, o tratamento resultou em grande número de animais portadores, contrapondo os resultados obtidos pela ENR, que foi capaz não só de reduzir a mortalidade, mas também eliminar o patógeno do hospedeiro. O terceiro experimento, no ensaio vacinal com os alevinos, a formulação bacterina e adjuvante apresentou melhor desempenho com menor taxa de mortalidade (47%) e eficácia de 50% (porcentagem relativa de sobrevivência-PRS); os juvenis demonstraram performance superior quando comparada a mesma formulação (bacterina e adjuvante), obtendo menor taxa de mortalidade (30%) e eficácia de 63%. A compilação dos resultados deste estudo permite inferir que o uso de antimicrobianos *off-label* nas produções nacionais de tilápia já trouxe consequências, pois este é o primeiro relato de isolados de *F. orientalis* resistentes ENR, NOR e AMO; quanto ao tratamento da franciselose com ENR este altamente eficaz, sendo um fármaco com possibilidade futura para licenciamento; contudo, atualmente, seu uso não é recomendado. Já a vacina desenvolvida foi capaz de diminuir a mortalidade e progressão dos sinais clínicos, demonstrando-se como uma alternativa viável no controle da franciselose. Este estudo trouxe medidas de profilaxia e controle para franciselose que podem ser empregadas nas tilapiculturas nacionais.

Palavras-chave: Franciselose. Tilápia. Antibioticoterapia. Perfil de susceptibilidade. Imunoprofilaxia.

ABSTRACT

Infection with *Francisella orientalis* (FO) is considered a significant barrier to Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) production in worldwide scenario. Despite the major economic impact, there is no commercial vaccine against, and the disease is controlled by oral antibiotic therapy. However, therapeutic efficiency depends on the susceptibility profile of the circulating isolates and the use of the appropriate antimicrobial. There is no CLSI standard method for antimicrobial susceptibility testing of FO. Additionally, there are reports from producers regarding the disease recurrence with the use of oxytetracycline (OTC) and the efficient off-label use of enrofloxacin (ENR) for the treatment of francisellosis in Nile tilapia. The aims of this study were: to standardize the disk diffusion test to determine the susceptibility profile of Brazilian isolates of *F. orientalis* to florfenicol (FLO), oxytetracycline (OTC), enrofloxacin (ENR), ampicillin (AMP), amoxicillin (AMO), erythromycin (ERI), norfloxacin (NOR) and doxycycline (DOX); evaluate the therapeutic efficacy of OTC and ENR in the treatment of francisellosis; and the development of an immersion inactivated vaccine for the prophylaxis of disease in tilapia. The sample FNO-12 was used in all assays. The first experiment consisted of the determination of the most suitable medium, modified cystine heart agar (CHAM) and modified Mueller-Hinton agar (MHAM), incubation period for reading the FO inhibition zones. Subsequently, 89 FO isolates from 6 Brazilian states were evaluated and the epidemiological cutoff value (CO_{wt}) calculated by the Normalized Resistance Interpretation-NRI methodology. In the second experiment, the therapeutic efficacy was evaluated through the experimental infection of tilapia juvenile followed by oral treatment with ENR at a dose of 10mg/Kg and OTC at doses of 100 and 300mg/Kg. The third experiment consisted of two vaccine trials with groups of fingerlings and juveniles. These were immersed in the solutions of: bacterin and adjuvant, bacterin and adjuvant, and after 30 days experimentally challenged. The results obtained in the first experiment determined that for the disc diffusion test for FO, the suitable medium was CHAM with an incubation period of 48 hrs to measure the inhibition halos. Furthermore, 100% and 96.7% of the isolates were classified with WT for FLO, OTC, ERI, DOX and AMO, AMP, ENR and NOR, respectively; while 3.3% were classified as NWT for ENR, NOR, AMO and AMP. In the second experiment, the therapeutic efficacy of OTC at both doses were able to prevent mortality, nevertheless the treatment resulted in a large number of animals in carrier state, contrasting the results obtained by the ENR, which was able not only to reduce mortality, but also to eliminate the pathogen from the host. The third experiment, in the vaccine trial with fingerlings, the bacterin and the adjuvant formulation presented better performance with a lower mortality rate (47%) and 50% efficacy (relative percentage of survival-RPS); the juveniles showed superior performance when compared to the same formulation (bacterin and adjuvant), obtaining a lower mortality rate (30%) and an efficacy of 63%. Compiling the results, this study demonstrated that the use of off-label antimicrobials in Brazilian tilapia farming has already brought consequences, since this is the first report of *F. orientalis* isolates resistant to ENR, NOR and AMO. Regarding the treatment of francisellosis with ENR, it was highly effective when compared to OTC, however, there are already resistant isolates in the country and its off-label use is not recommended. The developed vaccine was able to reduce mortality and progression of clinical signs, demonstrating itself as a viable alternative in the control of francisellosis. This study brought prophylaxis and control measures for the disease caused by *F. orientalis* that can be used in national tilapia farms.

Keywords: Francisellosis. Tilapia. Susceptibility profile. Antimicrobials. Immunoprophylaxis.

LISTA DE FIGURAS

Introdução

Figura 1: Países e períodos em que ocorreram surtos de franciselose em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Adaptado de Nguyen et al., 2015). 19

Figura 2: Estados brasileiros e períodos em que ocorreram os surtos de infecção por *Francisella orientalis* em tilápia do Nilo. 21

Capítulo 1

Figura 1.1: Ágar MHAM inoculado com amostra de FO em diferentes períodos de incubação: A- 24 horas; B- 48 horas; e C- 96 horas, quando o crescimento bacteriano pode ser verificado (setas vermelhas). 37

Figura 1.2: Ágar CHAM inoculado com amostra FNO-12 em diferentes períodos de incubação: A- 24 horas; B- 48 horas; C- 72 horas; e D- 96 horas. Para a amoxicilina, evidente diminuição do halo de inibição formado e aumento na área de crescimento bacteriano previamente. 38

Figura 1.3: Distribuição das zonas de inibição dos antimicrobianos, florfenicol, eritromicina, oxitetraciclina e doxiciclina para os 89 isolados de FO testados. 41

Figura 1.4: Distribuição das zonas de inibição dos antimicrobianos, ampicilina, amoxicilina, enrofloxacina e norfloxacina para os 89 isolados de FO testados. 42

Capítulo 2

Figura 2.1: Mortalidade acumulativa dos grupos experimentais desafiados com FNO-12 e tratados com ENR e OTC durante todo período experimental. 53

Capítulo 3

Figura 3.1: Mortalidade acumulativa dos grupos de alevinos de tilápia do Nilo vacinados no período pós-desafio com a amostra FNO-12. 64

Figura 3.2: Mortalidade acumulativa dos grupos de juvenis de tilápia do Nilo vacinados no período pós-desafio com a amostra FNO-12. 66

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1.1: Resultados obtidos da *E. coli* ATCC® 2599 nos ágares MH e CHAM, incubadas 28°C 39

Tabela 1.2: Resultados obtidos da *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC® 33658 nos ágares MH. 39

Tabela 1.3: Determinação do CO_{WT} dos oito antimicrobianos para FO, variação dos halos obtidos, média e desvio padrão (DP) dos mesmos e classificação dos isolados. 40

Capítulo 2

Tabela 2.1: Taxa de mortalidade e análises estatísticas da eficácia terapêutica da ENR e OTC durante todo período experimental, quando comparado ao grupo controle positivo. 53

Tabela 2.2: Resultado dos testes realizados e análises estatísticas da indução de animais portadores no tratamento de franciselose com as doses de 100mg/Kg e 300mg/Kg PV de OTC, quando comparadas ao tratamento com a dose de 10mg/KG PV de ENR. 544

Capítulo 3

Tabela 3.1: Mortalidade, eficácia vacinal e análise estatística dos grupos de alevinos vacinados, durante todo período experimental..... 64

Tabela 3.2: Resultados dos testes realizados para determinar a presença de animais portadores. 65

Tabela 3.3: Mortalidade, eficácia vacinal e análise estatística dos grupos de juvenis vacinados, durante todo período experimental..... 66

Tabela 3.4: Resultados dos testes realizados para determinar a presença de animais portadores. 67

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP	Ampicilina
AMO	Amoxicilina
°C	Graus Celsius
CHAM	Ágar cisteína coração modificado
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
CQ	Controle de qualidade
DL ₅₀	Dose letal 50%
DO	Densidade óptica
DP	Desvio padrão
DOX	Doxiciclina
ECV/CO _{WT}	Ponto de corte epidemiológico
ENR/ENO	Enrofloxacina
ERIC	<i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus elements</i>
ERITRO	Eritromicina
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FC	Farmacocinética
FD	Farmacodinâmica
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i>
FLO/FFC	Florfenicol
FO	<i>Francisella orientalis</i>
FQ	Fluorquinolonas
g	grama
hrs	horas
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	Intervalo de confiança
IP	Intraperitoneal
Kg	quilograma
L	litro
LMR	Limite Mínimo de Resíduos
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
µg	micrograma
mL	mililitro
mg	miligrama
MHA	Ágar Mueller-Hinton
MHAM	Ágar Mueller-Hinton cátion ajustado modificado
MMH	Caldo Mueller-Hinton cátion ajustado modificado
nm	nanômetro
NOR	Norfloxacina
NRI	<i>Normalized Resistance Interpretation</i>
NWT	<i>Non-Wild Type</i>
OIE	<i>World Organisation for Animal Health</i>
OTC/OT	Oxitetraciclina
PBS	Tampão fosfato salina
PCR	Reação de Polimerase em Cadeia
PI	Pós-inoculação

PRS	Porcentagem Relativa de Sobrevivência
PV	Peso vivo
qPCR	Reação de Polimerase em Cadeia Quantitativa
REP	<i>Repetitive Extragenic Palindromic elements</i>
rpm	Rotações por minuto
RR	Risco Relativo
RRR	Redução do Risco Relativo
SUT	Sulfametoxazol-Trimetoprim
TSA	Testes de Susceptibilidade a Antimicrobianos
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
wgMLST	<i>whole genome Multilocus Sequence Typing</i>
WT	<i>Wild Type</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	15
2. CAPÍTULO 1: Padronização de antibiograma, pontos de corte epidemiológicos e determinação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos para isolados Brasileiros de <i>Francisella orientalis</i>	31
2.1. Introdução	31
2.2. Material e Métodos.....	33
2.3. Resultados	36
2.4. Discussão.....	43
2.5. Conclusões	47
3. CAPÍTULO 2: Eficácia terapêutica da oxitetraciclina e enrofloxacina no tratamento da infecção por <i>Francisella orientalis</i> em juvenis de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i> L.).....	48
3.1. Introdução	48
3.2. Material e Métodos.....	50
3.3. Resultados	52
3.4. Discussão.....	55
3.5. Conclusões	57
4. CAPÍTULO 3: Desenvolvimento de vacina inativada de célula completa por administração via imersão para imunoprofilaxia da infecção por <i>Francisella orientalis</i> em alevinos e juvenis de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i> L.).....	58
4.1. Introdução	58
4.2. Material e Métodos.....	59
4.3. Resultados	63
4.4. Discussão.....	67
4.5. Conclusões	70
5. Considerações finais	71
6. REFERÊNCIAS.....	72
7. APÊNDICES	95

1. INTRODUÇÃO GERAL

A aquicultura vem apresentando um grande crescimento nas últimas décadas, devido à expansão na produção, houve aumento na demanda e incremento do consumo *per capita* mundial de pescado. Essa fonte de proteína animal já responde por 20% do total consumido pela população mundial, principalmente nos países em desenvolvimento (FAO, 2015, 2018). Segundo a *Food and Agriculture Organization* (FAO), no ano de 2018 foram produzidos 114,5 milhões de toneladas de pescado na aquicultura mundial, gerando divisas da ordem de 263,8 bilhões de dólares (FAO, 2020). No Brasil, a atividade foi responsável pela produção de 551,9 mil de toneladas no ano de 2020 (IBGE, 2021).

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é um ciclídeo africano considerado uma das espécies mais importantes da aquicultura subtropical e tropical (Elangovan et al., 2019). Altamente adaptável a diferentes temperaturas, salinidades e sistemas de produção. Além disso, possui boa conversão alimentar, baixo custo produtivo, toleram baixa qualidade de água, filé branco, sem espinhas com características organolépticas agradáveis ao consumidor. Foi introduzida no Brasil em 1971 com o intuito de povoar reservatórios na região nordeste, mas a expansão produtiva deu-se apenas na década de 90 (Kubitza, 2003; FAO, 2005; SENAR, 2018). Atualmente, destaca-se por ser a espécie de peixe mais cultivada no Brasil e a terceira no mundo (FAO, 2020; IBGE, 2021). No país essa é responsável por 62,3% do total da produção nacional, sendo o estado do Paraná o principal produtor, seguido de São Paulo (IBGE, 2021).

Com o passar de vinte anos, a produção de tilápia foi gradualmente expandindo, do cultivo em tanque escavado para tanque-rede em grandes reservatórios (Valenti et al., 2021). A intensificação da produção para atender à crescente demanda do mercado, exige que o setor seja mais produtivo, em contrapartida, há um aumento na probabilidade de surtos de enfermidades endêmicas na tilapicultura (*Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus agalactiae*, *Flavobacterium columnare*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus dysgalactiae*) (Figueiredo et al., 2005; Mian et al., 2009; Carvalho-Castro et al., 2010; Netto et al., 2011; Figueiredo et al., 2012; Chideroli et al., 2017) como a possibilidade de emergir uma nova enfermidade (Oidtmann et al., 2011; Peeler & Taylor, 2011; Roriz et al., 2017).

Atualmente, a doença emergente de etiologia bacteriana que tem representado uma grande adversidade para a tilapicultura nacional, bem como mundial, é a infecção por *Francisella orientalis*, devido ao severo impacto econômico na cadeia produtiva gerado pelas perdas (alta mortalidade, baixa conversão alimentar de animais sobreviventes, aumento do

custo produtivo, etc) (Soto et al., 2009; Leal et al., 2014; Duodu et al., 2012; Sebastião et al., 2017; Delphino et al., 2019; Ramirez-Paredes et al., 2020; Favero et al., 2021).

Francisella orientalis é uma espécie pertencente ao filo das *Proteobacterias*, subclasse *Gammaproteobacteria*, ordem *Thiotrichales*, família *Francisellaceae* e gênero *Francisella* (Bergey's Manual, 2005). É caracterizada como cocobacilo pleomórfico, tamanho variando de 0,2-0,4µm (largura) e 0,4-1,7 µm (altura), Gram-negativa, estritamente aeróbia, não produtora de esporos, não-móvel, metabolismo dependente de cisteína, intracelular facultativa, fracamente positiva para o teste de catalase, positiva para o teste de gelatinase, negativa para o teste de citocromo oxidase, incapaz de metabolizar D-alanina como fonte de carbono. Suas colônias são mucoides podendo variar de coloração branca-acinzentada a cinza-esverdeada (Birkbeck et al., 2011; Ramírez-Paredes et al., 2017; Ramirez-Paredes et al., 2020).

Quanto a sua taxonomia, a espécie *Francisella orientalis* apresentou diversas mudanças ao longo do tempo, devido à dificuldade no isolamento, bem como a baixa sensibilidade do mesmo (Assis et al., 2017), tornando os métodos moleculares as ferramentas mais viáveis de diagnóstico. Inicialmente, nos primeiros surtos ocorridos em Taiwan e Havaí (Mauel et al., 2003; Mauel et al., 2005), o microrganismo encontrado apresentava algumas semelhanças com *Piscirickettsia salmonis* (intracelular, pleomórfico, presença no citosol e fagolisossomo) mas que diferiam da mesma com relação ao tamanho, hospedeiro acometido, temperatura da ocorrência dos surtos, e variância antigênica, sendo então denominada *Piscirickettsia-like*. Em 2006, baseando-se nos resultados obtidos de histopatologia, citologia, sequência do gene 16S rRNA, hibridização *in situ* e análise filogenética (gene 16S rRNA), concluiu-se que se tratava de uma espécie pertencente ao gênero *Francisella*, e que apresentava alta similaridade com *Francisella philomiragia* (98,7%). Dessa forma, a bactéria foi denominada como *Francisella-like* (Hsieh et al., 2006).

Em 2007, amostras de surtos ocorridos em Taiwan (*Oreochormis* sp.) e Japão (*Parapristipoma trilineatum*) (Fukuda et al., 2002) demonstraram pela análise do gene 16S rRNA, 99,9% de similaridade entre si, e alta similaridade com *F. philomiragia* (99,3%) e *Francisella* sp. (99,2%) previamente isolada de bacalhau (*Gadus morhua*) (Mauel et al., 2007). Concomitantemente, sete amostras oriundas de bacalhau foram comparadas com isolados de *F. philomiragia* através de hibridização DNA-DNA, quimiotaxonomia, sequência do gene 16S rRNA, sendo, portanto, determinada uma nova subespécie para tais isolados, *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* (Mikalsen et al., 2007).

Posteriormente, em 2009, Ottem e colaboradores revisaram a classificação taxonômica ao comparar isolados de *Francisella philomiragia* subsp. *philomiragia*, *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis*, *Francisella piscicida*, *Francisella* sp. (Ehime-1) e *Francisella* sp. (Ind04, *Oreochromis mossambicus*, Indonésia). Através de análises fenotípicas, bioquímicas, sequenciamento do gene 16S rRNA e de nove genes *housekeeping* (*dnaA*, *mutS*, *pgm*, *prfB*, *putA*, *rpoA*, *rpoB*, *tpiA*, *mdh*) seguida por análise filogenética (alinhamento do gene 16SrRNA e sequências concatenadas entre os genes) e hibridização DNA-DNA. Pelos resultados obtidos *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* e *Francisella piscicida* eram idênticas, sendo sugerido então o nome *Francisella noatunensis*. Os isolados Ehime-1 e Ind04 apresentaram alta similaridade entre si e eram mais intimamente relacionadas a *Francisella noatunensis* quando comparadas a *Francisella philomiragia* subsp. *philomiragia*. Estes dados foram reiterados pela hibridização DNA-DNA com valor médio de 68,7%. Com os resultados obtidos, verificou-se que *Francisella* sp. Ehime-1 e Ind04 eram espécies distintas de *F. philomiragia* subsp. *philomiragia* e, que de acordo com o limite previamente estabelecido de 70% (Wayne et al., 1987) para o ensaio de hibridização seria suficiente para delimitar uma espécie. Juntamente com os demais dados obtidos por esses autores, não foi possível distinguir *Francisella noatunensis* de *Francisella* sp. Ehime-1 e Ind04, sendo os nomes sugeridos *Francisella noatunensis* subsp. *noatutensis* e *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*, respectivamente.

Em 2020, Ramirez-Paredes e colaboradores, propuseram uma nova classificação taxonômica para as subespécies dessa espécie bacteriana, uma vez que, os critérios para determinar espécies distintas foram atualizados: os isolados devem apresentar similaridade do gene 16S rRNA $\leq 98,65\%$ e taxa de reassociação na hibridização DNA-DNA $\leq 70\%$ (Kim et al., 2014; Stackebrandt & Ebers, 2006; Tindall et al., 2010). Entretanto, tais metodologias não se aplicavam a *Francisella noatunensis* subsp. *noatunensis* e *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*, visto que essas apresentavam similaridade $> 99,3\%$ (Ottem et al., 2009). Logo, a reclassificação foi realizada com base em parâmetros genômicos, fenotípicos (*fingerprint* metabólico) e quimiotaxonômicos (ácidos graxos celulares, quinonas etc.). A utilização das análises de genoma completo (hibridização digital DNA-DNA); identidade média de nucleotídeos-ANI; filogenia (gene 16S rRNA e análise de sequência multilocus - oito genes *housekeeping*) funcionaram como uma solução alternativa para validar novas espécies intimamente relacionadas que possuem alto grau de similaridade do gene 16S rRNA (Chun et al., 2018; Ciufu et al., 2018). As análises foram feitas com amostras de *Francisella noatunensis*

subsp. *noatunensis*, *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*, *Francisella philomiragia*, *Francisella tularensis* (subsp. *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* e *novicida*), *Francisella hispaniensis* e uma espécie do gênero *Allofrancisella*. As análises de genoma completo indicaram que *Francisella noatunensis* subsp. *noatunensis* e *Francisella philomiragia* são mais intimamente relacionadas entre si, do que *Francisella noatunensis* subsp. *noatunensis* e *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*, validando a proposta que estas duas últimas são de espécies distintas. Tanto o perfil do *fingerprint* metabólico quanto o de ácidos graxos monoinsaturados foram capazes de diferenciar *Francisella noatunensis* subsp. *noatunensis* e *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*. Assim, a nova nomenclatura proposta foi de *Francisella noatunensis* subsp. *noatunensis* para *Francisella noatunensis* e para *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* para *Francisella orientalis*.

A diversidade genética de amostras de *F. orientalis* já foi analisada a fim de verificar a variabilidade genética entre isolados obtidos de espécies e países distintos por diferentes técnicas como ERIC-PCR (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus elements-Polymerase Chain Reaction*) e BOX-PCR (Soto et al., 2012), REP-PCR (*Repetitive Extragenic Palindromic elements-PCR*) (Leal et al., 2014), eletroforese em campo pulsado (Duodu et al., 2013), e análise de genoma completo de dezesseis amostras brasileiras (Pereira et al., 2018). Em geral nessas análises os isolados demonstraram baixos níveis de variabilidade genética, indicando relação clonal entre a maioria das amostras, com a exceção do isolado Toba04 (Indonésia) (Sridhar et al., 2012). Essa apresenta rearranjos, sugerindo uma origem distinta dos demais isolados dos estudos supracitados. De maneira similar, isolados brasileiros foram analisados por REP-PCR (Leal et al., 2014) e análise genômica (Gonçalves et al., 2016; Pereira et al., 2018). No Brasil, os isolados apresentaram relação clonal, entretanto, segundo a análise de *wgMLST* (*whole genome Multilocus Sequence Typing*), os isolados brasileiros oriundos de diferentes tilapiculturas, já demonstram diferenças sutis resultantes da ocorrência de mutações (Pereira et al., 2018).

Assim como a maioria dos patógenos emergentes na aquacultura, *Francisella orientalis* disseminou-se rapidamente através de fronteiras internacionais, causando sérios impactos financeiros nos países afetados. Surtos já foram relatados nos Estados Unidos (Mauel et al., 2005), Costa Rica (Soto et al., 2009), Indonésia (Ottem et al., 2009), Reino Unido (Jeffery et al., 2010), Brasil (Leal et al., 2014), Tailândia (Nguyen et al., 2015), China (Qiang et al., 2015), México (Ortega et al., 2016) e Honduras (Soto et al., 2019) (Fig. 1).

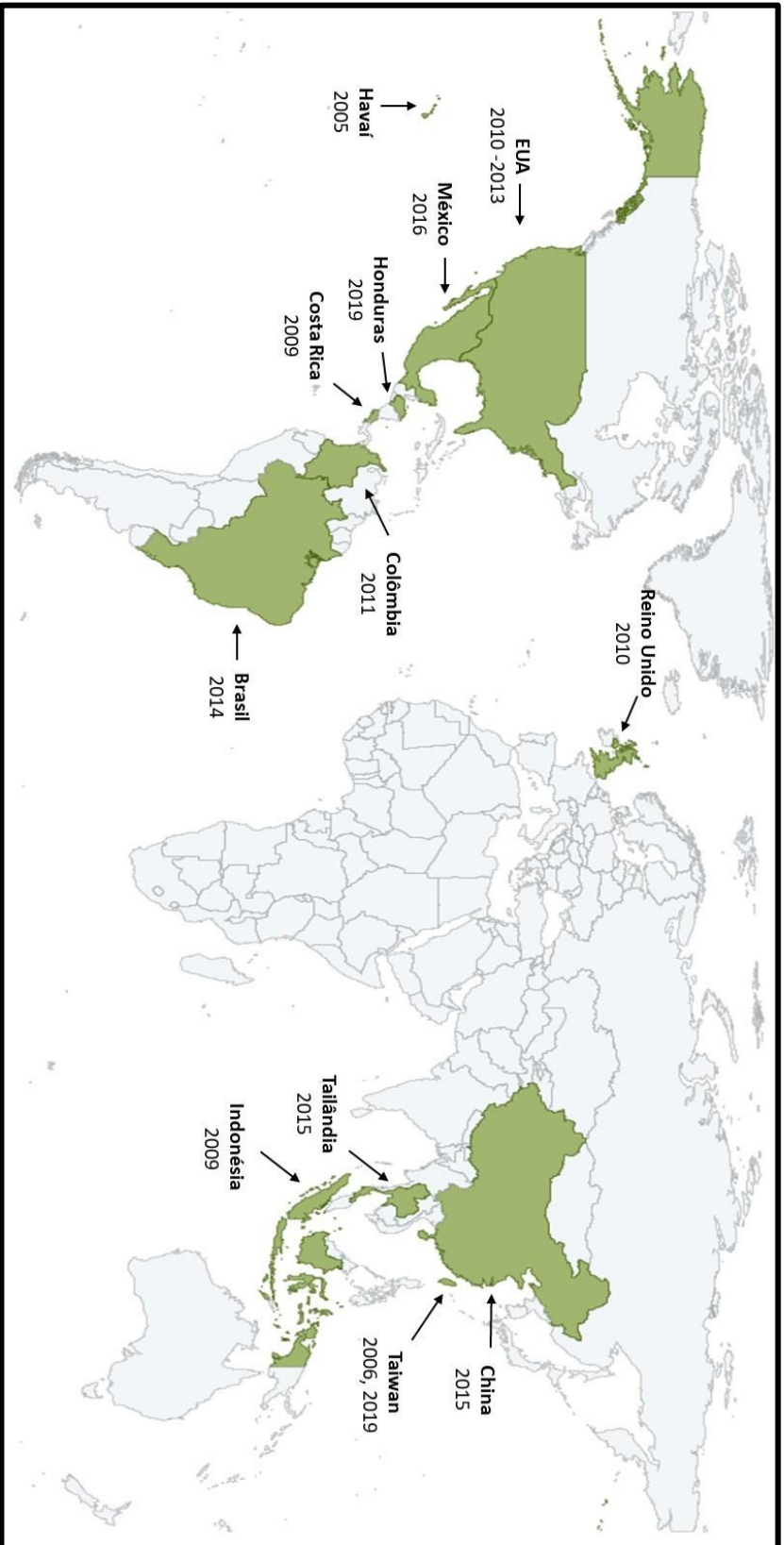


Figura 1: Países e períodos em que ocorreram surtos de franciselose em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Adaptado de Nguyen et al., 2015).

Acomete principalmente alevinos e juvenis, nos períodos de Outono e Inverno (onde a temperatura da água é menor, variando entre 22-24°C) acarretando altas mortalidades (até 90% dos lotes) (Birkbeck et al., 2011; Leal et al., 2014; Ramirez-Paredes et al., 2017; Sebastião et al., 2017; Soto et al., 2009).

O curso da infecção pode ser agudo ou crônico. Os animais com doença clínica apresentam sinais clínicos inespecíficos como anorexia, letargia, melanose, exoftalmia, ulcerações em base de nadadeira, brânquias pálidas, natação errática, opacidade de córnea e ascite; a necropsia, verifica-se a presença de lesões esbranquiçadas com aspecto granulomatoso, multifocais, principalmente no baço e rim cranial. Estas podem ser atribuídas à infecção intracelular de macrófagos, induzindo uma resposta imune adaptativa e formação de granulomas, sobretudo com maior intensidade nos órgãos pertencentes ao sistema imune (Birkbeck et al., 2011; Jantrakajorn & Wongtavatchai, 2016; Assis et al., 2017; Soto et al., 2017).

No Brasil, o primeiro relato na literatura ocorreu no ano de 2014, entretanto, as mortalidades vinham ocorrendo desde 2011, nas fases mais jovens de vida que eram acometidas de maneira aguda, nos períodos de Outono e Inverno (onde a temperatura da água é menor, variando entre 22-24°C) acarretando altas mortalidades (até 80% dos lotes) (Soto et al., 2009; Birkbeck et al., 2011; Leal et al., 2014; Ramirez-Paredes et al., 2017). Já em sua forma crônica, pode causar lesões puntiformes enegrecidas na musculatura, que levam a condenação da carcaça, fato até o presente momento descrito apenas no Brasil (Junior et al., 2020; Leal et al., 2018). A entrada do patógeno provavelmente ocorreu pela importação de tilápias vivas (no período de 2005-2016) (Cunha, 2017). A disseminação pelo território brasileiro deu-se pelo transporte de animais infectados (Fig. 2), e sua permanência durante vários ciclos produtivos ocorre pela presença de animais portadores sobreviventes dos surtos (Birkbeck et al., 2011; Favero et al., 2021; Soto et al., 2010b), espécies vicinais ao cultivo podem servir como reservatório, a formação de biofilme (nos tanques-rede, fômites utilizados no manejo) (Soto et al., 2015), além da transmissão vertical (Pradeep et al., 2017; Nguyen et al., 2019).

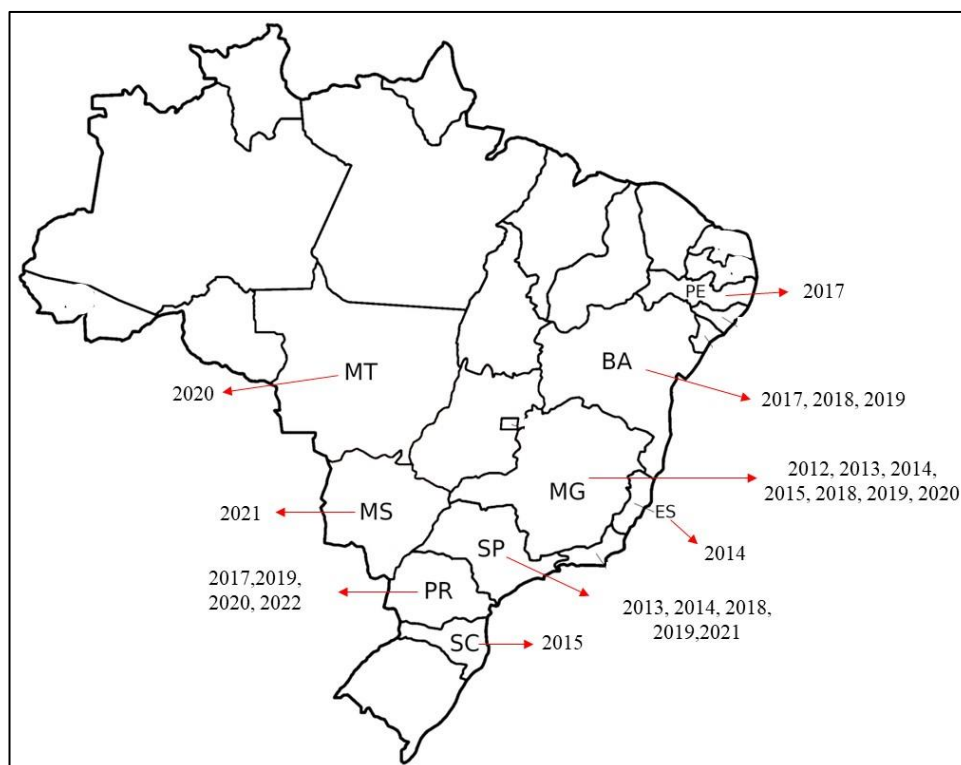


Figura 2: Estados brasileiros e períodos em que ocorreram os surtos de infecção por *Francisella orientalis* em tilápia do Nilo.

Para doenças bacterianas, como a franciselose, a antibioticoterapia administrada por via oral através da ração, é a medida de eleição para o controle dos surtos (Soto et al., 2010a; Soto et al., 2013). Visando a eficácia do tratamento, é de fundamental importância o conhecimento e acompanhamento dos perfis de susceptibilidade a antimicrobianos das amostras do patógeno (Miller & Harbottle, 2018). A mensuração da susceptibilidade é dada pelos testes *in vitro* de susceptibilidade a antimicrobianos (TSA) juntamente com seus critérios interpretativos (Smith, 2017; Smith, 2020). Os mais comumente empregados são os testes de disco difusão (popularmente conhecidos com antibiogramas) e concentração inibitória mínima (CIM). Segundo (Smith, 2007), grande parte dos laboratórios que recebem isolados oriundos de organismos aquáticos para TSA utiliza a metodologia de discos de difusão. Essa é menos laboriosa quando comparada ao CIM, possui baixo custo, repetibilidade, possibilidade de realizar testes em larga escala; tais características torna-o uma opção exequível na rotina laboratorial (Declercq et al., 2013; Smith et al., 2013; Miranda et al., 2016; Smith & Egan, 2020).

A OIE (*World Organisation for Animal Health*) preconiza o uso de protocolos de execução dos TSA originários de organizações mundialmente reconhecidas, como CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*, EUA) e EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*, UE) (OIE, 2021). O CLSI, até a presente data, é o único que dispõe de diretrizes específicas para avaliação da susceptibilidade em bactérias de animais aquáticos (VET03-A) (CLSI, 2006, 2020b), porém, não possui informações a respeito da realização do teste com microrganismos fastidiosos, como *Francisella orientalis*. Devido a diversidade dessas bactérias, com relação a temperatura de crescimento, período de incubação e aporte nutricional diferenciado, a recomendação é que os testes sejam adaptados de acordo com as particularidades do patógeno (OIE, 2019, 2021).

Quanto ao critério interpretativo, diferentemente de patógenos de mamíferos, as bactérias oriundas de animais aquáticos não possuem *breakpoint* clínico estabelecido, ou seja, os dados a respeito da farmacocinética, farmacodinâmica, dose, via de administração, período de tratamento, espécie-alvo e interação bactéria-hospedeiro-antimicrobiano são inexistentes ou escassos (Kahlmeter, 2014; Miller & Harbottle, 2018; Silley, 2012; Smith, 2020). Este fato impossibilita classificar os isolados submetidos aos TSA em sensível, intermediário e resistente, que seriam medidas *in vivo* da probabilidade de sucesso terapêutico para a droga utilizada (Silley, 2012; Baron et al., 2017; Giesecker et al., 2017; Smith, 2020). Com exceção a *Aeromonas salmonicida* onde existem *breakpoint* clínico determinado para oxitetraciclina e ácido oxolínico em salmão (*Salmo salar*) (CLSI, 2020a).

Logo, para que o conjunto de dados obtidos nos testes dos microrganismos supracitados possam ter significância, é necessário a adoção de um critério interpretativo que leve em consideração apenas as interações e condições ocorridas *in vitro* (Smith, 2013; Baron et al., 2017; Smith et al., 2017; OIE, 2019). A metodologia que vem sendo largamente utilizada desde de 2007 em testes de susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias provenientes de animais aquáticos é o *NRI* (*Normalized Resistant Interpretation*) (Douglas et al., 2007; Ruane et al., 2007; Smith et al., 2007; Smith & Christofilogiannis, 2007).

O *NRI* é o primeiro critério interpretativo que usa diretamente os dados obtidos no teste de disco difusão independente dos valores de CIM pré-determinados. Além disso, a abordagem matemática empregada para a reconstrução da população susceptível em uma distribuição gaussiana faz com que os resultados obtidos com sua aplicação, sejam extremamente próximos aos dados reais, demonstrando seguir critérios paramétricos precisos em grau suficiente que

seja possível estabelecer o limite inferior de uma população susceptível (Joneberg et al., 2003; Kronvall, 2003; Smith et al., 2009; Smith & Kronvall, 2014). Esta, permite a determinação dos valores de ponto de corte epidemiológico (*Epidemiological cutoff value- ECV/CO_{WT}*), possibilitando a classificação dos isolados como susceptíveis (ou *Wild Type-WT*) e com susceptibilidade reduzida (ou *Non Wild Type-NWT*) (Joneberg et al., 2003; Kronvall et al., 2003; Smith et al., 2009; Kronvall, Giske & Kahlmeter, 2011).

Atualmente existem apenas três estudos que avaliam susceptibilidade de *Francisella orientalis*, porém, a esses não apresentam o critério interpretativo utilizado, bem como, avaliaram um reduzido número de amostras, o que torna as análises e comparação dos dados inviáveis (Soto et al., 2012; Soto et al., 2016; Ramirez-Paredes et al., 2017). A escassez de dados na literatura evidencia a necessidade de estabelecer *CO_{WT}* para classificar o isolados de *F. orientalis*, permitindo assim, a detecção e monitoramento de amostras com susceptibilidade reduzida ou resistentes ao longo do tempo em regiões acometidas pela franciselose (Minogue et al., 2012; Contreras-Lynch et al., 2017).

