

Uso de antibióticos em aquacultura e resistência bacteriana: Impacto em saúde pública

Antibiotics in aquaculture and bacterial resistance: Health care impact

S. Gastalho¹, G.J. da Silva², F. Ramos³

ARTIGO DE REVISÃO | REVIEW ARTICLE

RESUMO

Os antibióticos têm sido utilizados em produção animal, incluindo aquacultura, para prevenção e tratamento de doenças infecciosas. A sua administração tem impacto sobre o ambiente e pode conduzir ao aparecimento de resistência antimicrobiana, tanto em bactérias comensais do intestino humano e animal, como em bactérias do meio ambiente, com a possível disseminação de genes de resistência entre diversas populações bacterianas. A capacidade de transferência horizontal de genes de resistência aos antimicrobianos de bactérias ambientais aquáticas, como *Aeromonas salmonicida*, para bactérias, como *Escherichia coli*, tem sido documentada. A transmissão do animal para o homem pode ocorrer por vários meios, incluindo contacto directo com animais e fezes, bem como ingestão de alimentos e água. O uso excessivo e não controlado de antimicrobianos em animais tem consequências na saúde pública, tendo transformado a resistência aos antimicrobianos num preocupante problema global. As mudanças no sistema de produção podem aumentar a importância da difusão de resistências no meio ambiente, se a produção se tornar mais integrada ou mais intensiva em áreas geográficas de menores dimensões. Assim, no presente trabalho realça-se a importância da monitorização contínua da administração de antibióticos em aquacultura.

Palavras-chave: aquacultura, resistência antimicrobiana, *Aeromonas*, *Escherichia coli*

ABSTRACT

Antibiotics are used in animal production, including aquaculture, to prevent and treat infectious disease. The administration of antibiotics has impact on the environment, and may lead to the emergence of antimicrobial resistance, in commensal bacteria both in human and animal gut, and in environmental bacteria, with the possible spread of resistance genes in diverse bacterial populations. The ability of horizontal transfer genes from environmental bacteria such as *Aeromonas salmonicida* to bacteria such as *Escherichia coli* has been reported. The transmission from animal to human can occur through various ways, including direct contact with animals and feces, and ingestion of food and water. The excessive and non-controlled use of antibiotics in animals has impact in public health, and transformed the antimicrobial resistance as a huge concern and a global issue. The changes in the production system can increase the importance of dissemination of resistance in the environment, as this production is becoming more integrated or more intensive in smaller geographic areas. The present review highlights the importance of the continuous monitoring of the administration of antibiotics in aquaculture.

Keywords: aquaculture, antimicrobial resistance, *Aeromonas*, *Escherichia coli*

¹Mestre em Segurança Alimentar

²Doutora em Farmácia – Especialidade de Microbiologia e Parasitologia

³Doutor em Farmácia – Especialidade de Bromatologia e Hidrologia

Endereço para correspondência: Soraia Gastalho, Centro de Estudos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Azinhaga de Santa Comba 3000-549 Coimbra, Portugal

E-mail: soraiagastalho@gmail.com

INTRODUÇÃO

A maioria das doenças que causa prejuízo aos piscicultores é provocada por agentes infecciosos, podendo tornar a actividade pouco lucrativa¹. Assim sendo, há muitos anos que são utilizados antimicrobianos com o fim de matar ou inibir o crescimento de microrganismos e para combater a mortalidade excessiva dos peixes².

O sucesso deste tipo de actividade depende da implementação de boas práticas nos sistemas de produção de peixe, como controlo da qualidade da água, fornecimento de alimentação equilibrada e de qualidade, garantindo assim a saúde dos animais e consequentemente a prevenção de doenças¹.

Contudo, a medicação eventualmente administrada apresenta consequentes impactos sobre o meio ambiente, devido principalmente à libertação de resíduos orgânicos e inorgânicos². Esses impactos tendem a ser mais graves, se a mudança da água não for efectuada adequadamente, levando a um aumento de riscos em termos de segurança alimentar, devido à presença de resíduos de antibióticos em peixes que foram com eles tratados³. Além disso, o consumo de antibióticos não detectados em alimentos, podem gerar problemas de alergia e toxicidade, que são difíceis de diagnosticar, devido à falta de esclarecimento na ingestão dos mesmos⁴. A exposição a antibióticos em concentrações sub-inibitórias pode, também, levar ao aparecimento de resistência, quer em bactérias comensais do intestino humano, quer em bactérias dos peixes e aquáticas, com possível disseminação de genes de resistência em diversas populações bacterianas^{3, 5, 6}.

Aquacultura

Segundo a FAO (Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação), o termo aquacultura engloba todas as actividades relacionadas com o cultivo de organismos aquáticos, como peixes, moluscos, crustáceos, plantas aquáticas, répteis e anfíbios⁷. Envolve

técnicas de criação e métodos de manejo. A aquacultura extensiva envolve o cultivo de pescado ou marisco, num habitat 'natural' sem qualquer suplemento alimentar e com o mínimo impacto sobre o meio ambiente. Por outro lado, a criação intensiva de peixes ósseos, envolve o fornecimento de rações de alta qualidade².

Nas últimas décadas, esta tecnologia tem contribuído significativamente para a redução da escassez global de alimentos⁸, tendo uma importância reconhecida como fonte de alimento saudável para o consumo humano. Além disso, tem proporcionado, também, oportunidades de emprego em diferentes partes do mundo, particularmente nos países em desenvolvimento⁷.

Com um crescimento acentuado da produção de peixes e canais de distribuição melhorados, o consumo tem crescido acentuadamente nas últimas décadas⁹. Em 2008, a aquacultura contribuiu aproximadamente com 50% da produção de peixe para alimentação em todo o mundo, sendo a China, responsável por aproximadamente 70% da produção mundial enquanto o Japão e os demais países da região da Ásia-Pacífico representaram cerca de 22%. A Europa Ocidental e a América do Norte com apenas 3,5% e 1,3%, respectivamente, representam uma pequena fracção da produção mundial. Cerca de 40% da produção mundial de pescado, a maioria de aquacultura, é negociado internacionalmente, com exportações superiores às mercadorias diárias, assim como a carne, os cereais, o açúcar e o café¹⁰.

Em termos percentuais, até 2008, a produção aquícola foi dividida de forma aproximadamente igual, entre água marinha ou salobra (57%) e água doce (43%) e, em termos de valor, os peixes foram o produto da aquacultura dominante (54%), seguidos dos crustáceos (20%) e moluscos (14%)¹⁰.

O consumo *per capita* de peixe na alimentação aumentou em média de 9,9 Kg (peso vivo) em 1960, para 18,4 Kg em 2009. Dos

126 milhões de toneladas, disponíveis para consumo humano em 2009, o consumo de peixe era menor em África, enquanto a Ásia foi responsável por dois terços do consumo total com 85,4 milhões de toneladas, dos quais 42,8 milhões foram consumidos fora da China⁹.

Os valores *per capita* de consumo de peixe correspondentes a Oceânia, América do Norte, Europa, e América Latina e Caribe foram 24,6, 24,1, 22,0 e 9,9 Kg, respectivamente. Embora o consumo anual *per capita* de produtos da pesca tenha crescido nas regiões em desenvolvimento, ainda é notável a diferença para as regiões mais desenvolvidas. Uma parte considerável do peixe consumido nos países desenvolvidos consiste em importações, e, devido à procura constante e produção local em declínio, está previsto um aumento das importações nos próximos anos⁹.

A China, por exemplo, tem sido responsável pela maior parte do aumento de consumo de peixe no mundo. A sua participação na produção mundial de pescado cresceu de 7% em 1961 para 35% em 2010, impulsionada pelo aumento na diversidade de peixe disponível⁹.