O estudo do perfil de susceptibilidade vem de encontro com a necessidade de testar a eficácia terapêutica *in vivo* dos mesmos. Já que no Brasil, assim como nos demais países com produção aquícola, o número de antimicrobianos licenciados é demasiadamente restrito (Smith, 2008; Morrison & Saksida, 2013; Price et al., 2016; Love et al., 2020). Este fator, associado ao uso contínuo e inadvertido dos mesmos à longo prazo, pode levar a ineficácia terapêutica, bem como, o desenvolvimento de patógenos resistentes (Smith, 2008, 2012).

Atualmente, são licenciados para uso na produção nacional a oxitetraciclina (OTC) e o florfenicol (FLO). Soto e colaboradores (2013) verificaram a eficácia terapêutica do FLO *in vivo* no tratamento da franciselose em tilápia do Nilo. O antimicrobiano reduziu a mortalidade, porém não foi capaz de eliminar o microrganismo do hospedeiro. Já a oxitetraciclina é um antibiótico de amplo espectro, que tem como mecanismo de ação a inibição da síntese proteica através do bloqueio reversível à subunidade 30S do ribossomo (Armstrong et al., 2005). Esse composto possui baixo custo e é extensivamente utilizado na tilapicultura mundial, e segundo Favero e colaboradores (2021), é capaz de diminuir a mortalidade pela franciselose, entretanto como o FLO, o tratamento resulta em animais portadores. Apesar disso, esses fármacos vêm sendo utilizados para o tratamento da infecção de *F. orientalis* no país. Nas produções nacionais, falhas terapêuticas têm sido relatadas por técnicos de campo com o uso de florfenicol para o tratamento de franciselose. Já para oxitetraciclina os dados são conflitantes, com algumas

empresas obtendo resultados positivos com a utilização de altas dosagens e outras sem sucesso na terapia (Leal et al., 2018; Favero et al., 2021).

Diante desta problemática, o produtor com o intuito de sanar o problema, pode vir a utilizar antimicrobianos *off-label* (FDA, 2011) oriundos da produção de aves ou suínos, nos quais a antibioticoterapia pode ser administrada através da ração. O uso de fármacos *off-label* pode comprometer a segurança alimentar, uma vez que a droga pode não ter limite máximo de resíduo estabelecido; a eficácia terapêutica pode ser comprometida, pois não há dose, período de tratamento estabelecido para administração em peixes; além do aumento da probabilidade de indução de resistência (FDA, 2011; Henriksson et al., 2018; Okocha et al., 2018).

Alguns países como Estados Unidos e União Européia, possuem critérios estabelecidos por lei de quando empregar antimicrobianos *off-label*. No Brasil, desde de o ano de 2018 existe o Pan-BR Agro (Plano de ação nacional de prevenção e controle da resistência aos antimicrobianos no âmbito da agropecuária) (MAPA, 2018) e que juntamente com a IN n°4 do dia 28 de fevereiro de 2019, acompanha as normas recomendadas pela OIE. De acordo com o *Aquatic Animal Health Code*, em casos onde existem problemas na eficácia dos fármacos legalizados, admite-se o uso fármacos *off-label* sendo responsabilidade do médico veterinário, devido a carência residual para que as concentrações das drogas estejam no limite residual mínimo (OIE, 2021).

A partir da premissa supracitada, uma opção viável seria a enrofloxacina (ENR). Um antimicrobiano pertencente à segunda geração das fluoroquinolonas, e de uso exclusivo veterinário, bem como o florfenicol. Essa droga tem demonstrado eficácia no tratamento de animais terrestres acometidos por infecções de bactérias intracelulares como *Brucella canis* e *Chlamydophila felis* (Trouchon & Lefebvre, 2016). Adicionalmente, apresenta resultados satisfatórios no tratamento de doenças bacterianas em peixes causadas por *A. salmonicida*, *R. salmoninarum*, *P. damsela* subsp. *piscicida* em salmonídeos, *S. iniae* em *sunshine bass*, *A. salmonicida*, *A. sobria* e *A. hydrophila* em carpa (*Cyprinus carpio*; *Carassius auratus gibelio*; *Ctenopharyngodon idella*), *F. psychrophilum* em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (Bowser et al., 1994; Hsu et al., 1994; Stoffregen et al., 1996; Fang et al., 2012; Fan et al., 2017; Yang et al., 2021).

A enrofloxacina ao ser administrada via ração a animais cultivados em água com baixas temperaturas, apresenta ampla e rápida distribuição tecidual, bem como intracelular. Características relacionadas a natureza lipofílica da molécula, facilitam a sua entrada nas

células intestinais e bacterianas, através de difusão passiva (Bowser & Babish, 1991; Stoffregen et al., 1996; Samuelsen, 2006; Kyuchukova et al., 2015; Troughon & Lefebvre, 2016). Adicionalmente, atinge altas concentrações no fígado, rim cranial e baço. apresenta baixas taxas de depleção resultando em um maior tempo de meia-vida, prolongando a ação do antimicrobiano nos tecidos (Kyuchukova et al., 2015; Teles et al., 2016; Wang et al., 2016; Fan et al., 2017).

Como mencionado anteriormente, a antibioticoterapia ainda é a principal medida de controle da franciselose (Soto et al., 2013), uma vez que esta não possui vacina comercial (Rigos & Smith, 2015). Entretanto, na ocorrência de surtos pode não haver tempo para intervenção medicamentosa ou quando esta é realizada tardiamente, os animais já apresentam anorexia, levando a um consumo insuficiente da ração medicada, e pôr consequência, a ineficácia do tratamento. Além disso, uma das principais preocupações atuais é o uso inadequado/exacerbado dessas substâncias na produção animal, propiciando o desenvolvimento de microrganismos resistentes, além de acarretar um aumento no custo produtivo, diminuição da qualidade do produto final (Smith, 2008; Okocha et al., 2018; Sheng, 2017; Smith, 2017).

Nesse contexto, o desenvolvimento de vacinas torna-se uma medida estratégica para o controle da franciselose. Esse tipo de produto imunoprolático tem sido utilizado durante décadas na piscicultura de espécies marinhas, pois reduz de maneira eficiente a ocorrência de enfermidades infecciosas, diminui o custo produtivo em consequência da diminuição da mortalidade, bem como, o emprego de antimicrobianos (Smith, 2008; Reimschuessel et al., 2013; Tufa, 2015; Okocha et al., 2018; Lulijwa et al., 2019; Rigos et al., 2021).

As vacinas ofertadas para o mercado aquícola, em sua grande maioria, são compostas por células bacterianas completas inativadas, associadas a adjuvante oleoso, sendo a principal via de administração a intraperitoneal (IP) (Børgwald & Dalmo, 2012; Roberts, 2012; Tafalla et al., 2013, 2014; Dalmo et al., 2016). Até o presente momento, existem três vacinas experimentais para controle da franciselose na literatura com a composição acima mencionada e administrada via IP que apresentam resultados promissores com altas taxas de porcentagem relativa de sobrevivência (PRS) (variando de 65,9% a 100%) (Ramirez-Paredes et al., 2019; Shahin et al., 2019; Pulpipat et al., 2020) reiterando que a resposta imune humoral através da produção de IgM é capaz de mitigar a infecção.

Embora via IP seja comumente empregada na vacinação, sua utilização é, contraindicada para peixes muito jovens e de baixo peso (< 15g), não só pela mão-de-obra e

infraestrutura necessária, mas também pela ocorrência de efeitos adversos como reação inflamatória exacerbada pela presença do adjuvante, imunodepressão, tornando inapropriado o uso destas vacinas a campo (Yu et al., 2018; Adams & Subasinghe, 2021).

Vias alternativas de administração como a imersão, que têm sido utilizadas com o intuito de vacinar animais jovens (larvas e alevinos) em grande escala, por diminuir o custo e a demanda de mão-de-obra, propiciar a realização de reforços vacinais ao longo do ciclo de produção e minimizar o estresse do processo de vacinação, além de estimularem a resposta imune de mucosa e sistêmica (Rombout & Kiron, 2014; Munang'andu et al., 2015; Sudheesh e Cain, 2017; Munang'andu e Evensen, 2018; Bøgwald e Dalmo, 2019).

As vacinas administradas via imersão, assim como as IP, podem ser constituídas de patógenos atenuados ou inativados. As vacinas atenuadas utilizam-se de cepas menos virulentas ou de virulência reduzida (por processos químicos ou manipulação genética) (Dadar et al., 2017; Sudheesh & Cain, 2017; Ma et al., 2019; Mohd-Aris et al., 2019;). Estas por serem capazes de entrar/multiplicar na célula do hospedeiro, mimetizando uma infecção, por esta razão são mais imunogênicas e induzem resposta imune humoral e celular, resultando em uma memória imune de maior duração (Bondad-Reantaso et al., 2005; Sudhagar et al., 2016; Dadar et al., 2017; Ma et al., 2019; Mohd-Aris et al., 2019).

Comercialmente, vacinas atenuadas por imersão estão disponíveis para *F. columnare* e *ictaluri* destinadas a bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) licenciada para utilização nos EUA (Shoemaker et al., 2011; Dadar et al., 2017; Ma et al., 2019), para herpesvírus da carpa koi e viremia primaveril da carpa (*Rhabdovirus carpio*) ambas em carpa comum (*Cyprinus carpio*) licenciadas para uso em Israel e China, respectivamente (Dhar et al., 2014; Dadar et al., 2017; Ma et al., 2019). No âmbito experimental, Soto e colaboradores (2011) desenvolveram uma vacina para o controle da franciselose em tilápia. Essa é composta pelo microrganismo atenuado, através da deleção do gene *iglC* e administrada via imersão, mostrando-se eficiente na profilaxia da enfermidade por induzir resposta imune humoral e celular.

Apesar da comprovada eficácia, as vacinas atenuadas ainda são consideradas de alto risco por diversos fatores, como a possibilidade de reversão de virulência, virulência residual, podem gerar infecções subclínicas em hospedeiros imunocomprometidos e risco de introdução de amostras patogênicas para espécies de vida livre vizinhas ao cultivo. Por tais razões existe uma grande dificuldade e dispêndio financeiro que acabam gerando entraves no licenciamento

destes produtos (Jorge & Dellagostin, 2017; Ma et al., 2019; Mohd-Aris et al., 2019; Adams & Subasinghe, 2021).

Apesar da comprovada eficácia, as vacinas atenuadas ainda são consideradas de alto risco por diversos fatores, como a possibilidade de reversão de virulência, virulência residual, podem gerar infecções subclínicas em hospedeiros imunocomprometidos e risco de introdução de amostras patogênicas para espécies de vida livre vizinhas ao cultivo. Por tais razões existe uma grande dificuldade e dispêndio financeiro que acabam gerando entraves no licenciamento destes produtos (Jorge & Dellagostin, 2017; Ma et al., 2019; Mohd-Aris et al., 2019; Adams & Subasinghe, 2021).

Já as vacinas por imersão inativadas podem ser compostas de células completas de patógenos mortos por processos químicos (formalina) ou físicos (calor) (Munang'andu et al., 2014; Mohd-Aris et al., 2019; Sudheesh & Cain, 2017), proteínas imunogênicas no caso de vacina recombinante (Shahin et al., 2020). Induzem resposta imune humoral de mucosa (pele, brânquias, intestino, fossas nasais) e sérica que podem durar até três meses e postergar caso o reforço vacinal seja efetuado (Medina & Guzmán, 2000; Rombout & Kiron, 2014; Munang'andu et al., 2015; Soto et al., 2015; Sudheesh & Cain, 2017; Adams, 2019; Børgwald & Dalmo, 2019; Somamoto & Nakanishi, 2020).

Quando comparadas as vacinas via intraperitoneal, as administradas via imersão geram uma resposta imune induzida menos intensa e menos duradoura. Com o intuito de induzir uma resposta imunológica mais eficiente e duradoura, utilizam-se adjuvantes. Esses ao serem administrados juntamente com a suspensão bacteriana inativada, são capazes aumentar a imunogenicidade, bem como intensificar a resposta humoral e induzir a resposta imune celular (Børgwald & Dalmo, 2012; Tafalla et al., 2013, 2014; Dalmo et al., 2016;).

Estudos para o desenvolvimento de vacinas via imersão para peixes têm sido realizados com o adjuvante MONTANIDE® IMS 1312 VG (Seppic, França). Esse adjuvante é composto de nanopartículas ($\pm 100\text{nm}$) dispersas em água, associadas a um componente imunoestimulador (Aucouturier et al., 2001). Por possuir uma fase aquosa, é indicada para vacinas de imersão, apresentando resultados promissores no controle imunoprolático de infecções bacterianas por *Yersinia ruckeri* (Skov et al., 2018; Soltani et al., 2014); *Flavobacterium psychrophilum* em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (Hoare et al., 2017); vírus da septicemia hemorrágica em *olive flounder* (*Paralichthys olivaceus*) (Hwang et al., 2017); vírus da necrose pancreática em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (Monfared et al., 2018); vírus da encefalopatia e

retinopatia em esturjão-estrelado (*Acipenser stellatus*) (Afsharipour et al., 2021); *Lactococcus garvieae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus iniae* e *Enterococcus faecalis* em tilápia do Nilo (Abu-Elala et al., 2019).

Uma formulação vacinal que possua a suspensão bacteriana inativada e MONTANIDE® IMS 1312 VG, poderia ser uma alternativa potencialmente eficaz no controle da franciselose, na qual a resposta imune gerada seja eficiente mediante um patógeno intracelular, assim como as vacinas de imersão para *Yersinia ruckeri* e *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* em associação com *Vibrio anguillarum*, (Bøgwald & Dalmo, 2019).

HIPÓTESES

- O teste de disco difusão é uma metodologia aplicável para determinar a susceptibilidade de isolados de *Francisella orientalis* a diferentes antimicrobianos;
- Antimicrobianos das classes das quinolonas e tetraciclinas são efetivos no tratamento da franciselose em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*);
- A vacina inativada de célula completa administrada via imersão confere resposta imune humoral protetiva mediante a infecção por *Francisella orientalis* em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Os objetivos do presente trabalho foram padronizar uma metodologia de discos de difusão para determinação do perfil de susceptibilidade de *Francisella orientalis* a antimicrobianos, bem como, avaliar a eficácia terapêutica da enrofloxacina e oxitetraciclina para tratamento da franciselose e desenvolver vacina inativada de célula completa para imunoprofilaxia da doença em alevinos e juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronização da metodologia de discos de difusão de Kirby & Bauer para as estirpes de *Francisella orientalis* através da determinação do meio de cultivo e período de incubação mais apropriados;
- Avaliar os perfis de susceptibilidade de amostras Brasileiras de *Francisella orientalis* previamente isoladas de surtos ocorridos em cultivos de tilápia do Nilo para florfenicol, oxitetraciclina, ampicilina, amoxicilina, eritromicina, norfloxacina, doxiciclina, enrofloxacina e trimetoprim-sulfametoxazol, bem como determinar os valores locais de ponto de corte epidemiológico através da metodologia de disco difusão;
- Determinar a eficácia terapêutica da oxitetraciclina e enrofloxacina no tratamento da infecção por *Francisella orientalis* em juvenis de tilápia do Nilo;
- Desenvolver vacina de células completas inativada para administração por imersão, para imunoprofilaxia da infecção por *Francisella orientalis* em alevinos e juvenis de tilápia do Nilo.

2. CAPÍTULO 1: Padronização de antibiograma, pontos de corte epidemiológicos e determinação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos para isolados Brasileiros de *Francisella orientalis*

Manuscrito original aceito pelo periódico Aquaculture

2.1. Introdução

A franciselose é uma doença sistêmica granulomatosa causada por cocobacilos Gram-negativos pertencentes à espécie *Francisella orientalis* (FO), que acomete peixes de águas tropicais. A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é o peixe cultivado mais afetado (Soto et al., 2009; Birkbeck et al., 2011; Leal et al., 2014; Maekawa et al., 2021). Esta é considerada a terceira espécie de peixe mais cultivada no mundo (FAO, 2020) e a mais cultivada no Brasil, sendo responsável por 62,3% da produção aquícola total (IBGE, 2021).

O gênero *Francisella* é bem estudado, especialmente a subespécie *Francisella tularensis*, o agente causador da tularemia devido ao interesse relacionado à saúde humana e biossegurança (Oyston et al., 2004; Brudal et al., 2014; Caspar & Maurin, 2017). Outras espécies de importância veterinária, assim como a FO ainda são pouco estudadas. *F. orientalis* já foi detectada nos continentes americanos, incluindo Estados Unidos (Mauel et al., 2005), Costa Rica (Soto et al., 2009), Colômbia (Iregui et al., 2011), Brasil (Leal et al., 2014), México (Ortega et al., 2016), Honduras (Soto et al., 2019) e; bem como no asiático, incluindo Japão (Ottem et al., 2009), Tailândia (Nguyen et al., 2015), China (Qiang et al., 2015), e Europa, no Reino Unido (Jeffery et al., 2010).

Embora haja um grande impacto econômico decorrente das altas taxas de mortalidade nas tilapiculturas pela franciselose, até o presente momento, não existem vacinas comerciais (Soto et al., 2009; Leal et al., 2014). O método de eleição para controle da enfermidade é a administração de antimicrobianos por via oral através da ração, sendo o florfenicol (FLO) o agente terapêutico comumente utilizado (Soto et al., 2013). No entanto, por tratar-se de um patógeno emergente, uma conduta necessária seria a coleta de amostras durante os surtos ocorridos, para analisar o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos, com o objetivo de garantir sua utilização de maneira eficiente e racional. Os relatos a respeito da susceptibilidade a antimicrobianos da *F. orientalis* são escassos. Além disso, esses apresentam um número limitado de isolados e não possuem critérios de interpretação para os dados obtidos, tornando a

análise e a comparação dos mesmos, impraticável (Soto *et al.*, 2010b ; Ramírez-Paredes *et al.*, 2017; Soto *et al.*, 2016).

Diferentes metodologias têm sido empregadas para determinar a susceptibilidade aos antimicrobianos, sendo o método de discos de difusão (Kirby-Bauer) um dos mais utilizados (Barker & Kehoe, 1995; Miller *et al.*, 2003; Smith & O’Grady, 2006; Smith *et al.*, 2009; Ge *et al.*, 2019). Essa técnica apresenta repetibilidade, precisão, sendo aplicável na rotina laboratorial, devido à simples execução e baixo custo (Reller *et al.*, 2009; Patel, 2012). No entanto, para a implementação de testes de suscetibilidade, organizações globais de saúde como a OIE (*World Organisation for Animal Health*) recomendam que os protocolos implementados sejam padronizados por uma organizações reconhecidas mundialmente (CLSI- *Clinical and Laboratory Standards Institute*, EUA; EUCAST- *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* - UE), e que os critérios interpretativos devem ser obrigatórios (OIE, 2021).

O CLSI atualmente tem o único manual para teste de disco de difusão de microrganismos de animais aquáticos (VET03 - *Methods for Antimicrobial Broth Dilution and Disk Diffusion Susceptibility Testing of Bacteria Isolated From Aquatic Animals; Approved Guideline*) (CLSI, 2006, 2020), que possui os critérios metodológicos a serem seguidos para realizar o teste de susceptibilidade a antimicrobianos (TSA). No entanto, ainda não existe informações suficientes para a completa padronização dos protocolos para os patógenos de peixe, incluindo a FO.

Importante ressaltar que o CLSI até então, não é empregável para a *F. orientalis*, uma vez que as informações básicas a respeito das condições de cultivo do patógeno ainda não se apresentam disponíveis. Para que este seja aplicável, algumas lacunas que devem ser preenchidas são: a implementação de protocolos para microrganismos fastidiosos e a determinação de valores de ponto de corte epidemiológicos (*Epidemiological cutoff value- ECV* ou CO_{WT}) que até agora só foram implementados para alguns antimicrobianos e patógenos, como *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* (CLSI, 2014). O uso de *ECV* pode superar os desafios interpretativos dos testes de susceptibilidade para microrganismos aquáticos (Smith, 2008; Smith *et al.*, 2013; Smith, 2019a). Nesse caso, os isolados não são classificados como susceptíveis, intermediários ou resistentes, mas como *Wild Type (WT)* e *Non-Wild Type (NWT)*, que apresentam susceptibilidade total e susceptibilidade antimicrobiana reduzida, respectivamente (Silley, 2012; OIE, 2021). Para microrganismos exigentes, recomenda-se que

as condições dos testes de susceptibilidade a antimicrobianos sejam baseadas em protocolos padronizados, e esses devem ser adaptados às necessidades de crescimento do patógeno para a realização dos mesmos (CLSI, 2006; OIE, 2021).

Diante do exposto, os objetivos deste estudo foram: padronizar um teste de disco de difusão específico para a avaliação da susceptibilidade antimicrobiana de isolados de *Francisella orientalis*; calcular valores de corte epidemiológicos ($ECVs/CO_{WT}$) para diferentes antimicrobianos; e avaliar o perfil de susceptibilidade de amostras isoladas de surtos em cultivos de tilápia no Brasil de 2012 a 2019.

2.2. Material e Métodos

2.2.1. Amostras bacterianas

Para a realização do teste de susceptibilidade a antimicrobianos por disco de difusão foram selecionadas oitenta e nove amostras de *Francisella orientalis* do banco de bactérias do Laboratório AQUAVET e Laboratório de Bacteriologia de Rotina (pertencentes a Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais/UFMG), oriundos de surtos de franciselose ocorridos em trinta e quatro tilapiculturas de seis diferentes estados brasileiros (Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo, Bahia, Pernambuco e Santa Catarina) no período de 2012-2019 (Apêndice 1). Estes foram identificados através de reação de polimerase em cadeia quantitativa (qPCR) espécie-específica para *F. orientalis* (Soto et al., 2010). As amostras *Escherichia coli* ATCC® 25922 e *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC® 33658 foram utilizadas como controle de qualidade para os ensaios (Miller et al., 2003; CLSI, 2006). Todas as amostras supracitadas foram mantidas a -80°C até utilização.

2.2.2. Antimicrobianos

Os antimicrobianos selecionados para o teste de disco difusão foram baseados nos antimicrobianos mais utilizados na aquicultura mundial (Acar et al., 2012): florfenicol (Oxoid, FFC/FLO, 30µg), oxitetraciclina (Oxoid, OT/OTC, 30µg), eritromicina (Oxoid, ER/ERI, 15µg), ampicilina (Oxoid, AMP, 10µg), enrofloxacina (Oxoid, ENO/ENR, 5µg), norfloxacina (Oxoid, NOR, 10µg), amoxicilina (Oxoid, AMO, 10µg), doxiciclina (Oxoid, DOX, 5µg) e trimetropim-sulfametoxazol (1:19) (Oxoid, SUT, 25µg). As concentrações de todos os fármacos presentes nos discos deste experimento, estão de acordo com manual do CLSI- VET03-A (CLSI, 2006, 2020).

2.2.3. Avaliação do meio de cultivo e período de incubação

Para a padronização e execução do ensaio de discos de difusão dos isolados de *F. orientalis* foram seguidas as diretrizes do manual “*Methods for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing of Bacteria Isolated from Aquatic Animals; Approved Guideline- VET03-A*” do CLSI (CLSI, 2006), com as modificações necessárias para o cultivo da espécie supracitada (OIE, 2021). Por tratar-se de um microrganismo fastidioso, a FO não é capaz de crescer no ágar Mueller-Hinton (MH) recomendado para realização dos testes, logo, neste estudo foram testados dois meios de cultura para realização dos teste: ágar cisteína coração modificado (CHAM) suplementado com 2% de hemoglobina bovina (BD, EUA) previamente utilizado em testes de susceptibilidade a antimicrobianos para *Francisella tularensis* (Tomaso et al., 2005; Kreizinger et al., 2013; Loughman et al., 2016) e FO (Soto et al., 2012); e ágar Mueller-Hinton II cátion ajustado modificado (BD, EUA) (MHAM), suplementado com 2% de suplemento Vx (Laborclin, Brasil) e 0,1% de glicose. Ambos os meios mencionados foram testados para os níveis de timidina/timina de acordo com o manual VET03-A, onde o antibiograma foi realizado com a amostra de referência *Enterococcus faecalis* ATCC® 33186 para associação de SUT, sendo incubadas a 37°C por 24 horas. O meio de cultivo torna-se elegível para o teste com SUT, apenas se o halo de inibição formado for ≥ 20 mm (CLSI, 2006).

Dez amostras (FNO-12, FNO-22, FNO-25, FNO-30, FNO-55, FNO-65, FNO-111, FNO-135 e FNO-222; aproximadamente 10% do total) foram selecionadas para avaliação dos meios de cultivo e período de incubação. As amostras supracitadas foram descongeladas, plaqueadas em CHAM e incubadas a 28°C por 72 hrs. Posteriormente, três a cinco colônias foram selecionadas para preparação de uma suspensão bacteriana em solução salina estéril (0,85%) com densidade ótica (DO_{625}) variando entre 0,12-0,13 (correspondente a escala de 0,5 de McFarland), equivalente a concentração de 10^8 UFC/mL. As placas de Petri contendo os ágares CHAM e MHAM foram inoculadas com a suspensão bacteriana, sendo essa distribuída por espalhamento em toda a superfície do meio de cultura com a utilização de suabe estéril. Este processo foi realizado por três vezes e ao término de cada etapa a placa de Petri foi rotacionada a 60° para garantir a dispersão homogênea da suspensão (CLSI, 2006). Após a secagem, dois ou três discos de antimicrobianos foram dispostos de maneira equidistante por placa, com o intuito de impedir/minimizar a sobreposição dos halos de inibição.

Essas foram incubadas a 28°C. As leituras realizadas com 24, 48, 72 e 96 hrs pós-inoculação (PI) a fim de determinar o período de incubação mais adequado para mensuração dos halos de inibição formados (Miller et al., 2003; Smith & Kronvall, 2015; Smith et al., 2018).

As amostras *Escherichia coli* ATCC® 25922 e *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC® 33658 foram utilizadas como controle de qualidade durante os testes. Essas foram plaqueadas em ágar MHAM e CHAM para avaliação e posterior comparação com os valores de referência estipulados para FFC, OT, ER, AMP, SUT e ENR pelo manual VET03 (CLSI, 2006). Os testes destas amostras seguiram a mesma metodologia supracitada, porém a mensuração dos halos de inibição foi realizada com 24 hrs pós-inoculação.

2.2.4. Ensaio de disco de difusão

As amostras de FO foram descongeladas, plaqueadas em CHAM e incubadas a 28°C por 72 hrs. Posteriormente, três a cinco colônias foram selecionadas para preparação de uma suspensão bacteriana em solução salina estéril (0,85%) com densidade ótica (DO_{625}) variando entre 0,12-0,13 (correspondente a escala de 0,5 de McFarland), equivalente a concentração de 10^8 UFC/mL. As placas de Petri contendo CHAM foram inoculadas com a suspensão bacteriana, sendo essa distribuída por espalhamento em toda a superfície do meio de cultura com o uso de suabe estéril. Este processo foi realizado por três vezes e ao término de cada etapa a placa de Petri foi rotacionada a 60° para garantir a dispersão homogênea da suspensão (CLSI, 2006). Após a secagem, três discos de antimicrobianos foram dispostos de maneira equidistante por placa, com o intuito de impedir/minimizar a sobreposição dos halos de inibição. Essas foram incubadas a 28°C. As leituras realizadas com 24 e 48, hrs pós-inoculação. As amostras de controle de qualidade são as mesmas do item 3.2.1. Todos os ensaios deste estudo foram realizados em triplicata e os halos de inibição mensurados com paquímetro digital (Merck, Alemanha).

2.2.5. Análise dos dados e determinação do ponto de corte epidemiológico

A determinação dos pontos de corte epidemiológicos (ECV/CO_{WT}) para os antimicrobianos testados foi determinada através da metodologia de *Normalized Resistance Interpretation (NRI)* (Goran Kronvall, 2003; Göran Kronvall & Smith, 2016). O *NRI* foi empregado com o consentimento do titular da patente (Bioscand AB, TABY, Suécia; Patente US nº 7.465.559 e Patente Europeia nº 1383913). Para a análise do *NRI*, utilizou-se uma planilha automática do Excel, gratuita, fornecida pelo site <http://www.bioscand.se/nri/> (Cálculos automáticos para histogramas de zona de disco na versão padrão).

A partir do valor de CO_{WT} calculado para cada antimicrobiano, os isolados foram classificados como *Wild-Type (WT)* e *Non-Wild Type (NWT)* quando apresentam completa ou reduzida susceptibilidade, respectivamente (OIE, 2021; P. Smith, 2017; P Smith et al., 2016).

2.3. Resultados

2.3.1. Padronização do meio de cultivo e período de incubação

Nos testes de controle de qualidade, o CHAM apresentou níveis elevados de timina/timidina, com zona de inibição de 16 mm para *Enterococcus faecalis* ATCC® 33186, não podendo ser utilizado para teste de susceptibilidade com a associação antimicrobiana SUT. Já o ágar MHAM apresentou um halo de inibição de 24 mm, valor pertencente a da faixa normal (≥ 20 mm) (CLSI, 2006), tornando-o adequado para análise.

Durante a padronização, as dez amostras de *F. orientalis* apresentaram crescimento muito lento e com pouca massa bacteriana nas placas MHAM. As amostras não apresentaram crescimento nas primeiras 48 hrs de incubação e somente após 72 hrs foi verificado um fraco crescimento bacteriano (Fig. 1.1). Foram obtidos halos de inibição superiores a 40 mm após 96 hrs de incubação para todos os antimicrobianos testados.

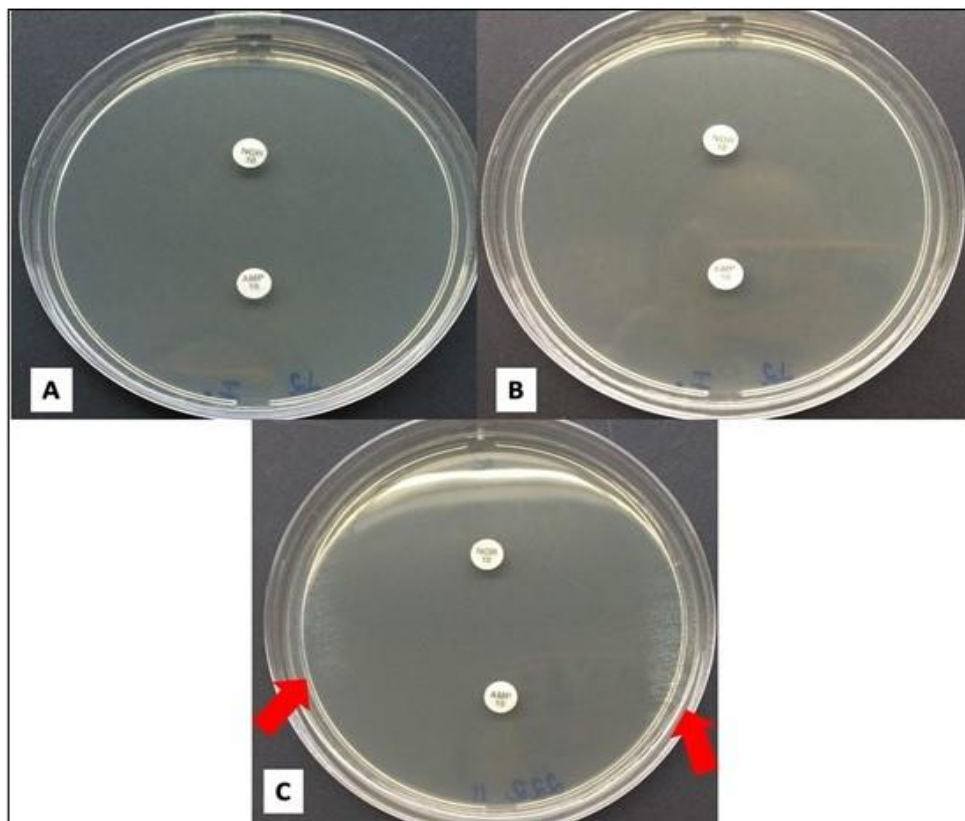


Figura 1.1:Ágar MHAM inoculado com amostra de FO em diferentes períodos de incubação: A- 24 horas; B- 48 horas; e C- 96 horas, quando o crescimento bacteriano pode ser verificado (setas vermelhas).

O meio MHAM não propiciou o crescimento necessário para mensurar o halo de inibição até 72 horas. O período de incubação prolongado, devido ao lento crescimento da *F. orientalis* no meio supracitado, pode afetar o desempenho do teste de disco difusão e, conseqüentemente, a precisão dos dados obtidos (Miranda et al., 2016; Ngo et al., 2018; Smith et al., 2018). Além disso, zonas de inibição muito maiores foram observadas em CHAM em comparação com os mesmos antimicrobianos. Logo, o MHAM não se mostrou um meio adequado para o ensaio de disco difusão para isolados brasileiros de FO.

Para os dez isolados, a mensuração dos halos de inibição no meio CHAM após um período de 24 hrs não pôde ser realizada. Embora o crescimento bacteriano fosse visível, as zonas de inibição formadas não foram claramente delimitadas, tornando as medições imprecisas (Fig. 1.2A). Estas quando efetuadas às 48 hrs caracterizaram-se por uma melhor definição e

regularidade nos halos, permitindo uma mensuração mais precisa (Fig. 1.2B). Foi observado também a diminuição dos valores dos halos obtidos após 72 e 96 hrs em relação aos demais períodos. Adicionalmente, após 72 hrs de incubação, os antimicrobianos ampicilina e amoxicilina apresentaram crescimento bacteriano que sobrepunha o halo de inibição previamente formado, resultando em falsa indicação de resistência (Fig. 1.2C e 1.2D). Portanto, um período de incubação de 48 hrs mostrou-se ideal para o teste de disco difusão para isolados de *F. orientalis* em CHAM.

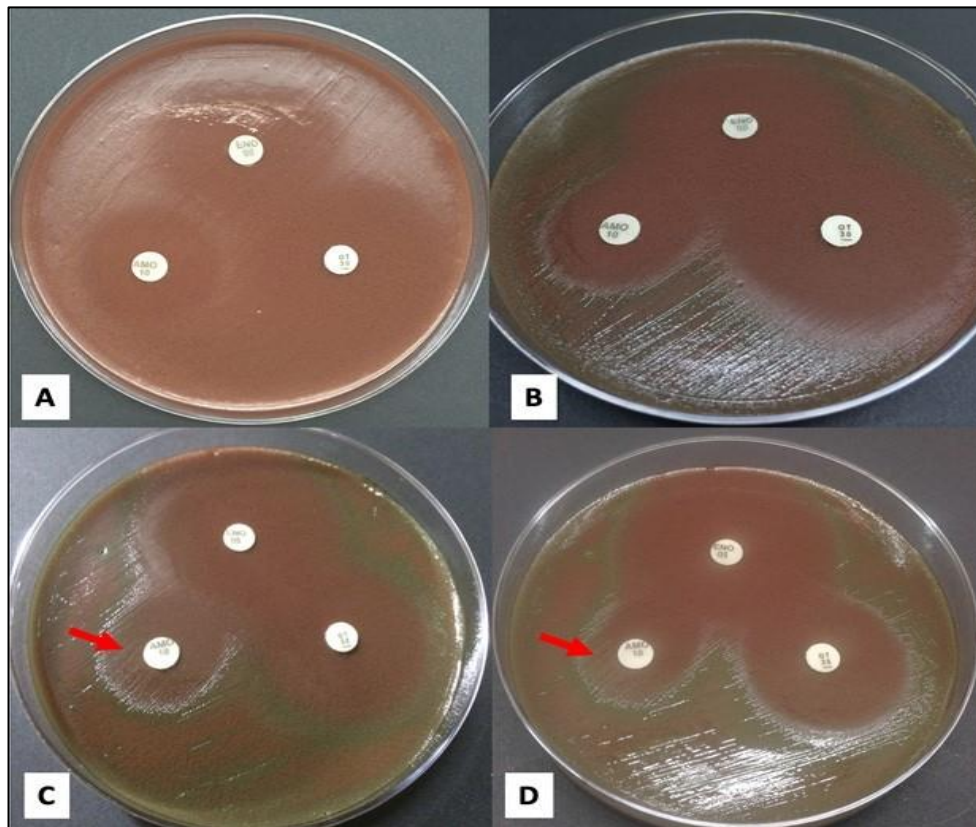


Figura 1.2: Ágar CHAM inoculado com amostra FNO-12 em diferentes períodos de incubação: A- 24 horas; B- 48 horas; C- 72 horas; e D- 96 horas. Para a amoxicilina, evidente diminuição do halo de inibição formado e aumento na área de crescimento bacteriano previamente.

2.3.2. Controle de qualidade em CHAM

As amostras de referência testadas para controle de qualidade nos dois meios de cultura anteriormente mencionados e incubados a 28 °C por 24 hrs, apresentaram os resultados nas seguintes tabelas: *E. coli* ATCC® 25922 (Tab. 1.1) e *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC® 33658 (Tab. 1.2). Os resultados para as amostras de referência obtidas no CHAM estavam dentro dos intervalos aceitáveis estabelecidos pelo CLSI (CLSI, 2020) para testes realizados usando MH.

Tabela 1.1: Resultados obtidos da *E. coli* ATCC® 2599 nos ágaros MH e CHAM, incubadas 28°C por 24hrs.

<i>E. coli</i> ATCC 25922					
Antimicrobiano	MH		CHAM		CLSI (MH)
	Variação (mm)	Média (mm)	Variação (mm)	Média (mm)	Variação (mm)
Ampicilina	15-18	17	16-20	18	14-23
Eritromicina	9-12	11	0	0	10-15
Florfenicol	20-23	22	18-22	20	20-30
Oxitetraciclina	22-28	24	21-24	22	23-29

Tabela 1.2: Resultados obtidos da *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC® 33658 nos ágaros MH.

<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> ATCC 33658					
Antimicrobiano	MH		CHAM		CLSI (MH)
	Variação (mm)	Média (mm)	Variação (mm)	Média (mm)	Variação (mm)
Ampicilina	33-34	33	30-32	31	33-41
Enrofloxacina	35-38	36	28-30	30	35-45
Eritromicina	21-22	21	15-16	16	21-29
Florfenicol	33-35	34	30-31	30	33-41
Oxitetraciclina	30-33	31	26-30	28	28-34

2.3.3. Ponto de corte epidemiológico e perfil de susceptibilidade

O CO_{WT} foi determinado pelo método *NRI* de acordo com Kronvall (2003) para os oito antimicrobianos testados nos oitenta e nove isolados de FO, bem como suas classificações *WT* ou *NWT* (Tab. 1.3). Todas as distribuições dos halos de inibição apresentaram um único pico modal dominante. Para cada agente antimicrobiano, esses grupos modais foram considerados representativos das observações para os isolados *WT*. O desvio padrão observado nestes grupos modais de *WT* putativos estavam todos dentro dos limites para os dados que foram propostos para o meio MH, a 28 °C. Portanto, os CO_{WT} determinados foram provisoriamente aceitos como válidos.

Tabela 1.3: Determinação do CO_{WT} dos oito antimicrobianos para FO, variação dos halos obtidos, média e desvio padrão (DP) dos mesmos e classificação dos isolados.

Isolados <i>F. orientalis</i>									
Antimicrobiano	Variação (mm)	Média e DP	CO_{WT} (mm)	WT		NWT		Total	
				n	%	n	%	N	%
Florfenicol	22 - 31	26,22 ± 2,37	$CO_{wt} \geq 17$	89	100	--	--	89	100
Eritromicina	20 - 26	22,97 ± 1,89	$CO_{wt} \geq 19$	89	100	--	--	89	100
Oxitetraciclina	30 - 36	32,60 ± 1,89	$CO_{wt} \geq 26$	89	100	--	--	89	100
Doxiciclina	24 - 31	27,20 ± 2,14	$CO_{wt} \geq 20$	89	100	--	--	89	100
Ampicilina	21 - 29	24,33 ± 2,16	$CO_{wt} \geq 16$	86	96.7	3	3.3	89	100
Amoxicilina	20 - 27	26,13 ± 2,09	$CO_{wt} \geq 16$	86	96.7	3	3.3	89	100
Enrofloxacina	33 - 40	39,79 ± 2,08	$CO_{wt} \geq 34$	86	96.7	3	3.3	89	100
Norfloxacina	32 - 40	36,73 ± 2,34	$CO_{wt} \geq 32$	86	96.7	3	3.3	89	100

O CO_{WT} categorizou todos os 89 isolados *F. orientalis* (100%) considerados *WT* para florfenicol, oxitetraciclina, eritromicina e doxiciclina, e 86 isolados (96,7%) foram considerados *WT* para amoxicilina, ampicilina, enrofloxacina e norfloxacina. Três isolados FNO-92, FNO-93 e FNO-94 (3,3%) foram categorizados como *NWT* para amoxicilina, ampicilina, enrofloxacina e norfloxacina, sem formação de halos de inibição. Além disso, salienta-se que a análise do *NRI* mostra que a distribuição dos 89 isolados de FO tem uma distribuição unimodal para todos os antimicrobianos testados (Fig. 1.3 e 1.4).

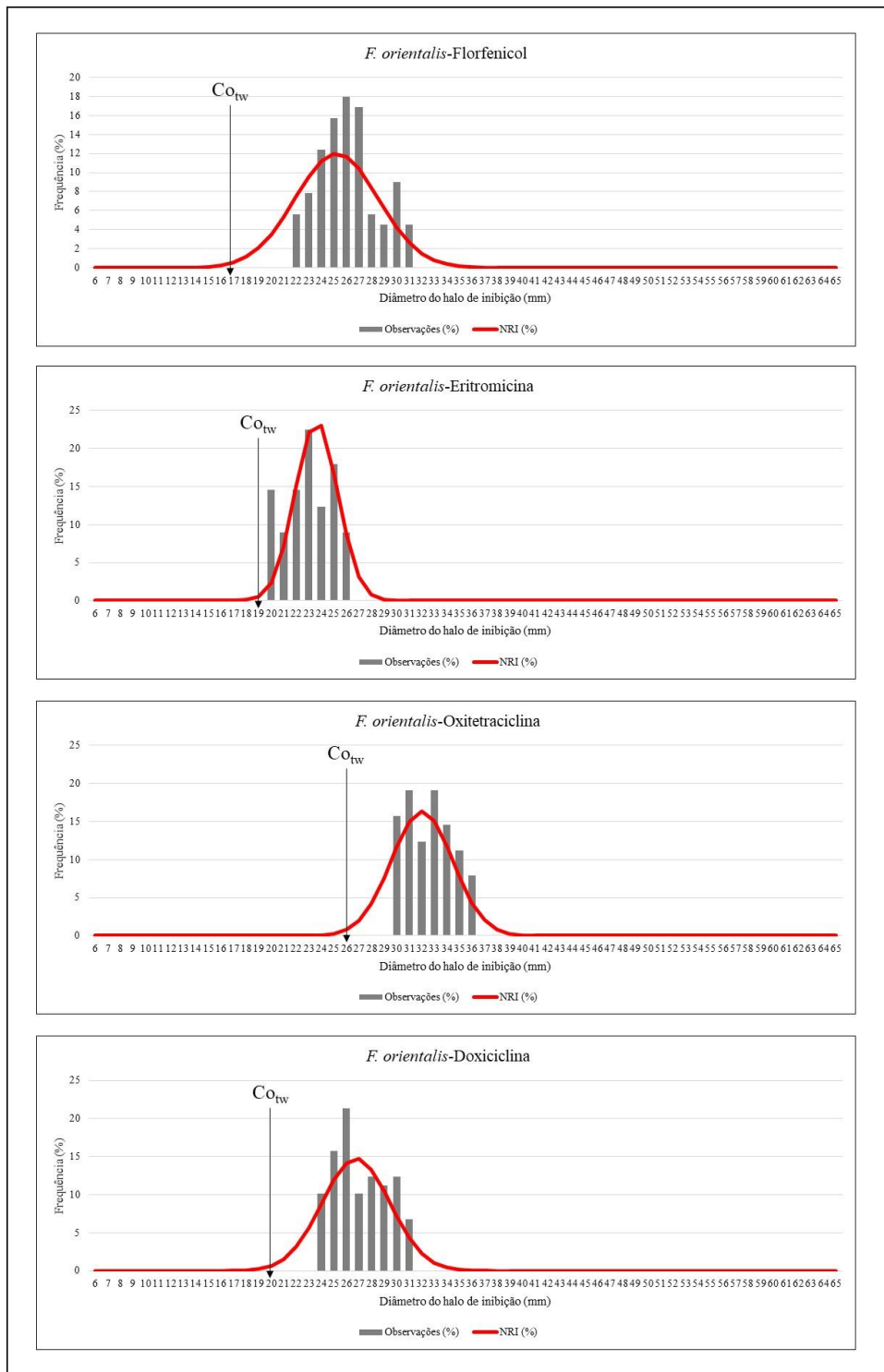


Figura 1.3: Distribuição das zonas de inibição dos antimicrobianos, florfenicol, eritromicina, oxitetraciclina e doxiciclina para os 89 isolados de FO testados.

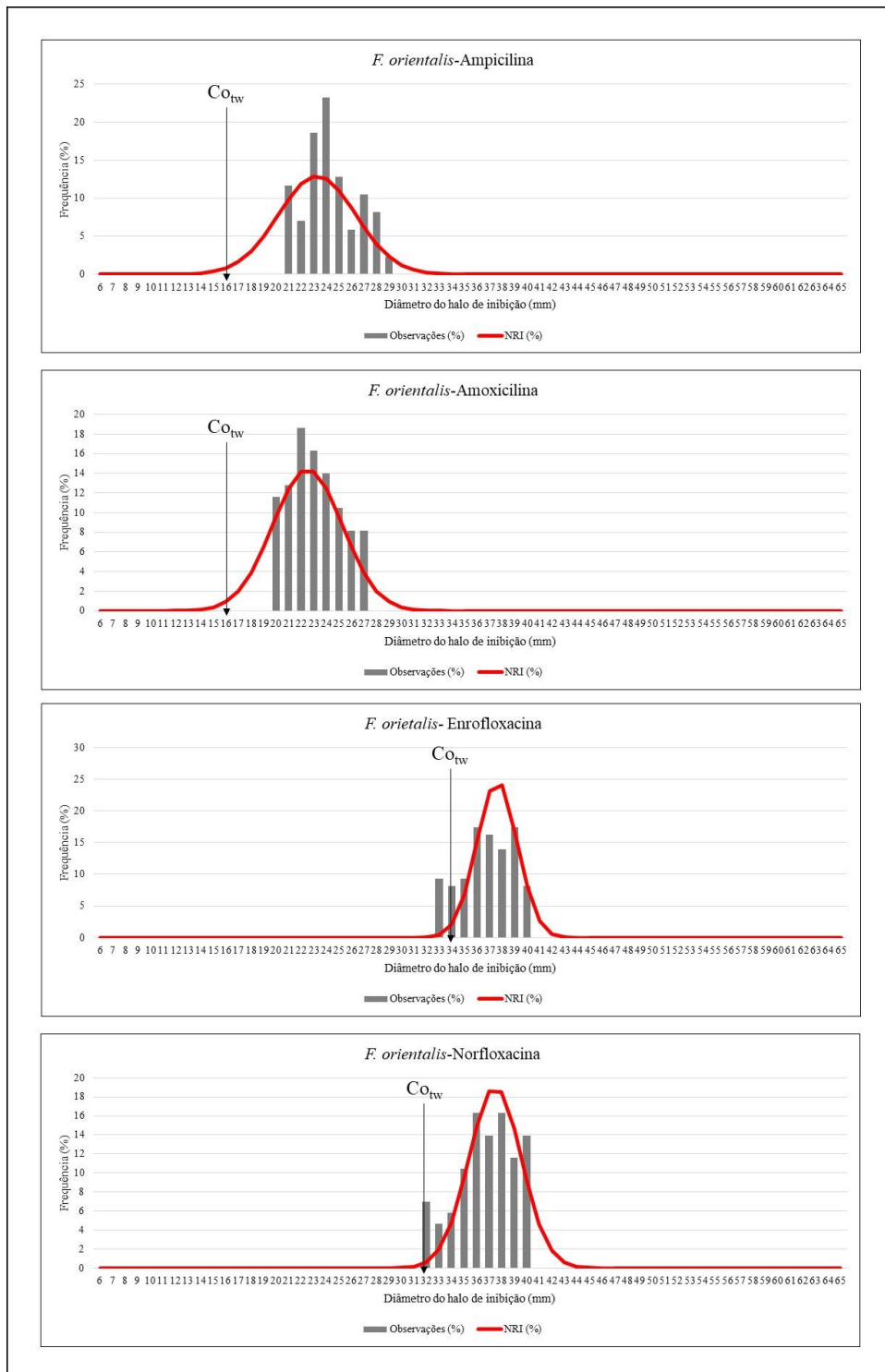


Figura 1.4: Distribuição das zonas de inibição dos antimicrobianos, ampicilina, amoxicilina, enrofloxacin e norfloxacin para os 89 isolados de FO testados.

2.4. Discussão

A franciselose é uma doença emergente que vem afetando a tilapicultura mundial e é responsável por altas taxas de mortalidade acarretando grande prejuízo econômico (Leal et al., 2014; Leal et al., 2018; Ramírez-Paredes et al., 2017). Existem pesquisas na literatura para o desenvolvimento de imunoprofiláticos (Soto et al., 2011; Ramirez-Paredes et al., 2019), porém atualmente não há nenhum produto comercial. Logo, a medida empregada para o controle no caso de surtos é a antibioticoterapia (Soto et al., 2013; Rigos & Smith, 2015).

Para um uso mais eficiente e adequado da antibioticoterapia, é necessário conhecer o perfil de susceptibilidade dos isolados circulantes de *Francisella orientalis* e, se possível, compará-los com os parâmetros existentes. No entanto, em razão do diminuto número de casos de *F. orientalis* nos demais países afetados, tais valores ainda não foram estabelecidos. Além disso, as diretrizes internacionais para testes de susceptibilidade antimicrobiana, como a segunda edição do manual VET03 do CLSI, não fornecem protocolos padrões para realização dos mesmos com a FO, bem como os critérios interpretativos para os resultados gerados. Desta forma, a padronização dos protocolos de TSA para este microrganismo é uma questão de grande importância.

Com a adoção de critérios interpretativos (como *NRI*) associados a metodologia de execução padronizada para que gerem dados acurados e confiáveis (Kronvall, 2003; Smith, 2008, 2009), o teste de disco de difusão tornou-se uma alternativa de baixo custo, de fácil execução acarretando repetibilidade, capaz de ser utilizado para um grande número de amostras bem como de vários antimicrobianos de maneira simultânea (Joneberg et al., 2003; OIE, 2021; Pete Smith, 2006). Esse método já vem sendo o teste de susceptibilidade mais rotineiramente usado por laboratórios que recebem amostras relacionadas a organismos aquáticos (Miller et al., 2003; Smith, 2007; Smith et al., 2009).

Com o objetivo de viabilizar o teste de disco difusão para isolados de FO, a metodologia de realização do teste foi padronizada. O meio de cultura MHAM além de mostrar-se ineficiente, também apresentou limitações para execução do teste, em razão do lento crescimento bacteriano (somente após 72 hrs PI). Os resultados obtidos sugerem que a utilização desse meio de cultura durante o ensaio, resultaria em menor precisão e acurácia dos dados, em virtude do longo período de incubação e formação de halos de inibição superestimados, tornando-se inegável para o uso (Smith & Kronvall, 2014; Miranda et al., 2016; Ngo et al., 2018; Smith et al., 2018).

Até então, não existem diretrizes para realização dos TSA e critérios interpretativos para os resultados oriundos de patógenos emergentes, como *Francisella orientalis*. No entanto, o CLSI recomenda testar amostras de referência como controle de qualidade (CQ), para assegurar que os dados relatados sejam fidedignos a precisão de desempenho do teste. Neste estudo, duas amostras de referência de CQ aquática *E. coli* ATCC® 25922 e *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC® 33658, que estão inclusas no manual CLSI-VET03, foram selecionadas baseadas em seus perfis de susceptibilidade e padrões de cultivo (Miller et al., 2003; CLSI, 2020). Os dados obtidos com CHAM para estas duas amostras mostraram-se quantitativamente comparáveis aos obtidos com o meio de referência MH e pertencem aos intervalos aceitáveis estabelecidos pelo CLSI (CLSI, 2020).

No entanto, verificou-se que o meio CHAM tem uso limitado na avaliação da susceptibilidade de isolados de *F. orientalis* à associação de sulfametoxazol e trimetoprim. O mecanismo de ação desses agentes antimicrobianos é baseado na inibição do metabolismo do ácido fólico bacteriano. Atuam em várias etapas da síntese do ácido tetraidrofólico, que atua como coenzima na produção das bases púricas e da timidina, componentes do DNA necessários ao crescimento celular. A presença de timidina/timina em altas concentrações no meio de cultivo, acabam por atuar como antagonistas não competitivos das enzimas dihidropteroato sintase (alvo do sulfametoxazol) e dihidrofolato redutase (alvo do trimetoprim), pois fornece diretamente produtos da via metabólica, acarretando um “desvio” no mecanismo de ação de ambos os antimicrobianos. Logo, os microrganismos sensíveis a SUT neste meio continuam a produção de precursores de material genético e, conseqüentemente, seu crescimento. Esse fato leva à formação de uma zona de inibição menor ou mesmo ausente, o que leva à interpretação errônea de uma falsa resistência (Koch & Burchall, 1971; Dale & Greenberg, 1972; Bushby, 1975; Ferone et al., 1975; Amyes, 1981; Hartman, 1993; Sangurdekar et al., 2011; Levinson, 2016; Lüllmann et al., 2016).

O CHAM por conter altas concentrações timina/timidina, impossibilita a avaliação de susceptibilidade dos isolados de FO a essas drogas. A existência de isolados de *F. orientalis* "resistentes" à sulfa em associação com trimetoprim foi anteriormente descrita na literatura (Soto et al., 2012; Ramírez-Paredes et al., 2017). Tais resultados podem estar relacionados ao problema metodológico supracitado na utilização do CHAM e não à real existência de isolados resistentes a esses antimicrobianos. Uma vez que o uso de MHAM se mostrou inviável, estudos adicionais devem ser conduzidos para investigar um meio mais apropriado para avaliar a susceptibilidade de isolados de FO à combinação de SUT.

Além do meio de cultura, o período de incubação é uma informação essencial na execução dos testes de susceptibilidade a antimicrobianos para microrganismos exigentes (Smith & Kronvall, 2015; Contreras-Lynch et al., 2017). O tempo de incubação influenciou nos testes de susceptibilidade a antimicrobianos para patógenos de peixes, como *Vibrio* spp. (Baron et al., 2020) e de mamíferos como *Salmonella typhimurium* (Laure et al., 2021). No presente estudo, para *Francisella orientalis*, verificou-se que um intervalo de tempo de 48 hrs foi necessário para obter halos de inibição mais visualmente nítidos para que as mensurações fossem precisas. É interessante notar que as mensurações realizadas após 72 e 96 hrs pós-inóculo geraram resultados falsos-resistentes para ampicilina e amoxicilina, o que, como supracitado, confirma o efeito de períodos de incubação prolongados sobre os dados obtidos. Adicionalmente, tal fato poderia justificar os resultados dos isolados "resistentes" no estudo de Ramirez-Paredes e colaboradores (2017), em que a leitura de halos de inibição ocorreu após 72 hrs.

Ao realizar o teste de disco difusão nos 89 isolados de *F. orientalis*, foi possível determinar os valores de ponto de corte epidemiológicos com base na metodologia *NRI* para os oito agentes antimicrobianos testados. Como resultado, foram identificados 89 isolados *WT* para florfenicol, oxitetraciclina, eritromicina e doxiciclina e 86 isolados *WT* (96,6%) para amoxicilina, ampicilina, enrofloxacina e norfloxacina. Enquanto 3 isolados de FO (3,4%) foram categorizados como *NWT* para amoxicilina, ampicilina, enrofloxacina e norfloxacina. Esses três isolados são oriundos de peixes diferentes, mas pertencentes ao mesmo surto em uma tilapicultura específica. Essa, tem uma grande história de uso profilático e terapêutico de antimicrobianos, incluindo enrofloxacina e norfloxacina. Além disso, os dados resultantes da análise de *NRI* podem ser usados para gerar valores de corte epidemiológicos. No entanto, como foram gerados por um único laboratório, devem ser considerados como valores CO_{WT} locais para *Francisella orientalis* (Smith, 2019).

Este é o primeiro relato de isolados resistentes (*NWT*) de *Francisella orientalis* à enrofloxacina, norfloxacina e amoxicilina. A resistência à ampicilina "β-lactâmica" foi relatada anteriormente na literatura para *Francisella* spp. incluindo para FO e *F. tularensis* (Soto, et al., 2012; Caspar & Maurin, 2017). Embora existam poucos estudos sobre resistência a antimicrobianos para *F. orientalis*, existem diversos estudos descritos na literatura para *F. tularensis* (Caspar & Maurin, 2017). Essa é intrinsecamente resistente a muitas classes de antimicrobianos devido à natureza de seu LPS, presença de enzimas produzidas pela mesma (Biswas et al., 2008; Caspar & Maurin, 2017), além do potencial de aquisição de resistência

(Caspar & Maurin, 2017). Em contraste com nossos resultados, *F. tularensis* permanece sensível às fluoroquinolonas, que exibem atividade bactericida contra o estágio intracelular do patógeno, e parecem reduzir as taxas de recidiva em modelos animais (Caspar & Maurin, 2017).

Os mecanismos de resistência a antimicrobianos estão diretamente associados a mutações pontuais ocorridas por pressão seletiva devido a presença do fármaco ou aquisição de elementos genéticos móveis (plasmídeos, transposon, integron, genes cassetes e sequências de inserção), que na grande maioria conferem resistência a mais de uma classe de antimicrobianos (Smith, 2008; Aldred et al., 2014; Bush, 2018; King et al., 2017).

A resistência aos β -lactâmicos dá-se principalmente por meio da degradação do anel β -lactâmico pela ação da enzima β -lactamase (Bush & Bradford, 2016; King et al., 2017; Bush, 2018). Podendo ser intrínseco, como nas espécies de *Aeromonas* (Ghatak et al., 2016) ou adquirida, como no caso de *Edwardsiella ictaluri* (Welch et al., 2009); através de modificações de alvo (afinidade reduzida de proteínas de ligação à penicilina) (Zeng e Lin, 2013; King et al., 2017); pelo controle do fluxo de entrada e saída de medicamentos por bombas de efluxo (Zeng e Lin, 2013; King et al., 2017), que podem conferir resistência a múltiplos medicamentos, como em *A. salmonicida* (Valdes et al., 2015) e *P. salmonis* (Cartes et al., 2017).

Já a resistência às fluoroquinolonas se deve a mutações em genes pertencentes à região que determina a resistência às quinolonas, *gyrA* e *gyrB* (Blondeau, 2004; Rice, 2012; Aldred et al., 2014; Redgrave et al., 2014; Correia et al., 2017), descrito para *A. salmonicida* (Miller e Harbottle, 2018), *Yersinia ruckeri* (Huang et al., 2014), *Aeromonas hydrophila* (Lukkana et al., 2012; Bello-López et al., 2019), *P. salmonis* (Henriquez et al., 2015) e *F. psychrophilum* (Izumi et al., 2007), bem como aquisição de genes do complexo QNR (*qnrA*, *qnrB* e *qnrS*), onde as proteínas codificadas reduzem as enzimas alvo no cromossomo, mecanismo mais comum entre os patógenos de peixes, sendo relatados para *A. salmonicida* (Kim et al., 2011; Valdes et al., 2011; Valdes et al., 2011, 2015), *P. salmonis* (Buschmann et al., 2012) e *A. hydrophila* (Bello-López et al., 2019). Adicionalmente, os genes que codificam proteínas que compõem as bombas de efluxo (*qepA1*, *qepA2* e *oqxAB*) presentes em *A. hydrophila* (Bello-López et al., 2019), e as proteínas aac (6')-Ib-cr (Aldred et al., 2014; Redgrave et al., 2014; Hooper & Jacoby, 2015) que não foram descritos anteriormente em patógenos de organismos aquáticos. No entanto, mais estudos são necessários para elucidar o mecanismo de resistência do *F. orientalis*.

Este estudo contém o primeiro relato de isolados de *Francisella orientalis* resistentes à amoxicilina e fluoroquinolonas. Isso mostra que o Brasil já está sentindo os efeitos não só do

uso inadvertido de medicamentos licenciados, mas também de medicamentos *off-label*, uma vez que nenhum medicamento das classes citadas é legalmente utilizado na piscicultura no país.

2.5. Conclusões

Este estudo fornece informações valiosas que servirão como parâmetro para a realização de testes de susceptibilidade a antimicrobianos para *Francisella orientalis* em estudos futuros, além de desempenhar papel importante no monitoramento epidemiológico de *Francisella orientalis*. Com a utilização da metodologia padronizada, bem como seu critério interpretativo, será possível avaliar e comparar o perfil de susceptibilidade exibido pelos isolados nos demais países onde os surtos ocorreram.

3. CAPÍTULO 2: Eficácia terapêutica da oxitetraciclina e enrofloxacina no tratamento da infecção por *Francisella orientalis* em juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.)

Manuscrito submetido ao periódico *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*

3.1. Introdução

A infecção causada por *Francisella orientalis* (FO) vem sendo um obstáculo a ser transposto pela tilapicultura mundial (Leal et al., 2018; Maekawa et al., 2021; Shahin et al., 2020). A franciselose é responsável por grandes perdas econômicas, associadas as altas taxas de mortalidade (Soto et al., 2010; Birkbeck et al., 2011; Leal et al., 2014) e aumento do custo de produção pela antibioticoterapia empregada (Smith, 2012; Okocha et al., 2018; Lulijwa et al., 2019). Além disso, a permanência da FO durante o ciclo produtivo da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), pode vir a acarretar a recidiva da enfermidade (Nguyen et al., 2019). Finalmente, a enfermidade em sua forma crônica pode causar lesões na musculatura (puntiformes e enegrecidas) que por questões sanitárias levam a condenação da carcaça, fato até o presente momento descrito apenas no Brasil (Junior et al., 2020; Leal, et al., 2018).

Assim como a maioria das enfermidades infecciosas que não possuem vacinas comerciais disponíveis (Rigos & Smith, 2015), a medida de eleição para o controle da doença é a antibioticoterapia oral, onde os fármacos são incorporados a ração (Soto et al., 2010a, 2013). A escolha do fármaco a ser utilizado varia conforme a disponibilidade de produtos licenciados em cada país. No Brasil, os antimicrobianos licenciados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para uso na aquicultura são florfenicol (FLO) e oxitetraciclina (OTC).

Soto e colaboradores (2013) determinaram a eficácia terapêutica do FLO mediante infecção por *Francisella orientalis* em tilápia do Nilo. Doses de 15 e 20 mg/Kg de peso vivo (PV), foram capazes de controlar a mortalidade. Entretanto, nenhuma das doses do ensaio mostrou-se eficiente na eliminação do patógeno, sendo observado o desenvolvimento de animais portadores. Já a OTC é um dos antimicrobianos mais usados na aquicultura desde a década de 50, pois além de apresentar amplo espectro possui baixo custo (Chopra & Roberts, 2001; Alday-Sanz et al., 2012; Rigos & Smith, 2015). Favero e colaboradores (2021) descrevem

a OTC como efetiva no controle da mortalidade por *F. orientalis* em condições experimentais. Além de baixos índices de quadro de portador foram observados nos animais medicados. Apesar de ser amplamente utilizada no país, os dados da literatura a respeito da eficácia terapêutica da OTC no tratamento da franciselose são conflitantes, quando comparados aos dados de campo no Brasil, onde falhas terapêuticas têm sido reportadas.

Tais falhas terapêuticas podem ocorrer não somente devido a dosagem inadequada, metabolização e perfusão tecidual dos fármacos, mas também pelo restrito número de antimicrobianos licenciados que acarretam o uso contínuo das mesmas moléculas durante um longo período de tempo, levando a uma redução na eficácia terapêutica dos mesmos e possibilitando o desenvolvimento de microrganismos resistentes (Smith, 2008; Morrison & Saksida, 2013; Price et al., 2016; Love et al., 2020). Devido a esses fatores, existem relatos de que as pisciculturas nacionais têm utilizado enrofloxacin (ENR) nos tratamentos contra franciselose (Leal et al., 2018). A ENR é licenciada no Brasil somente para uso na produção de ovinos, caprinos e aves de corte (Paschoal et al., 2013; Teles, 2013; Guidi et al., 2018), caracterizando seu uso na aquicultura como *off-label* (Reimschuessel et al., 2013; FAO, 2019; Lulijwa et al., 2019; OIE, 2020; Jahan et al., 2021; Limbu et al., 2021). Tal fato que pode ser corroborado através da detecção de ENR em produtos comercializados oriundos das tilapiculturas do país, que vem crescendo continuamente (Monteiro *et al.*, 2015; Guidi et al., 2018; Lulijwa et al., 2019; Bortolotte et al., 2021; Branco et al., 2021).

O uso de fluoroquinolonas, principalmente a enrofloxacin que foi desenvolvida apenas para uso veterinário, mostrou-se eficiente no tratamento contra infecções por: *Aeromonas salmonicida*, *Renibacterium salmoninarum* e *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* em salmonídeos; *Streptococcus iniae* em *sunshine bass*; *A. salmonicida*, *A. sobria* e *A. hydrophila* em carpas (*Cyprinus carpio*, *Carassius auratus gibelio*, *Ctenopharyngodon idella* e *Labeo rohita*) (Hsu et al., 1994; Stoffregen et al., 1996; Fang et al., 2012; Fan et al., 2017; Yang et al., 2021; Mog et al., 2021). Uma vez que já existem relatos a campo da ocorrência de falhas terapêuticas com o uso de FLO e OTC e sabe-se do emprego *off-label* da enrofloxacin no tratamento de franciselose, é essencial a verificação da real eficácia desse fármaco no tratamento da doença, para posteriormente torná-la uma alternativa legal e segura.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficácia terapêutica da oxitetraciclina e enrofloxacin no tratamento da infecção por *Francisella orientalis* em alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Amostra

A amostra utilizada no ensaio de eficácia terapêutica foi a FNO-12. Essa amostra foi isolada de um caso de surto de franciselose ocorrido em uma tilapicultura em Minas Gerais em 2012. Essa foi caracterizada por métodos fenotípicos e moleculares (Leal et al., 2014), além de possuir seu genoma completo sequenciado (Gonçalves et al., 2016). A amostra supracitada foi mantida a -80°C até sua utilização.

3.2.2. Animais

Oitenta e cinco juvenis de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) com peso médio de $11,51 \pm 1,20$ g foram adquiridos de uma piscicultura comercial. Dez animais foram selecionados aleatoriamente e submetidos a exame bacteriológico a fim de verificar a ausência de microrganismos patogênicos. Os peixes foram aclimatados as condições laboratoriais durante um período de sete dias. Esses foram alojados em aquários de vidro de 57 L, com fluxo contínuo de água (taxa de renovação de 0,5 litros/h), aeração suplementar e temperatura média de $26^{\circ}\text{C} \pm 1,5^{\circ}\text{C}$. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia, com ração comercial com 36% de proteína bruta (Laguna-Socil, Brasil) (Mian et al., 2009). Todos os procedimentos foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA-UFMG, protocolo n° 86/2018).

3.2.3. Preparação da ração medicada

A rações medicadas foram produzidas através da incorporação de enrofloxacina (ENR) (Sigma-Aldrich, EUA) e oxitetraciclina (OTC) (Sigma-Aldrich, EUA) na ração comercial com 36% de proteína bruta (Laguna-Socil, Brasil) considerando uma taxa de arraçoamento de 2% do peso vivo (PV), na dose de 10mg/Kg para ENR (Austin & Austin, 2016) e nas doses de 100mg/Kg (Phibro, EUA) recomendada pelo fabricante e 300mg/Kg utilizada a campo (Leal et al., 2018) para OTC.

Cada antimicrobiano foi adicionado ao alimento e vigorosamente homogeneizado. Posteriormente, foi acrescido óleo de soja (na proporção de 1000 μL de óleo para cada 100g de ração) para evitar a perda do antimicrobiano por hidrossolubilização durante a alimentação. Nos grupos controle (alimentados com ração não-medicada) o óleo de soja também foi

adicionado a ração comercial. As rações (medicadas e não-medicadas), foram preparadas e armazenadas a 2-8°C até à sua utilização.

3.2.4. Ensaio de eficácia terapêutica

As eficácias terapêuticas da oxitetraciclina e enrofloxacina foram avaliadas por meio de desafio experimental seguido da antibioticoterapia oral dos peixes. Juvenis de tilápia do Nilo foram desafiados com a amostra FNO-12 e em seguida tratados com a ração medicada. Cada grupo experimental foi constituído de 15 animais, sendo dispostos da seguinte maneira: Grupo 1- desafiado e tratado com 10mg/Kg de PV de ENR; Grupo 2- desafiado e tratado com 100mg/Kg de PV de OTC; Grupo 3- desafiado e tratado com 300mg/Kg de PV de OTC; Grupo 4- desafiado e alimentado com ração não medicada (grupo controle positivo); e Grupo 5- não desafiado e alimentado com ração não medicada (grupo controle negativo).

Para o desafio experimental, a amostra FNO-12 foi descongelada, plaqueada em ágar cisteína coração modificado (BD, EUA) (CHAM) suplementado com 2% de hemoglobina bovina (BD, EUA) e incubada a 28°C por 72 hrs. Posteriormente, algumas colônias foram inoculadas em 200 mL de caldo Mueller-Hinton cátion ajustado modificado (BD, EUA) (MMH) suplementado com 2% de suplemento Vx (Laborclin, Brasil) e 0,1% de glicose. Esse foi cultivado sob leve agitação (140 rpm) a 28°C até atingir a densidade ótica (DO₆₀₀) equivalente a dose letal 50 (DL₅₀) de 10³ UFC/mL a 22°C (Pereira et al., 2019). Os peixes foram anestesiados via imersão em uma solução contendo concentração de 10 mg/L de benzocaína (Sigma-Aldrich, EUA). Subsequentemente, estes foram desafiados pela administração intraperitoneal de 0,1mL do inóculo de FNO-12, correspondendo a 10² UFC/peixe. O grupo controle negativo foi inoculado com 0,1 mL de caldo MMH estéril. Nesta fase do experimento a temperatura da água foi mantida entre 22 ± 2°C.

Os parâmetros descritos a seguir foram monitorados três vezes ao dia: temperatura da água; comportamento alimentar; aparecimento e evolução de sinais clínicos; e mortalidade. A ração medicada foi fornecida 1 hr após o desafio experimental. Esses foram alimentados com a ração medicada durante 10 dias consecutivos, período recomendado de tratamento pela literatura/fabricante) seguidos de 20 dias de observação. Neste período de observação os peixes foram alimentados apenas com ração comercial. Todos os animais que vieram a óbito durante o período experimental, foram necropsiados para coleta asséptica de amostras de baço e rim para o reisolamento bacteriano e extração de DNA para realização da reação de polimerase em

cadeia quantitativa (qPCR) espécie-específica para *F. orientalis* (Soto *et al.*, 2010). Ao término do experimento, os animais sobreviventes foram eutanasiados através da imersão em uma solução com sobredose de benzocaína (250mg/L) e submetidos aos processos de diagnóstico supracitados.

3.2.5. Análise estatística

Os dados referentes a mortalidade dos grupos tratados (ENR e OTC) e controle foi comparada através do teste Chi-quadrado, sendo considerados como estatisticamente significativos valores de $P < 0,05$ e utilizando-se a correção de Yates, caso o N total da tabela de contingência utilizada para os cálculos seja inferior a 40 (Sweeting *et al.*, 2004; Rodrigues & Ziegelmann, 2011; Pagano & Gauvreau, 2018; Möller & Ahrenfeldt, 2021). A metodologia de Mantel-Haenszel com intervalo de confiança (IC) de 95% utilizada para calcular o risco relativo (RR). As análises foram realizadas utilizando o software estatístico StatsDirect (*StatsDirect Statistical Software version 3.3.5*, 2021).

3.3. Resultados

3.3.1. Eficácia terapêutica

O grupo controle negativo não apresentou sinais clínicos, bem como mortalidade durante o período experimental. Os resultados também foram negativos para os testes de isolamento bacteriano e qPCR espécie-específica para FO. No grupo controle positivo (desafiados com FNO-12 e não medicados) foi observado mortalidade acumulativa de 80% (n= 12) ao longo de todo período experimental (Fig. 2.1) e todos os peixes que vieram a óbito durante e ao término obtiveram resultado positivos para isolamento bacteriano e qPCR espécie-específica para FO. Os principais sinais clínicos verificados nos peixes acometidos foram anorexia, letargia, melanose e ascite.