Os peixes e os produtos da pesca representam uma valiosa fonte de proteínas e micronutrientes essenciais para a nutrição equilibrada e boa saúde. Em 2009, o pescado representou 16,6% do consumo na população mundial de proteína animal e de 6,5% de toda a proteína consumida. Globalmente, o peixe é responsável, em cerca de 3,0 biliões de pessoas, por quase 20% do seu consumo de proteína animal, e em 4,3 biliões de pessoas por cerca de 15% desse tipo de proteína⁹.

Em 2010, a pesca e a aquacultura, forneceram 148 milhões de toneladas de peixe, dos quais 128 milhões de toneladas foram consumidos pelo Homem, e os dados preliminares para 2011 indicam um aumento na produção de 154 milhões de toneladas, dos quais 131 milhões são destinados ao consumo⁹.

A tendência mundial no consumo de produtos de origem animal, mais concretamente do consumo de peixe, em todo o mundo,

registou valores de 9 Kg *per capita* por ano em 1960 e de 16,7 Kg em 2006, estimando-se que este valor aumente para 17,0 Kg em 2020⁷.

Portanto, a aquacultura continua a ser a actividade de maior crescimento no sector produtivo de animais para consumo humano¹¹.

A sua contribuição para as reservas mundiais de várias espécies de peixes, crustáceos e moluscos teve um aumento de 3,9% da produção total em 1970, para 33% em 2005. Estima-se que a pesca e a aquacultura tenham proporcionando uma oferta *per capita* de 16,7 Kg (peso vivo) de peixe. Desta oferta, 47% é derivado da produção aquícola¹².

A vasta gama de espécies produzidas reflecte-se na diversidade dos sistemas ambientais¹⁰. No entanto, existem vários factores que influenciam a escolha de ração para peixes de aquacultura. Destes, o factor económico é geralmente o mais importante. Outros factores importantes no fabrico de rações para animais aquáticos, são a estabilidade do alimento na água e a sua aceitabilidade. Assim, torna-se necessária a inclusão de um agente de ligação para assegurar uma correcta alimentação do pescado, podendo este ser líquido ou sólido, sob a forma de revestimentos ou de películas. Os agentes de ligação são usados para melhorar a ração animal e para estabilizar as dietas em ambientes aquáticos. A ração para os peixes exige um nível adequado de processamento, para garantir uma boa estabilidade na água até que os animais a consumam¹³. Mesmo assim, esta produção é dificultada pela mortalidade imprevisível, que pode ocorrer devido a interacções negativas entre peixes e bactérias patogénicas¹².

A aquacultura intensiva, em condições ambientais desfavoráveis ou más práticas de produção, pode afectar significativamente a homeostasia e levar ao *stress* fisiológico, contribuindo para o desequilíbrio entre o ambiente e o bem-estar do hospedeiro-microrganismo^{14,15}. Entre os parâmetros de bem-estar, o cortisol é comumente aceite como um indicador de

stress dos peixes. A resposta dos peixes mal-adaptados resulta na sobrecarga alostática que afecta negativamente muitas funções fisiológicas tais como: osmorregulação, crescimento, reprodução ou defesa imunitária e, ainda, alterações celulares em diversos tecidos, como os do tracto gastrointestinal. Esta situação pode facilitar a indução de doenças infecciosas devido a uma translocação bacteriana¹⁵. Para ultrapassar este problema, os produtores utilizam frequentemente antibióticos no tratamento de doenças bacterianas¹².

Microbiota dos peixes

O trato intestinal dos peixes tem sido investigado devido à sua assumida importância na nutrição, digestão e doença oferecendo um nicho ecológico para o crescimento bacteriano¹². O microbiota presente no interior do tracto intestinal é dependente da espécie hospedeira, estirpe, crescimento ontogenético, níveis de tensão e estrutura do intestino. O processamento de nutrientes e desenvolvimento de absorção do sistema imune das mucosas, angiogénese e renovação epitelial são influenciados pelo microbiota intestinal. Por conseguinte, o microbiota intestinal desempenha um papel importante no estado fisiológico de um indivíduo. Um microbiota alterado pode facilitar o crescimento e a sobrevivência das bactérias potencialmente patogénicas de peixes e também resultar em maturação diferente da imunidade da mucosa em peixes jovens^{12, 16}.

A especificidade da resposta do hospedeiro depende das espécies de bactérias que colonizam o tracto digestivo. Eventuais modificações no microbiota gastrointestinal, devido ao tratamento com antibióticos, podem alterar a relação benéfica hospedeiro-parasita. Portanto, entender como os compostos antibacterianos modificam o microbiota gastrointestinal dos peixes, pode ajudar a melhorar a gestão dos sistemas de produção a fim de reduzir o uso de antibióticos e aumentar a segurança alimentar dos peixes de aquacultura. No entanto, poucos

estudos se têm centrado na determinação dos efeitos do tratamento com antibiótico sobre a ecologia microbiana do intestino de peixes. Em geral, os que existem descrevem essencialmente a frequência na resistência a antibióticos, durante e após a utilização destes, a susceptibilidade dos agentes patogénicos isolados a partir de peixe e determinantes moleculares da resistência aos antibióticos¹².

Os sistemas de monitorização de resistência destinados a resolver problemas de saúde, principalmente humana, normalmente incluem bactérias zoonóticas enteropatogénicas ou comensais. Todas estas bactérias podem ser encontradas no trato gastrointestinal de uma ou mais espécies de animais, podendo contaminar os alimentos de origem animal¹⁷, sendo que a adição de antibióticos acelera a taxa de desenvolvimento de resistência em seres humanos¹⁸.

As bactérias zoonóticas são directamente perigosas para a saúde humana e a resistência antimicrobiana dessas espécies pode aumentar a carga de doença no Homem, devido a uma variedade de mecanismos, como o aumento da frequência, a duração e severidade da infecção. As bactérias comensais podem funcionar como um reservatório de genes de resistência podendo transferir a sua resistência para bactérias patogénicas^{17, 19}.

Vários géneros bacterianos isolados de aquacultura têm sido reportados como resistentes a diversos antibióticos, mas isolados do género *Aeromonas* e da família *Enterobacteriaceae* são talvez dos mais estudados, dado o potencial patogénico que apresentam.

***Aeromonas* sp.**

Até 1984, apenas quatro espécies de *Aeromonas* sp. eram conhecidas, *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria* (actualmente *A. veronii* biovar *sobria*) e *A. salmonicida*. Desde então, o género *Aeromonas* evoluiu com o aparecimento de novas espécies, anteriormente colocadas em conjunto com *Vibrio* sp. e *Plesiomonas* na família *Vibrionaceae*. No entanto, estudos genéticos

forneceram evidências suficientes para apoiar a colocação numa família própria, *Aeromonadaceae*²⁰.

Os membros do género *Aeromonas* são encontrados em diversos habitats, incluindo solo e água e são patogénicos em animais de sangue frio, como os peixes^{21,22} podendo, embora raramente, causar infecção no Homem^{14,20,22}. Aparecem naturalmente em água doce, rios, valas e lagos de água, esgoto bruto, esgoto tratado, lama activada e água municipal potável tratada com cloro. São facilmente isolados em águas estuarinas e de praias, mas não em mar profundo. Porém, estes organismos aparecem em água de salinidade muito elevada, fontes geotérmicas ou rios extremamente poluídos. De realçar que, algumas espécies de *Aeromonas* sp. são resistentes às concentrações de cloro usuais em água destinadas ao consumo humano²⁰.

A temperatura de crescimento de *Aeromonas* sp. varia de 12° a 43°C, com crescimento óptimo a 30°C. A sua motilidade vai de uma faixa de temperatura entre 0° e 45°C para algumas espécies, com faixa de temperatura óptima de 22° a 35°C e pH entre 5,5 - 9,0, apesar de preferir pHs alcalinos, uma característica utilizada no isolamento de espécies de *Aeromonas* a partir de fezes e de outras amostras ricas em bactérias entéricas, em que se usa um meio de enriquecimento alcalino (pH 8,5 - 9,0)²⁰.

Os membros do género *Aeromonas* são bacilos Gram-negativo de aproximadamente 0,3 – 1,0 µm de diâmetro por 1,0 – 3,5 µm de comprimento, anaeróbios facultativos, catalase e oxidase-positivo, não produzem esporos e não apresentam cápsula^{20, 22, 23}. Possuem geralmente um único flagelo polar, podendo, no entanto, os flagelos laterais e peritricos serem formados por algumas espécies. Produzem várias enzimas hidrolíticas como amilase, desoxirribonuclease, elastase e lipase²⁰.

A virulência de *Aeromonas* é multifactorial e não está totalmente esclarecida. A enteropatogenicidade tem sido atribuída à produção de exotoxinas elaboradas (hemolisinas, cito-

toxinas, enterotoxinas), hemaglutininas e adesinas^{20, 21}.

Muitas espécies têm sido implicadas em doenças de peixes, incluindo *A. hydrophila*, *A. veronii biovar sobria*, *A. allosaccharophila*, e *A. salmonicida*. *Aeromonas hydrophila* pode causar septicémia e mortalidade em peixes de água doce temperada ou quente, em todo o mundo. É também um importante patogénico em peixes ornamentais e em animais de estimação. *A. hydrophila*, *A. sobria veronii biovar*, *A. jandaei*, *A. schubertii* e *A. caviae* são mais comumente implicadas em infecções humanas intestinais. Vários relatórios têm indicado espécies de *Aeromonas* como causa de gastroenterites em crianças e adultos e cada vez mais se isolam de pacientes com diarreia do viajante. *A. hydrophila* foi isolada no Homem em casos de gastroenterites, infecções do trato urinário, osteomielite, septicémia, meningite e infecções de feridas comuns^{14,20, 22-25}.

As bactérias patogénicas de peixes, como *Aeromonas* spp., podem transmitir genes de resistência a antibióticos a outros agentes patogénicos^{22,26} tais como *Escherichia coli*⁴. Factores de virulência, como citotoxinas geneticamente semelhantes à shiga-toxina de *Escherichia coli* verotoxigénica (VTEC), foram encontrados em plasmídeos de *Aeromonas* sp., realçando o potencial patogénico deste género e a sua plasticidade genética²⁴.

Há um aumento da incidência de resistência antimicrobiana de *Aeromonas* spp, isolada em ambientes de aquacultura²⁶. O primeiro relatório nos Estados Unidos, em 1959, sobre resistência antibacteriana adquirida, em trutas tratadas com sulfatiazol e tetraciclina, indicou *Aeromonas salmonicida* como capaz de causar doenças em peixes de regiões temperadas e frias^{14, 20}. A espécie *salmonicida* causa furunculose em salmonídeos, enquanto outras subespécies, também conhecidas como estirpes atípicas, causam septicemia e infecções na pele, músculos, e noutras espécies de peixe marinhos¹⁴.

A resistência intrínseca deste género a β -lactâmicos está associada a expressão cromossómica de β -lactamases e/ou bombas de efluxo. Beta-lactamases que conferem resistência aos β -lactâmicos de espectro estreito (penicilinas e cefalosporinas de primeira geração), tais como, enzimas tipo-OXA e penicilinasas TEM-1 e SHV-1, foram identificadas no género, bem como β -lactamases de espectro estendido (ESBL, “*extended-spectrum beta-lactamases*”), como TEM-24^{27, 28}. Além disso, a metalo- β -lactamase *CPhA/imiS*, e os genes *tet*, conferem resistência a carbapenemos e tetraciclina, respectivamente. Por outro lado, outros genes *bla* (genes que codificam resistência a β -lactâmicos) clinicamente relevantes foram encontrados ocasionalmente entre estirpes clínicas de *Aeromonas* sp. e também em isolados não-clínicos isolados de ambientes aquáticos e de animais de aquacultura, o que demonstra capacidade deste género de adquirir genes de resistência e capacidade evolutiva²⁸.

A multirresistência (MDR), ou seja, resistência a antibióticos pertencentes a pelo menos três categorias, foi também observada e associada a bombas de efluxo. Estes sistemas são conhecidos por desempenhar um papel importante na resistência aos antibióticos de vários bacilos Gram-negativo que se comportam como agentes patogénicos oportunistas, bombeando os antibióticos para o exterior da célula³⁰.

A capacidade de transferência horizontal de genes que codificam resistência a diversos grupos de antibióticos tem sido também documentada. Por exemplo, num estudo dinamarquês, três isolados de *A. salmonicida* transferiram o seu plasmídeo R com resistência à oxitetraciclina, sulfonamidas, trimetoprim e estreptomicina para a *E. coli*¹⁴.

A alta incidência de resistência a cefalosporinas de terceira geração e a fluoroquinolonas é encontrada em *Aeromonas* isoladas a partir de fontes clínicas em alguns países em desenvolvimento da Ásia²⁰.

Estes dados são preocupantes uma vez que,

ocasionalmente, esta bactéria causa doença no Homem, e podem vir a aumentar. Por exemplo, em Espanha, os dados do Centro Nacional de Epidemiologia indicam que o género *Aeromonas* ocupou o quarto lugar entre as causas de doenças gastro-intestinais totais relatadas a cada ano durante o período de 1997 a 2006²⁴.

A resistência é também preocupante no caso do tratamento de peixes doentes. Um estudo de 2001 com a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) no norte de Portugal, com lesões causadas predominantemente por *A. hydrophila*, mostrou que esta bactéria apresentava resistência a β -lactâmicos, incluindo imipenemo. No entanto, o nível de resistência contra antibióticos β -lactâmicos entre os isolados de *A. hydrophila* foi inferior a muitos isolados de infecções clínicas humanas¹⁴.

Enterobacteriaceae

As bactérias da família *Enterobacteriaceae*, que incluem *Enterobacter* spp, *Klebsiella* spp, *Escherichia coli*, *Proteus* spp, *Serratia marcescens*, *Salmonella* spp, *Citrobacter* spp³¹, entre outras, são bacilos Gram-negativo anaeróbios facultativos, catalase positiva e oxidase negativa, não produzem esporos e são fermentadores de glicose³². São habitantes da flora intestinal e patogénicos oportunistas importantes, capazes de causar numerosas infecções, tais como cistite e pielonefrite, septicémia, pneumonia, peritonite, colangite, meningite e várias infecções intra-abdominais, quer no Homem, quer noutros animais³³⁻³⁶.

Escherichia coli é a causa frequente de infecções do trato urinário. É uma espécie com enorme plasticidade genética, capaz de adquirir plasmídeos conjugativos, e transferi-los para outras espécies bacterianas³⁷. *Klebsiella* spp e *Enterobacter* spp são causas importantes de pneumonia, enquanto *Salmonella enterica* provoca gastroenterite e, em alguns pacientes, certos serotipos podem mesmo originar uma infecção invasiva³⁵.