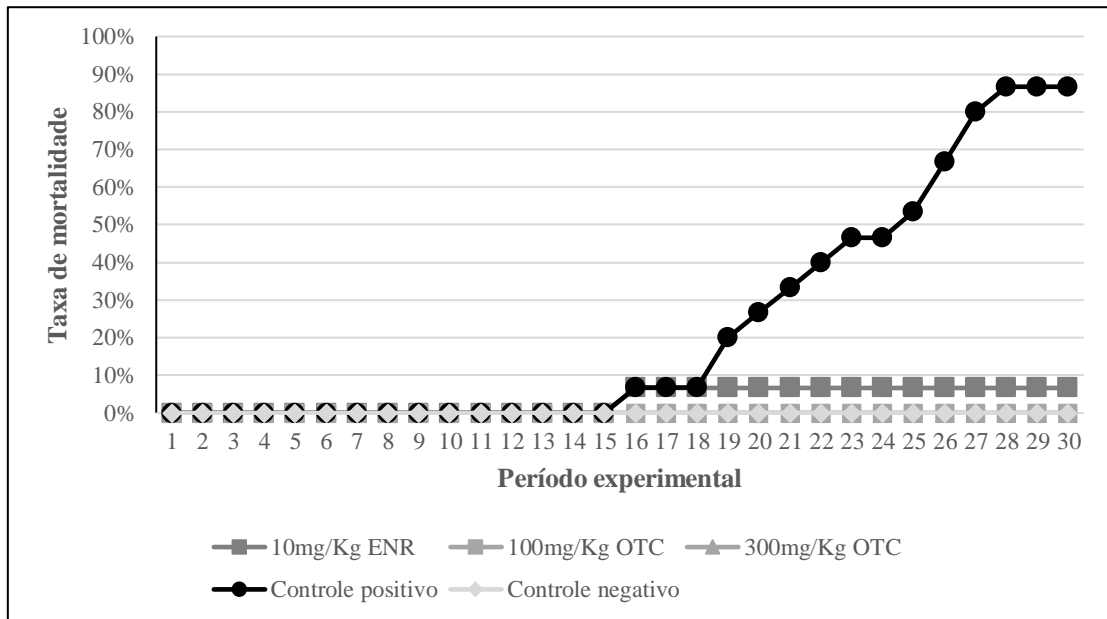


Figura 2.1: Mortalidade acumulada dos grupos experimentais desafiados com FNO-12 e tratados com ENR e OTC durante todo período experimental.

Tabela 2.1: Taxa de mortalidade e análises estatísticas da eficácia terapêutica da ENR e OTC durante todo período experimental, quando comparado ao grupo controle positivo.

ATB/Dose	Mortalidade						RR ^a	IC _{95%} ^b	RRR % ^c	valor <i>P</i> ^d
	Sim		Não		Total					
	n	%	n	%	N	%				
ENR - 10mg/Kg	1	7	14	93	15	100	0,083	0,01467-0,3874	91,7	< 0,0001
OTC - 100mg/Kg	0	0	15	100	15	100	0,040	0,00491-0,3547	96,0	< 0,0001
OTC - 300mg/Kg	0	0	15	100	15	100	0,040	0,00491-0,3547	96,0	< 0,0001
Controle positivo	12	80	3	20	15	100	--	--	--	--

ATB: antimicrobiano

^aRR: risco relativo

^bIC 95%: interval de confiança de 95%

^cRRR: redução do risco relativo (Eficácia)

valor *P*^d: teste Chi-quadrado com correção de Yates

Durante o período experimental, o tratamento com ENR na dose de 10mg/Kg PV foi eficiente em controlar a mortalidade causada pela infecção por *F. orientalis*, apresentando apenas 7% (n=1) de mortalidade durante o período de observação. Esta dose apresentou risco relativo (RR) de 8,3% ($P < 0,0001$) e redução do risco relativo (RRR) de morte por infecção

por FO em 91,7%, quando comparada ao grupo controle positivo. As análises estatísticas para a OTC apresentaram valores iguais a zero nas tabelas de contingência empregadas nos cálculos (mortalidade durante o período experimental), impossibilitando a determinação dos mesmos. Assim, a estatística foi realizada adicionando-se o menor valor possível em todos os elementos da tabela de contingência com o intuito de minimizar a interferência nos resultados obtidos, sendo esse equivalente a 0,5. Adicionalmente, o teste Chi-quadrado foi utilizado com a correção de Yates (Sweeting et al., 2004; Rodrigues & Ziegelmann, 2011; Pagano & Gauvreau, 2018; Möller & Ahrenfeldt, 2021). Logo, as doses de OTC de 100mg/Kg e 300mg/Kg PV foram capazes de controlar a mortalidade por franciselose (Fig. 2.1) (Tab. 2.1). Ambos os tratamentos com OTC apresentaram risco relativo (RR) de 4,0% e promoveram uma RRR de morte por infecção por *F. orientalis* de 96% (Tab. 2.1). Houve diferença estatística entre os grupos que receberam ração medicada com enrofloxacina (10mg/Kg PV) e oxitetraciclina (100mg/K e 300mg/Kg PV) ($P < 0,0001$).

Quanto a presença de animais portadores, a dose de 100mg/Kg de OTC apresentou RR de 31%, enquanto a dose de 300mg/Kg o RR foi de 23% e ambas apresentaram diferença estatística quando comparadas a ENR ($P < 0,0001$ e $P=0,0003$, respectivamente). As doses de OTC indicam através dos valores de $RR > 1$ obtidos (teste Chi-quadrado pelos mesmos fatores anteriormente mencionados) (Tab. 2.2) que o uso desse antimicrobiano não atua como fator que pode impedir ou diminuir a incidência de animais portadores após o tratamento.

Tabela 2.2: Resultado dos testes realizados e análises estatísticas da indução de animais portadores no tratamento de franciselose com as doses de 100mg/Kg e 300mg/Kg PV de OTC, quando comparadas ao tratamento com a dose de 10mg/Kg PV de ENR.

ATB/Dose	Testes									
	Isolamento bacteriano		qPCR ^a		Portadores		RR ^b	IC _{95%} ^c	RRR ^d	valor <i>P</i> ^e
	+	-	+	-	Total	N				
OTC - 100mg/Kg	67	33	100	0	15	100	31	4,0100-296,38	-	< 0,0001
OTC - 300mg/Kg	33	67	73	27	11	73	23	2,8753-221,84	-	0,0003
ENR - 10mg/Kg	0	100	0	100	0	0	-	-	-	--

ATB: antimicrobiano

^a qPCR: reação de polimerase em cadeia quantitativa

^bRR: risco relativo

^cIC 95%: interval de confiança de 95%

^dRRR: redução do risco relativo

valor *P*^e: teste Chi-quadrado com correção de Yates

3.4. Discussão

Atualmente, a eficácia terapêutica do florfenicol (FLO) e da oxitetraciclina (OTC) no tratamento de franciselose em tilápia do Nilo já foi previamente demonstrado. O FLO quando utilizado nas doses de 15 e 20mg/Kg PV durante quinze dias (Soto et al., 2013), bem como, a OTC nas doses de 100 e 200mg/Kg PV pelo mesmo período (Favero et al., 2021), são capazes de diminuir a taxa de mortalidade acarretada pela infecção causada pela *F. orientalis*. No entanto, nenhum dos antimicrobianos demonstrou-se eficiente em eliminar o patógeno do hospedeiro (Soto et al., 2013; Favero et al., 2021).

Este estudo, além de ser o primeiro relato da eficácia terapêutica da enrofloxacin no tratamento de alevinos de tilápia do Nilo acometidos por franciselose, reitera os dados da literatura a respeito da eficácia da OTC no controle da mortalidade no casos de infecção aguda por *Francisella orientalis* (Favero et al., 2021). Ambos os fármacos foram capazes de reduzir significativamente ou até evitar (OTC) grandes mortalidades durante todo período experimental, validando a utilização dessas drogas para o controle de surtos de franciselose nas tilapiculturas.

Como mencionado anteriormente, a OTC é o antimicrobiano mais amplamente empregado e licenciado para uso na aquicultura (Alday-Sanz et al., 2012; Julinta et al., 2019; Rigos & Smith, 2015), entretanto, a dose recomendada de 100mg/Kg PV e a dose utilizada a campo de 300mg/Kg PV não foram eficientes em eliminar a *F. orientalis*, levando os peixes sobreviventes ao estado de portador (Soto et al., 2013). O uso da OTC obteve resultados semelhantes nos tratamentos de infecção por *S. agalactiae* em tilápia do Nilo (Faria et al., 2013); *F. psychrophilum* em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (Bruun et al., 2003); *S. iniae* em tilápia azul (*Oreochromis aureus*) (Darwish et al., 2002). A presença desses animais dificulta o controle da doença, uma vez que, estes ao serem novamente submetidos a condições estressantes (baixa temperatura e qualidade de água, alta densidade, nutrição deficiente, manejo intenso, imunossupressão etc.) são capazes de disseminar o patógeno, acarretando a recidiva da enfermidade (Faria et al., 2013; Soto et al., 2013; Price et al., 2016; Leal et al., 2018; Rigos et al., 2021) , fato que justifica os dados controversos observados a campo.

As falhas terapêuticas podem estar relacionadas ao microrganismo, dosagem incorreta e distribuição tecidual do fármaco. Em relação ao microrganismo, *F. orientalis* quando exposta a situações letais (presença de antimicrobiano) ou de privação de nutrientes, entra em um estado denominado viável mas não-cultivável, na qual, esta se mantém viva mas com a virulência

diminuída o que acaba por limitar a disseminação da doença (Soto et al., 2012, 2013). Ao passo que o microambiente no hospedeiro se torna favorável, a bactéria se reestabelece metabolicamente possibilitando novamente sua dispersão (Soto et al., 2012; Ramirez-Paredes et al., 2017).

Adicionalmente, a oxitetraciclina quando administrada em baixas temperaturas leva a uma diminuição nas taxas de absorção intestinal (Chi et al., 2014) que associadas as altas taxas de absorção e depleção, acarretam baixas concentrações do fármaco nos órgãos mais afetados dificultando a eliminação do patógeno do hospedeiro (Chen & Bowser, 2005; Zhang and Li, 2007), e tem como limitação a baixa toxicidade seletiva, em altas dosagens são tóxicos tanto para procariotos como eucariotos (Dixon, 2000); logo a OTC em altas concentrações podem causar nos peixes diminuição do tecido hemato e linfopoiético no rim cranial, danos ao tecido hepático e hiperplasia epitelial laminar difusa no tecido branquial (Gaikowski et al., 2003).

Quanto à enrofloxacin, este é o primeiro relato de sua eficácia terapêutica no tratamento de juvenis de tilápia do Nilo acometidos pela infecção por *F. orientalis*, tal como nas demais doenças com agentes etiológicos bacterianos intracelulares (facultativos ou não) oriundos de organismos aquáticos (Bowser & Babish, 1991; Bowser et al., 1994; Hsu et al., 1994; Samanidou et al., 2008; Rico et al., 2013; Tran Minh et al., 2015; Yang et al., 2021).

Diferenças como melhor biodisponibilidade em peixes; mesmo tendo absorção lenta quando administrada por via oral é capaz de penetrar em todos os tecidos; viável e ativa no meio intracelular (fagossomo, fagolisossomo, citosol); lenta taxa de eliminação, levando a uma maior meia-vida do fármaco e aumentado o período de exposição celular ao fármaco; possui metabólito ativo, a ciprofloxacina; concentram-se em células fagocíticas sem impedir suas atividades (como a expansão respiratória); apresenta concentração intracelular muito maior do que a concentração sérica ao atingir equilíbrio (Maurin & Raoult, 1993; Briones et al., 2008; Giguère et al., 2013; Paschoal et al., 2013; Kaldestad et al., 2014; Teles et al., 2016; Viel et al., 2021; Yang et al., 2021), além disso, as fluorquinolonas possuem o denominado efeito pós-antibiótico. Esse consiste na supressão do crescimento bacteriano quando as concentrações séricas já estão baixas, ou seja, o fármaco continua atuando em bactérias susceptíveis mesmo com a interrupção/término do tratamento, e sabe-se que microrganismos que são submetidos ao efeito da fase pós-antibiótico são mais susceptíveis as funções bactericidas exercidas pelos fagócitos (Vaccaro et al., 2003; Xu et al., 2013) fatores que possivelmente contribuíram para o sucesso terapêutico.

A enrofloxacin por se tratar de uma molécula de uso exclusivo veterinário, como anteriormente mencionado, e ser registrada para uso na atividade aquícola para controle de enfermidades bacterianas em diversos países (Guidi et al., 2018; Kang et al., 2018; Liu et al., 2018; Lulijwa et al., 2019; Yang et al., 2021), seria uma alternativa viável para o licenciamento no Brasil (Quesada et al., 2013). Mas até o presente momento, seu uso *off-label* não é aconselhado.

O estudo do perfil de susceptibilidade dos isolados de *F. orientalis* brasileiros, revelou que existe um pequeno e isolado de grupo de amostras resistentes a fluorquinolonas (Oliveira et al., 2022). Este fato exige que o uso da enrofloxacin deve ser associado a determinação do perfil de susceptibilidade dos isolados da região, bem como o monitoramento das mesmas a fim de evitar a disseminação de microrganismos resistentes (Okocha et al., 2018; UE, 2019; OIE, 2020).

3.5. Conclusões

Este estudo demonstrou a eficácia da oxitetraciclina em relação a diminuição da mortalidade da infecção por *F. orientalis* em tilápia do Nilo, entretanto, o elevado número de animais portadores pode prejudicar o controle da enfermidade a campo, devido as possíveis recidivas.

Em contrapartida, a eficácia terapêutica da enrofloxacin mostrou-se superior, pois além da diminuição da mortalidade, eliminou o patógeno do hospedeiro.

4. CAPÍTULO 3: Desenvolvimento de vacina inativada de célula completa por administração via imersão para imunoprofilaxia da infecção por *Francisella orientalis* em alevinos e juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.)

Manuscrito aceito pelo periódico *Fish and Shellfish Immunology*

4.1. Introdução

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é a terceira espécie mais produzida do mundo e a primeira no Brasil, sendo responsável por 62,8% da produção nacional no ano de 2020 (FAO, 2020; IBGE, 2021). A intensificação de seu cultivo, acaba propiciando o surgimento de doenças infecciosas, nas quais os agentes etiológicos bacterianos têm se destacado (cerca de 54,9% dos surtos ocorridos na aquicultura mundial) (Dhar et al., 2014; Dadar et al., 2017), gerando grandes perdas econômicas diretas devido as mortalidades ocasionadas e indiretas, ao aumento no custo produção pelo uso de antimicrobianos para o controle.

Os casos de infecção pela bactéria *Francisella orientalis* têm sido consideradas atualmente uma das principais enfermidades infecciosas para a tilapicultura mundial (Mauel et al., 2003, 2005; Ottem et al., 2009; Soto et al., 2009; Jeffery et al., 2010; Iregui et al., 2011; Leal et al., 2014; Nguyen et al., 2015; Ortega et al., 2016; Qiang et al., 2015). Durante os casos de surtos, altas mortalidades (até 90% dos lotes) podem ser verificadas, principalmente em lotes de alevinos e juvenis no período de inverno (temperatura da água < 22-24 °C) (Soto et al., 2009; Birkbeck et al., 2011; Leal et al., 2014).

Até o presente momento a forma de controle da franciselose dá-se pela antibioticoterapia via oral administrada através da ração (Soto et al., 2013). Por vezes, a antibioticoterapia oral pode não ser eficiente devido ao curso agudo da doença, não havendo tempo para intervenção medicamentosa, ou pelo baixo consumo da ração medicada, uma vez que um dos primeiros sinais clínicos a surgir é a anorexia (Soto et al., 2009; Birkbeck et al., 2011; Leal et al., 2014, 2018). Neste contexto o desenvolvimento de imunoprofiláticos são de grande importância, não só na redução e impedimento da mortalidade, mas também na diminuição do uso de antimicrobianos. Tais fatores reduzem o custo de produção, além de reduzirem a possibilidade do surgimento de microrganismos resistentes, fazendo com que esta atividade produtiva seja ambientalmente sustentável (Gudding 2012, 2014; Smith, 2012; Henriksson et al., 2018; Love et al., 2020;).

As vacinas mais comumente utilizadas na tilapicultura são compostas pela suspensão de células completas do microrganismo inativada por formalina associadas a um adjuvante oleoso, formando uma emulsão administrada por via intraperitoneal (IP) (Tafalla et al., 2013; Munang'andu et al., 2012, 2014; Dalmo et al., 2016). Possuem a vantagem de serem formulações de baixo custo, de execução simples, estáveis e induzem imunidade humoral de longa duração (devido a presença do antígeno em um adjuvante de depósito) quando comparada as demais vias de administração, imersão e oral (Evensen, 2009, 2016; Tafalla et al., 2013; Dalmo et al., 2016; Dadar et al., 2017). Porém, possuem como desvantagens a dificuldade de vacinação maciça pois requer de mão-de-obra treinada ou equipamento técnico especializado, demanda um maior período de tempo, estressante para os animais devido ao alto manejo e é contra indicada para animais com peso > 15g (Lillehaug, 2014; Evensen, 2016).

Como a franciselose acomete majoritariamente peixes pequenos (0,5-30 g) (Leal et al., 2014, 2018) e a imunização deve ser realizada antes do desafio, quando o tamanho dos animais é pequeno, o uso de vacinas injetáveis é inviável. Nesse contexto, a vacinação por imersão torna-se uma alternativa mais factível do ponto de vista técnico. Essa é indicada para vacinação das fases mais jovens com baixo peso, sendo também um procedimento menos estressante, de maior facilidade, pois permite a vacinação em larga escala. Adicionalmente, pode ser utilizada como reforço, caso seja necessário (Tafalla et al., 2013; Lillehaug, 2014; Dalmo et al., 2016; Evensen, 2016; Dadar et al., 2017; Sudheesh & Cain, 2017; Ma et al., 2019). Apesar da imunidade induzida ser menos duradoura quando comparada a via IP, perdura o suficiente para que os animais jovens sobrevivam as doenças que acometam os animais nessa fase (Tafalla et al., 2013; Dalmo et al. 2016; Evensen, 2016; Dadar et al., 2017; Sudheesh & Cain, 2017).

O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma vacina inativada de célula completa para administração via imersão para alevinos e juvenis de tilápia do Nilo contra a infecção por *Francisella orientalis*.

4.2. Material e Métodos

4.2.1. Bactéria e condições de cultivo

A amostra utilizada para confecção da bacterina para formulação vacinal, bem como desafio experimental foi a FNO-12. Esta foi isolada de um surto ocorrido no estado Minas Gerais em 2012, caracterizada fenotípica e molecularmente (Leal et al., 2014). Adicionalmente,

essa amostra possui genoma completo sequenciado (Gonçalves et al., 2016). A amostra encontrava-se armazenada a -80°C até sua utilização.

A FNO-12 foi descongelada e plaqueada em ágar cisteína coração modificado (BD, EUA) (CHAM), suplementado com 2% de hemoglobina bovina (BD, EUA). A placa foi incubada a 28°C por 72 horas. Posteriormente algumas colônias foram selecionadas e inoculadas em caldo Mueller-Hinton cátion ajustado modificado (BD,EUA) (MMH), suplementado com 2% de suplemento Vx (Laborclin, Brasil) e 0,1% de glicose (Soto et al., 2009), incubada a 28°C , sob leve agitação (140 rpm), até atingir a concentração adequada para cada etapa experimental.

4.2.2. Animais

No total foram adquiridos de uma piscicultura comercial cento e trinta e cinco tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alevinos. Inicialmente, dez animais foram selecionados aleatoriamente e submetidos a exame bacteriológico a fim de verificar a ausência de microrganismos patogênicos. Os peixes foram aclimatados as condições laboratoriais durante um período de sete dias. Os alevinos foram alojados em aquários de vidro de 57 L, com fluxo contínuo de água (taxa de renovação de 0,5 litros/h), aeração suplementar e temperatura média de $26^{\circ}\text{C} \pm 1,5^{\circ}\text{C}$. Adicionalmente, foram alimentados duas vezes ao dia, com ração comercial com 36% de proteína bruta (Laguna-Socil, Brasil) (Mian et al., 2009). Todos os procedimentos serão submetidos à aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA-UFMG, protocolo n°86/2018).

4.2.3. Preparação da vacina

A amostra FNO-12 foi cultivada como descrito no item 5.2.2 até atingir uma densidade ótica (DO_{600}) de 0,216 equivalente a concentração de 10^9 UFC/mL. O inóculo foi submetida a três ciclos de centrifugação a $14.000 \times g$, a 4°C por 15 minutos e lavagem em tampão fosfato salina estéril (PBS). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* obtido, ressuspensão em PBS estéril adicionado de formalina na concentração de 1,0%. A suspensão foi incubada a 4°C , sob leve agitação (140 rpm) por 24 horas. Após esse período, a bacterina foi novamente submetida a três ciclos de centrifugação e lavagem supracitados. Ao final, o *pellet* bacteriano foi novamente ressuspensão em PBS estéril (Leal et al., 2010). A bacterina foi submetida ao teste de esterilidade

através do plaqueamento em CHAM, seguido de incubação a 28°C por 7 dias. A bacterina foi armazenada a 4°C até sua utilização.

O *premix* vacinal foi formulado a partir da bacterina e do adjuvante aquoso MONTANIDE® IMS 1312 VG (Seppic, França). Ambos foram misturados na proporção de 1:1 (v/v), homogeneizados a 30°C, sob leve agitação (140 rpm) por dez minutos, seguindo a recomendação do fabricante. A preparação foi realizada imediatamente antes da realização da imunização dos animais.

A vacina completa foi preparada a partir da solução *premix*, diluído em água deionada na proporção de 1:4, obtendo a concentração final de 10⁸ UFC/mL de antígeno (bacterina) e 10% de adjuvante (Soltani et al., 2014). Para os grupos em que a bacterina foi administrada, esta foi misturada na mesma proporção de 1:4 com água deionada, mantendo a concentração final em 10⁸ UFC/mL de antígeno (bacterina); nos grupos em que o adjuvante foi usado, este foi diluído em água deionada para obter uma solução final com 10% do adjuvante. Para os grupos controle positivo foi usado apenas PBS para a imersão.

4.2.4. Imunização

4.2.4.1. Ensaio vacinal de alevinos

Para o ensaio 1, foram selecionados setenta e cinco alevinos (condições descritas no item 5.2.3) com peso médio de 3,43 ± 0,54 g, sendo cada grupo experimental composto por quinze animais dispostos da seguinte maneira: Grupo A1- vacina completa (bacterina associada ao adjuvante aquoso); Grupo A2- bacterina; Grupo A3- adjuvante aquoso; Grupo A4- PBS (controle positivo) e Grupo A5- controle negativo.

Para a imunização, os peixes foram retirados dos aquários de aclimação e transferidos para recipientes contendo as respectivas formulações, dotados de aeração suplementar. Estes permaneceram imersos durante dois minutos nas soluções e posteriormente devolvidos para os aquários de origem.

A água dos aquários foi mantida a 28°C e o período de observação ocorreu durante trinta dias, onde foram avaliados os seguintes parâmetros: temperatura da água; comportamento alimentar; alterações clínicas; e mortalidade. Ao término deste período, os animais foram submetidos ao desafio experimental (procedimento descrito no item 5.2.6).

4.2.4.2. Ensaio vacinal de juvenis

Para o ensaio 2 foram formados cinco grupos experimentais contendo dez animais com peso médio de $11,58 \pm 3,62$ g, sendo dispostos da seguinte maneira: Grupo J1 - vacina completa (bacterina associada ao adjuvante aquoso); Grupo J2- bacterina; Grupo J3- adjuvante aquoso; Grupo J4- PBS (controle positivo) e Grupo J5- controle negativo.

O procedimento vacinal, bem como as condições experimentais, foram as mesmas supracitadas no item 5.2.5.2.

4.2.5. Infecção experimental

A amostra FNO-12 foi cultivada como descrito no item 5.2.2 até atingir a concentração de 10^5 UFC/mL. Os grupos: A1-vacina completa; A2-bacterina; A3-adjuvante aquoso e A4- controle positivo (ensaio 1), bem como os grupos J1-vacina completa; J2-bacterina, J3- adjuvante aquoso e J4- controle positivo (ensaio 2), foram anestesiados via imersão em uma solução contendo benzocaína na concentração de 10mg/L (Sigma-Aldrich, EUA) e posteriormente desafiados por via intraperitoneal com o volume de 0,1 mL (dose de 10^4 UFC/peixe). Os grupos controle negativo (A5 e J5) foram inoculados com 0,1 mL de MMH estéril.

Os grupos foram acompanhados por um período de trinta dias. Em ambos os ensaios, a água dos aquários foi mantida a temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Os seguintes parâmetros foram monitorados três vezes ao dia: temperatura da água; comportamento alimentar; aparecimento e evolução de sinais clínicos; e mortalidade. Todos os animais que vieram a óbito neste período, foram submetidos a necropsia para coleta asséptica de amostras de baço e rim para o isolamento bacteriano em CHAM e extração de DNA para realização da reação de polimerase em cadeia quantitativa (qPCR) espécie-específica para *F. orientalis* (Soto et al., 2010). Ao término do experimento, os animais sobreviventes foram eutanasiados através da imersão em uma solução de benzocaína (250mg/L) e submetidos aos processos de diagnóstico supracitados.

4.2.6. Avaliação eficácia vacinal e análise estatística

A eficácia das vacinas foi determinada pela porcentagem relativa de sobrevivência (PRS) dos grupos vacinados em relação aos controles. Essa foi calculada de acordo com a fórmula (Amend, 1981):

$$PRS = 1 - (\%MPV/\%MPC) \times 100$$

MPV=mortalidade de peixes vacinados

MPC=mortalidade de peixes controle

Os dados referentes a mortalidade dos grupos vacinados e grupo controle foram comparados através do teste exato de *Fischer's* e valores de $P < 0,05$ foram considerados como significantes. As análises foram realizadas utilizando o software estatístico MedCalc versão 19.0.7 (*MedCalc Statistical Software version 19.0.7*, 2019).

4.3. Resultados

4.3.1. Ensaio vacinal e desafio experimental com alevinos

O grupo controle negativo do ensaio 1 não apresentou mortalidade, bem como, sinais clínicos de franciselose e outras enfermidades durante todo período experimental. Todos os animais desses grupos apresentaram resultados negativos para os testes de isolamento bacteriano e qPCR.

O aparecimento dos sinais clínicos (anorexia, letargia e melanose), bem como as primeiras mortes foram observadas no oitavo dia pós-desafio nos grupos A2 (vacinados com bacterina) e A3 (adjuvante aquoso). No grupo controle positivo (A4) foi verificada uma taxa de mortalidade de 93% ($n = 14$) (Fig. 3.1).

O grupo A1 (vacina completa) apresentou uma taxa de mortalidade equivalente a 47% ($n=7$) e PRS de 50% sendo o único estatisticamente significativo ($P = 0,014192$) quando comparado ao grupo controle positivo (A4) (Tab.3.1); enquanto os grupos A2 (bacterina) e A3 (adjuvante aquoso) obtiveram taxas de mortalidade de 60% e 93% e PRS de 37% e 0%, respectivamente (Fig. 3.1).

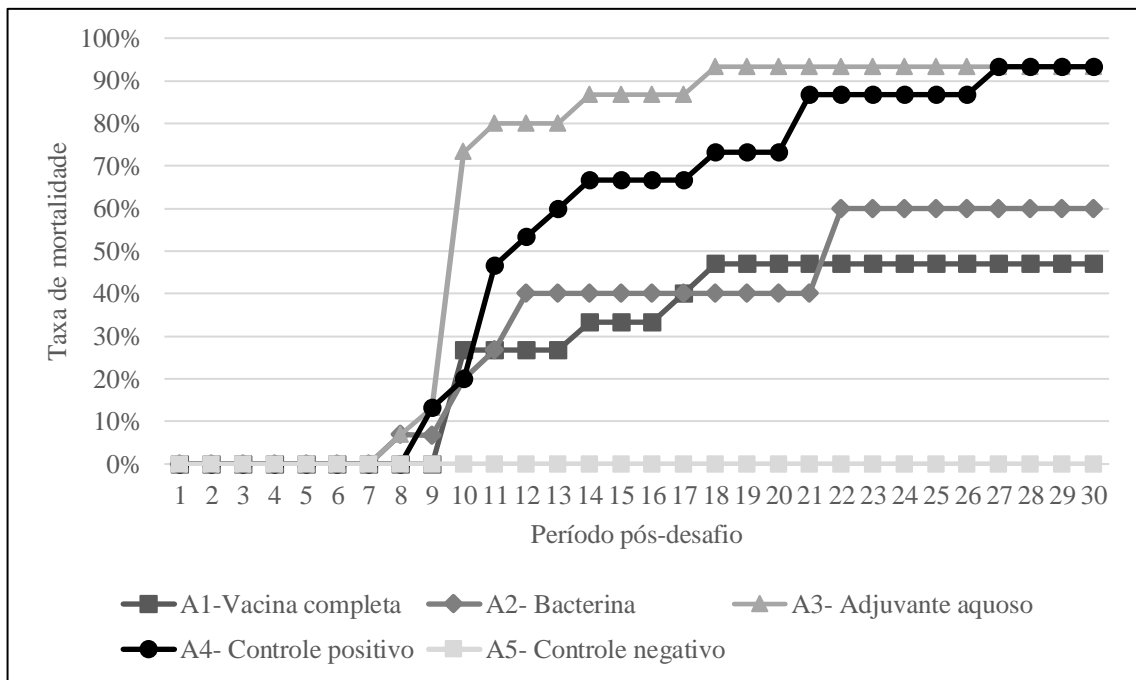


Figura 3.1: Mortalidade acumulada dos grupos de alevinos de tilápia do Nilo vacinados no período pós-desafio com a amostra FNO-12.

Tabela 3.1: Mortalidade, eficácia vacinal e análise estatística dos grupos de alevinos vacinados, durante todo período experimental.

Grupos	Preparação vacinal	Mortalidade						PRS ^a (%)	valor <i>P</i> ^b
		Sim		Não		Total			
		n	%	n	%	N	%		
A1	Bacterina e adjuvante	7	47	8	53	15	100	50	0,014192
A2	Bacterina	9	60	6	40	15	100	37	0,080076
A3	Adjuvante	14	93	1	7	15	100	0	1,000000
A4	Controle positivo	14	93	1	7	15	100	--	--
A5	Controle negativo	0	0	100	0	15	100	--	--

PRS^a: porcentagem relativa de sobrevivência

valor *P*^b: teste exato de Fisher's

Entretanto, todos os animais que vieram a óbito durante o experimento, assim como, os sobreviventes eutanasiados ao término, apresentaram resultados positivos para ao menos um dos testes realizados, indicando a presença de animais portadores (Tab. 3.2).

Tabela 3.2: Resultados dos testes realizados para determinar a presença de animais portadores.

Grupos	Preparação vacinal	Testes				Portadores	
		Isolamento bacteriano		qPCR		Total	
		Positivo %	Negativo %	Positivo %	Negativo %	N	%
A1	Bacterina e adjuvante	75	25	100	0	8	100
A2	Bacterina	67	33	100	0	6	100
A3	Adjuvante	100	0	100	0	1	100

4.3.2. Ensaio vacinal e desafio experimental com juvenis

O grupo controle negativo do ensaio 2 não apresentou mortalidade, bem como, sinais clínicos de franciselose e outras enfermidades durante todo período experimental. Todos os animais desses grupos apresentaram resultados negativos para os testes de isolamento bacteriano e qPCR.

Durante o período pós-vacinação um animal do grupo J1 (vacina completa) e um do J3 (adjuvante aquoso) vieram a óbito. Ambos foram negativos para os testes de isolamento bacteriano e qPCR. O aparecimento dos sinais clínicos (anorexia, letargia e melanose) ocorreram concomitantemente com as primeiras mortes nos grupos J2 (bacterina) e controle positivo (J4), no sétimo dia pós-desafio. O grupo controle positivo apresentou taxa de mortalidade de 80%.

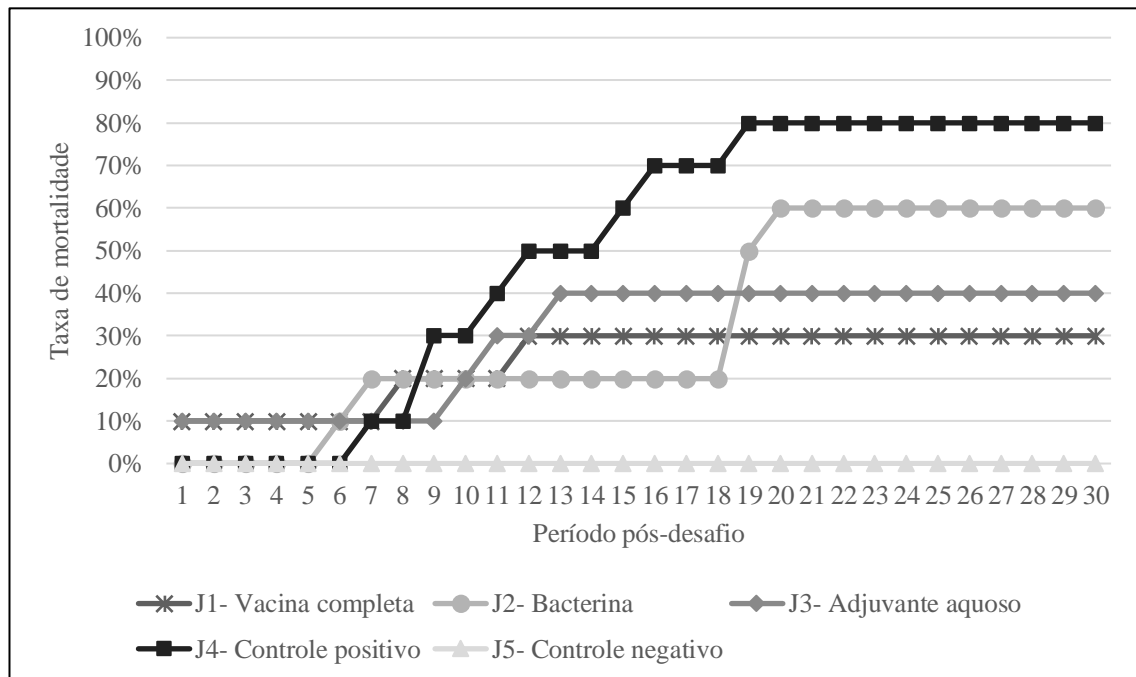


Figura 3.2: Mortalidade acumulada dos grupos de juvenis de tilápia do Nilo vacinados no período pós-desafio com a amostra FNO-12.

O grupo J1 apresentou maior PRS e a menor taxa de mortalidade deste ensaio sendo equivalentes a 63% e 30%, nesta ordem (Fig. 3.2) (Tab. 3.3). Apesar do bom desempenho alcançado, o grupo J1 não apresentou diferença estatística significativa ($P = 0,069778$) quando comparado ao grupo controle positivo. Enquanto os grupos J2 e J3 exibiram uma menor PRS quando comparados a J1 correspondentes a 25% e 50%, respectivamente, não sendo estatisticamente significativos.

Tabela 3.3: Mortalidade, eficácia vacinal e análise estatística dos grupos de juvenis vacinados, durante todo período experimental.

		Mortalidade							
		Sim		Não		Total			
Grupos	Preparação vacinal	n	%	n	%	N	%	PRS ^a (%)	valor P ^b
J1	Bacterina e adjuvante	3	30	7	70	10	100	63	0,069778
J2	Bacterina	6	60	4	40	10	100	25	0,628482
J3	Adjuvante	4	40	6	60	10	100	50	0,169802
J4	Controle positivo	8	80	2	20	10	100	--	--
J5	Controle negativo	0	0	10	100	10	100	--	--

PRS^a: porcentagem relativa de sobrevivência

valor P^b: teste exato de Fisher's

Tabela 3.4: Resultados dos testes realizados para determinar a presença de animais portadores.

Grupos	Preparação vacinal	Testes					
		Isolamento bacteriano		qPCR		Portadores	
		Positivo %	Negativo %	Positivo %	Negativo %	Total N	Total %
J1	Bacterina e adjuvante	83	17	83	17	6	100
J2	Bacterina	75	25	100	0	4	100
J3	Adjuvante	67	33	83	17	6	100

4.4. Discussão

Atualmente, a antibioticoterapia via oral é medida de eleição para o controle dos casos de surtos de franciselose (Soto et al., 2013; Favero et al., 2021), assim como as demais enfermidades, nas quais, não existe imunoprofilaxia comercial (Rigos & Smith, 2015). Entretanto, além da dificuldade na administração dos fármacos nos casos de surto ou intervenção tardia, como supracitado, a ineficácia terapêutica pode também ocorrer em consequência do uso contínuo das mesmas bases antimicrobianas (FDA, 2011; Smith 2008, 2012), o que associado ao uso recorrente e inadvertido pode acarretar o desenvolvimento de bactérias patogênicas resistentes (DePaola et al., 1995; Pulkkinen et al., 2010; Romero et al., 2012; Gudding, 2014; Andrieu et al., 2015; Dadar et al., 2017; Henriksson et al., 2018).