A resistência aos antibióticos é um problema

emergente em *Enterobacteriaceae*. A resistência relacionada com ESBLs é um problema particular devido ao espectro alargado destas enzimas, que inactivam grande parte dos antibióticos β -lactâmicos, complicando o tratamento de infecções. No entanto, muitos outros mecanismos de resistência estão presentes nesta família, estando na origem da multirresistência a antibióticos de várias classes³⁵.

Desde 2000, a disseminação adquirida a nível hospitalar e comunitário de enterobactérias que produzem ESBLs capazes de hidrolisar quase todas as cefalosporinas e de carbapenemases (CPEs) tem sido relatada em todo o mundo, principalmente como consequência de aquisição de genes³⁶.

Recentemente, estirpes produtoras de ESBLs, em especial *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp., surgiram em todo o mundo como importantes microrganismos patogénicos humanos resistentes a múltiplos antibióticos devido à produção da ESBL tipo CTX-M^{38,39}. Portugal é um dos países europeus com maiores taxas de produtores de ESBL na clínica, com uma mudança de variantes TEM ou SHV para tipos-CTX-M, desde 2003. A propagação de bactérias multirresistentes, incluindo produtores de ESBL, em hospitais, animais saudáveis produtores de alimentos, produtos alimentícios e aquáticos, encontra-se já bem descrita^{29,40}.

A qualidade microbiana do peixe tilápia foi estudada em 2005, mostrando que todas as amostras de tecidos, com excepção dos tecidos musculares, foram contaminadas com coliformes fecais. *Escherichia coli* era o contaminante mais frequente⁴¹. A presença desta espécie em água ou alimentos é um indicador de contaminação fecal e de exposição dos consumidores para microrganismos potencialmente patogénicos. Muitas estirpes são altamente virulentas, e podem ser fatais no Homem⁴², disseminando-se facilmente (por contacto directo, alimentos e água contaminados), e adquirindo material genético principalmente através de plasmídeos e transposões^{31,36}.

O consumo de água contaminada com material fecal é uma importante via de exposição, e de acordo com o regulamento CE nº 2073/2005, a família *Enterobacteriaceae* pode ser utilizada na monitorização de rotina. No caso em que estes microrganismos estejam presentes, devem efectuar-se testes para detecção de agentes patogénicos específicos^{43,44}.

Uso de agentes antimicrobianos em Peixes

Os agentes antimicrobianos podem ser definidos como moléculas que têm a capacidade de matar ou inibir o crescimento de microrganismos^{2,3,6}. Podem ser produzidos por microrganismos como fungos ou bactérias, ou de forma sintética ou semi-sintética^{5,12}. Depois da descoberta da penicilina por Fleming, em 1928, os antibióticos tornaram-se medicamentos essenciais. Devem ser seguros (não tóxicos) para o hospedeiro, permitindo a sua utilização como agentes quimioterapêuticos para o tratamento de doenças infecciosas bacterianas. Em complemento à sua utilização na medicina humana, os agentes antimicrobianos são também usados em saúde animal e em animais produtores de alimentos, incluindo aquacultura, sendo, neste caso, classificados como agentes terapêuticos, profilácticos ou metafilácticos. A utilização terapêutica corresponde ao tratamento de infecções estabelecidas. Profiláctico significa a utilização de agentes antimicrobianos como forma de prevenção em indivíduos ou grupos para impedir o desenvolvimento de infecções. Metafiláctico é um termo usado para o procedimento em que o grupo de medicamentos que visa tratar os animais doentes, simultaneamente trata os outros do grupo que se encontram sãos de forma a evitar que a doença se propague¹².

Em aquacultura, os antibióticos são frequentemente administrados, por curtos períodos de tempo, em níveis terapêuticos, por via oral^{12,14}, à excepção de alguns casos de peixes reprodutores, que são tratados com injeções intraperitoneais. No entanto, os peixes marinhos, devido ao teor de sais da água do mar, devem

ter maior quantidade de antibióticos ao seu dispor para assegurar um nível suficiente de moléculas de fármacos activas¹⁴.

Os peixes doentes não obtêm níveis óptimos dos fármacos nos tecidos do corpo por causa da perda de apetite, enquanto os saudáveis são capazes de ganhar níveis mais elevados de medicamentos ingeridos¹⁴.

Uma característica distinta, em aquacultura, é o número muito limitado de agentes antimicrobianos autorizados¹⁰. Todos os fármacos legalmente utilizados na aquacultura são aprovados pelo órgão governamental responsável pela medicina veterinária. Nos EUA, os seguintes agentes antimicrobianos estão autorizados pela FDA para uso na aquacultura: oxitetraciclina, florfenicol e sulfadimetoxina/ormetoprim. Este tipo de agências reguladoras pode definir regras para o uso de antibióticos, incluindo vias e formas de administração, tempos de retirada, tolerâncias, incluindo doses e limitações ao uso. Por exemplo, na Noruega, o uso de agentes antimicrobianos requer prescrição por veterinário, e, por conseguinte, a sua utilização é terapêutica. São vendidos em farmácias ou em fábricas de ração autorizadas pela Agência de Medicamentos da Noruega. É obrigatório informar a quantidade de antibióticos utilizada e manter os registos das prescrições^{12, 45}.

Em muitos países, as várias legislações em vigor, no intuito de proibirem a adição a rações de antibióticos utilizados em clínica humana, bem assim como na respectiva definição das quantidades autorizadas de antibióticos, estabeleceram medidas de vigilância e de controlo rigorosas¹².

Em relação a 25 países europeus, onde se inclui Portugal, o número médio de antimicrobianos regulamentados para uso em aquacultura é actualmente de $2,0 \pm 1,2$ ¹⁰.

A escolha dos antibióticos permitidos em aquacultura é difícil devida à ausência de regime terapêutico padronizado e à falta de dados sobre a eficácia clínica das diferentes

terapias. Na prática, a escolha do agente terapêutico é frequentemente influenciada tanto por considerações de disponibilidade do agente, como pelos regulamentos e susceptibilidade bacteriana, por considerações sobre a natureza da doença a ser tratada e, ainda, pela experiência do prescriptor¹⁰.

Os níveis actuais de antimicrobianos usados na aquacultura mundial não são fáceis de determinar porque os diferentes países têm distribuição diferente e sistemas de registo autónomos¹². As diversidades entre espécies aquícolas e ambientes aquáticos de produção e de tecnologias são muito maiores do que para os animais terrestres¹⁰. Na aquacultura comercial, a terapêutica antimicrobiana é mais comumente aplicada na produção de peixes e de crustáceos. Em sistemas de produção de moluscos, a utilização de agentes antimicrobianos é quase confinada às primeiras fases larvares, e as quantidades utilizadas são, por conseguinte, relativamente pequenas. Já em peixes ornamentais, a utilização de antimicrobianos é em grande parte não regulamentada e raramente tem sido quantificada, mas pensa-se ser considerável. A importância desta utilização, apesar daquele tipo de peixes não se destinar à alimentação, é cada vez maior dada proximidade dos peixes em questão com os seres humanos¹⁰.

Os sistemas de produção modernos favorecem um melhor controlo de doenças, devido à melhoria de condições higiénicas. No entanto, tornam os peixes mais vulneráveis a doenças devido à sua elevada densidade e condições de *stress* a que estão submetidos⁵. Estas doenças são provocadas por dinoflagelados, protozoários, mixosporídeos, monogenéticos e crustáceos, além de fungos, bactérias e vírus¹, o que resulta num acréscimo da utilização de agentes antimicrobianos¹².