Diante deste cenário, o desenvolvimento e implementação de vacinas reduz a possibilidade dos animais desenvolverem a doença; diminuem ou impedem a mortalidade; aumenta a eficácia produtiva; e a longo prazo reduzem de maneira significativa o emprego de antimicrobianos, reduzindo o custo de produção e oferecendo produtos com maior segurança alimentar, livre de resíduos desses fármacos (Bondad-Reantaso et al., 2005; Gudding, 2014; Evensen, 2016; Sheng, 2017; Subasinghe, 2017; Adams, 2019; Ma et al., 2019).

As vacinas experimentais presentes na literatura para tilápia do Nilo contra infecção por *Francisella orientalis* são compostas por células deste microrganismo inativadas, associadas a adjuvante oleoso e administradas por via intraperitoneal. Essas apresentam resultados promissores com diminuição da mortalidade e PRS de 100% (Ramirez-Paredes et al., 2019), 71% (Pulpipat et al., 2020) e 82,3% (desafio com cepa homóloga) (Shahin et al., 2019). Contudo, para que a vacinação seja exequível a campo, os animais nas fases de vida mais jovens, alevinos e juvenis (1-10g) comumente acometidos pela franciselose (Leal et al.,

2014, 2018), devem ser vacinados com um prazo de no mínimo trinta dias antes da fase e peso críticos (por volta de 0,2-1,5g) para o desenvolvimento da imunidade protetora. Uma vez que, a administração via IP não é recomendada para animais com peso inferior a 15g, pois pode gerar alta mortalidade oriunda do estresse e lesões geradas pelo inóculo, isso inviabiliza o uso de vacinas injetáveis para controle da franciselose (Lillehaug, 2014; Munang'andu et al., 2015; Evensen, 2016a). Esse tipo de composição vacinal via IP seria plausível de utilização em reprodutores, pela capacidade que de transmissão vertical que a *Francisella orientalis* possui (Nguyen et al., 2019), bem como, em situações epidemiológicas onde a doença acometa animais maiores no período de engorda.

Neste caso, para o controle da franciselose em animais jovens, as vacinas via imersão são indicadas. Soto e colaboradores (2011) desenvolveram uma vacina para ser administrada via imersão, constituída pelo microrganismo vivo atenuado, através da deleção do gene *IgIC*, que apresentou resultados promissores (PRS = 87,5%). Porém, apesar da eficácia, por se tratar de uma vacina viva atenuada, seu uso é dificultado por questões regulatórias, devido aos riscos potenciais de reversão de virulência, virulência residual e para animais imunocomprometidos (Dadar et al., 2017; Ma et al., 2019; Mohd-Aris et al., 2019).

Pelos fatores supracitados, uma alternativa viável e segura seria a administração de vacina inativada de células completas via imersão. Esta já é empregada na aquacultura e disponível comercialmente para diversos patógenos como *Yersinia ruckeri* (MSD,EUA; Pharmaq/Zoetis, EUA; Fatro, Itália; Sivra, Espanha; Elanco, EUA); *V. anguillarum*, *V. ordalli* e *V. salmonicida* (Merck, Alemanha; Pharmaq/Zoetis, EUA; Hipra, Espanha); *V. anguillarum* e *V. ordalli* (Elanco, EUA); *Flavobacterium psychrophilum* (Veterquímica, Chile), *F. columnare* (Veterquímica, Chile) *A. salmonicida* (MSD, EUA; Veterquímica, Chile); *P. salmonis* (Veterquímica, Chile); *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* e *V. anguillarum* (MSD, EUA; Hipra, Espanha); *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Hipra, Espanha; MSD, EUA); *Streptococcus iniae* (MSD, EUA); *L. garvieae* e *S. iniae* (MSD, EUA) (Evensen, 2016; Bøggwald & Dalmo, 2019; Ma et al., 2019; Miccoli et al., 2019, 2021). Por se tratarem de vacinas inativadas, a associação destas suspensões com adjuvantes recomendada, pois aumentam a imunogenicidade, bem como duração da resposta imune (Tafalla et al., 2013, 2014; Dalmo et al., 2016).

Com os ensaios vacinais realizados neste estudo, foi observada a diferença da eficácia vacinal, bem como os efeitos do adjuvante MONTANIDE® IMS 1312 VG (Seppic, França) em

alevinos e juvenis de tilápia do Nilo. Ao administrar a bacterina associada ao adjuvante, houve um incremento na taxa de sobrevivência e na eficácia vacinal para ambos os ensaios, reiterando resultados de estudos pregressos (Soltani et al., 2014; Hwang et al., 2017; Skov et al., 2018; Afsharipour et al., 2021). Para que uma vacina seja considerada eficiente, seu PRS deve ser $\geq 60\%$ (Amend, 1981); logo, é possível afirmar que a formulação vacinal completa foi considerada eficiente em juvenis (PRS= 63%), enquanto a mesma composição quando administrada em alevinos foi tida como ineficiente (PRS= 50%), mesmo sendo o único grupo, mesmo sendo estatisticamente significativa. Ao analisar os grupos expostos somente ao adjuvante após o desafio, nota-se que a mortalidade e PRS em juvenis, mostra valores muito semelhantes a mesma composição administrada via IP (Ravelo et al., 2006). Em contrapartida, a alta taxa de mortalidade em alevinos expostos somente ao adjuvante, equivalente a mortalidade do controle positivo, pode evidenciar uma imunoestimulação excessiva e potencialmente prejudicial as tilápias do Nilo nessa fase. Os dados do presente estudo se contrapõem ao verificado em resultados.

Adicionalmente, nos dois ensaios realizados, a vacina comprovou ser eficiente na diminuição da mortalidade e progressão dos sinais clínicos acarretados pela franciselose; porém a resposta imune induzida pela mesma, foi incapaz de eliminar o patógeno do hospedeiro, fazendo com que os animais sobreviventes sejam portadores (Soto et al., 2011; Assis et al., 2017), reiterando dados prévios de literatura (Soto et al., 2011; Ramirez-Paredes et al., 2019; Shahin et al., 2019; Pulpipat et al., 2020). Tal efeito pode estar associado ao uso de antígenos inativados que são indutores de resposta imune humoral. Somente a resposta humoral induzida pelos imunobiológicos não se mostra suficiente para eliminar a *Francisella orientalis* do organismo dos peixes, possivelmente devido ao comportamento intracelular facultativo desse patógeno (Evensen, 2016a; Munang'andu et al., 2015, 2018). Futuro estudos devem ser realizados para verificar se os animais imunizados sobreviventes podem manifestar recidivas da doença, o que poderia comprometer os programas de imunoprofilaxia a nível de campo.

A eficácia vacinal comumente é avaliada através do valor da PRS. Entretanto, na avaliação para licenciamento, bem como, na produção comercial, a eficácia não é traduzida unicamente pelo PRS. Esse é considerado um valor dinâmico que sofre alterações devido a via de administração vacinal e do desafio, período até o desafio etc. (Midtlyng, 2005, 2016; Nordmo, 1997). Para uma ampla análise a fim de assegurar a eficácia vacinal, fatores como taxa de mortalidade, inapetência e comportamento pós-vacinal, período em que os sinais clínicos se manifestam, ocorrência do primeiro óbito, avaliação de efeitos colaterais da vacina

ou via de administração, devem ser também serem considerados (Frost & Ness, 1997; Midtlyng, 1996, 1997, 2016). Logo, embora o PRS da vacina completa em alevinos tenha sido inferior ao desejado, ao verificar as demais características, pode-se considerar o seu uso como uma possível alternativa para o controle da franciselose. A fim de potencializar a resposta imune induzida pela vacina contra *Francisella orientalis* via imersão desenvolvida no presente estudo para imunoprofilaxia em tilápia do Nilo, a realização de reforços vacinais com intervalos a serem definidos, como ocorre nas vacinações para *Y. ruckeri* em truta arco-íris (Deshmukh et al., 2012; Bøgwald & Dalmo, 2019), *V. anguillarum* e *P. damsela* subsp. *piscicida* em *sea bass* (*Dicentrarchus labrax*) (Gravningen et al., 1998; Bøgwald & Dalmo, 2019), pode ser uma alternativa viável.

4.5. Conclusões

As vacinas via imersão inativadas desenvolvidas no presente estudo demonstram ser uma alternativa viável para ser testada a campo e tornar-se mais uma ferramenta no controle da franciselose em juvenis de tilápia do Nilo. Futuros estudos devem ser realizados para determinar a eficácia dos reforços vacinais e duração da resposta imune induzida por essas vacinas.

5. Considerações finais

A infecção por *Francisella orientalis* em tilápia do Nilo ainda é um desafio a ser transposto. Pois trata-se de um patógeno emergente que acarreta grande impacto econômico na cadeia produtiva.

As informações presentes na literatura a respeito do patógeno, condições ambientais, status imune do hospedeiro, bem como a interação entre os mesmos, geram obstáculos para o desenvolvimento de estratégias de controle. Logo, este estudo foi realizado de maneira ampla trazendo ferramentas preventivas (imunoprofilaxia) e de controle epidemiológico e terapêutico (susceptibilidade dos isolados; eficácia terapêutica) exequíveis e adequadas, financeira e logisticamente para serem aplicadas nas tilapiculturas nacionais.

Com os resultados aqui obtidos, espera-se que projetos subsequentes possam avaliar a vacina desenvolvida quanto a resposta imune induzida, duração da mesma, e a possibilidade de reforço vacinal e a via mais adequada para tal. Quanto aos pontos de corte epidemiológicos estabelecidos, que funcionem para acompanhamento, a fim de detectar o surgimento de isolados com susceptibilidade reduzidas e/ou resistentes. Adicionalmente, neste estudo tornou-se evidente a necessidade do licenciamento de outras bases antimicrobianas para uso aquícola, uma vez que, os fármacos licenciados apresentam-se com eficácia reduzida tanto para patógenos endêmicos, quanto para os emergentes.

6. REFERÊNCIAS

- Abu-Elala, N. M., Samir, A., Wasfy, M., & Elsayed, M. (2019). Efficacy of injectable and immersion vaccines against streptococcal infections in broodstock and offspring of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish & Shellfish Immunology*, *88*, 293–300. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.02.042>.
- Acar, J. F., Moulin, G., Page, S. W., & Pastoret, P. P. (2012). Antimicrobial resistance in animal and public health: introduction and classification of antimicrobial agents. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, *31*(1), 15–21.
- Adams, A. (2019). Progress, challenges and opportunities in fish vaccine development. *Fish & Shellfish Immunology*, *90*, 210–214. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.04.066>.
- Adams, A., & Subasinghe, R. (2021). Fish Vaccines. In *Veterinary Vaccines* (pp. 113–118). <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781119506287.ch9>.
- Afsharipour, E., Zorriehzahra, M. J., Azari Takami, G., Kakoolaki, S., Motallebi, A. A., Sharifpour, I., Faggio, C., Filippo Peritore, A., & Di Paola, D. (2021). An investigation on protective effects of the new killed vaccine against nervous necrosis virus (NNV) using histopathology and immunohistochemistry approach on the brain and eye tissues of *Acipenser stellatus* Pallas 1771. *Fish & Shellfish Immunology*, *116*, 91–97. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.06.018>.
- Alday-Sanz, V., Corsin, F., Irde, E., & Bondad-Reantaso, M. (2012). Survey on the use of veterinary medicines in aquaculture. *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper No. 547*, 29–44.
- Aldred, K. J., Kerns, R. J., & Osheroff, N. (2014). Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry*, *53*(10), 1565–1574. <https://doi.org/10.1021/bi5000564>.
- Amend, D. F. (1981a). Potency testing of fish vaccines. *Developments in Biological Standardization*, *49*, 447–454.
- Amend, D. F. (1981b). Potency testing of fish vaccines. *Dev Biol Stand*, *49*.
- Amyes, S. G. (1981). Co-trimoxazole susceptibility tests improved with separate trimethoprim and sulfamethoxazole disks. *Journal of Clinical Microbiology*, *13*(4), 613–617. <https://doi.org/10.1128/jcm.13.4.613-617.1981>.
- Andrieu, M., Rico, A., Phu, T. M., Huong, D. T. T., Phuong, N. T., & Van den Brink, P. J. (2015). Ecological risk assessment of the antibiotic enrofloxacin applied to Pangasius catfish farms in the Mekong Delta, Vietnam. *Chemosphere*, *119*, 407–414. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.06.062>.
- Armstrong, S. M., Hargrave, B. T., & Haya, K. (2005). *Antibiotic Use in Finfish Aquaculture: Modes of Action, Environmental Fate, and Microbial Resistance BT - Environmental Effects of Marine Finfish Aquaculture* (B. T. Hargrave (ed.); pp. 341–357). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/b136017>.
- Assis, G. B. N., de Oliveira, T. F., Gardner, I. A., Figueiredo, H. C. P., & Leal, C. A. G. (2017).

Sensitivity and specificity of real-time PCR and bacteriological culture for francisellosis in farm-raised Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Journal of Fish Diseases*, 40(6), 785–795. <https://doi.org/10.1111/jfd.12559>.

Aucouturier, J., Dupuis, L., & Ganne, V. (2001). Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. *Vaccine*, 19(17), 2666–2672. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(00\)00498-9](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(00)00498-9).

Austin, B., & Austin, D. A. (2016). Bacterial fish pathogens: Disease of farmed and wild fish. In *Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish, Sixth Edition* (4th ed.). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-32674-0>.

Barker, G. A., & Kehoe, E. (1995). Assessment of disc diffusion methods for susceptibility testing of *Aeromonas salmonicida*. *Aquaculture*, 134(1), 1–8. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0044-8486\(95\)00023-U](https://doi.org/10.1016/0044-8486(95)00023-U).

Baron, S., Ceccarelli, D., Dalsgaard, I., Granier, S. A., Haenen, O., Jansson, E., Madsen, L., Jouy, E., Kempf, I., Larvor, E., Morin, T., Testerink, J., Veldman, K., Mouritsen, K. K., Van Gelderen, B., Voorbergen-Laarman, M., Säker, E., Blomkvist, E., & Smith, P. (2020). Influence of incubation time on antimicrobial susceptibility testing of pathogenic *Vibrio anguillarum* and *Vibrio vulnificus* isolated from fish. *Aquaculture*, 524, 735258. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735258](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735258).

Baron, S., Granier, S. A., Larvor, E., Jouy, E., Cineux, M., Wilhelm, A., Gassilloud, B., Le Bouquin, S., Kempf, I., & Chauvin, C. (2017). *Aeromonas* Diversity and Antimicrobial Susceptibility in Freshwater—An Attempt to Set Generic Epidemiological Cut-Off Values. *Frontiers in Microbiology*, 8, 503. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00503>.

Birkbeck, T. H., Feist, S. W., & Verner - Jeffreys, D. W. (2011). Francisella infections in fish and shellfish. *Journal of Fish Diseases*, 34(3), 173–187. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2010.01226.x>.

Bøgwald, J., & Dalmo, R. (2019). Review on Immersion Vaccines for Fish: An Update 2019. *Microorganisms*, 7(12), 627. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120627>.

Bøgwald, J., & Dalmo, R. A. (2012). 10 - Developments in adjuvants for fish vaccines. In B. B. T.-I. D. in A. Austin (Ed.), *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition* (pp. 244–274). Woodhead Publishing. [https://doi.org/https://doi.org/10.1533/9780857095732.2.244](https://doi.org/10.1533/9780857095732.2.244).

Bondad-Reantaso, M. G., Subasinghe, R. P., Arthur, J. R., Ogawa, K., Chinabut, S., Adlard, R., Tan, Z., & Shariff, M. (2005). Disease and health management in Asian aquaculture. *Veterinary Parasitology*, 132(3–4), 249–272. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.07.005>.

Bortolotte, A. R., Daniel, D., & Reyes, F. G. R. (2021). Occurrence of antimicrobial residues in tilapia (*Oreochromis niloticus*) fillets produced in Brazil and available at the retail market. *Food Research International*, 140, 109865. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109865](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109865).

Bowser, P. R., & Babish, J. G. (1991). Clinical pharmacology and efficacy of fluoroquinolones in fish. *Annual Review of Fish Diseases*, 1, 63–66. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0959-8030\(91\)90022-C](https://doi.org/10.1016/0959-8030(91)90022-C).

Bowser, P. R., Wooster, G. A., & Hsu, H.-M. (1994). Laboratory Efficacy of Enrofloxacin for the Control of *Aeromonas salmonicida* Infection in Rainbow Trout. *Journal of Aquatic Animal Health*, 6(4), 288–291. [https://doi.org/10.1577/1548-8667\(1994\)006<0288:LEOEFT>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8667(1994)006<0288:LEOEFT>2.3.CO;2).

Briones, E., Colino, C. I., & Lanao, J. M. (2008). Delivery systems to increase the selectivity of antibiotics in phagocytic cells. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 125(3), 210–227. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.10.027>.

Bruun, M. S., Madsen, L., & Dalsgaard, I. (2003). Efficiency of oxytetracycline treatment in rainbow trout experimentally infected with *Flavobacterium psychrophilum* strains having different in vitro antibiotic susceptibilities. *Aquaculture*, 215(1), 11–20. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00897-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00897-3).

Bush, K. (2018). Past and Present Perspectives on β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(10), e01076-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.01076-18>.

Bushby, S. R. (1975). Synergy of trimethoprim-sulfamethoxazole. *Canadian Medical Association Journal*, 112(13 Spec No), 63–66.

Carvalho-Castro, G. A., Lopes, C. O., Leal, C. A. G., Cardoso, P. G., Leite, R. C., & Figueiredo, H. C. P. (2010). Detection of type III secretion system genes in *Aeromonas hydrophila* and their relationship with virulence in Nile tilapia. *Veterinary Microbiology*, 144(3), 371–376. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.01.021>.

Caspar, Y., & Maurin, M. (2017). *Francisella tularensis* Susceptibility to Antibiotics: A Comprehensive Review of the Data Obtained In vitro and in Animal Models. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 122.

Castello Branco, L., Rodrigues, M. V. N., & Reyes, F. G. R. (2021). Effect of food processing (fish burger preparation and frying) on residual levels of enrofloxacin and ciprofloxacin. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 38(10), 1689–1700. <https://doi.org/10.1080/19440049.2021.1941303>.

Chi, Z., Liu, R., You, H., Ma, S., Cui, H., & Zhang, Q. (2014). Probing the *In Vitro* Cytotoxicity of the Veterinary Drug Oxytetracycline. *PLOS ONE*, 9(7), e102334. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102334>.

Chideroli, R. T., Amoroso, N., Mainardi, R. M., Suphoronski, S. A., de Padua, S. B., Alfieri, A. F., Alfieri, A. A., Mosela, M., Moralez, A. T. P., de Oliveira, A. G., Zanol, R., Di Santis, G. W., & Pereira, U. P. (2017). Emergence of a new multidrug-resistant and highly virulent serotype of *Streptococcus agalactiae* in fish farms from Brazil. *Aquaculture*, 479, 45–51. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.05.013>.

Chopra, I., & Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 65(2), 232–260. <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001>.

Chun, J., Oren, A., Ventosa, A., Christensen, H., Arahal, D. R., da Costa, M. S., Rooney, A. P., Yi, H., Xu, X.-W., De Meyer, S., & Trujillo, M. E. (2018). Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *International Journal of Systematic and*

Evolutionary Microbiology, 68(1), 461–466. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002516>.

Ciufo, S., Kannan, S., Sharma, S., Badretdin, A., Clark, K., Turner, S., Brover, S., Schoch, C. L., Kimchi, A., & DiCuccio, M. (2018). Using average nucleotide identity to improve taxonomic assignments in prokaryotic genomes at the NCBI. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(7), 2386–2392. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002809>.

CLSI. (2006). Methods for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing of Bacteria Isolated From Aquatic Animals. *VET03A -Clinical and Laboratory Standards Institute*.

CLSI. (2014). Methods for Broth Dilution Susceptibility Testing of Bacteria Isolated From Aquatic Animals. *VET04-A2. The Clinical and Laboratory Standards Institute*, 56.

CLSI. (2020a). Methods for Antimicrobial Broth Dilution and Disk Diffusion Susceptibility Testing of Bacteria Isolated From Aquatic Animals. *VET03-Clinical and Laboratory Standards Institute*, 122. <https://clsi.org/standards/products/veterinary-medicine/documents/vet03/>.

CLSI. (2020b). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacteria Isolated From Aquatic Animals. *VET04-Clinical and Laboratory Standards Institute*, 88. <https://clsi.org/standards/products/veterinary-medicine/documents/vet04/>.

Contreras-Lynch, S., Smith, P., Olmos, P., Loy, M. E., Finnegan, W., & Miranda, C. D. (2017). A Novel and Validated Protocol for Performing MIC Tests to Determine the Susceptibility of *Piscirickettsia salmonis* Isolates to Florfenicol and Oxytetracycline. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1255. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01255>.

Cunha, E. A. P. (2017). *Personal Communication*.

Dadar, M., Dhama, K., Vakharia, V. N., Hoseinifar, S. H., Karthik, K., Tiwari, R., Khandia, R., Munjal, A., Salgado-Miranda, C., & Joshi, S. K. (2017). Advances in Aquaculture Vaccines Against Fish Pathogens: Global Status and Current Trends. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 25(3), 184–217. <https://doi.org/10.1080/23308249.2016.1261277>.

Dale, B. A., & Greenberg, G. R. (1972). Effect of the folic acid analogue, trimethoprim, on growth, macromolecular synthesis, and incorporation of exogenous thymine in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 110(3), 905–916. <https://doi.org/10.1128/jb.110.3.905-916.1972>.

Dalmo, R. A., Bogwald, J., & Tafalla, C. (2016). Adjuvants and Delivery Methods: Current and Novel. In Alexandra Adams (Ed.), *Fish Vaccines* (pp. 75–104). Springer Basel. <https://doi.org/10.1007/978-3-0348-0980-1>.

Darwish, A. M., Rawles, S. D., & Griffin, B. R. (2002). Laboratory Efficacy of Oxytetracycline for the Control of *Streptococcus iniae* Infection in Blue Tilapia. *Journal of Aquatic Animal Health*, 14(3), 184–190. [https://doi.org/10.1577/1548-8667\(2002\)014<0184:LEOOF>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8667(2002)014<0184:LEOOF>2.0.CO;2).

Declercq, A. M., Boyen, F., Van den Broeck, W., Bossier, P., Karsi, A., Haesebrouck, F., & Decostere, A. (2013). Antimicrobial susceptibility pattern of *Flavobacterium columnare* isolates collected worldwide from 17 fish species. *Journal of Fish Diseases*, 36(1), 45–55. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2012.01410.x>.

- Delphino, M. K. V. C., Leal, C. A. G., Gardner, I. A., Assis, G. B. N., Roriz, G. D., Ferreira, F., Figueiredo, H. C. P., & Gonçalves, V. S. P. (2019). Seasonal dynamics of bacterial pathogens of Nile tilapia farmed in a Brazilian reservoir. *Aquaculture*, 498, 100–108. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.023>.
- DePaola, A., Peeler, J. T., & Rodrick, G. E. (1995). Effect of oxytetracycline-medicated feed on antibiotic resistance of gram-negative bacteria in catfish ponds. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(6), 2335–2340..
- Deshmukh, S., Raida, M. K., Dalsgaard, I., Chettri, J. K., Kania, P. W., & Buchmann, K. (2012). Comparative protection of two different commercial vaccines against *Yersinia ruckeri* serotype O1 and biotype 2 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 145(1–2), 379–385. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.12.014>.
- Dhar, A. K., Manna, S. K., & Thomas Allnut, F. C. (2014). Viral vaccines for farmed finfish. *Virusdisease*, 25(1), 1–17. <https://doi.org/10.1007/s13337-013-0186-4>.
- Dixon, B. A. (2000). Encyclopedia of Aquaculture. In R. R. Stickney (Ed.), *Antibiotics*. Wiley-Interscience Publication. http://www.chanthaburi.buu.ac.th/~chalee/ref/Encyclopedia_Aquaculture.pdf.
- Douglas, I., Ruane, N., Geary, M., Carroll, C., T.A. Fleming, G., McMurray, J., & Smith, P. (2007). The advantages of the use of discs containing single agents in disc diffusion testing of the susceptibility of *Aeromonas salmonicida* to potentiated sulphonamides. *Aquaculture*, 272, 118–125. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.08.042>.
- Duodu, S., Larsson, P., Sjödin, A., Soto, E., Forsman, M., & Colquhoun, D. J. (2012). Real-time PCR assays targeting unique DNA sequences of fish-pathogenic *Francisella noatunensis* subspecies *noatunensis* and *orientalis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 101(3), 225–234. <https://doi.org/10.3354/dao02514>.
- Duodu, S., Wan, X., Tandstad, N., Larsson, P., Myrtenäs, K., Sjödin, A., Forsman, M., & Colquhoun, D. (2013). An improved multiple-locus variable-number of tandem repeat analysis (MLVA) for the fish pathogen *Francisella noatunensis* using capillary electrophoresis. *BMC Veterinary Research*, 9, 252. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-252>.
- Elangovan, P., Cbt, R., Ahilan, B., Jeevagan, I., & Renuhadevi, M. (2019). Tilapia – An Excellent Candidate Species for World Aquaculture: A Review. *Annual Research & Review in Biology*, 31(3), 1–14. <https://doi.org/10.9734/arrb/2019/v31i330052>.
- Evensen, Ø. (2016). Immunization Strategies against *Piscirickettsia salmonis* Infections: Review of Vaccination Approaches and Modalities and Their Associated Immune Response Profiles. *Frontiers in Immunology*, 7, 482. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2016.00482>.
- Evensen, Øystein. (2009). Development in fish vaccinology with focus on delivery methodologies, adjuvants and formulations. *Options Méditerranéennes*, 86, 177–186.
- Evensen, Øystein. (2016). Development of Fish Vaccines: Focusing on Methods. In Alexandra Adams (Ed.), *Fish Vaccines* (pp. 53–74). Springer Basel. <https://doi.org/10.1007/978-3-0348-0980-1>.

Fan, J., Shan, Q., Wang, J., Liu, S., Li, L., & Zheng, G. (2017). Comparative pharmacokinetics of enrofloxacin in healthy and *Aeromonas hydrophila*-infected crucian carp (*Carassius auratus gibelio*). *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 40(5), 580–582. <https://doi.org/10.1111/jvp.12392>.

Fang, X., Liu, X., Liu, W., & Lu, C. (2012). Pharmacokinetics of enrofloxacin in allogynogenetic silver crucian carp, *Carassius auratus gibelio*. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 35(4), 397–401. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2011.01337.x>.

FAO. (2005). Cultured aquatic species information programme *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, 2, 12. http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis_niloticus/en.

FAO. (2015). FAO Statistical Pocketbook. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, 236. <https://doi.org/978-92-5-108802-9>.

FAO. (2018). State of Fisheries and Aquaculture in the world. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, 227. <https://doi.org/issn 10>.

FAO. (2019). *Aquaculture development. Recommendations for prudent and responsible use of veterinary medicines in aquaculture.* (n. 5, Supp). <https://www.fao.org/3/ca7029en/CA7029EN.pdf>.

FAO. (2020). *The State of World Fisheries and Aquaculture. Sustainability in action.* 224. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>.

Faria, F. C., Leal, C. A. G., Carvalho-Castro, G. A., Leite, R. C., & Figueiredo, H. C. P. (2013). Carrier state induced by oxytetracycline therapy against streptococcosis in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Journal of Fish Diseases*, 37(9), 853–857. <https://doi.org/10.1111/jfd.12177>.

Favero, L. M., Facimoto, C. T., Chideroli, R. T., da Costa, A. R., Umezu, D. F., Honda, B. T. B., de Oliveira Junior, A. G., Flaiban, K. K. M. da C., Di Santis, G. W., & Pereira, U. de P. (2021). Administration of dehydrated oxytetracycline effectively reduces francisellosis mortality in Nile tilapia. *Aquaculture Research*, n/a(n/a). <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/are.15250>.

FDA. (2011). Aquaculture Drugs. *Food and Drug Administration Fish and Fishery: Products Hazards and Controls Guidance*, 183–208.

Ferone, R., Bushby, S. R., Burchall, J. J., Moore, W. D., & Smith, D. (1975). Identification of Harper-Cawston factor as thymidine phosphorylase and removal from media of substances interfering with susceptibility testing to sulfonamides and diaminopyrimidines. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 7(1), 91–98. <https://doi.org/10.1128/aac.7.1.91>.

Figueiredo, H. C., Netto, L. N., Leal, C. A. G., Pereira, U., & Mian, G. (2012). *Streptococcus iniae* outbreaks in Brazilian Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) farms. *Brazilian Journal of Microbiology: [Publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 43(2), 576–580. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000200019>.

Figueiredo, H. C. P., Klesius, P. H., Arias, C. R., Evans, J., Shoemaker, C. A., Pereira Jr, D. J.,

& Peixoto, M. T. D. (2005). Isolation and characterization of strains of *Flavobacterium columnare* from Brazil. *Journal of Fish Diseases*, 28(4), 199–204. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2005.00616.x>.

FROST, P., & NESS, A. (1997). Vaccination of Atlantic salmon with recombinant VP2 of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV), added to a multivalent vaccine, suppresses viral replication following IPNV challenge. *Fish & Shellfish Immunology*, 7(8), 609–619. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/fsim.1997.0113>.

Fukuda, Y., Okamura, A., Nishiyama, M., Kawakami, H., Kamaishi, T., & Yoshinaga, T. (2002). Granulomatosis of Cultured Three-line Grunt *Parapristipoma trilineatum* Caused by an Intracellular Bacterium. *Fish Pathology*, 37, 119–124. <https://doi.org/10.3147/jsfp.37.119>.

Gaikowski, M. P., Wolf, J. C., Schleis, S. M., & Gingerich, W. H. (2003). Safety of Oxytetracycline (Terramycin TM-100F) Administered in Feed to Hybrid Striped Bass, Walleyes, and Yellow Perch. *Journal of Aquatic Animal Health*, 15(4), 274–286. <https://doi.org/10.1577/H03-042.1>.

Ge, M.-C., Kuo, S.-F., Chang, S.-C., Chien, C.-C., You, H.-L., & Lu, J.-J. (2019). Antimicrobial Susceptibility and Virulence Surveillance of *Campylobacter* spp. Isolated From Patients in Two Tertiary Medical Centers in Taiwan. *Frontiers in Microbiology*, 9, 3186. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.03186>.

Gieseke, C. M., Crosby, T. C., & Woods, L. C. 3rd. (2017). Provisional epidemiological cutoff values for standard broth microdilution susceptibility testing of *Flavobacterium columnare*. *Journal of Fish Diseases*, 40(5), 679–686. <https://doi.org/10.1111/jfd.12549>.

Giguère, S., Dowling, P. M., & Prescott, J. F. (2013). Fluoroquinolones. In S. Giguère, P. M. Dowling, & J. F. Prescott (Eds.), *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine* (5th ed., pp. 295–314). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781118675014.ch18>.

Gonçalves, L. A., de Castro Soares, S., Pereira, F. L., Dorella, F. A., de Carvalho, A. F., de Freitas Almeida, G. M., Leal, C. A. G., Azevedo, V., & Figueiredo, H. C. P. (2016). Complete genome sequences of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* strains FNO12, FNO24 and FNO190: a fish pathogen with genomic clonal behavior. *Standards in Genomic Sciences*, 11, 30. <https://doi.org/10.1186/s40793-016-0151-0>.

Gravningen, K., Thorarinsson, R., Johansen, L. H., Nissen, B., Rikardsen, K. S., Greger, E., & Vigneulle, M. (1998). Bivalent vaccines for sea bass (*Dicentrarchus labrax*) against vibriosis and pasteurellosis. *Journal of Applied Ichthyology*, 14(3-4), 159–162. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.1998.tb00635.x>.

Gudding, R. (2014). Vaccination as a Preventive Measure. In R. Gudding, Ø. Evensen, & A. Lillehaug (Eds.), *Fish Vaccination* (1st ed., pp. 12–21). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118806913.ch2>.

Gudding, Roar. (2012). Disease prevention as basis for sustainable aquaculture. Part 1- Contributed Papers on Understanding the use of Veterinary Medicine in Aquaculture. In M. G. Bondad-Reantaso, J. Richard Arthur, & R. P. Subasingue (Eds.), *Improving biosecurity through prudent and responsible use of veterinary medicines in aquatic food production* (pp. 141–146). FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper. <https://doi.org/10.13140/2.1.2229.3441>.

Guidi, L. R., Santos, F. A., Ribeiro, A. C. S. R., Fernandes, C., Silva, L. H. M., & Gloria, M. B. A. (2018). Quinolones and tetracyclines in aquaculture fish by a simple and rapid LC-MS/MS method. *Food Chemistry*, 245, 1232–1238. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.094>.

Hartman, P. G. (1993). Molecular Aspects and Mechanism of Action of Dihydrofolate Reductase Inhibitors. *Journal of Chemotherapy*, 5(6), 369–376. <https://doi.org/10.1080/1120009X.1993.11741083>.

Henriksson, P. J. G., Rico, A., Troell, M., Klinger, D. H., Buschmann, A. H., Saksida, S., Chadag, M. V., & Zhang, W. (2018). Unpacking factors influencing antimicrobial use in global aquaculture and their implication for management: a review from a systems perspective. *Sustainability Science*, 13(4), 1105–1120. <https://doi.org/10.1007/s11625-017-0511-8>.

Hoare, R., Ngo, T. P. H., Bartie, K. L., & Adams, A. (2017). Efficacy of a polyvalent immersion vaccine against *Flavobacterium psychrophilum* and evaluation of immune response to vaccination in rainbow trout fry (*Onchorynchus mykiss* L.). *Veterinary Research*, 48(1), 43. <https://doi.org/10.1186/s13567-017-0448-z>.

Hsieh, C., Tung, M., Tu, C., Chang, C., & Tsai, S.-S. (2006). Enzootics of visceral granulomas associated with *Francisella*-like organism infection in tilapia (*Oreochromis* spp.). *Aquaculture*, 254, 129–138. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.03.044>.

Hsu, H.-M., Wooster, G. A., & Bowser, P. R. (1994). Efficacy of Enrofloxacin for the Treatment of Salmonids with Bacterial Kidney Disease, Caused by *Renibacterium salmoninarum*. *Journal of Aquatic Animal Health*, 6(3), 220–223. [https://doi.org/10.1577/1548-8667\(1994\)006<0220:EOEFTT>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8667(1994)006<0220:EOEFTT>2.3.CO;2).

Hwang, J. Y., Kwon, M.-G., Kim, Y. J., Jung, S.-H., Park, M.-A., & Son, M.-H. (2017). Montanide IMS 1312 VG adjuvant enhances the efficacy of immersion vaccine of inactivated viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 60, 420–425. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2016.12.011>.

IBGE. (2019). *Pesquisa da Pecuária Municipal*. https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/media/com_media/ibge/arquivos/9130d7d3e67662a2277b97bde61a52d0.pdf.

IBGE. (2020). Produção da Pecuária Municipal. *Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística*, 1–8. file:///C:/Users/Thais/Desktop/IBGE 2019A.pdf.

Iregui, C. A., Vasquez, G. M., Rey, A. L., & Verjan, N. (2011). Piscirickettsia-Like Organisms as a Cause of Acute Necrotic Lesions in Colombian Tilapia Larvae. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23(1), 147–151. <https://doi.org/10.1177/104063871102300128>.

Jahan, F., Faruk, M., & Azad, K. (2021). Use of Extra-label Drugs in Commercial Aquaculture. *Journal of Bangladesh Agricultural University*, 19(1), 160–167. <https://doi.org/10.5455/JBAU.14479>.

Jantrakajorn, S., & Wongtavatchai, J. (2016). Francisella Infection in Cultured Tilapia in Thailand and the Inflammatory Cytokine Response. *Journal of Aquatic Animal Health*, 28(2), 97–106. <https://doi.org/10.1080/08997659.2015.1135198>.