A terapia antimicrobiana actua através da redução do impacto de uma bactéria sobre a saúde do hospedeiro. O objectivo de qualquer diagnóstico não deve ser apenas a detecção da bactéria em particular, mas também, e de

maneira crítica, uma avaliação do seu papel no desenvolvimento da doença¹⁰. Do ponto de vista clínico, deve-se ter em conta a eficácia clínica, a toxicidade para o hospedeiro, o risco de desenvolvimento de resistência e os efeitos adversos sobre a flora microbiana⁵⁾

A administração de antibióticos para tratar infecções associadas a bactérias clinicamente resistentes pode não beneficiar o animal infectado e pode ter somente impactos negativos. Nos últimos anos, alguns progressos foram feitos no desenvolvimento de métodos padronizados para determinar a susceptibilidade *in vitro* de bactérias associadas com a doença dos animais aquáticos. O uso de antimicrobianos deve, portanto, ser sempre acompanhado pelos dados de susceptibilidade da bactéria alvo¹⁰.

Nesse sentido, foram desenvolvidas vacinas para algumas doenças em peixes. A sua utilização encontra-se indicada pelo papel importante na redução da infecção. No entanto, os crustáceos carecem de um sistema imune adaptativo e, por isso, as vacinas não fornecem um método de redução da utilização de antibióticos¹⁰.

As duas vias mais comuns de administração de antibióticos são a utilização de rações medicadas e a adição directamente na água (terapia de imersão), sendo que ambos os métodos implicam o tratamento efectivo dos animais^{8,12}. Porém, os peixes não metabolizam alguns antibióticos e transportam-nos directamente para o ambiente nas fezes. Estima-se que 75% dos antibióticos utilizados na alimentação dos peixes são excretados na água¹².

Agentes antibacterianos – Mecanismos de Acção

Os antibióticos podem afectar indirectamente a biodiversidade das comunidades de fitoplâncton e zooplâncton, a saúde dos animais e dos seres humanos, e são potencialmente prejudiciais para a indústria de aquacultura³.

Os antibióticos utilizados na medicina veterinária, podem ter diferentes tipos de estru-

turas químicas, e actuam em diferentes locais da célula bacteriana³. Em geral, os antibióticos podem apresentar:

- i. Um efeito bactericida, isto é, o antibiótico mata as bactérias, por interferir com a formação, quer da parede celular da bactéria, quer dos seus conteúdos celulares, como são exemplo, penicilina, quinolonas e metronidazol¹²;
- ii. Um efeito bacteriostático, ou seja, o antibiótico impede que as bactérias se multipliquem, interferindo com a produção de proteína bacteriana, a replicação de ADN, ou outros aspectos do metabolismo celular, como é o caso de tetraciclina, sulfonamidas, cloranfenicol e macrólidos¹².

Na Tabela 1 encontram-se discriminados os mecanismos de acção dos antibióticos.

Alguns dos antibióticos que inibem a síntese da parede celular bacteriana incluem beta-lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas) e glicopeptídeos. Bloqueiam a síntese da parede celular bacteriana, interferindo com as enzimas necessárias para a síntese de peptidoglicano. Em contraste, vancomicina e teicoplanina actuam através da ligação de terminais da D-alanina a cadeias de peptidoglicanos, impedindo assim a ligação cruzada necessária para a síntese da parede celular¹².

Os antibióticos que actuam inibindo a síntese de proteínas, como macrólidos, aminoglicosídeos, tetraciclina e cloranfenicol aproveitam as diferenças estruturais entre os ribossomas bacterianos e eucarióticos para inibir selectivamente o crescimento das bactérias¹². Macrólidos, aminoglicosídeos e tetraciclina ligam-se à subunidade 30S do ribossoma bacteriano, ao passo que o cloranfenicol se liga à subunidade 50S^{12, 46, 47}.

As fluoroquinolonas exercem os seus efeitos antibacterianos interrompendo a síntese do ADN⁴⁸. Sulfonamidas e trimetoprim (TMP) inibem a síntese do ADN. A combinação do fármaco antibacteriano comum TMP, um

análogo do ácido fólico, com sulfametoxazol (SMX), uma sulfonamida, inibem dois passos na via enzimática para a síntese do folato bacteriano. Por exemplo, a sulfadimetoxina é uma sulfonamida de acção prolongada e o ormetoprim é estruturalmente relacionado com TMP. Estes antibióticos agem em sinergia bloqueando dois passos sequenciais na síntese do ácido fólico^{12,46,47}.

As polimixinas acumulam-se na membrana da célula bacteriana e exercem efeitos inibitórios por aumento da permeabilidade da membrana bacteriana. A daptomicina, aparentemente, insere sua cauda lipídica na membrana celular das bactérias, causando a despolarização da membrana e a morte da bactéria^{12,47}.

Resistência aos antimicrobianos

O uso de antimicrobianos em aquacultura fornece as condições para o aparecimento de bactérias resistentes aos antibióticos. As bactérias com variantes mais resistentes são mais prováveis de aparecer associadas a doenças características de peixes, o que fornece razões fortes para a ponderação da utilização de antibióticos, como rotina, em aquacultura. O uso irracional ou excessivo de qualquer agente terá

um impacto directo sobre o seu valor terapêutico futuro¹⁰.

A possibilidade do uso de antimicrobianos na aquacultura ter um impacto sobre o tratamento de infecções em humanos e outros animais terrestres, foi equacionada pela primeira vez há cerca de 40 anos¹⁰. Os riscos relevantes para a saúde pública relacionados com o uso de antimicrobianos na aquacultura incluem o desenvolvimento de resistência, com disseminação de estirpes bacterianas resistentes a antimicrobianos e genes de resistência, e a presença de resíduos de antimicrobianos nos peixes e meio ambiente que podem ser transferidos para humanos através da cadeia alimentar^{10, 12}.

O recente grupo da OMS/FAO/OIE identificou os principais riscos para a saúde humana associados ao uso de antimicrobianos em aquacultura como sendo aqueles decorrentes do aparecimento de resistências transferíveis nas bactérias associadas a doenças de peixes e em ambientes de aquacultura. Recomendam que o aparecimento de tais resistências transferíveis deve ser regularmente monitorizado¹⁰.

Esses regulamentos, particularmente aqueles que regem o comércio internacional, têm estimulado rápidas melhorias na capaci-

Tabela 1 - Mecanismos de acção dos antibióticos¹²

Mecanismos de acção de agentes antibacterianos	Exemplos
Interferência com a síntese da parede celular	β -lactâmicos
	Glicopeptídeos
Inibição da síntese de proteínas	Subunidade ribossomal 50S
	Subunidade ribossomal 30S
Interferência com a síntese de ácido nucleico	Isoleucina-tRNA sintetase
	Inibição da síntese de ADN
	Inibição da síntese de ADN
Mecanismos de inibição metabólica	Sulfonamidas, análogos de ácido fólico
Ruptura da membrana bacteriana	Polimixinas, daptomicina

dade de muitos países detectarem e monitorizarem os resíduos de antibióticos. A introdução de testes rápidos de determinação de resíduos também teve um grande impacto sobre o uso de antibióticos¹⁰.

Os mecanismos de resistência aos antibióticos incluem a inativação do antibiótico por síntese de enzimas (por exemplo, β -lactamases), a diminuição da concentração intracelular (por redução da permeabilidade da membrana externa em Gram-negativos ou bombas de efluxo) e a alteração do local activo^{48,49}.

A resistência intrínseca decorre de um factor estrutural ou funcional associado a espécies bacterianas, um género ou mesmo um grande grupo. A resistência adquirida decorre de alterações genéticas no genoma bacteriano, as quais podem ser uma consequência de mutações ou aquisição horizontal de genes exógenos localizados (em elementos genéticos móveis, como plasmídeos, transposões, integrões, fagos, ilhas genómicas^{3, 4, 18, 19, 50, 51}. Análises de sequências de genoma total de diferentes espécies bacterianas têm indicado que grande parte do genoma bacteriano resulta da transferência horizontal de genes¹⁹. A transferência horizontal de genes ocorre por três mecanismos: transformação, conjugação e transdução^{12,52}.