- Jeffery, K. R., Stone, D., & SW, Feist, S. W. (2010). An outbreak of disease caused by *Francisella* sp. in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* at a recirculation fish farm in the UK. *Diseases of Aquatic Organisms*, 91(2), 161–165. <http://www.int-res.com/abstracts/dao/v91/n2/p161-165/>.
- Joneberg, J., Rylander, M., Galas, M. F., C., C., & Kronvall, G. (2003). Analysis of parameters and validation of method for normalized interpretation of antimicrobial resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 21(6), 525–535.
- Jorge, S., & Dellagostin, O. A. (2017). The development of veterinary vaccines: a review of traditional methods and modern biotechnology approaches. *Biotechnology Research and Innovation*, 1(1), 6–13. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biori.2017.10.001>.
- Julinta, R., Abraham, T. J., Roy, A., Singha, J., Dash, G., Mali, P., Talagunda Srinivasan, N., Sar, T., Patil, P., & Kumar, K. (2019). Effect of Oxytetracycline-dosing on the Growth, Safety and Intestinal Histology of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) Juveniles. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 8, 2708–2724. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.808.313>.
- Junior, J. A. F., Leal, C. A. G., de Oliveira, T. F., Nascimento, K. A., de Macêdo, J. T. S. A., & Pedroso, P. M. O. (2020). Anatomopathological characterization and etiology of lesions on Nile tilapia fillets (*Oreochromis niloticus*) caused by bacterial pathogens. *Aquaculture*, 526, 735387. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735387>.
- Kahlmeter, G. (2014). Defining antibiotic resistance-towards international harmonization. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 119(2), 78–86. <https://doi.org/10.3109/03009734.2014.901446>.
- Kaldestad, M., GT, H., Rønneseth, A., & HI, W. (2014). Antibiotic uptake by cultured Atlantic cod leucocytes and effect on intracellular *Francisella noatunensis* subsp. *noatunensis* replication . *Diseases of Aquatic Organisms*, 108(1), 11–21. <https://www.int-res.com/abstracts/dao/v108/n1/p11-21/>.
- Kang, H.-S., Lee, S.-B., Shin, D., Jeong, J., Hong, J.-H., & Rhee, G.-S. (2018). Occurrence of veterinary drug residues in farmed fishery products in South Korea. *Food Control*, 85, 57–65. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.09.019>.
- Kim, M., Oh, H.-S., Park, S.-C., & Chun, J. (2014). Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(Pt 2), 346–351. <https://doi.org/10.1099/ijcs.0.059774-0>.
- King, D. T., Sobhanifar, S., & Strynadka, N. C. J. (2017). The Mechanisms of Resistance to β -Lactam Antibiotics. In M. Gotte, A. Berghuis, G. Matlashewski, M. Wainberg, & D. Sheppard (Eds.), *Handbook of Antimicrobial Resistance* (pp. 177–202). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0667-3_10-1.
- Koch, A. E., & Burchall, J. J. (1971). Reversal of the antimicrobial activity of trimethoprim by thymidine in commercially prepared media. *Applied Microbiology*, 22(5), 812–817.
- Kreizinger, Z., Makrai, L., Helyes, G., Magyar, T., Erdelyi, K., & Gyuranecz, M. (2013). Antimicrobial susceptibility of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* strains from Hungary,

Central Europe. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(2), 370–373. <https://doi.org/10.1093/jac/dks399>.

Kronvall, G. (2003). Determination of the real standard distribution of susceptible strains in zone histograms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22(1), 7–13.

Kronvall, G., & Smith, P. (2016). Normalized resistance interpretation, the NRI method. *APMIS*, 124(12), 1023–1030. <https://doi.org/10.1111/apm.12624>.

Kubitza, F. (2003). A evolução da tilapicultura no Brasil: produção e mercados. *Panorama Da Aquicultura*, 25–33. http://www.aquaimagem.com.br/docs/Pan76_Kubitza.pdf.

Kyuchukova, R., Milanova, A., Pavlov, A., & Lashev, L. (2015). Comparison of plasma and tissue disposition of enrofloxacin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and common carp (*Cyprinus carpio*) after a single oral administration. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 32(1), 35–39. <https://doi.org/10.1080/19440049.2014.983998>.

Leal, C. A. G., Carvalho-Castro, G. A., Sacchetin, P. S. C., Lopes, C. O., Moraes, A. M., & Figueiredo, H. C. P. (2010). Oral and parenteral vaccines against *Flavobacterium columnare*: evaluation of humoral immune response by ELISA and in vivo efficiency in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture International*, 18(4), 657–666. <https://doi.org/10.1007/s10499-009-9287-x>.

Leal, C A G, Tavares, G., & Figueiredo, H. C. P. (2014). Outbreaks and genetic diversity of *Francisella noatunensis* subsp *orientalis* isolated from farm-raised Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Brazil. *Genetics and Molecular Research: GMR*, 13, 5704–5712. <https://doi.org/10.4238/2014.July.25.26>.

Leal, Carlos Augusto Gomes, Queiroz, G. A., & Figueiredo, H. C. P. (2018). Franciselose: um desafio de inverno para a tilapicultura brasileira- Parte 1. *Panorama Da Aquicultura*, 27(166), 24–31.

Leal, Carlos Augusto Gomes, Queiroz, G. A., & Figueiredo, H. C. P. (2018). Franciselose: um desafio de inverno para a tilapicultura brasileira- Parte 2. *Panorama Da Aquicultura*, 28(166), 25–35.

Levinson, W. (2016). Fármacos Antimicrobianos: Mecanismo de Ação. In S. Fraga (Ed.), *Microbiologia Médica e Imunologia- Parte I: Bacteriologia Básica* (13th ed., pp. 69–85). McGraw Hill Brasil. <https://books.google.com.br/books?id=OFDWCwAAQBAJ>.

Lillehaug, A. (2014). Vaccination Strategies and Procedures. In R. GUDDING, Ø. EVENSEN, & A. LILLEHAUG (Eds.), *Fish Vaccination* (pp. 140–152). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/doi:10.1002/9781118806913.ch12>.

Limbu, S. M., Chen, L.-Q., Zhang, M.-L., & Du, Z.-Y. (2021). A global analysis on the systemic effects of antibiotics in cultured fish and their potential human health risk: a review. *Reviews in Aquaculture*, 13(2), 1015–1059. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/raq.12511>.

Liu, S., Dong, G., Zhao, H., Chen, M., Quan, W., & Qu, B. (2018). Occurrence and risk assessment of fluoroquinolones and tetracyclines in cultured fish from a coastal region of northern China. *Environmental Science and Pollution Research International*, 25(8), 8035–8043. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-1177-6>.

Loughman, K., Hall, J., Knowlton, S., Sindeldecker, D., Gilson, T., Schmitt, D. M., Birch, J. W.-M., Gajtko, T., Kobe, B. N., Florjanczyk, A., Ingram, J., Bakshi, C. S., & Horzempa, J. (2016). Temperature-Dependent Gentamicin Resistance of *Francisella tularensis* is Mediated by Uptake Modulation. *Frontiers in Microbiology*, 7, 37. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.00037>.

Love, D. C., Fry, J. P., Cabello, F., Good, C. M., & Lunestad, B. T. (2020). Veterinary drug use in United States net pen Salmon aquaculture: Implications for drug use policy. *Aquaculture*, 518, 734820. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734820>.

Lulijwa, R., Rupia, E. J., & Alfaro, A. C. (2019). Antibiotic use in aquaculture, policies and regulation, health and environmental risks: a review of the top 15 major producers. *Reviews in Aquaculture*, 12(2), 640–663. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/raq.12344>.

Lüllmann, H., Mohr, K., & Hein, L. (2016). *Farmacologia: Texto e Atlas* (L. B. Lima (ed.); 7th ed.). Artmed Editora. <https://books.google.com.br/books?id=e5W2DQAAQBAJ>.

Ma, J., Bruce, T. J., Jones, E. M., & Cain, K. D. (2019). A Review of Fish Vaccine Development Strategies: Conventional Methods and Modern Biotechnological Approaches. *Microorganisms*, 7(11), 569. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7110569>.

Maekawa, S., Pulpipat, T., Wang, P.-C., & Chen, S.-C. (2021). Transcriptome analysis of immune- and iron-related genes after *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 111, 36–48. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.11.009>.

MAPA. (2018). Pan-Br Agro- Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no âmbito da Agropecuária. In *Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA* (Issue 1). <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/programas-especiais/resistencia-antimicrobianos/pan-br-agro>.

Mauel, M., Miller, D., Frazier, K., Liggett, A., Styer, L., Montgomery-Brock, D., & Brock, J. (2003). Characterization of a piscirickettsiosis-like disease in Hawaiian tilapia. *Diseases of Aquatic Organisms*, 53, 249–255. <https://doi.org/10.3354/dao053249>.

Mauel, M J, Soto, E., Moralis, J. A., & Hawke, J. (2007). A piscirickettsiosis-like syndrome in cultured Nile tilapia in Latin America with *Francisella* spp. as the pathogenic agent. *Journal of Aquatic Animal Health*, 19(1), 27–34. <https://doi.org/10.1577/H06-025.1>.

Mauel, Michael J, Miller, D. L., Styer, E., Poudel, D. B., Yanong, R. P. E., Goodwin, A. E., & Schwedler, T. E. (2005). Occurrence of Piscirickettsiosis-like syndrome in tilapia in the continental United States. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation : Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 17(6), 601–605. <https://doi.org/10.1177/104063870501700616>.

Maurin, M., & Raoult, D. (1993). Antibiotic Penetration within Eukariotic cells. In First (Ed.), *Antimicrobial Agents and Intracellular Pathogens* (pp. 23–35). Taylor & Francis. <https://books.google.com.pr/books?id=B9BbXGvpTYIC>.

Medina, E., & Guzmán, C. A. (2000). Modulation of immune responses following antigen administration by mucosal route. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 27(4), 305–

311. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2000.tb01444.x>.

Mian, G. F., Godoy, D. T., Leal, C. A. G., Yuhara, T. Y., Costa, G. M., & Figueiredo, H. C. P. (2009). Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia. *Veterinary Microbiology*, *136*(1), 180–183. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.10.016>.

Miccoli, A., Saraceni, P. R., & Scapigliati, G. (2019). Vaccines and immune protection of principal Mediterranean marine fish species. *Fish & Shellfish Immunology*, *94*, 800–809. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.09.065>.

Miccoli, Andrea, Manni, M., Picchietti, S., & Scapigliati, G. (2021). State-of-the-Art Vaccine Research for Aquaculture Use: The Case of Three Economically Relevant Fish Species. *Vaccines*, *9*(140), 1–27. <https://doi.org/10.3390/vaccines9020140>.

Midtlyng, P. J. (2016). Methods for Measuring Efficacy, Safety and Potency of Fish Vaccines. In Alexandra Adams (Ed.), *Fish Vaccines* (pp. 119–142). Springer Basel. <https://doi.org/10.1007/978-3-0348-0980-1>.

Midtlyng, P. J. (1997). Vaccinated fish welfare: protection versus side-effects. *Developments in Biological Standardization*, *90*, 371–379.

Midtlyng, P. J. (2005). Critical assessment of regulatory standards and tests for fish vaccines. *Developments in Biologicals*, *121*, 219–226.

MIDTLYNG, P. J., REITAN, L. I. V. J., LILLEHAUG, A., & RAMSTAD, A. (1996). Protection, immune responses and side effects in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) vaccinated against furunculosis by different procedures. *Fish & Shellfish Immunology*, *6*(8), 599–613. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/fsim.1996.0055>.

Mikalsen, J., Olsen, A. B., Tengs, T., & Colquhoun, D. J. (2007). *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* subsp. nov., isolated from farmed Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *57*(Pt 9), 1960–1965. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64765-0>.

Miller, R A, Walker, R. D., Baya, A., Clemens, K., Coles, M., Hawke, J. P., Henricson, B. E., Hsu, H. M., Mathers, J. J., Oaks, J. L., Papapetropoulou, M., & Reimschuessel, R. (2003). Antimicrobial susceptibility testing of aquatic bacteria: quality control disk diffusion ranges for *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658 at 22 and 28 degrees C. *Journal of Clinical Microbiology*, *41*(9), 4318–4323..

Miller, Ron A, & Harbottle, H. (2018). Antimicrobial Drug Resistance in Fish Pathogens. *Microbiology Spectrum*, *6*(1). <https://www.asmscience.org/content/journal/microbiolspec/10.1128/microbiolspec.ARBA-0017-2017>.

Minogue, E., Barry, T., Carroll, C., & Smith, P. (2012). Setting epidemiological cut-off values for *Aeromonas salmonicida* disc diffusion data capable of discriminating between strains on the basis of their possession of *sulI* genes. *Aquaculture*, *364*, 329–332. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.08.013>.

Miranda, C. D., Smith, P., Rojas, R., Contreras-Lynch, S., & Vega, J. M. A. (2016).

- Antimicrobial Susceptibility of *Flavobacterium psychrophilum* from Chilean Salmon Farms and Their Epidemiological Cut-Off Values Using Agar Dilution and Disk Diffusion Methods. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1880. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01880>.
- Mohd-Aris, A., Muhamad-Sofie, M. H. N., Zamri-Saad, M., Daud, H. M., & Ina-Salwany, M. Y. (2019). Live vaccines against bacterial fish diseases: A review. *Veterinary World*, 12(11), 1806–1815. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.1806-1815>.
- Möller, S., & Ahrenfeldt, L. J. (2021). Estimating Relative Risk When Observing Zero Events-Frequentist Inference and Bayesian Credibility Intervals. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(11). <https://doi.org/10.3390/ijerph18115527>.
- Monfared, S., Mostafa, A., Pourbakhsh, S., Fallahi, R., Soltanian, S., & Yektaseresht, A. (2018). An inactivated infectious pancreatic necrosis virus immersion vaccine used in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Walbaum, 1792) and the effect of Montanide IMS 1312 VG as adjuvant on the vaccine efficacy. *Iranian Journal of Aquatic Animal Health*, 4. <https://doi.org/10.29252/ijaah.4.1.69>.
- Monteiro, S. H., Francisco, J. G., Campion, T. F., Pimpinato, R. F., Moura Andrade, G. C. R., Garcia, F., & Tornisielo, V. L. (2015). Multiresidue antimicrobial determination in Nile tilapia (*Oreochromis Niloticus*) cage farming by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Aquaculture*, 447, 37–43. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.07.002>.
- Morrison, D. B., & Saksida, S. (2013). Trends in antimicrobial use in Marine Harvest Canada farmed salmon production in British Columbia (2003-2011). *The Canadian Veterinary Journal = La Revue Veterinaire Canadienne*, 54(12), 1160–1163. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24293677>.
- Munang'andu, H. M., Mutoloki, S., & Evensen, Ø. (2014). Non-replicating Vaccines. In A. Adams (Ed.), *Fish Vaccination* (pp. 22–32). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118806913.ch3>.
- Munang'andu, H. M., Mutoloki, S., & Evensen, Ø. (2015). An Overview of Challenges Limiting the Design of Protective Mucosal Vaccines for Finfish. *Frontiers in Immunology*, 6, 542. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2015.00542>.
- Munang'andu, H., Mutoloki, S., & Evensen, Ø. (2015). A review of the immunological mechanisms following mucosal vaccination of finfish. *Front Immunol*, 6.
- Munang'andu, H., Hetron, & Evensen, Ø. (2018). Correlates of protective immunity for fish vaccines. *Fish & Shellfish Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.03.060>.
- Munang'andu, H., Hetron M, Fredriksen, B. N., Mutoloki, S., Brudeseth, B., Kuo, T.-Y., Marjara, I. S., Dalmo, R. A., & Evensen, O. (2012). Comparison of vaccine efficacy for different antigen delivery systems for infectious pancreatic necrosis virus vaccines in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in a cohabitation challenge model. *Vaccine*, 30(27), 4007–4016. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.04.039>.
- Munang'andu, M. H. (2018). Intracellular Bacterial Infections: A Challenge for Developing Cellular Mediated Immunity Vaccines for Farmed Fish. In *Microorganisms* (Vol. 6, Issue 2). <https://doi.org/10.3390/microorganisms6020033>.

Netto, L. N., Leal, C. A. G., & Figueiredo, H. C. P. (2011). *Streptococcus dysgalactiae* as an agent of septicaemia in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Journal of Fish Diseases*, *34*(3), 251–254. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2010.01220.x>.

Ngo, T. P. H., Smith, P., Bartie, K. L., Thompson, K. D., Verner-Jeffreys, D. W., Hoare, R., & Adams, A. (2018). Antimicrobial susceptibility of *Flavobacterium psychrophilum* isolates from the United Kingdom. *Journal of Fish Diseases*, *41*(2), 309–320. <https://doi.org/10.1111/jfd.12730>.

Nguyen, V. V., Dong, H. T., Senapin, S., Gangnonngiw, W., Pirarat, N., Kayansamruaj, P., Rung-Ruangkijkrui, T., & Rodkhum, C. (2019). Transmission of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* from subclinically infected hybrid red tilapia broodstock (*Oreochromis* sp.) to their offspring. *Microbial Pathogenesis*, *136*, 103670. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103670>.

Nguyen, V. V., Dong, H. T., Senapin, S., Pirarat, N., & Rodkhum, C. (2015). *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*, an emerging bacterial pathogen affecting cultured red tilapia (*Oreochromis* sp.) in Thailand. *Aquaculture Research*, *47*(11), 3697–3702. <https://doi.org/10.1111/are.12802>.

Nordmo, R. (1997). Strengths and weaknesses of different challenge methods. *Developments in Biological Standardization*, *90*, 303–309.

Oidtmann, B. C., Crane, C. N., Thrush, M. A., Hill, B. J., & Peeler, E. J. (2011). Ranking freshwater fish farms for the risk of pathogen introduction and spread. *Preventive Veterinary Medicine*, *102*(4), 329–340. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2011.07.016>.

OIE. (2019). Laboratory Methodologies for Bacterial Antimicrobial Susceptibility Testing. In *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* (8th ed., pp. 1–14). <https://www.oie.int/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/#ui-id-2>.

OIE. (2020). *Standards, Guidelines and Resolutions on Antimicrobial Resistance and the use of antimicrobial agents* (2nd ed.). <https://www.oie.int/app/uploads/2021/03/book-amr-ang-fnl-lr.pdf>.

OIE. (2021). Development and Harmonisation of National Antimicrobial Resistance Surveillance and Monitoring Programmes for Aquatic Animals. In *Aquatic Animal Health Code* (23rd ed., pp. 1–4). Organization for Animal Health. https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahc/current/chapitre_antibio_development_harmonisation.pdf.

Okocha, R. C., Olatoye, I. O., & Adedeji, O. B. (2018). Food safety impacts of antimicrobial use and their residues in aquaculture. *Public Health Reviews*, *39*, 21. <https://doi.org/10.1186/s40985-018-0099-2>.

Oliveira, T. F., Leibowitz, M. P., & Leal, C. A. G. (2022). Local epidemiological cutoff values and antimicrobial susceptibility profile for Brazilian *Francisella orientalis* isolates. *Aquaculture*, *553*, 738054. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738054>.

Ortega, C., Mancera, G., Enríquez, R., Vargas, A., Martínez, S., Fajardo, R., Avendaño-Herrera, R., MJ, N., & Romero, A. (2016). First identification of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* causing mortality in Mexican tilapia *Oreochromis* spp. . *Diseases of Aquatic*

Organisms, 120(3), 205–215. <http://www.int-res.com/abstracts/dao/v120/n3/p205-215/>.

Ottem, K. F., Nylund, A., Karlsbakk, E., Friis-Møller, A., & Kamaishi, T. (2009). Elevation of *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* Mikalsen et al. (2007) to *Francisella noatunensis* comb. nov. [syn. *Francisella piscicida* Ottem et al. (2008) syn. nov.] and characterization of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* subsp. nov., *Journal of Applied Microbiology*, 106(4), 1231–1243. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04092.x>.

Pagano, M., & Gauvreau, K. (2018). *Principles of Biostatistics* (2nd ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780429489624>.

Paschoal, J. A. R., Quesada, S. P., Gonçalves, L. U., Cyrino, J. E. P., & Reyes, F. G. R. (2013). Depletion study and estimation of the withdrawal period for enrofloxacin in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 36(6), 594–602. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jvp.12043>.

Patel, R. M. (2012). The Guiding Principles on Antimicrobial Susceptibility Testing. *Bulletin of Pharmaceutical Research*, 2(3), 146–153..

Peeler, E. J., & Taylor, N. G. H. (2011). The application of epidemiology in aquatic animal health -opportunities and challenges. *Veterinary Research*, 42(1), 94. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-94>.

Pereira, F. L., Gonçalves, L. A., Tavares, G. C., Soares, S. de C., Dorella, F. A., de Carvalho, A. F., Leibowitz, M. P., Leal, C. A. G., Azevedo, V. A. de C., & Figueiredo, H. C. P. (2018). Complete genome sequencing of sixteen *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* isolates: A genomic approach for molecular characterization and spread dynamics of this clonal population. *Genomics*, 110(6), 442–449. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2018.10.011>.

Pereira, F. L., Tavares, G. C., de Carvalho, A. F., Rosa, J. C. C., Rezende, C. P., Leal, C. A. G., & Figueiredo, H. C. P. (2019). Effects of temperature changes in the transcriptional profile of the emerging fish pathogen *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*. *Microbial Pathogenesis*, 133, 103548. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103548>.

Pradeep, P. J., Suebsing, R., Sirithammajak, S., Kampeera, J., Turner, W., Jeffs, A., Kiatpathomchai, W., & Withyachumanarnkul, B. (2017). Vertical transmission and concurrent infection of multiple bacterial pathogens in naturally infected red tilapia (*Oreochromis* spp.). *Aquaculture Research*, 48(6), 2706–2717. <https://doi.org/10.1111/are.13102>.

Price, D., Stryhn, H., Sánchez, J., Ibarra, R., Tello, A., & St-Hilaire, S. (2016). Retrospective analysis of antibiotic treatments against Piscirickettsiosis in farmed Atlantic salmon *Salmo salar* in Chile. *Diseases of Aquatic Organisms*, 118, 227–235. <https://doi.org/10.3354/dao02978>.

Pulkkinen, K., Suomalainen, L.-R., Read, A. F., Ebert, D., Rintamaki, P., & Valtonen, E. T. (2010). Intensive fish farming and the evolution of pathogen virulence: the case of columnaris disease in Finland. *Proceedings. Biological Sciences*, 277(1681), 593–600. <https://doi.org/10.1098/rspb.2009.1659>.

Pulpipat, T., Maekawa, S., Wang, P.-C., & Chen, S.-C. (2020). Immune Responses and Protective Efficacy of a Formalin-Killed *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* Vaccine

Evaluated through Intraperitoneal and Immersion Challenge Methods in *Oreochromis niloticus*. *Vaccines*, 8(2). <https://doi.org/10.3390/vaccines8020163>.

Qiang, L., Ningqiu, L., Xiaozhe, F., Qiandong, H., Ouqin, C., Lihui, L., Defeng, Z., Guangjun, W., Guibao, S., & Shuqin, W. (2015). An outbreak of granulomatous inflammation associated with *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* in farmed tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) in China. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 34(3), 460–466. <https://doi.org/10.1007/s00343-016-4311-2>.

Quesada, S. P., Paschoal, J. A. R., & Reyes, F. G. R. (2013). Considerations on the Aquaculture Development and on the Use of Veterinary Drugs: Special Issue for Fluoroquinolones—A Review. *Journal of Food Science*, 78(9), R1321–R1333. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1750-3841.12222>.

Ramirez-Paredes, Jose G, Thompson, K. D., Metselaar, M., Shahin, K., Soto, E., Richards, R. H., Penman, D. J., Colquhoun, D. J., & Adams, A. (2017). A Polyphasic Approach for Phenotypic and Genetic Characterization of the Fastidious Aquatic Pathogen *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2324. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02324>.

Ramirez-Paredes, Jose Gustavo, Larsson, P., Thompson, K. D., Penman, D. J., Busse, H.-J., Öhrman, C., Sjödin, A., Soto, E., Richards, R. H., Adams, A., & Colquhoun, D. J. (2020). Reclassification of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* Ottem et al. 2009 as *Francisella orientalis* sp. nov., *Francisella noatunensis* subsp. *chilensis* subsp. nov. and emended description of *Francisella noatunensis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(3), 2034–2048. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004009>.

Ramirez-Paredes, Jose Gustavo, Mendoza-Roldan, M. A., Lopez-Jimena, B., Shahin, K., Metselaar, M., Thompson, K. D., Penman, D. J., Richards, R. H., & Adams, A. (2019). Whole cell inactivated autogenous vaccine effectively protects red Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) against francisellosis via intraperitoneal injection. *Journal of Fish Diseases*, 42(8), 1191–1200. <https://doi.org/10.1111/jfd.13041>.

Ravelo, C., Magariños, B., Herrero, M. C., Costa, L., Toranzo, A. E., & Romalde, J. L. (2006). Use of adjuvanted vaccines to lengthen the protection against lactococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 251(2), 153–158. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.05.027>.

Reimschuessel, R., Miller, R. A., & Giesecker, C. M. (2013). Antimicrobial Drug Use in Aquaculture. In S. Giguère, J. F. Prescott, & P. M. Dowling (Eds.), *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine* (5th ed., pp. 645–661). <https://doi.org/doi:10.1002/9781118675014.ch39>.

Reller, L. B., Weinstein, M., Jorgensen, J. H., & Ferraro, M. J. (2009). Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clinical Infectious Diseases*, 49(11), 1749–1755. <http://dx.doi.org/10.1086/647952>.

Rico, A., Phu, T. M., Satapornvanit, K., Min, J., Shahabuddin, A. M., Henriksson, P. J. G., Murray, F. J., Little, D. C., Dalsgaard, A., & Van den Brink, P. J. (2013). Use of veterinary medicines, feed additives and probiotics in four major internationally traded aquaculture species farmed in Asia. *Aquaculture*, 412–413, 231–243. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.07.028>.

- Rigos, G., Kogiannou, D., Padrós, F., Cristòfol, C., Florio, D., Fioravanti, M., & Zarza, C. (2021). Best therapeutic practices for the use of antibacterial agents in finfish aquaculture: a particular view on European seabass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*) in Mediterranean aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, *13*(3), 1285–1323. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/raq.12523>.
- Rigos, G., & Smith, P. (2015). A critical approach on pharmacokinetics, pharmacodynamics, dose optimisation and withdrawal times of oxytetracycline in aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, *7*(2), 77–106. <https://doi.org/10.1111/raq.12055>.
- Roberts, Ronald J. (2012). Fish Pathology. In R. J. Roberts (Ed.), *Fish Pathology* (4th ed.). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9781118222942>.
- Rodrigues, C. L., & Ziegelmann, P. K. (2011). Metanálise: Um Guia Prático. *Clinical & Biomedical Research*, *30*(4), 436–447.
- Rombout, J. H. W. M., & Kiron, V. (2014). Mucosal Vaccination of Fish. In *Fish Vaccination* (pp. 56–67). <https://doi.org/doi:10.1002/9781118806913.ch6>.
- Romero, J., Feijoo, C., & Navarrete, P. (2012). Antibiotics in Aquaculture – Use, Abuse and Alternatives. In E. Carvalho (Ed.), *Health and Environment in Aquaculture* (pp. 159–198). Intech. <https://doi.org/10.5772/28157>.
- Roriz, G., Delphino, M., Delphino, C., Gardner, I., Salvador, V., & Alves, P. (2017). Characterization of tilapia farming in net cages at a tropical reservoir in Brazil-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>). *Aquaculture Reports*, *6*, 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2017.03.002>.
- Ruane, N. M., Douglas, I., Geary, M., Carroll, C., Fleming, G. T. A., & Smith, P. (2007). Application of normalised resistance interpretation to disc diffusion data on the susceptibility of *Aeromonas salmonicida* to three quinolone agents. *Aquaculture*, *272*(1), 156–167. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.08.037>.
- Samanidou, V., Evaggelopoulou, E., Trötz Müller, M., Guo, X., & Lankmayr, E. (2008). Multi-residue determination of seven quinolones antibiotics in gilthead seabream using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1203*(2), 115–123. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.07.003>.
- Samuelsen, O. (2006). Pharmacokinetics of quinolones in fish: A review. *Aquaculture*, *255*(1–4), 55–75. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.12.008>.
- Sangurdekar, D. P., Zhang, Z., & Khodursky, A. B. (2011). The association of DNA damage response and nucleotide level modulation with the antibacterial mechanism of the anti-folate drug trimethoprim. *BMC Genomics*, *12*, 583. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-583>.
- Sebastião, F. A., Pilarski, F., Kearney, M. T., & Soto, E. (2017). Molecular detection of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* in cultured Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) in three Brazilian states. *Journal of Fish Diseases*, *40*(11), 1731–1735. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jfd.12636>.
- SENAR. (2018). Piscicultura : criação de tilápias em tanques-rede. In *Serviço Nacional de Aprendizagem Rural- Coleção SENAR 208* (pp. 1–111).

<https://www.cnabrazil.org.br/assets/arquivos/208-CRIAÇÃO-DE-TILÁPIAS.pdf>.

Shahin, K., Pirezan, F., Rogge, M., LaFrentz, B. R., Shrestha, R. P., Hildebrand, M., Lu, F., HogenEsch, H., & Soto, E. (2020). Development of IglC and GroEL recombinant vaccines for francisellosis in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, *105*, 341–349. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.07.045>.

Shahin, K., Shinn, A. P., Metselaar, M., Ramirez-Paredes, J. G., Monaghan, S. J., Thompson, K. D., Hoare, R., & Adams, A. (2019). Efficacy of an inactivated whole-cell injection vaccine for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L), against multiple isolates of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* from diverse geographical regions. *Fish & Shellfish Immunology*, *89*, 217–227. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.03.071>.

Sheng, L. . (2017). Future of Vaccination in Warmwater Aquaculture. *Strengthening Capacities, Policies and National Action Plans on Prudent and Responsible Use of Antimicrobials in Fisheries*, 1–29. <http://www.fao.org/fi/static-media/MeetingDocuments/WorkshopAMR17/presentations/21.pdf%0Ahttp://www.fao.org/fi/static-media/MeetingDocuments/WorkshopAMR17/presentations/19.pdf>.

Shoemaker, C. A., Klesius, P. H., Drennan, J. D., & Evans, J. J. (2011). Efficacy of a modified live *Flavobacterium columnare* vaccine in fish. *Fish & Shellfish Immunology*, *30*(1), 304–308. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.11.001>.

Silley, P. (2012). Susceptibility testing methods, resistance and breakpoints: what do these terms really mean? *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, *31*(1), 33–41..

Skov, J., Chettri, J. K., Jaafar, R. M., Kania, P. W., Dalsgaard, I., & Buchmann, K. (2018). Effects of soluble immunostimulants on mucosal immune responses in rainbow trout immersion-vaccinated against *Yersinia ruckeri*. *Aquaculture*, *492*, 237–246. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.04.011>.

Smith, P. (2012). Antibiotics in aquaculture: reducing their use and maintaining their efficacy. In B. B. T.-I. D. in A. Austin (Ed.), *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition* (pp. 161–189). Woodhead Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1533/9780857095732.2.161>.

Smith, P. (2019). *The performance of antimicrobial susceptibility testing programmes relevant to aquaculture and aquacultural products*. (FAO Fisheries and Aquaculture Circular No. 1191 (ed.); C1191 ed.). FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper. <http://www.fao.org/documents/card/en/c/ca6028en/>.

Smith, P. (2017). Laboratory determination of the susceptibility to antibiotics of bacteria isolated from aquatic animals. *Aquatic AMR Workshop-FAO-FMM/RAS/298, April*.

Smith, P. (2007). A survey of methods and protocols currently being used to determine antimicrobial susceptibility of bacteria associated with fish disease. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, *27*.

Smith, P. (2008). Antimicrobial resistance in aquaculture. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, *27*(1), 243–264.

Smith, P. (2020). Eight rules for improving the quality of papers on the antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from aquatic animals. *Diseases of Aquatic Organisms*, 139, 87–92. <https://doi.org/10.3354/dao03476>.

Smith, P., Alday-Sanz, V., Matyszczak, J., Moulin, G., Lavilla-Pitogo, C. R., & Prater, D. (2013). Monitoring and surveillance of antimicrobial resistance in microorganisms associated with aquatic animals. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 32(2), 583–593.

Smith, P., Endris, R., Kronvall, G., Thomas, V., Verner-Jeffreys, D., Wilhelm, C., & Dalsgaard, I. (2016). Epidemiological cut-off values for *Flavobacterium psychrophilum* MIC data generated by a standard test protocol. *Journal of Fish Diseases*, 39(2), 143–154. <https://doi.org/10.1111/jfd.12336>.

Smith, P., & Kronvall, G. (2015). Effect of incubation temperature and time on the precision of data generated by antibiotic disc diffusion assays. *Journal of Fish Diseases*, 38(7), 629–636. <https://doi.org/10.1111/jfd.12278>.

Smith, P., & O’Grady, P. (2006). Laboratory studies of the clinical significance of disc diffusion data for oxolinic acid against *Aeromonas salmonicida*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 26, 229–231.

Smith, Pete. (2006). Breakpoints for disc diffusion susceptibility testing of bacteria associated with fish diseases: A review of current practice. *Aquaculture*, 261(4), 1113–1121. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.05.027>.

Smith, Pete, Ruane, N. M., Douglas, I., Carroll, C., Kronvall, G., & Fleming, G. T. A. (2007). Impact of inter-lab variation on the estimation of epidemiological cut-off values for disc diffusion susceptibility test data for *Aeromonas salmonicida*. *Aquaculture*, 272(1), 168–179. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.07.216>.

Smith, Peter. (2019). *the Performance of Antimicrobial Susceptibility Testing Programmes Relevant To Aquaculture* (Vol. C1191). <http://www.fao.org/documents/card/en/c/ca6028en/>.

Smith, Peter, & Christoflogiannis, P. (2007). Application of Normalised Resistance Interpretation to the detection of multiple low-level resistance in strains of *Vibrio anguillarum* obtained from Greek fish farms. *Aquaculture*, 272(1), 223–230. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.07.232>.

Smith, Peter, Douglas, I., McMurray, J., & Carroll, C. (2009). A rapid method of improving the criteria being used to interpret disc diffusion antimicrobial susceptibility test data for bacteria associated with fish diseases. *Aquaculture*, 290(1), 172–178. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.02.017>.

Smith, Peter, & Egan, S. (2020). Critical Review of Methods Used in Published Studies of Susceptibility of *Vibrio* spp.; Lessons to Be Learnt. *Asian Fisheries Science*, 33(S1), 22–26. <https://doi.org/10.33997/j.afs.2020.33.S1.004>.

Smith, Peter, Finnegan, W., Ngo, T., & Kronvall, G. (2018). Influence of incubation temperature and time on the precision of MIC and disc diffusion antimicrobial susceptibility test data. *Aquaculture*, 490, 19–24. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.02.020>.

- Smith, Peter, & Kronvall, G. (2014). Estimating the precision of disc diffusion antibiotic susceptibility data published by the European committee on antimicrobial susceptibility testing. *APMIS : Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, 122(11), 1096–1101. <https://doi.org/10.1111/apm.12262>.
- Soltani, M., Shafiei, S., Yosefi, P., Mosavi, S., & Mokhtari, A. (2014). Effect of Montanide™ IMS 1312 VG adjuvant on efficacy of *Yersinia ruckeri* vaccine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol*, 37. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.12.027>.
- Somamoto, T., & Nakanishi, T. (2020). Mucosal delivery of fish vaccines: Local and systemic immunity following mucosal immunisations. *Fish & Shellfish Immunology*, 99, 199–207. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.01.005>.
- Soto, E., Bowles, K., & Fernandez, D. (2010). Development of a real-time PCR assay for identification and quantification of the fish pathogen *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 89(3), 199–207. <http://www.int-res.com/abstracts/dao/v89/n3/p199-207/>.
- Soto, E., Halliday-Simmonds, I., Francis, S., Kearney, M. T., & Hansen, J. D. (2015). Biofilm formation of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*. *Veterinary Microbiology*, 181(3–4), 313–317. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.10.007>.
- Soto, E, Griffin, M. J., & Tobar, J. A. (2015). Mucosal vaccines. In B. H. Beck & E. Peatman (Eds.), *Mucosal Health in Aquaculture* (pp. 297–323). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2013-0-06826-0>.
- Soto, E, Hawke, J. P., Fernandez, D., & A Morales, J. (2009). *Francisella* sp., an emerging pathogen of tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), in Costa Rica. *Journal of Fish Diseases*, 32(8), 713–722. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2009.01070.x>.
- Soto, E, Kidd, S., Gaunt, P. S., & Endris, R. (2013). Efficacy of florfenicol for control of mortality associated with *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Journal of Fish Diseases*, 36(4), 411–418. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2012.01425.x>.
- Soto, Endris, R., & Hawke, J. P. (2010). *In Vitro* and *In Vivo* Efficacy of Florfenicol for Treatment of *Francisella asiatica* Infection in Tilapia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(11), 4664 LP – 4670. <https://doi.org/10.1128/AAC.00206-10>.
- Soto, Esteban, Baumgartner, W., Wiles, J., & Hawke, J. P. (2011). *Francisella asiatica* as the causative agent of piscine francisellosis in cultured tilapia (*Oreochromis* sp.) in the United States. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23(4), 821–825. <https://doi.org/10.1177/1040638711407058>.
- Soto, Esteban, Griffin, M., Wiles, J., & Hawke, J. P. (2012). Genetic analysis and antimicrobial susceptibility of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* (syn. *F. asiatica*) isolates from fish. *Veterinary Microbiology*, 154(3), 407–412. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.07.030>.
- Soto, Esteban, Halliday-Simmonds, I., Francis, S., Fraites, T., Martínez-López, B., Wiles, J., Hawke, J. P., & Endris, R. D. (2016). Improved Broth Microdilution Method for Antimicrobial Susceptibility Testing of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*. *Journal of Aquatic Animal*

Health, 28(3), 199–207. <https://doi.org/10.1080/08997659.2016.1185051>.