A transformação inicia-se quando as paredes celulares das bactérias são rompidas, e o ADN cromossómico, ou parte dele, é capturado por uma bactéria competente, e se integra no cromossoma da célula receptora^{12,52}.

A conjugação requer o contacto entre células e a presença na célula dadora de plasmídeo conjugativo, sendo este transferido para a bactéria receptora da mesma ou doutra espécie^{12,19,52}.

Por outro lado, estamos em presença de um mecanismo de transdução quando um vírus bacteriano chamado bacteriófago (ou simplesmente fago) pode transferir genes de uma bactéria para outra⁵². Esta alternativa tem potencial para desempenhar um papel impor-

tante na transferência de resistência devido às elevadas concentrações de vírus (bacteriófagos) em habitats aquáticos, de água do mar ou de sedimentos marinhos¹².

Independentemente da forma como a resistência é adquirida, o uso de agentes antimicrobianos cria condições adequadas para a emergência e a disseminação de bactérias resistentes⁵. Esta disseminação ocorre como consequência da transferência horizontal mediada por um conjunto diversificado de elementos de ADN móveis, como plasmídeos, transposões, ilhas genómicas, integrões, bem como, transformação natural¹⁹.

Consequência da transferência de resistência a antimicrobianos para o Homem

As bactérias resistentes podem disseminar-se e ultrapassar fronteiras geográficas através do movimento de pessoas, ou serem transferidas para os seres humanos através de feridas, pela exposição obtida após o manuseamento de peixe, contacto com animais terrestres e através da cadeia alimentar^{3,4,19,26}.

Isso implica que o uso de antimicrobianos em animais tenha consequências para a saúde pública, sendo a resistência aos antimicrobianos considerado um problema a nível mundial⁵. Os animais e seres humanos podem estar expostos a bactérias resistentes através do contacto com outros animais ou consumo de produtos alimentares contaminados⁵⁰. Ocorre ainda uma libertação de substâncias activas em ecossistemas aquáticos⁶ e de uma quantidade significativa da substância original, não metabolizada, através da urina ou fezes, no ambiente⁵³.

A Tabela 2 resume os principais agentes antimicrobianos utilizados na aquacultura mundial e a sua importância na medicina humana. Assim, entre os agentes antimicrobianos comumente utilizados em aquacultura, vários são classificados pela OMS como criticamente importantes para utilização em medicina humana. A resistência aos antibióticos limita severamente as opções em medicina humana,

e, portanto, a utilização destes agentes em animais deve ser evitada ou controlada a fim de prevenir a disseminação de resistência a antimicrobianos^{8,54}.

O efeito tóxico dos resíduos de antibióticos acumulados no músculo de peixes origina, também, um risco potencial para o consumidor^{1,7,50,53}.

No que se refere ao Homem, há poucos relatos de reacções adversas a antibióticos com origem em produtos de aquacultura¹⁰.

Segundo o regulamento (CEE) n.o 2377/90⁵⁵ os limites permitidos baseiam-se *no tipo e quantidade de resíduos que se considera não apresentarem qualquer risco de toxicidade para a saúde humana nos termos expressos pela dose diária aceitável (DDA) ou com base numa DDA temporária com um factor de segurança adicional. Atende também a outros riscos pertinentes para a saúde pública, bem como a aspectos de tecnologia alimentar.*

A quantidade de antibióticos excretada em aquacultura varia com o tipo de substância, dosagem, espécie e idade animal, entre outros factores. Mesmo quando a molécula é em grande parte metabolizada, alguns dos produtos de degradação excretados podem permanecer bioactivos⁵⁴.

Como podemos visualizar na Tabela 3, as tetraciclina e os macrólidos apresentam baixa taxa de metabolização (< 20% da dose administrada), enquanto as lincosamidas, as fluoroquinolonas e as sulfonamidas apresentam moderada a elevada taxa de metabolização (> 20% da dose). Já os aminoglicosídeos têm comportamento bastante variável⁵⁴.

Tabela 3 - Taxa de metabolismo dos principais antimicrobianos em aquacultura⁵⁵

Grupo farmacológico	Taxa de metabolismo no animal
Tetraciclina	Baixa
Macrólidos	Baixa
Aminoglicosídeos	Baixa a elevada
Lincosamidas	Moderada
Fluoroquinolonas	Moderada a elevada
Sulfonamidas	Elevada

Baixa: < 20%; Moderada: de 20 a 80%; Elevada: > 80% da dose administrada.

A fim de minimizar o possível impacto do uso de antimicrobianos em animais sobre a saúde pública e animal, várias organizações internacionais, como a OMS, a OIE, a FAO

Tabela 2 - Principais agentes antimicrobianos utilizados em aquacultura e a sua importância na medicina humana⁸

Agente antimicrobiano (classe de antibiótico)	Via de administração em aquacultura	Importância da classe em medicina humana
Amoxicilina (aminopenicilinas)	Oral	Elevada
Ampicilina (aminopenicilinas)	Oral	Elevada
Cloranfenicol (fenicol)	Oral/banho/injectável	Importante
Florfenicol (fenicol)	Oral	Importante
Eritromicina (macrólidos)	Oral/banho/injectável	Elevada
Estreptomicina, neomicina (aminoglicosídeos)	Banho	Elevada
Furazolidona (nitrofuranos)	Oral/banho	Importante
Nitrofurantoína (nitrofuranos)	Oral	Importante
Ácido oxolínico (quinolonas)	Oral	Elevada
Enrofloxacina (fluoroquinolonas)	Oral/banho	Elevada
Flumequina (fluoroquinolonas)	Oral	Elevada
Oxitetraciclina, clortetraciclina, tetraciclina (tetraciclina)	Oral/banho/injectável	Muito importante
Sulfonamidas	Oral	Importante

e a Comissão Europeia, nos últimos anos, têm dado importância à utilização prudente e racional de antimicrobianos em animais, não só para salvaguardar a eficácia dos antibióticos em medicina veterinária, mas, mais ainda, para evitar o aparecimento e a disseminação de fenótipos resistentes indesejáveis em patógenos zoonóticos, bem como a transmissão entre animais e humanos. Também as associações profissionais internacionais, como a Associação Mundial de Veterinária (WVA), a Federação Internacional dos Produtores Agrícolas (IFAP), a Federação Mundial da Indústria de Saúde Animal (COMISA), a Federação dos Veterinários da Europa (FVE), o Colégio Americano de Medicina Veterinária Interna (ACVIM) e as Associações Americanas de Médicos Veterinários (AVMA), bem como as nacionais, como as Ordens dos Farmacêuticos (OF), dos Médicos (OM) e dos Médicos Veterinários (OMV), tem reconhecido o problema⁵.

No entanto, os piscicultores ainda contam com o uso agressivo de quimioterapêuticos para combater infecções bacterianas e infestações de ectoparasitas, bem como desinfetantes para evitar a propagação de doenças³.

Consequência da transferência de antimicrobianos no ambiente

De modo geral, as concentrações ambientais de antimicrobianos são relativamente baixas (ng/L ou Kg a $\mu\text{g/L}$ ou Kg), sendo consideradas insuficientes para ocasionar efeitos tóxicos agudos aos organismos expostos^{54,56}.