Soto, Esteban, Illanes, O., Hilchie, D., Morales, J. A., Sunyakumthorn, P., Hawke, J. P., Goodwin, A. E., Riggs, A., Yanong, R. P., Pouder, D. B., Francis-Floyd, R., Arauz, M., Bogdanovic, L., & Castillo-Alcala, F. (2012). Molecular and immunohistochemical diagnosis of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 24(5), 840–845. <https://doi.org/10.1177/1040638712452108>.

Soto, Esteban, McGovern-Hopkins, K., Klinger-Bowen, R., Fox, B. K., Brock, J., Antonio, N., Waal, Z. van der, Rushton, S., Mill, A., & Tamaru, C. S. (2013). Prevalence of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* in Cultured Tilapia on the Island of Oahu, Hawaii. *Journal of Aquatic Animal Health*, 25(2), 104–109. <https://doi.org/10.1080/08997659.2013.781554>.

Soto, Esteban, Shahin, K., Talhami, J., Griffin, M., Ramirez-Paredes, J. G., & Adams, A. (2019). Characterization of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* isolated from Nile tilapia *Oreochromis niloticus* farmed in Lake Yojoa, Honduras. *Diseases of Aquatic Organisms*, 141–145. <https://doi.org/10.3354/dao03333>.

Soto, Esteban, Wiles, J., Elzer, P., Macaluso, K., & Hawke, J. P. (2011). Attenuated *Francisella asiatica* iglC mutant induces protective immunity to francisellosis in tilapia. *Vaccine*, 29(3), 593–598. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.06.040>.

Soto, Esteban, Yun, S., Lewis, J., Kearney, M. T., & Hansen, J. (2017). Interaction of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* with *Oreochromis mossambicus* bulbus arteriosus cell line. *Microbial Pathogenesis*, 105, 326–333. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2017.03.003>.

Sridhar, S., Sharma, A., Kongshaug, H., Nilsen, F., & Jonassen, I. (2012). Whole genome sequencing of the fish pathogen *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* Toba04 gives novel insights into *Francisella* evolution and pathogenicity. *BMC Genomics*, 13, 598. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-598>.

Stackebrandt, E., & Ebers, J. (2006). Taxonomic parameters revisited: Tarnished gold standards. *Microbiol Today*, 8, 6–9.

Stoffregen, D A, Backman, S. C., Perham, R. E., Bowser, P. R., & Babish, J. G. (1996). Initial Disease Report of Streptococcus iniae Infection in Hybrid Striped (Sunshine) Bass and Successful Therapeutic Intervention with the Fluoroquinolone Antibacterial Enrofloxacin. *Journal of the World Aquaculture Society*, 27(4), 420–434. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1996.tb00626.x>.

Stoffregen, Dana A, Bowser, P. R., & Babish, J. G. (1996). Antibacterial Chemotherapeutants for Finfish Aquaculture: A Synopsis of Laboratory and Field Efficacy and Safety Studies. *Journal of Aquatic Animal Health*, 8(3), 181–207. [https://doi.org/10.1577/1548-8667\(1996\)008<0181:ACFFAA>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8667(1996)008<0181:ACFFAA>2.3.CO;2).

Subasinghe, R. (2017). Fish Vaccination. *FAO-FMM/RAS/298: Strengthening Capacities, Policies and National Action Plans on Prudent and Responsible Use of Antimicrobials in Fisheries*, 1–19. http://www.fao.org/fi/static-media/MeetingDocuments/Workshop2AMR/presentations/15_Subasinghe.pdf.

Sudhagar, A., S., F., & Prabu, D. L. (2016). *Fish vaccination: A health management tool for Aquaculture*.

Sudheesh, P. S., & Cain, K. (2017). Prospects and challenges of developing and commercializing immersion vaccines for aquaculture. *International Biology Review*, 1, 20.

Sweeting, M. J., Sutton, A. J., & Lambert, P. C. (2004). What to add to nothing? Use and avoidance of continuity corrections in meta-analysis of sparse data. *Statistics in Medicine*, 23(9), 1351–1375. <https://doi.org/10.1002/sim.1761>.

Tafalla, C., Børgwald, J., & Dalmo, R. A. (2013). Adjuvants and immunostimulants in fish vaccines: Current knowledge and future perspectives. *Fish & Shellfish Immunology*, 35(6), 1740–1750. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2013.02.029>.

Tafalla, C., Børgwald, J., Dalmo, R. A., Munang'andu, H. M., & Evensen, Ø. (2014). Adjuvants in Fish Vaccines. In R. Gudding, A. Lillehaug, & Ø. Evensen (Eds.), *Fish Vaccination* (1st ed., pp. 68–84). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118806913.ch7>.

Teles, J. A. (2013). *Estudo farmacocinético da enrofloxacin em tilápia do Nilo (Oreochromis niloticus) utilizando ração medicada preparada com recobrimento polimérico*. UNICAMP-Universidade Estadual de Campinas..

Teles, J. A., Castello Branco, L. C., Del Bianchi, M., Pilarski, F., & Reyes, F. G. R. (2016). Pharmacokinetic study of enrofloxacin in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) after a single oral administration in medicated feed. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 39(2), 205–208. <https://doi.org/10.1111/jvp.12257>.

Tindall, B. J., Rosselló-Móra, R., Busse, H.-J., Ludwig, W., & Kämpfer, P. (2010). Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(Pt 1), 249–266. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.016949-0>.

Tomaso, H., Al Dahouk, S., Hofer, E., Splettstoesser, W. D., Treu, T. M., Dierich, M. P., & Neubauer, H. (2005). Antimicrobial susceptibilities of Austrian *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* biovar II strains. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26(4), 279–284. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.07.003>.

Tran Minh, P., Douny, C., Scippo, M.-L., De Pauw, E., Nguyen, Q. T., Do, H., Huynh Phuoc, V., Nguyen, P., & Dalsgaard, A. (2015). Elimination of enrofloxacin in striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) following on-farm treatment. *Aquaculture*. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.12.032>.

Trouchon, T., & Lefebvre, S. (2016). A Review of Enrofloxacin for Veterinary Use. *Open Journal of Veterinary Medicine*, 06(2), 40–58. <https://doi.org/10.4236/ojvm.2016.62006>.

Tufa, T. B. (2015). Veterinary Drug Residues in Food-animal Products: Its Risk Factors and Potential Effects on Public Health. *Journal of Veterinary Science & Technology*, 7(1), 1–7. <https://doi.org/10.4172/2157-7579.1000285>.

UE. (2019). *Regulation (EU) 2019/6 of the European Parliament and of the Council of 11 December 2018 on veterinary medicinal products and repealing Directive 2001/82/EC*. Regulation (EU) 2019/6 of the European Parliament and of the Council of 11 December 2018

on Veterinary Medicinal Products and Repealing Directive 2001/82/EC (Text with EEA Relevance). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32019R0006>.

Valenti, W. C., Barros, H. P., Moraes-Valenti, P., Bueno, G. W., & Cavalli, R. O. (2021). Aquaculture in Brazil: past, present and future. *Aquaculture Reports*, *19*, 100611. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100611>.

Viel, A., Rostang, A., Morvan, M.-L., Fournel, C., Daniel, P., Thorin, C., Baron, S., Sanders, P., & Calvez, S. (2021). Population pharmacokinetics/pharmacodynamics modelling of enrofloxacin for the three major trout pathogens *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium psychrophilum* and *Yersinia ruckeri*. *Aquaculture*, *545*, 737119. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737119>.

Wang, D., Li, S., & Lu, T. (2016). Rule of accumulation of enrofloxacin in *Acipenser baerii* and drug-induced damage to the tissues. *Experimental Biology and Medicine*, *241*(17), 1977–1984. <https://doi.org/10.1177/1535370216654995>.

Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R., Grimont, P., Krichevsky, M., Moore, L. H., Moore, W. E. C., Murray, R. G. E., Stackebrandt, E., Starr, M. P., & Truper, H. G. (1987). Report of the Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *37*(4), 463–464. <https://doi.org/10.1099/00207713-37-4-463>.

Yang, F., Yang, F., Wang, D., Zhang, C.-S., Wang, H., Song, Z.-W., Shao, H.-T., Zhang, M., Yu, M.-L., & Zheng, Y. (2021). Development and Application of a Water Temperature Related Physiologically Based Pharmacokinetic Model for Enrofloxacin and Its Metabolite Ciprofloxacin in Rainbow Trout . In *Frontiers in Veterinary Science* (Vol. 7, p. 1246). <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fvets.2020.608348>.

Yu, Y.-Y., Kong, W., Yin, Y.-X., Dong, F., Huang, Z.-Y., Yin, G.-M., Dong, S., Salinas, I., Zhang, Y.-A., & Xu, Z. (2018). Mucosal immunoglobulins protect the olfactory organ of teleost fish against parasitic infection. *PLOS Pathogens*, *14*(11), e1007251. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007251>.

7. APÊNDICES

Apêndice 1: Isolados de FO utilizados para determinação do CO_{WT} e análise do perfil de susceptibilidade.

Estado	Fazenda	Isolado	Ano do isolamento
MG ^a	1	FNO-05	2012
		FNO-08	2012
		FNO-12	2012
	2	FNO-23	2012
		FNO-26	2012
		FNO-35	2012
	3	FNO-39	2012
		FNO-40	2012
		FNO-42	2013
	4	FNO-51	2013
		FNO-60	2013
		FNO-64	2013
	5	FNO-72	2013
		FNO-77	2013
		FNO-81	2013
	6	FNO-84	2013
		FNO-86	2013
		FNO-93	2013
	7	FNO-94	2013
		FNO-100	2013
		FNO-104	2013
	8	FNO-110	2013
		FNO-111	2013
		FNO-113	2013
	9	FNO-115	2013
		FNO-120	2013
		FNO-128	2013
	10	FNO-132	2013
		FNO-135	2013
		FNO-136	2013
	11	FNO-150	2013
		FNO-166	2013
		FNO-180	2013
	12	FNO-191	2013
		FNO-193	2014
		FNO-196	2014
	13	FNO-199	2014
FNO-210		2014	
FNO-212		2014	
14	FNO-213	2014	
	FNO-76	2018	
	FNO-69	2018	
15	FNO-237	2015	
	FNO-242	2015	
	FNO-244	2015	
16	FNO-246	2015	
	FNO-247	2015	
	FNO-249	2015	
17	FNO-265	2015	
	FNO-273	2015	
	FNO-277	2015	
18	FNO-280	2015	
	FNO-284	2015	
	FNO-287	2015	
19	FNO-307	2015	
20			
21			

		FNO-313	2015
		FNO-290	2015
	22	FNO-319	2015
		FNO-324	2015
	23	FNO-374	2015
		FNO-378	2015
		FNO-138	2013
		FNO-154	2013
	1	FNO-185	2013
SP ^b		FNO-22	2018
		FNO-30	2018
		FNO-222	2014
	2	FNO-226	2015
		FNO-234	2015
	3	FNO-67	2018
	1	FNO-215	2014
ES ^c		FNO-217	2014
	2	FNO-220	2014
		FNO-361	2015
SC ^d	1	FNO-366	2015
		FNO-371	2015
		FNO-24	2017
	1	FNO-25	2017
		FNO-26	2017
		FNO-29	2017
		FNO-65	2017
BA ^e	2	FNO-66	2017
	3	FNO-55B	2018
		FNO-92	2019
	4	FNO-93	2019
		FNO-94	2019
		FNO-30	2017
PE ^f	1	FNO-55	2017

MG^a: Minas Gerais

SP^b: São Paulo

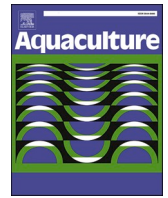
ES^c: Espírito Santo

SC^d: Santa Catarina

BA^e: Bahia

PE^f: Pernambuco

APÊNDICE 2: Local epidemiological cutoff values and antimicrobial susceptibility profile for Brazilian Francisella orientalis isolates-Aquaculture 2022



Local epidemiological cutoff values and antimicrobial susceptibility profile for Brazilian *Francisella orientalis* isolates

Thaís.F. Oliveira, Márcia P. Leibowitz, Carlos Augusto Gomes Leal*

AQUAVET, Laboratory of Aquatic Animal Diseases, Department of Preventive Veterinary Medicine, Veterinary School, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Antibiotic resistance
Disc diffusion test
Francisellosis
NRI
Nile tilapia

ABSTRACT

Francisellosis is an emerging disease caused by *Francisella orientalis* and is responsible for major economic losses in tilapia farms worldwide. The method of choice for francisellosis outbreak control is oral antibiotic administration, as no commercial vaccines or autogenous effective vaccines are available. Although there is a standard method recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) for susceptibility testing of fish pathogenic *Francisella* spp., basic information on culture and growth conditions for this pathogen is scarce. In this study, the antibiotic susceptibility profile of *Francisella orientalis* was determined using the disk diffusion test. For that, 89 *Francisella orientalis* samples obtained from disease outbreaks in tilapia farms in 2012–2019 in various Brazilian states were selected for testing against different antibiotics. Because *F. orientalis* cannot grow on the standard Mueller-Hinton (MH) agar medium, two different culture media were selected for testing: modified heart cystine agar (CHAH) and modified cation-adjusted Mueller-Hinton agar (MMHA). Different incubation periods were also tested for more appropriate and accurate measurement data. CHAH was more suitable for performing the diffusion disk tests because MMHA required longer incubation periods and formed overestimated inhibition zones. Incubation time affected the antibiogram results mainly for β -lactam antibiotics, with 48 h being the ideal period for measuring inhibition zones. Epidemiological cutoff values of *Francisella orientalis* isolates using the normalized resistance interpretation (NRI) methodology were successfully calculated. All 89 isolates (100%) were considered wild type (WT) for florfenicol, oxytetracycline, erythromycin, and doxycycline, whereas 86 isolates (96.6%) were considered WT for amoxicillin, ampicillin, enrofloxacin, and norfloxacin. Three isolates (3.4%) were considered non-wild type (NWT) for enrofloxacin, norfloxacin, amoxicillin, and ampicillin. This is the first report of *Francisella orientalis* isolates resistant to amoxicillin and fluoroquinolones. This study provided important data on *Francisella orientalis* antibiotic susceptibility. Moreover, it showed that Brazil is already suffering the effects of the inadvertent use of licensed drugs and of off-label drugs, as the aforementioned drug classes are illegally used for farmed fish in the country.

1. Introduction

Francisellosis is a systemic granulomatous disease caused by the gram-negative coccobacillus *Francisella* spp., including *Francisella orientalis*. The disease caused by *Francisella orientalis* affects warm water fish, with the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) being the most commonly affected farmed fish (Birkbeck et al., 2011; Leal et al., 2014; Soto et al., 2009; Maekava et al., 2021). Nile tilapia is the second most farmed fish species in the world (FAO, 2020) and the most farmed fish in Brazil, accounting for 60% of the total aquaculture production (IBGE, 2020).

The genus *Francisella* has been well studied, especially the species *Francisella tularensis*, the causative agent of tularemia, due to interest in human health and biosafety (Brudal et al., 2014; Caspar and Maurin, 2017; Oyston et al., 2004). Other species of veterinary importance such as *Francisella orientalis* are still poorly studied. *F. orientalis* has been detected in the American continent in Colombia (Iregui et al., 2011), Brazil (Leal et al., 2014), the United States (Mauel et al., 2005), Mexico (Ortega et al., 2016), Costa Rica (Soto et al., 2009) and Honduras (Soto et al., 2019) as well as in the United Kingdom (Jeffery et al., 2010) and Asia, including Thailand (Jantrakajorn and Wongtawatchai, 2016), Japan (Ottem et al., 2009), and China (Qiang et al., 2015).

* Corresponding author at: Av. Pres. Antônio Carlos, 6627, São Luiz, Belo Horizonte, MG CEP: 31270-901, Brazil.
E-mail address: carlosleal@vet.ufmg.br (C.A.G. Leal).

Despite the economic losses from the high mortality rates caused by francisellosis in tilapia farms (Leal et al., 2014; Soto et al., 2009), no commercial vaccines are available. The only method of choice for disease control is the administration of antibiotics, with florfenicol being the most commonly used therapeutic agent (Soto et al., 2013). However, as *Francisella orientalis* is an emerging pathogen, information on its antimicrobial susceptibility is lacking. Most studies conducted to date used a limited number of *F. orientalis* isolates, had no specific criteria for testing and interpreting the data obtained, thus making analysis and comparison of these data impractical.

Various methods have been used to determine antimicrobial susceptibility, and the disc diffusion method (Kirby-Bauer) is one of the most commonly used (Barker and Kehoe, 1995; Ge et al., 2018; Miller et al., 2003; Smith et al., 2009; Smith, 2006). This technique meets the standards for repeatability and precision and is suitable for routine use in the laboratory because of its ease of performance and low cost (Patel, 2012; Reller et al., 2009). However, global health organizations such as the World Organization for Animal Health (OIE) recommend that protocols of susceptibility tests should be standardized by a globally recognized organization (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI, USA; European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST, UE), and that the interpretive criteria should be mandatory (OIE, 2019).

The CLSI currently has the only manual for disc diffusion testing of microorganisms from aquatic animals (VET03 - Methods for Antimicrobial Broth Dilution and Disk Diffusion Susceptibility Testing of Bacteria Isolated From Aquatic Animals; Approved Guideline; CLSI, 2020). The manual contains the criteria to be followed when performing antimicrobial susceptibility testing (AST).

However, information to fully standardize protocols for all fish pathogens, including *Francisella orientalis*, is not yet available; as basic information on culture and growth conditions of *F. orientalis* are not available. Therefore, the CLSI guidelines are not yet applicable to this pathogen. Some gaps that must be filled are: the implementation of protocols for fastidious microorganisms (such as *Francisella orientalis*) and the determination of epidemiological cutoff values (ECVs), which have so far only been implemented for some antimicrobials and pathogens, such as *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* (CLSI, 2020).

The use of ECVs can overcome the interpretative challenges of susceptibility testing for aquatic microorganisms (Smith, 2019). In this case, isolates are not classified as susceptible, intermediate, or resistant, but as wild type (WT) and non-wild type (NWT), which have complete susceptibility and reduced susceptibility to antimicrobials, respectively (OIE, 2019). For fastidious microorganisms, the conditions of the susceptibility tests should be based on standardized protocols, and these should be adapted to the growth requirements of the pathogen (CLSI, 2020; OIE, 2019). Considering this information, the objectives of this study were to standardize a specific diffusion disk test for evaluating the antimicrobial susceptibility of *F. orientalis* isolates, calculating ECVs for different antimicrobials, and evaluating the susceptibility profile of isolated samples from outbreaks in tilapia cultures in Brazil from 2012 to 2019.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains

Eighty-nine *Francisella orientalis* strains were used to perform the antimicrobial susceptibility test by disc diffusion. They were selected from the bacterial collection of the AQUAVET Laboratory of Aquatic Animal Diseases, Department of Preventive Veterinary Medicine, Veterinary School, Federal University of Minas Gerais. These strains were isolated from francisellosis outbreaks that occurred in 34 tilapia cultures in six Brazilian states (Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo, Bahia, Pernambuco, and Santa Catarina) from 2012 to 2019 (Supplementary Table 1). These strains were identified by species-specific quantitative

polymerase chain reaction (qPCR) as *F. orientalis* (Soto et al., 2010). Samples of ATCC® *Escherichia coli* 25922 and ATCC® *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* 33,658 were used as quality controls for the experiments (CLSI, 2020; Miller et al., 2003). All of the above strains were stored at -80°C until use.

2.2. Antimicrobials

The antimicrobials selected for the disk diffusion assay were: florfenicol (Oxoid, UK; FFC, 30 μg), oxytetracycline (Oxoid; OT, 30 μg), erythromycin (Oxoid; ER, 15 μg), ampicillin (Oxoid; AMP, 10 μg), enrofloxacin (Oxoid; ENO, 5 μg), norfloxacin (Oxoid; NOR, 10 μg), amoxicillin (Oxoid; AMO, 10 μg), doxycycline (Oxoid; DOX, 5 μg), and trimethoprim-sulfamethoxazole (1:19) (Oxoid; SUT, 25 μg). The concentrations of all drugs used in this experiment were in accordance with the CLSI-VET03 manual (CLSI, 2020).

2.3. Evaluation of culture media and incubation time

Mueller-Hinton agar (MHA) and Mueller-Hinton agar supplemented with 5% sheep blood are recommended for disk diffusion assays for general and fastidious aquatic microorganisms in the CLSI Manual (CLSI, 2020), respectively. *Francisella orientalis* was unable to grow on either culture medium. Therefore, two culture media were selected to test their performance and ideal incubation time for the disk diffusion assay: modified heart cystine agar (CHAH) supplemented with 2% bovine hemoglobin (BD, USA), which had been previously used in AST for *F. tularensis* (Kreuzinger et al., 2013; Loughman et al., 2016; Tomaso et al., 2005) and *F. orientalis* (Soto et al., 2012); and the modified cation-adjusted Mueller-Hinton II agar (BD, USA) (MMHA) supplemented with 2% VX supplement (Laborclin, Brazil) and 0.1% glucose. These two media were tested for thymidine and thymine content, respectively, according to the VET03 manual. The antibiogram was performed using the reference sample *Enterococcus faecalis* ATCC 33186 against the antibiotic association of SUT and incubated at 37°C for 24 h. The culture medium is suitable for testing with SUT only if the zone of inhibition formed was ≥ 20 mm (CLSI, 2020).

Nine strains (FO-12, FO-22, FO-25, FO-30, FO-55, FO-65, FO-111, FO-135, and FO-222; approximately 10% of the total number of strains available) were randomly selected and used for the evaluation of culture media and incubation period. The aforementioned *Francisella orientalis* samples were thawed, plated in CHAH, and incubated at 28°C for 72 h. Three to five colonies were then selected to prepare a bacterial suspension in sterile saline (0.85%) with an optical density (OD_{625}) of 0.12–0.13 (McFarland scale of 0.5), at a concentration of 10^8 CFU/ml. Petri dishes containing CHAH and MHAM were inoculated with the bacterial suspension, which was spread over the entire surface of the culture medium using a sterile swab. This procedure was performed three times, and at the end of each step, the Petri dish was rotated 60° to ensure a homogeneous distribution of the suspension (CLSI, 2020). After drying, two and three antimicrobial discs were placed equidistantly per plate of MHAM and CHAH, respectively, to prevent or minimize the overlap of inhibition zones. The samples were then incubated at 28°C . Measurements were taken at 24, 48, 72, and 96 h post-inoculation (PI) to determine the most appropriate incubation period for measuring the inhibition zones formed (Miller et al., 2003; Smith et al., 2018; Smith and Kronvall, 2015). *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC® 33,658 and *E. coli* ATCC® 25,922 were used as quality control strains in the tests. They were plated on MH and CHAM agar for evaluation and subsequent comparison with the reference values for the antibiotics FFC, OT, ER, AMP, SUT, and ENR, which are specified in the VET03 manual (CLSI, 2020). These tests followed the aforementioned methodology, except for the measurement of inhibition zones, which was performed 24 h after inoculation using a digital caliper (Merck, Darmstadt).

2.4. Disk diffusion assay

The *Francisella orientalis* strains (Supplementary table I) were thawed, plated in CHAH, and incubated at 28 °C for 72 h. Three to five colonies were then selected to prepare a bacterial suspension in sterile saline (0.85%) with an optical density (OD₆₂₅) of 0.12–0.13 (McFarland scale of 0.5), at a concentration of 10⁸ CFU/ml. The bacterial suspension of five randomly selected strains (FO-12, FO-25, FO-30, FO-111, and FO-222) were submitted to plate counting during standardization to assure the bacterial concentration. All presented bacterial concentrations of 10⁸ CFU/ml. Petri dishes containing CHAH were inoculated with the bacterial suspension, which was spread over the entire surface of the culture medium using a sterile swab. This procedure was performed three times, and at the end of each step, the Petri dish was rotated 60° to ensure a homogeneous distribution of the suspension (CLSI, 2020). After drying, three antimicrobial discs were placed equidistantly on each plate to prevent or minimize the overlap of inhibition zones. The samples were then incubated at 28 °C. Measurements were taken 24 and 48 h PI. The quality control samples were the same as those described in Section 2.3. All tests in this study were performed in triplicate, and inhibition zones were measured using a digital caliper (Merck, Germany).

2.5. Data analysis and determination of epidemiological cutoff values

Provisional ECVs (COWt) for the antimicrobials tested were determined using the normalized resistance interpretation (NRI) methodology (Kronvall, 2003; Kronvall and Smith, 2016). The NRI was used with

the permission of the patent holder (Bioscand AB, TABY, Sweden; US Patent No. 7,465,559 and European Patent No. 1383913). An automatic Excel spreadsheet was used for the NRI analysis, which is provided free of charge on the website <http://www.bioscand.se/nri/> (automatic calculations for disk zone histograms in the standard version). Based on the ECV calculated for each antimicrobial agent, isolates were classified as WT and NWT if they exhibited complete and reduced susceptibility, respectively (OIE, 2019; Smith, 2017; Smith et al., 2016).

3. Results

3.1. Standardization of culture media and incubation period

In the quality control tests, CHAH showed high thymine/thymidine levels, with an inhibition zone of 16 mm for *E. faecalis* ATCC 33186, making it unsuitable for use in the sensitivity test with the SUT antibiotic. In contrast, the MHAM agar showed an inhibition zone of 24 mm, which was within the normal range (≥ 20 mm) (CLSI, 2020), making it suitable for analysis.

During standardization, the 10 *Francisella orientalis* strains showed very poor and slow growth in MMHA plates. The strains showed no growth during the first 48 h of incubation, and only after 72 h, poor bacterial growth was observed (Fig. 1). For all antibiotics, inhibition zones greater than 40 mm were obtained after 96 h of incubation.

The measurement of inhibition zones on CHAH medium after 24 h could not be performed for the 10 isolates. Despite visible bacterial growth, the inhibition zones could not be clearly delineated, making the

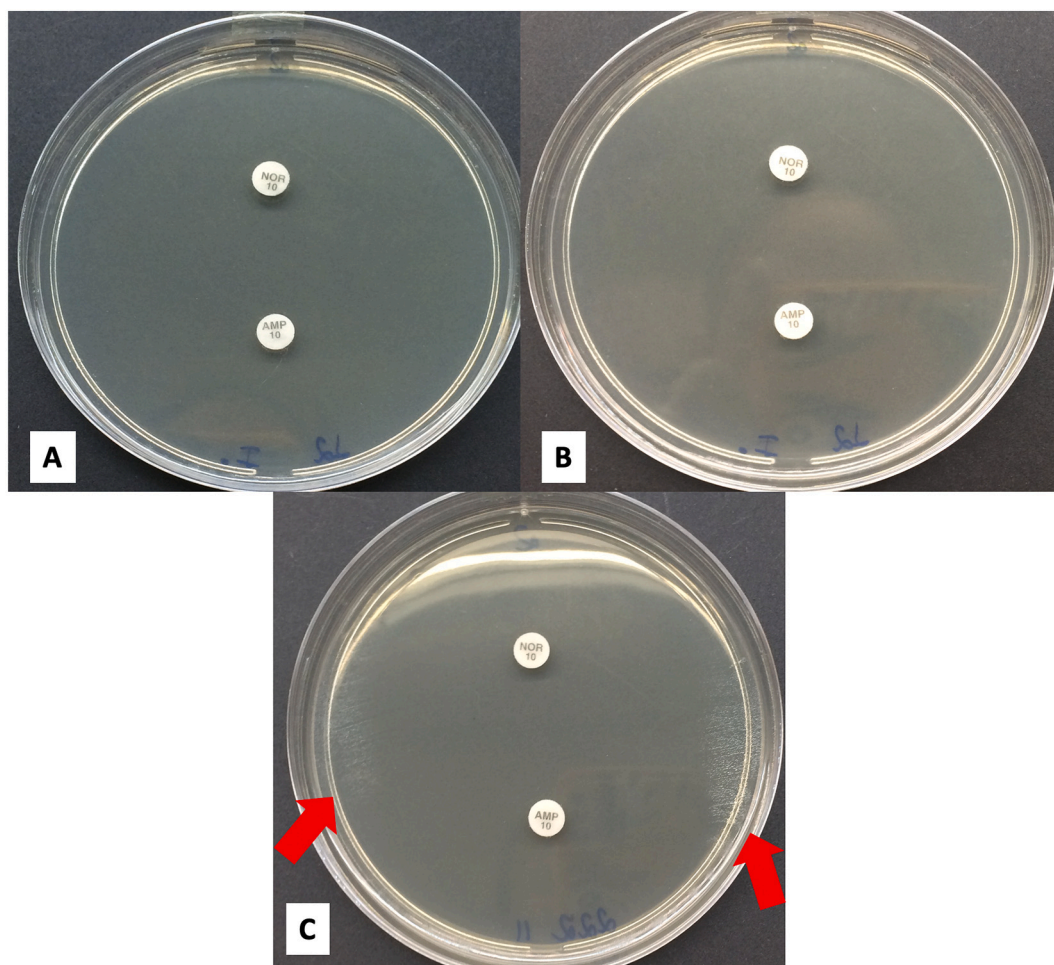


Fig. 1. Cation-adjusted Mueller-Hinton II modified agar inoculated with the *Francisella orientalis* strain at different incubation times: (A) 24 h; (B) 48 h; and (C) 96 h, when poor bacterial growth can be verified (arrows).

measurements inaccurate (Fig. 2A). The inhibition zones at 48 h were better defined and regular, allowing a more accurate measurement (Fig. 2B). Nevertheless, a decrease in the values of inhibition zones was observed after 72 and 96 h as compared to the other periods. In addition, after 72 h of incubation, the antibiotics ampicillin and amoxicillin showed bacterial growth wherever the zone of inhibition had been previously located, resulting in a false indication of resistance (Fig. 2C, D). Therefore, the incubation period of 48 h was ideal for disk diffusion testing of *F. orientalis* isolates in CHAH.

3.2. Quality control ranges in CHAH

The results of the quality control (QC) for of the reference strains *E. coli* ATCC® 25,922 and *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC® 33,658, tested in the two selected culture media and incubated at 28 °C for 24 h, are shown in Tables 1 and 2, respectively. The results for the reference strains obtained on CHAH were within the acceptable ranges set by CLSI (CLSI, 2020) for tests performed using MHA. For the incubation at 28 °C, there are no QC data in CLSI manuals for enrofloxacin using *E. coli* ATCC® 25,922 and for norfloxacin, amoxicillin, and doxycycline for both reference strains. Therefore, QCs were not carried out by those antimicrobials.

Table 1

Results of *Escherichia coli* ATCC® 2599 on Mueller-Hinton (MH) and cation-adjusted Mueller-Hinton II modified (CHAH) agar incubated at 28 °C for 24 h.

<i>E. coli</i> 25,922					
Antimicrobial	MH		CHAM		CLSI (MH)
	Variance (mm)	Average (mm)	Variance (mm)	Average (mm)	Variance (mm)
Ampicillin	15–18	17	16–20	18	14–23
Erythromycin	9–12	11	0	0	10–15
Florfenicol	20–23	22	18–22	20	20–30
Oxytetracycline	22–28	24	21–24	22	23–29

3.3. Epidemiological cutoff value and susceptibility profile

The COWt was determined using the NRI method according to Kronvall (2003) for the eight antimicrobials tested on the 89 *Francisella orientalis* isolates, as well as their WT or NWT classifications (Table 3). All disc zone distributions showed a single dominant modal peak. For each antimicrobial agent, these modal groups were considered representative of the WT isolates. The standard deviations observed in these putative WT modal groups were all within the limits for MH medium at 28 °C. Therefore, the calculated COWt was provisionally accepted as

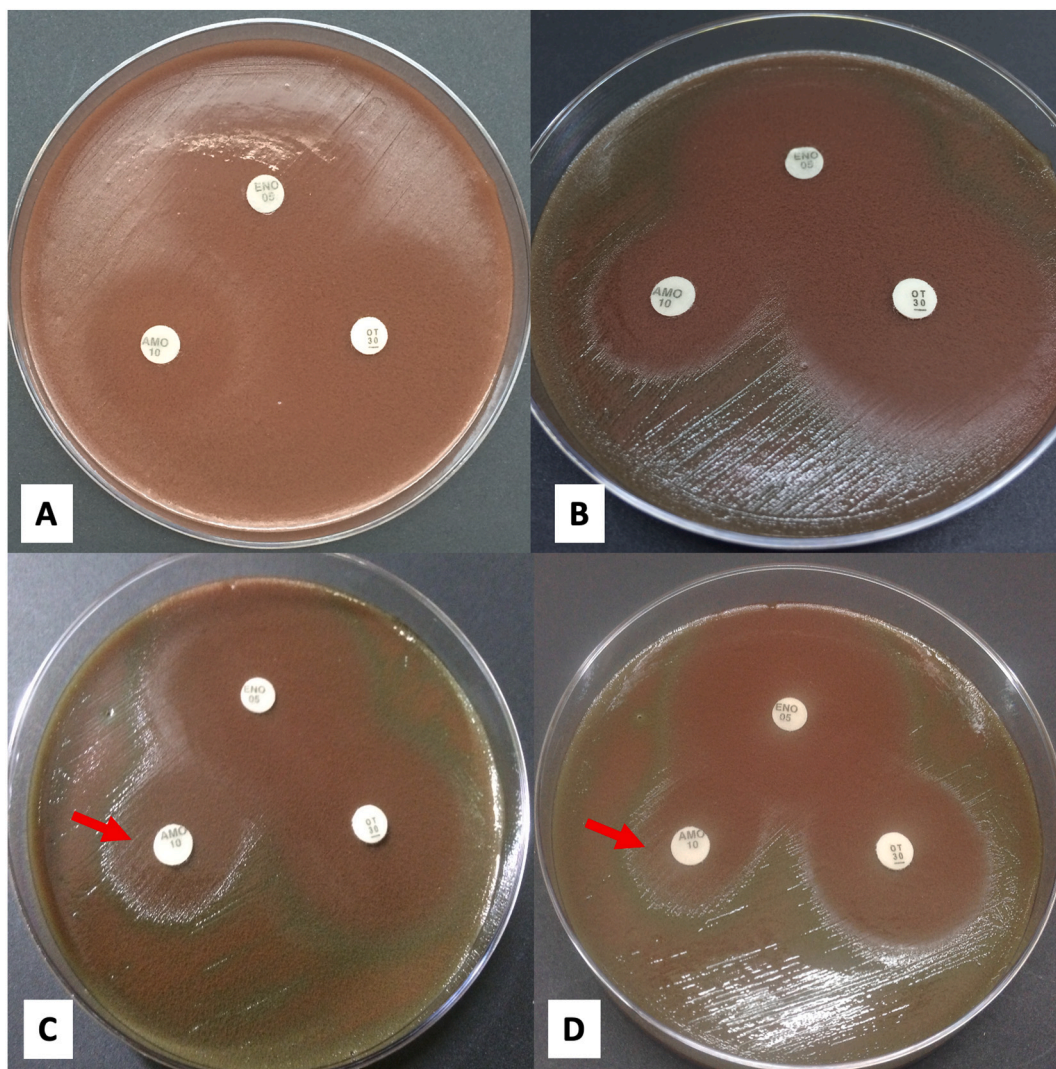


Fig. 2. Modified heart cystine agar inoculated with the *Francisella orientalis* FO-12 sample at different incubation times: (A) 24 h; (B) 48 h; (C) 72 h; and (D) 96 h. For amoxicillin, a clear reduction in the inhibition zone and bacterial growth in the previously inhibited area (arrows) were observed at 72 and 96 h of incubation.

Table 2

Results of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC® 33,658 on Mueller-Hinton (MH) and cation-adjusted Mueller-Hinton II modified (CHAH) agar incubated at 28 °C for 24 h.

A. salmonicida subsp. salmonicida 33,658					
Antimicrobial	MH		CHAM		CLSI (MH)
	Variance (mm)	Average (mm)	Variance (mm)	Average (mm)	Variance (mm)
Ampicillin	33–34	33	30–32	31	33–41
Enrofloxacin	35–38	36	28–30	30	35–45
Erythromycin	21–22	21	15–16	16	21–29
Florfenicol	33–35	34	30–31	30	33–41
Oxytetracycline	30–33	31	26–30	28	28–34

valid.

All 89 *Francisella orientalis* isolates (100%) were categorized as WT for florfenicol, oxytetracycline, erythromycin, and doxycycline, and 86 isolates (96.6%) were considered as WT for amoxicillin, ampicillin, enrofloxacin, and norfloxacin. Three *F. orientalis* isolates—FO-92, FO-93, and FO-94 (3.3%)—were categorized as NWT for amoxicillin, ampicillin, enrofloxacin, and norfloxacin, with no inhibition zones formed. Furthermore, the NRI analysis showed that the distribution of the 89 *F. orientalis* isolates was unimodal for all antimicrobials tested (Figs. 3 and 4).

4. Discussion

To make the disk diffusion test feasible for *Francisella orientalis* isolates, its methodology was standardized. MHAM culture medium proved to be inefficient and had limitations in performing the test, mainly due to slow bacterial growth (only after 72 h PI). This suggests that the use of this medium in the assay would result in less accurate data because of the long incubation time and the formation of overestimated inhibition zones (Miranda et al., 2016; Smith and Kronvall, 2014; Smith et al., 2018).

The CHAH medium was herein found to be more suitable for conducting diffusion disk tests for *Francisella orientalis*, as it allowed for better growth of the samples and clear visualization of the inhibition zones. When the method was standardized, this medium showed less variability in the results between replicates. This culture medium had already been used in previous studies to evaluate *F. orientalis* susceptibility, which confirms its viability (Ramirez-Paredes et al., 2017; Soto et al., 2012).

There are still no guidelines for testing and interpreting the results for emerging pathogens such as *Francisella orientalis*. Nonetheless, the CLSI recommends testing QC reference samples to ensure that the reported results accurately reflect the test's performance. In this study, two aquatic QC reference strains, *E. coli* ATCC® 25,922 and *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC® 33,658, which are in the CLSI-

VET03 manual, were chosen based on their susceptibility profiles (CLSI, 2020; Miller et al., 2003). The data obtained with CHAH for these two strains were quantitatively comparable to that obtained with the reference medium MHA and were within the acceptable ranges established by CLSI (CLSI, 2020). These reference strains can thus be used as quality control in *F. orientalis* disk diffusion assays using CHAH, and should be considered for the standardized protocol.

Nonetheless, the CHAH medium was limited in assessing the susceptibility of *Francisella orientalis* isolates to the combination of sulfa and trimethoprim. The mechanism of action of these antimicrobial agents is based on the inhibition of folic acid metabolism in bacteria. They act at various stages in the synthesis of tetrahydrofolic acid, which in turn acts as a coenzyme in the production of purine bases and thymidine (by the enzyme thymidylate synthase), which are DNA components necessary for cell growth. Microorganisms lacking thymidylate synthase can use exogenous sources of thymine/thymidine in the production of precursors of bacterial genetic material, which allows them to grow. With this, smaller or even no inhibition zones are formed, which leads to a false resistance diagnosis (Levinson, 2016; Lüllmann et al., 2016). CHAH might contain alternative sources of thymine/thymidine, thus making it impossible to assess the sensitivity of *F. orientalis* isolates to these drugs. The existence of sulfa “resistant” *F. orientalis* isolates in association with trimethoprim has been previously reported (Ramirez-Paredes et al., 2017; Soto et al., 2012). These results could be related to the aforementioned issue related to the use of CHAH rather than to an actual existence of isolates resistant to these antimicrobials. Since the use of MHAM was not adequate, further studies should be conducted to investigate a more appropriate medium for assessing the susceptibility of *F. orientalis* isolates to the antibiotic combination of sulfa and trimethoprim.

In addition to the culture medium, the incubation period is an essential information in AST for fastidious microorganisms (Smith and Kronvall, 2015). Incubation time influenced the AST for fish and mammalian pathogens, *Vibrio* spp. (Baron et al., 2017), and *Salmonella typhimurium* (Laure et al., 2021). In the present study, a 48-h interval was necessary to obtain more visually detectable inhibition zones for accurate measurements. The measurements taken after 72 and 96 h PI generated false-resistant results for ampicillin and amoxicillin, which as mentioned above, may suggest the effect of prolonged incubation periods on the data obtained. Moreover, this could justify the results of the “resistant” isolates in Ramirez-Paredes et al. (2017), in which the inhibition zones occurred after 72 h. Further studies are needed to confirm this hypothesis.

The disk diffusion test on the 89 *Francisella orientalis* isolates allowed determining the ECVs based on the NRI methodology for the eight antimicrobial agents tested. As a result, 89 WT isolates were identified for florfenicol, oxytetracycline, erythromycin, and doxycycline and 86 WT isolates (96.6%) for amoxicillin, ampicillin, enrofloxacin, and norfloxacin. Three *F. orientalis* isolates (3.4%) were NWT for amoxicillin, ampicillin, enrofloxacin, and norfloxacin. These three isolates

Table 3

Cutoff values (COwt) of the eight antimicrobial agents for *Francisella orientalis*, variation of inhibition zones, average and standard deviation (SD), and classification of isolates.

Isolates <i>F. orientalis</i>									
Antimicrobials	Variance (mm)	Average ± SD	COwt (mm)	WT		NWT		Total	
				n	%	n	%	N	%
Florfenicol	22–31	26.22 ± 2.37	COwt ≥17	89	100	–	–	89	100
Erythromycin	20–26	22.97 ± 1.89	COwt ≥19	89	100	–	–	89	100
Oxytetracycline	30–36	32.60 ± 1.89	COwt ≥26	89	100	–	–	89	100
Doxycycline	24–31	27.20 ± 2.14	COwt ≥20	89	100	–	–	89	100
Ampicillin	21–29	24.33 ± 2.16	COwt ≥16	86	96.7	3	3.3	89	100
Amoxicillin	20–27	26.13 ± 2.09	COwt ≥16	86	96.7	3	3.3	89	100
Enrofloxacin	33–40	39.79 ± 2.08	COwt ≥34	86	96.7	3	3.3	89	100
Norfloxacin	32–40	36.73 ± 2.34	COwt ≥32	86	96.7	3	3.3	89	100

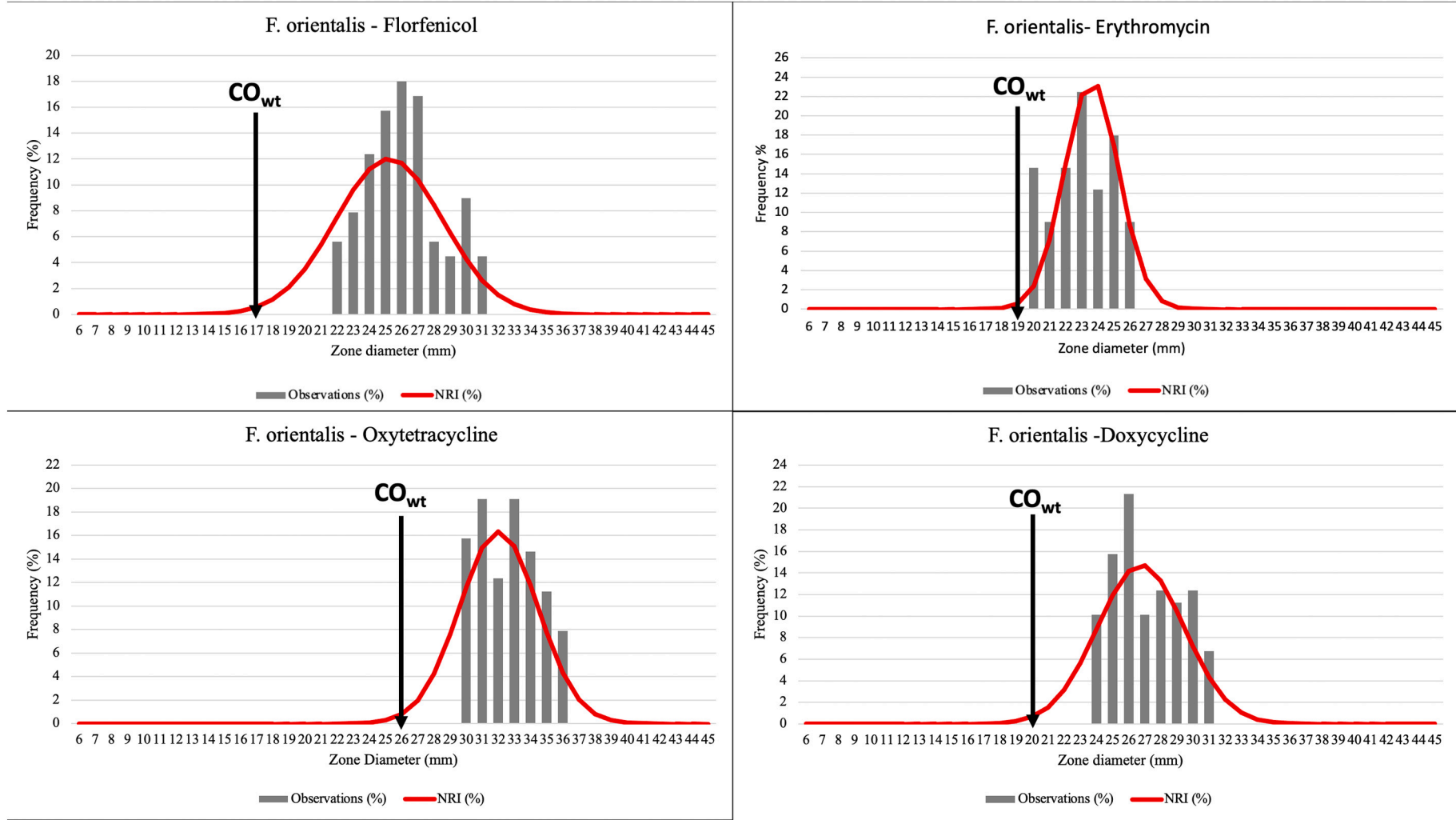


Fig. 3. Distribution of inhibition zones of the antimicrobial agents florfenicol, erythromycin, oxytetracycline, and doxycycline for the 89 *Francisella orientalis* isolates.

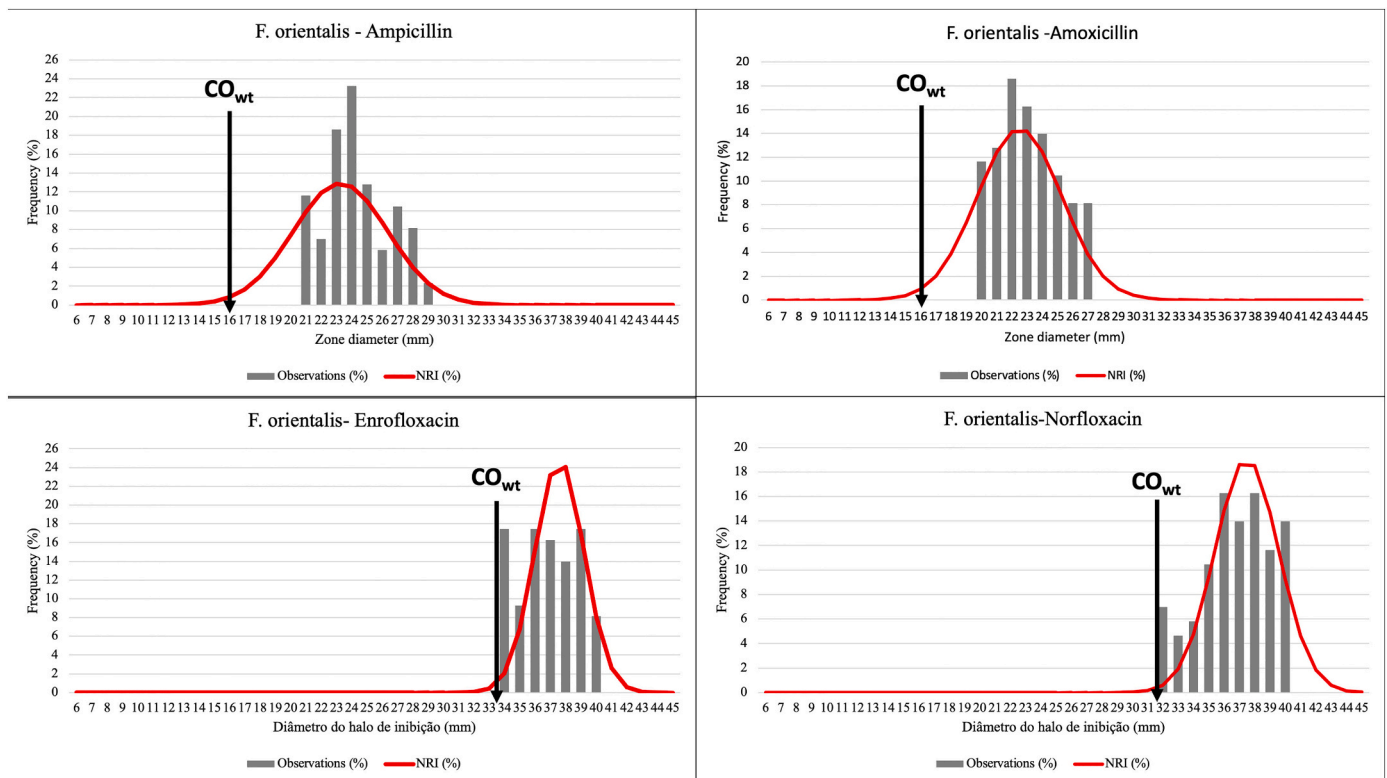


Fig. 4. Distribution of the inhibition zones of the antimicrobial agents ampicillin, amoxicillin, enrofloxacin, and norfloxacin for the 89 *Francisella orientalis* isolates.

originated from different fish, but all from the same outbreak in a specific farm with a long history of prophylactic and therapeutic use of antibiotics, including enrofloxacin and norfloxacin. These results prove that the continuous use of antimicrobials not approved in the country influences the susceptibility profile of *F. orientalis*, reinforcing the importance of this study. Furthermore, the data obtained from our NRI analysis can be used to generate ECVs. However, as they were generated by a single laboratory, they should be considered as a local COwt value for *F. orientalis*.

Our results are in line with those of Soto et al. (2012) for FLO using CHAH to test the antimicrobial susceptibility of *Francisella orientalis* (syn. *F. asiatica*) isolated from fish. With respect to enrofloxacin and erythromycin, the inhibition zones reported by these authors were slightly (5 mm) larger. However, these differences are within the range expected for inter-laboratory variations. In addition, Soto et al. (2012) also reported high MIC values for ampicillin and amoxicillin, which agrees with our results for the three NWT isolates. In contrast, inhibition zones with an average of 24.3 mm were observed for ampicillin in 86 WT isolates in our study, while Soto et al. (2012) found no inhibition zones. These differences remain unexplored and unexplained and require further investigation, as the same culture medium and incubation period were used.

This is the first report of *Francisella orientalis* isolates resistant (NWT) to enrofloxacin, norfloxacin, and amoxicillin. Resistance to “ β -lactam” ampicillin has been previously reported for *Francisella* spp., including *F. orientalis* and *F. tularensis* (Caspar and Maurin, 2017; Soto et al., 2012). While there are few studies on *F. orientalis* resistance to antibiotics, there are many studies on *F. tularensis* (Caspar and Maurin, 2017; Kassinger and Hoek, 2021). *F. tularensis* is reported to be intrinsically resistant to many classes of antibiotics (Biswas et al., 2008; Caspar and Maurin, 2017) and also can acquire antibiotic resistance (Caspar and Maurin, 2017; Kassinger and Hoek, 2021). In contrast to our results, *F. tularensis* remains sensitive to fluoroquinolones, which exhibit bactericidal activity against the intracellular stage of the pathogen and also appear to reduce relapse rates in animal models (Caspar and

Maurin, 2017).

Antimicrobial resistance mechanisms are associated with point mutations resulting from selective pressure due to the presence of a drug or acquisition of genetically mobile elements (plasmids, transposons, integrons, cassette genes, and insertion sequences) that usually confer resistance to more than one class of antimicrobial agents (Aldred et al., 2014; Bush, 2018; King et al., 2017; Smith, 2008). Resistance to β -lactams occurs mainly because of the degradation of the β -lactam ring by the action of the enzyme β -lactamase (Bush, 2018; Bush and Bradford, 2016; King et al., 2017). This can be intrinsic, as in *Aeromonas* species (Ghatak et al., 2016), or acquired, as in *Edwardsiella ictaluri* (Welch and Evenhuis, 2009); through target modifications (reduced affinity of penicillin-binding proteins) (King et al., 2017; Zeng and Lin, 2013), and through the control of drug entry and exit by efflux pumps (King et al., 2017; Zeng and Lin, 2013), which can confer resistance to multiple drugs, as in *A. salmonicida* (Valdes et al., 2015) and *Piscirickettsia salmonis* (Cartes et al., 2017). Resistance to fluoroquinolones results from mutations in the genes belonging to the region determining quinolone resistance, *gyrA* and *gyrB* (Aldred et al., 2014; Blondeau, 2004; Correia et al., 2017; Redgrave et al., 2014; Rice, 2012)—described for *A. salmonicida* (Miller and Harbottle, 2018), *Yersinia ruckeri* (Huang et al., 2014), *Aeromonas hydrophila* (Bello-López et al., 2019; Lukkana et al., 2012), *P. salmonis* (Henriquez et al., 2015), and *Flavobacterium psychrophilum* (Izumi et al., 2007)—as well as from the acquisition of QNR complex genes (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*), in which the encoded proteins reduce target enzymes in the chromosome—the most common mechanism among fish pathogens reported for *A. salmonicida* (Kim et al., 2011; Valdes et al., 2015), *P. salmonis* (Buschmann et al., 2012), and *A. hydrophila* (Bello-López et al., 2019). In addition, the genes encoding proteins that form efflux pumps (*qepA1*, *qepA2*, and *oqxAB*) were discovered in *A. hydrophila* (Bello-López et al., 2019), as were the proteins *aac* (6′)-Ib-cr (Aldred et al., 2014; Hooper and Jacoby, 2015; Redgrave et al., 2014), which had not yet been described in aquatic organisms. However, further studies are required to elucidate the resistance mechanism of *Francisella orientalis*.

This study is the first report of *Francisella orientalis* isolates resistant to amoxicillin and fluoroquinolones. This shows that Brazil is already suffering the effects of inadvertently using not only licensed drugs, but also off-label drugs, as no drug of the aforementioned classes is legally used in fish farming in the country.

5. Conclusion

Our study provides valuable information for performing *Francisella orientalis* antibiotic susceptibility testing, such as the most appropriate medium for performing diffusion disk testing (CHAH) and the preferred incubation period (48 h), mainly for β -lactam antibiotics. The latter may be considered by CLSI in the future as an alternative for inclusion in a reference protocol for *F. orientalis*. ECVs for the *F. orientalis* isolates were determined for the first time for eight antibiotics. Finally, we first describe the occurrence of *F. orientalis* strains resistant to amoxicillin, enrofloxacin, and norfloxacin isolated from Nile tilapia, which is an important new issue for tilapia farming in this country.

Funding

This work was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) for the student fellowship and CNPq for supporting this project [grant number 301915/2018-0].

Author statement

1- Thais Ferreira de Oliveira: acquisition of data, performed the experiments, analysis and interpretation of results and for drafting the article.

2-Marcia Pimenta Leibovitz: analysis and interpretation of results, drafting the article, and revising it critically for important intellectual content.

3- Carlos Augusto Gomes Leal: conception and design of the study, supervision of the study, funding acquisition, revising it critically for important intellectual content, and final approval of the version to be submitted.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no competing financial interests.

Acknowledgments

The authors wish to thank Prof. Peter R. Smith of the National University of Ireland for valuable help with NRI analysis and discussion of results.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738054>.

References

- Aldred, K.J., Kerns, R.J., Osheroff, N., 2014. Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry* 53, 1565–1574. <https://doi.org/10.1021/bi5000564>.
- Barker, G.A., Kehoe, E., 1995. Assessment of disc diffusion methods for susceptibility testing of *Aeromonas salmonicida*. *Aquaculture* 134, 1–8.
- Baron, S., Granier, S.A., Larvor, E., et al., 2017. *Aeromonas* diversity and antimicrobial susceptibility in freshwater—An attempt to set generic epidemiological cut-off values. *Front. Microbiol.* 8, 503.
- Bello-López, J.M., Cabrero-Martínez, O.A., Ibáñez-Cervantes, G., Hernández-Cortez, C., Pelcastre-Rodríguez, L.I., Gonzalez-Avila, L.U., Castro-Escarpulli, G., 2019. Horizontal gene transfer and its association with antibiotic resistance in the genus *Aeromonas* spp. *Microorganisms* 7. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7090363> p363.
- Birkbeck, T.H., Feist, S.W., Verner-Jeffreys, D.W., 2011. *Francisella* infections in fish and shellfish. *J. Fish Dis.* 34, 173–187. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2010.01226.x>.
- Biswas, S., Raoult, D., Rolain, J.M., 2008. A bioinformatic approach to understanding antibiotic resistance in intracellular bacteria through whole genome analysis. *Int. J. Antimicrob. Agents* 32, 207–220. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.03.017>.
- Blondeau, J.M., 2004. Fluoroquinolones: mechanism of action, classification, and development of resistance. *Surv. Ophthalmol.* 49 (Supplement 2), S73–S78. <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2004.01.005>.
- Brudal, E., Ulanova, L.S., Lampe, O.E., Rishovd, A.-L., Griffiths, G., Winther-Larsen, H.C., 2014. Establishment of three *Francisella* infections in zebrafish embryos at different temperatures. *Morrison RP, ed. Infect. Immun.* 82, 2180–2194.
- Buschmann, A.H., Tomova, A., López, A., Maldonado, M.A., Henríquez, L.A., Ivanova, L., Cabello, F.C., 2012. Salmon aquaculture and antimicrobial resistance in the marine environment. *PLoS One* 7, e42724. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042724>.
- Bush, K., 2018. Past and present perspectives on β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 62 <https://doi.org/10.1128/AAC.01076-18> e01076–18.
- Bush, K., Bradford, P.A., 2016. beta-lactams and beta-lactamase inhibitors: an overview. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 6, a025247 <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025247>.
- Cartes, C., Isla, A., Lagos, F., Castro, D., Muñoz, M., Yañez, A., Figueroa, J., 2017. Search and analysis of genes involved in antibiotic resistance in Chilean strains of *Piscirickettsia salmonis*. *J. Fish Dis.* 40, 1025–1039. <https://doi.org/10.1111/jfd.12579>.
- Caspar, Y., Maurin, M., 2017. *Francisella tularensis* susceptibility to antibiotics: a comprehensive review of the data obtained in vitro and in animal models. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7 <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00122> p122.
- CLSI, 2020. *Methods for antimicrobial disk susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic. Animals* 5, 1.
- Correia, S., Poeta, P., Hebraud, M., Capelo, J.L., Igrejas, G., 2017. Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand? *J. Med. Microbiol.* 66, 551–559. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000475>.
- FAO, 2020. *Aquaculture network. FAO Aquac. Newsl.* 60, 72.
- Ge, M.-C., Kuo, S.-F., Chang, S.-C., Chien, C.-C., You, H.-L., Lu, J.-J., 2018. Antimicrobial susceptibility and virulence surveillance of *Campylobacter* spp. isolated from patients in two tertiary medical centers in Taiwan. *Front. Microbiol.* 9 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03186>.
- Ghatak, S., Blom, J., Das, S., Sanjukta, R., Puro, K., Mawlong, M., Ngachan, S.V., 2016. Pan-genome analysis of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veronii* and *Aeromonas caviae* indicates phylogenomic diversity and greater pathogenic potential for *Aeromonas hydrophila*. *Anton Leeuw. Int. J. G.* 109, 945–956. <https://doi.org/10.1007/s10482-016-0693-6>.
- Henríquez, P., Bohle, H., Bustamante, F., 2015. Polymorphism in *gyrA* is associated to quinolones resistance in Chilean *Piscirickettsia salmonis* field isolates. *J. Fish Dis.* 38, 415–418. <https://doi.org/10.1111/jfd.12255>.
- Hooper, D.C., Jacoby, G.A., 2015. Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1354, 12–31. <https://doi.org/10.1111/nyas.12830>.
- Huang, Y., Michael, G.B., Becker, R., Kaspar, H., Mankertz, J., Schwarz, S., Steinhagen, D., 2014. Pheno- and genotypic analysis of antimicrobial resistance properties of *Yersinia ruckeri* from fish. *Vet. Microbiol.* 171, 406–412. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.10.026>.
- IBGE, 2020. *Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa da Pecuária Municipal.* 2020.
- Iregui, C.A., Vasquez, G.M., Rey, A.L., Verjan, N., 2011. *Piscirickettsia*-like organisms as a cause of acute necrotic lesions in Colombian Tilapia larvae. *J. Vet. Diagn. Investig.* 23, 147–151. <https://doi.org/10.1177/104063871102300128>.
- Izumi, S., Ouchi, S., Kuge, T., Arai, H., Mito, T., Fujii, H., Shimizu, A., 2007. PCR-RFLP genotypes associated with quinolone resistance in isolates of *Flavobacterium psychrophilum*. *J. Fish Dis.* 30, 141–147. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2007.00797.x>.
- Jantrakajorn, S., Wongtawatchai, J., 2016. *Francisella* infection in cultured tilapia in Thailand and the inflammatory cytokine response. *J. Aquat. Anim. Health* 28, 97–106. <https://doi.org/10.1080/08997659.2015.1135198>.
- Jeffery, K.R., Stone, D., Feist, S.W., 2010. An outbreak of disease caused by *Francisella* sp. in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* at a recirculation fish farm in the UK. *Dis. Aquat. Org.* 91, 161–165. <https://doi.org/10.3354/dao02260>.
- Kassinger, S.J., Hoek, M.L.V., 2021. Genetic determinants of antibiotic resistance in *Francisella*. *Front. Microbiol.* 12, 644855. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.644855>.
- Kim, J.H., Hwang, S.Y., Son, J.S., Han, J.E., Jun, J.W., Shin, S.P., Park, S.C., 2011. Molecular characterization of tetracycline- and quinolone-resistant *Aeromonas salmonicida* isolated in Korea. *J. Vet. Sci.* 12, 41–48. <https://doi.org/10.4142/jvs.2011.12.1.41>.
- King, D.T., Sobhanifar, S., Strynadka, N.C.J., 2017. The mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics. In: Gotte, M., Berghuis, A., Matlashewski, G., Wainberg, M., Sheppard, D. (Eds.), *Handb. Antimicrob. Resist.* Springer New York, New York, NY, pp. 177–202.
- Kreizinger, Z., Makrai, L., Helyes, G., Magyar, T., Károly, E., Gyuranecz, M., 2013. Antimicrobial susceptibility of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* strains from Hungary, Central Europe. *J. Antimicrob. Chemother.* 68, 370–373. <https://doi.org/10.1093/jac/dks399>.
- Kronvall, G., 2003. Determination of the real standard distribution of susceptible strains in zone histograms. *Int. J. Antimicrob. Agents* 22, 7–13.
- Kronvall, G., Smith, P., 2016. Normalized resistance interpretation, the NRI method. *APMIS* 124, 1023–1030.

- Laure, N.N., Dawan, J., Ahn, J., 2021. Effects of incubation time and inoculation level on the stabilities of bacteriostatic and bactericidal antibiotics against *Salmonella Typhimurium*. *Antibiotics* 10, 1019. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10081019>.
- Leal, C.A.G., Tavares, G., Figueiredo, H.C.P., 2014. Outbreaks and genetic diversity of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* isolated from farm-raised Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Brazil. *Genet. Mol. Res.* 13, 5704–5712.
- Levinson, W., 2016. *Fármacos Antimicrobianos: Mecanismo de Ação*. In: *Microbiol. Médica e Imunol. Parte I Bacteriol. Básica*, 13 edition. McGraw Hill, Brasil, pp. 69–85.
- Loughman, K., Hall, J., Knowlton, S., Sindeldecker, D., Gilson, T., Schmitt, D.M., Horzempa, J., 2016. Temperature-dependent gentamicin resistance of *Francisella tularensis* is mediated by uptake modulation. *Front. Microbiol.* 7, 37. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00037>.
- Lukkana, M., Wongtavatchai, J., Chuanchuen, R., 2012. Class 1 integrons in *Aeromonas hydrophila* isolates from farmed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J. Vet. Med. Sci.* 74, 435–440. <https://doi.org/10.1292/jvms.11-0441>.
- Lüllmann, H., Mohr, K., Hein, L., 2016. *Farmacologia - 7ed: Texto e Atlas*, 7 edition ed. [s.l.]. Artmed Editora, Porto Alegre.
- Maekava, S., Pulpipat, T., Wang, P.-C., Chen, S.-C., 2021. Transcriptome analysis of immune- and iron-related genes after *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Shellfish Immunol.* 111, 36–48. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.11.009>.
- Mauel, M.J., Miller, D.L., Styer, E., Pouder, D., 2005. Occurrence of Piscirickettsiosis-like syndrome in tilapia in the continental United States. *J. Vet. Diagn. Investig.* 17, 601–605. <https://doi.org/10.1177/104063870501700616>.
- Miller, R.A., Harbottle, H., 2018. Antimicrobial drug resistance in fish pathogens. *Microbiol. Spectr.* 6, 1. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0017-2017>.
- Miller, R.A., Walker, R.D., Baya, A., Clemens, K., Coles, M., Hawke, J.P., Reimschuesse, R., 2003. Antimicrobial susceptibility testing of aquatic bacteria: quality control disk diffusion ranges for *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658 at 22 and 28 degrees. *C. J. Clin. Microbiol.* 41, 4318–4323. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.9.4318-4323.2003>.
- Miranda, C.D., Smith, P., Rojas, R., Contreras-Lynch, S., Alonso-Veja, J.M., 2016. Antimicrobial susceptibility of *Flavobacterium psychrophilum* from Chilean Salmon farms and their epidemiological cut-off values using agar dilution and disk diffusion methods. *Front. Microbiol.* 7, 1880. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01880>.
- OIE, 2019. *Aquatic animal health code*. In: *OIE, Aquat. Anim. Heal. Code*, Chapter 6.4. [s.l.: s.n.], pp. 1–4.
- Ortega, C., Mancera, G., Enríquez, R., Vargas, A., Martínez, S., Fajardo, R., Romero, A., 2016. First identification of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* causing mortality in Mexican tilapia *Oreochromis* spp. *Dis. Aquat. Org.* 120, 205–215. <https://doi.org/10.3354/dao02999>.
- Ottem, K.F., Nylund, A., Karlsbakk, E., Friis-Møller, A., Kamaishi, T., 2009. Elevation of *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* Mikalsen et al. (2007) to *Francisella noatunensis* comb. nov. [syn. *Francisella piscicida* Ottem et al. (2008) syn. nov.] and characterization of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* subsp. nov. *J. Appl. Microbiol.* 106, 1231–1243. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04092.x>.
- Oyston, P.C.F., Sjöstedt, A., Titball, R.W., 2004. Tularemia: bioterrorism defence renews interest in *Francisella tularensis*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 967–978.
- Patel, R.M., 2012. The guiding principles on antimicrobial susceptibility testing. *Bull. Pharm. Res.* 2, 146–153.
- Qiang, L., Ningqiu, L., Xiaozhe, F., Hu, Q., Chang, O., Liu, L., Wu, S., 2015. An outbreak of granulomatous inflammation associated with *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* in farmed tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) in China. *Chin. J. Oceanol. Limnol.* 34, 460–466.
- Ramirez-Paredes, J.G., Thompson, K.D., Metselaar, M., Shahin, K., Soto, E., Richards, R. H., Adams, A., 2017. A Polyphasic approach for phenotypic and genetic characterization of the fastidious aquatic pathogen *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*. *Front. Microbiol.* 8, 2324. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02324>.
- Redgrave, L.S., Sutton, S.B., Webber, M.A., Piddock, L.J.V., 2014. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends Microbiol.* 22, 438–445. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.04.007>.
- Reller, L.B., Weinstein, M., Jorgensen, J.H., Ferraro, M.J., 2009. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clin. Infect. Dis.* 49 (11), 1749–1755. <https://doi.org/10.1086/647952>.
- Rice, L.B., 2012. Mechanisms of resistance and clinical relevance of resistance to β -lactams, glycopeptides, and fluoroquinolones. *Mayo Clin. Proc.* 87, 198–208. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2011.12.003>.
- Smith, P., 2006. Breakpoints for disc diffusion susceptibility testing of bacteria associated with fish diseases: a review of current practice. *Aquac* 261, 1113–1121. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.02.017>.
- Smith, P., 2008. Antimicrobial resistance in aquaculture. *Rev. Sci. Tech.* 27, 243–264.
- Smith, P., 2017. Laboratory determination of the susceptibility to antibiotics of bacteria isolated from aquatic animals. *FAO-FMM/RAS/298: Strengthening capacities, policies and national action plans on prudent and responsible use of antimicrobials in fisheries*. In: Disponível em. <https://www.fao.org/ri/static-media/MeetingDocuments/WorkshopAMR/presentations/List.html>.
- Smith, P., 2019. The Performance of Antimicrobial Susceptibility Testing Programmes Relevant To Aquaculture. Rome: [s.n.]. Disponível em. <http://www.fao.org/documents/card/en/c/ca6028en/>.
- Smith, P., Kronvall, G., 2014. Estimating the precision of disc diffusion antibiotic susceptibility data published by the European committee on antimicrobial susceptibility testing. *APMIS* 122 (11), 1096–1101. <https://doi.org/10.1111/apm.12262>.
- Smith, P., Kronvall, G., 2015. Effect of incubation temperature and time on the precision of data generated by antibiotic disc diffusion assays. *J. Fish Dis.* 38, 629–636. <https://doi.org/10.1111/jfd.12278>.
- Smith, P., Douglas, L., McMurray, J., Carroll, C., 2009. A rapid method of improving the criteria being used to interpret disc diffusion antimicrobial susceptibility test data for bacteria associated with fish diseases. *Aquac* 290, 72–178. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.02.017>.
- Smith, P., Endris, R., Kronvall, G., Thomas, V., Verner-Jeffreys, D., Wilhelm, C., Dalsgaard, I., 2016. Epidemiological cut-off values for *Flavobacterium psychrophilum* MIC data generated by a standard test protocol. *J. Fish Dis.* 39, 143–154. <https://doi.org/10.1111/jfd.12336>.
- Smith, P., Finnegan, W., Ngo, T., Kronvall, V., 2018. Influence of incubation temperature and time on the precision of MIC and disc diffusion antimicrobial susceptibility test data. *Aquac* 490, 19–24. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.02.020>.
- Soto, E., Hawke, J.P., Fernandez, D., Morales, J.A., 2009. *Francisella* sp., an emerging pathogen of tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), in Costa Rica. *J. Fish Dis.* 32, 713–722. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2009.01070.x>.
- Soto, E., Bowles, K., Fernandez, D., 2010. Development of a real-time PCR assay for identification and quantification of the fish pathogen *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*. *Dis. Aquat. Org.* 89, 199–207. <https://doi.org/10.3354/dao02204>.
- Soto, E., Griffin, M., Wiles, J., Hawke, J.P., 2012. Genetic analysis and antimicrobial susceptibility of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* (syn. *F. asiatica*) isolates from fish. *Vet. Microbiol.* 154, 407–412. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.07.030>.
- Soto, E., Kidd, S., Gaunt, P.S., Endris, R., 2013. Efficacy of florfenicol for control of mortality associated with *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *J. Fish Dis.* 36, 411–418. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2012.01425.x>.
- Soto, E., Shain, K., Talhami, J.J., et al., 2019. Characterization of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* isolated from Nile tilapia *Oreochromis niloticus* farmed in Lake Yojoa, Honduras. *Dis. Aquat. Org.* 133, 141–145. <https://doi.org/10.3354/dao03333>.
- Tomaso, H., Dahouk, S.A., Hoffer, E., Spletstoeser, W.D., Treu, T.M., Dierich, M.P., Neubauer, H., 2005. Antimicrobial susceptibilities of Austrian *Francisella tularensis* *holarctica* biovar II strains. *Int. J. Antimicrob. Agents* 26, 279–284. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.07.003>.
- Valdes, N., Espinoza, C., Sanhueza, L., Gonzalez, A., Corsini, G., Tello, M., 2015. Draft genome sequence of the Chilean isolate *Aeromonas salmonicida* strain CBA100. *FEMS Microbiol. Lett.* 362, 5. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnu062>.
- Welch, T.J., Evenhuis, J., 2009. IncA/C plasmid-mediated florfenicol resistance in the catfish pathogen *Edwardsiella ictaluri*. *Antimicrob. Agents Chemother.* United States 2009. <https://doi.org/10.1128/AAC.01312-08>.
- Zeng, X., Lin, J., 2013. Beta-lactamase induction and cell wall metabolism in Gram-negative bacteria. *Front. Microbiol.* 4, 128. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00128>.