Os resíduos são detectados a partir de diferentes classes de antibióticos importantes, tais como os macrólidos, tetraciclina, sulfonamidas, quinolonas e β -lactâmicos. A maioria dos antibióticos não são totalmente eliminados durante o processo de tratamento de águas residuais. Os resultados das investigações indicam que um certo número de antibióticos não é biodegradável no ambiente aquático, como a tetraciclina, que foi detectada no solo meses após a aplicação do fertilizante resul-

tante de estações de tratamento de águas residuais⁵⁶.

Nas águas residuais, águas de superfície, sedimentos, lamas e solos, um cocktail de diferentes compostos activos pode estar presente, em contraste com a aplicação médica e veterinária de antibióticos e desinfetantes. As concentrações são normalmente de ordens de grandeza mais baixa⁵⁶. Contudo, pouco se sabe sobre o efeito crónico da exposição a baixas concentrações desses resíduos a longo prazo, qual o efeito em espécies que não são estudadas e qual o impacto ambiental proveniente dos produtos de degradação desses antibióticos⁵⁴.

No entanto, pode haver também efeitos indesejáveis sobre as populações selvagens, tais como interações genéticas entre peixes de produção intensiva e peixes selvagens, transmissão de doenças pelos peixes que escaparam dos sistemas de aquacultura ou através da ingestão de resíduos contaminados².

As bactérias dos animais normalmente sobrevivem pouco tempo no ambiente. No entanto, foi sugerido que as bactérias resistentes a antimicrobianos a partir de animais possam transferir os genes de resistência a bactérias do solo. Tem sido demonstrado que os genes de resistência antimicrobiana podem estar presentes nos produtos residuais provenientes da produção animal e podem sobreviver durante um longo período de tempo no solo¹⁹. Por exemplo, em 2007, a FDA teve de bloquear temporariamente as vendas de cinco produtos da aquacultura da China, porque tinham salmonelas e, entre outros resíduos, nitrofuranos e fluoroquinolonas³.

No entanto, em comparação com outras formas de transmissão, este método de propagação no ambiente é, provavelmente, de menor importância. No futuro, as mudanças nos sistemas de produção podem aumentar a importância da difusão do meio ambiente, sobretudo se a produção se tornar mais integrada ou mais intensiva em áreas geográficas de menores dimensões¹⁹.

CONCLUSÃO

Em suma, o uso de antibióticos em aquacultura apresenta riscos de contaminação do meio ambiente, com possíveis nefastas e imprevisíveis consequências nos ecossistemas aquáticos, assim como tem impacto na saúde pública. O consumo de antibióticos nos alimentos de origem animal pode ter repercussões directas na saúde do indivíduo, e no seu microbiota intestinal. Também a transmissão de bactérias resistentes aos antibióticos, através de contacto directo ou da cadeia alimentar, e a promiscuidade genética bacteriana com disseminação de genes de resistência, colocam sérios problemas terapêuticos na medicina humana e veterinária. O estudo do comportamento e impacto no ambiente e em saúde pública dos antibióticos usados em aquacultura representa um enorme desafio, sendo essencial na avaliação de riscos e implementação de medidas de controlo do uso destes agentes.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado no âmbito da Tese de Mestrado em Segurança Alimentar da Mestre Soraia Gastalho e foi financiado pelo FEDER através do Programa Operacional Programa Factores de Competitividade - COMPETE, via FCT - Fundação Portuguesa de Ciência e Tecnologia (Projecto PTDC/AGR-ALI/122119/2010).

ABREVIATURAS

ACVIM – Colégio Americano de Medicina Veterinária Interna

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

AVMA – Associações Americanas de Médicos Veterinários

COMISA – Federação Mundial da Indústria de Saúde Animal

CPEs – Carapenemases

ESBL – β -lactamases de espectro alargado (Extended Spectrum β -lactamases)

EUA – Estados Unidos da América

FAO – Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (Food and Agriculture Organization)

FDA – Autoridade Americana para a Alimentação e Medicamentos (Food and Drugs Administration)

FVE – Federação dos Veterinários da Europa

IFAP – Federação Internacional dos Produtores Agrícolas

MDR – Multirresistência

OF – Ordem dos Farmacêuticos

OIE – Organização Mundial para a Saúde Animal (World Organization for Animal Health)

OM – Ordem dos Médicos

OMS – Organização Mundial de Saúde

OMV – Ordem dos Médicos Veterinários

SMX – Sulfametoxazol

TMP – Trimetoprim

VTEC – *Escherichia coli* verotoxigénica

WVA – Associação Mundial de Veterinária

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tavechio W, Guidelli G, Portz L. Alternativas para a prevenção e o controlo de patógenos em piscicultura. B. Inst. Pesca, 2009;35(2):335-41.
2. Read P, Fernandes T. Management of environmental impacts of marine aquaculture in Europe. Aquaculture. 2003;226(1-4):139-63.
3. Burrige L, Weis JS, Cabello F, Pizarro J, Bostick K. Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects. Aquaculture. 2010 Aug; 306(1-4):7-23.
4. Cabello FC. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. Environ Microbiol. 2006;8(7):1137-44.
5. Guardabassi L, Kruse H. Princípios da Utilização Prudente e Racional de Antimicrobianos em Animais. Guia de Antimicrobianos em Veterinária. 2010. 17-30.
6. Gordon L, Giraud E, Ganière J-P, Armand F, Bouju-Albert a, de la Cotte N, et al. Antimicrobial resistance survey in a river receiving effluents from freshwater fish farms. J. Appl Microbiol. 2007;102(4):1167-76.

7. Leston S, Nunes M, Lemos MFL, Jorge G, Parda MÂ, Ramos F. The veterinary drug use and environmental. In: Borgearo RS, editor. Animal Feed: Types, nutrition and safety. Nova Science Publishers, Inc.; 2011. 61–83.
8. Heuer OE, Kruse H, Grave K, Collignon P, Karunasagar I, Angulo FJ. Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture. Clinical infectious diseases: an official publication of the Inf Dis. Soc. Am. 2009;49(8):1248–53.
9. FAO F. The state of world fisheries and aquaculture. Rome; 2012. 209.
10. Smith, Peter R, . Guidelines for antimicrobial use in aquaculture. In L. B. J. and H. K. Luca Guardabassi, editores. Guide to antimicrobial use in animals. Blackwell; 2008. 207– 18.
11. FAO. Aquaculture topics and activities. 2013. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/topic/13542/en>
12. Romero J, Feijó C, Navarrete P. Antibiotics in aquaculture – Use, abuse and alternatives; In: Carvalho E, editor. Health and Environment in Aquaculture. 2012.
13. Muchlisin ZA. Aquaculture. In: Smiljanic T, editor. Croatia 2012. 1–400.
14. Sørum H. Antimicrobial drug resistance in fish pathogens. In: Aarestrup FM, editor. Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. Washington, D. C.; 2006. 213–37.
15. Torrecillas S, Makol A. Effects on mortality and stress response in European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), fed mannan oligosaccharides (MOS) after *Vibrio anguillarum* exposure. J. Fish Dis. 2012. 591–602.
16. Cantas L, Fraser T. The culturable intestinal microbiota of triploid and diploid juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*)-a comparison of composition and drug resistance. BMC veterinary research. BioMed Central Ltd; 2011;7(1):71.
17. McEwen, M. AF, David J. Monitoring of antimicrobial resistance in animals: principles and practices. In: Frank M. Washington, editor. Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. Washington, D. C.; 2006. 397–413.
18. Lees P, Shojaee Aliabadi F. Rational dosing of antimicrobial drugs: animals versus humans. Int. J. Antimicrobial Agents. 2002;19(4):269–84.
19. Aarestrup FM. The origin, evolution, and local and global dissemination of antimicrobial resistance. In: Aarestrup FM, editor. Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. Washington, D. C.; 2006. 339–59.
20. Ghenghesh K, Ahmed S. *Aeromonas*-associated infections in developing countries. Inf. Develop Countries. 2008;2:81–98.
21. Deodhar LP, Saraswathi K, Varudkar A. *Aeromonas* spp. and their association with human diarrheal disease. J. Clin. Microbiol. 1991;29(5):853–6.
22. Cantas L, Midtlyng PJ, Sørum H. Impact of antibiotic treatments on the expression of the R plasmid tra genes and on the host innate immune activity during pRAS1 bearing *Aeromonas hydrophila* infection in zebrafish (*Danio rerio*). BMC Microbiology. BioMed Central Ltd; 2012;12(1):37.
23. Rogol M, Sechter I. Pril-xylose-ampicillin agar, a new selective medium for the isolation of *Aeromonas hydrophila*. J. Med. Microbiol. 1979:229–31.
24. Pablos M, Rodríguez-Calleja JM, Santos J a, Otero A, García-López M-L. Occurrence of motile *Aeromonas* in municipal drinking water and distribution of genes encoding virulence factors. Int. J. Food Microbiol. 2009;135(2):158–64.
25. Barcellos L, Kreutz L, Rodrigues B, Santos L, Motta A, Ritter F, et al. Aspectos macro e microscópico das lesões e perfil de resistência a antimicrobianos. B. Inst. Pesca. 2008;34(3):355–63.
26. Jacobs L, Chenia HY. Characterization of integrons and tetracycline resistance determinants in *Aeromonas* spp. isolated from South African aquaculture systems. Int. J. Food Microbiol. 2007;114(3):295–306.
27. Picão RC, Poirel L, Demarta A, Petrini O, Corvaglia AR, Nordmann P. Expanded-spectrum beta-lactamase PER-1 in an environmental *Aeromonas media* isolate from Switzerland. Antimicrobial Ag. Chemotherapy. 2008;52(9):3461–2.

28. Carvalho MJ, Martínez-Murcia A, Esteves AC, Correia A, Saavedra MJ. Phylogenetic diversity, antibiotic resistance and virulence traits of *Aeromonas* spp. from untreated waters for human consumption. *Int. J. Food Microbiol.* 2012;159(3):230–9.
29. Mendonça N, Leitão J, Manageiro V, Ferreira E, Caniça M. Spread of extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-producing *Escherichia coli* clinical isolates in community and nosocomial environments in Portugal. *Antimicrobial Ag. Chemotherapy.* 2007;51(6):1946–55.
30. Hernould M, Gagné S, Fournier M, Quentin C, Arpin C. Role of the AheABC efflux pump in *Aeromonas hydrophila* intrinsic multidrug resistance. *Antimicrobial Ag. Chemotherapy.* 2008;52(4):1559–63.
31. Lynch JP, Clark NM, Zhanel GG. Evolution of antimicrobial resistance among *Enterobacteriaceae* (focus on extended spectrum b-lactamases and carbapenemases). *Exp. Opin. Pharmacotherapy.* 2013;199–210.
32. Bergey D, Breed R, Murray E, Smith N. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.* 1957;1–8.
33. Stone ND, O'Hara CM, Williams PP, McGowan JE, Tenover FC. Comparison of disk diffusion, VITEK 2, and broth microdilution antimicrobial susceptibility test results for unusual species of *Enterobacteriaceae*. *J. Clin Microbiol.* 2007;45(2):340–6.
34. Freney J, Husson MO, Gavini F, Madier S, Martra a, Izard D, et al. Susceptibilities to antibiotics and antiseptics of new species of the family *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Ag. Chemotherapy.* 1988;32(6):873–6.
35. Paterson DL. Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. *Am. J. Infection control.* 2006;34(5 Suppl 1):S20–8; discussion S64–73.
36. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg. Infectious Dis.* 2011;17(10):1791–8.
37. EFSA, ECDC. The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in Antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2011. *EFSA J.* 2013;11(5).
38. Picão RC, Cardoso JP, Campana EH, Nicoletti AG, Petrolini FVB, Assis DM, et al. The route of antimicrobial resistance from the hospital effluent to the environment: focus on the occurrence of KPC-producing *Aeromonas* spp. and *Enterobacteriaceae* in sewage. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* Elsevier Inc.; 2013;1–6.
39. Jiang H, Tang D, Liu Y, Zhang X, Zeng Z, Xu L, et al. Prevalence and characteristics of b-lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Escherichia coli* isolated from farmed fish in China. *J. Antimicrobial Chemotherapy.* 2012;67:2350–3.
40. Machado E, Coque TM, Cantón R, Sousa JC, Peixe L. Commensal *Enterobacteriaceae* as reservoirs of extended-spectrum beta-lactamases, integrons, and sul genes in Portugal. *Frontiers in Microbiology.* 2013;4:1–7.
41. Yagoub SO. Isolation of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* spp. from raw fish sold in fish market in Khartoum state. *J. Bacteriol Res.* 2009;1(7):85–8.
42. Vieira RHSDF, Carvalho EMR, Carvalho FCT, Silva CM, Sousa O V, Rodrigues DP. Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and pond environment in northeastern Brazil. *Journal of environmental science and health. Part. B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes.* 2010;45(3):198–203.
43. Regulamento da Comissão (CE) N.º 2073/2005 de 15 de Novembro de 2005. 1–26.
44. Sabat G, Rose P, Hickey WJ, Harkin JM. Selective and Sensitive Method for PCR Amplification of *Escherichia coli* 16S rRNA Genes in Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000;66(2).
45. OIE. OIE list of antimicrobials of veterinary importance. Paris; 2007. 1–9.
46. Pato MVV. Bases genéticas e mecanismos da resistência aos antibióticos. Susceptibilidade aos antibióticos. Manual de laboratório. Copyright. 1989. 61–73.

47. Stratton IV CW. Mechanisms of action for antimicrobial agents: General principles and mechanisms for selected classes of antibiotics. In: Lorian V, editor. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. 4th ed. 1996. 579–603.
48. Kocsis B, Mazzariol A, Kocsis E, Koncan R, Fontana R, Cornaglia G. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in *Enterobacteriaceae* strains isolated in North-East Italy. *Antimicrobial Original Research Paper*. 2013;21:36–40.
49. Nested EW, Roberts CE, Pearsall NN, Anderson DG, Nester MT. Antimicrobial Medicine. In: Terrance S, editor. *Microbiology - A human perspective*. 2nd ed. 1998. 447–70.
50. Marshall BM, Levy SB. Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clin. Microbiol. Rev.* 2011;24(4):718–33.
51. Rodríguez-Blanco A. Integrating conjugative elements as vectors of antibiotic, mercury, and quaternary ammonium compound resistance in marine aquaculture environments. *Antimicrobial Ag. Chemotherapy*. 2012;26:19–26.
52. Nested EW, Roberts CE, Pearsall NN, Anderson DG, Nester MT. Bacterial genetics. In: Terrance S, editor. *Microbiology - A human perspective*. 1998. 167–80.
53. Hirsch R, Ternes T, Haberer K, Kratz KL. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Sci. Total Environ.* 1999;225(1-2):109–18.
54. Regitano JB, Leal RMP. Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. 2010;34(3):601–16.
55. Regulamento da Comissão (CEE) n.º 2377/90 de 26 de Junho de 1990. 1-143.
56. Kümmerer K. Resistance in the environment. *J. Antimicrobial Chemotherapy*. 2004;54(2):311–20.