



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JOSIANE ANIELE SCARPASSA

**DETECÇÃO MOLECULAR E ISOLAMENTO DE
Streptococcus agalactiae EM TILÁPIA DO NILO
(*Oreochromis niloticus*) COM E SEM SINAIS CLÍNICOS DE
DOENÇA BACTERIANA**



Universidade Estadual de Londrina



Instituto Agrônomo do Paraná



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

JOSIANE ANIELE SCARPASSA

**DETECÇÃO MOLECULAR E ISOLAMENTO DE
Streptococcus agalactiae EM TILÁPIA DO NILO
(*Oreochromis niloticus*) COM E SEM SINAIS CLÍNICOS DE
DOENÇA BACTERIANA**

JOSIANE ANIELE SCARPASSA

**DETECÇÃO MOLECULAR E ISOLAMENTO DE
Streptococcus agalactiae EM TILÁPIA DO NILO
(*Oreochromis niloticus*) COM E SEM SINAIS CLÍNICOS DE
DOENÇA BACTERIANA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Laurival Antônio Vilas-Bôas.

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Lucienne Garcia Pretto-Giordano.

Londrina
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Scarpassa, Josiane Aniele .

Detecção molecular e isolamento de *Streptococcus agalactiae* em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com e sem sinais clínicos de doença bacteriana / Josiane Aniele Scarpassa. - Londrina, 2014.
54 f. : il.

Orientador: Laurival Antônio Vilas-Bôas.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas , 2014.

Inclui bibliografia.

1. Tilápia - Tese. 2. Estreptococo - Tese. 3. Genética bacteriana - Tese. 4. Reação em cadeia de polimerase - Tese. I. Vilas-Bôas, Laurival Antônio . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas . III. Título.

JOSIANE ANIELE SCARPASSA

DETECÇÃO MOLECULAR E ISOLAMENTO DE *Streptococcus agalactiae* EM TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*) COM E SEM SINAIS CLÍNICOS DE DOENÇA BACTERIANA

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Laurival Antônio Vilas-Bôas
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a. Alice Fernandes Alfieri
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a. Kérley Braga Pereira Bento Casaril
Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNOESTE

Londrina, 25 de fevereiro de 2014.

Dedico este trabalho à Deus por mais uma etapa cumprida; Aos meus pais Cesar e Célia, a minha Tia Vera, aos meus Avós Orlando e Iede ao meu irmão Matheus que fizeram tudo para que eu pudesse chegar até aqui; e aos meus amigos que estiveram ao meu lado sempre me apoiando e me ajudando.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelo Dom da Vida, por guiar meus caminhos, me segurar nos momentos difíceis, e me proporcionar essa jornada.

A toda minha família principalmente aos meus pais Orlando Cesar Scarpassa e Célia Crepaldi Scarpassa, ao meu irmão Matheus Fernando Scarpassa, aos meus avós Orlando Scarpassa e Iede Franch Scarpassa, a minha tia Vera Margarete Scarpassa e pelo suporte e carinho e compreensão.

Aos orientadores Prof^o Dr. Laurival Antônio Vilas-Bôas e Prof^a Dra. Lucienne Garcia Pretto-Giordano, pela oportunidade concedida, confiança depositada, paciência, ensinamentos, dedicação, competência, lições de vida e principalmente pelas suas constantes demonstrações de respeito, humildade, amizade e sabedoria.

Aos alunos de iniciação científica Bruno de Oliveira Hidalgo, Maxwell Bernardo Junior, Felipe Eduardo Scardovelli e Carolina Galdino Gumiero Ribeiro, pela dedicação, companhia, amizade e colaboração em todos os experimentos que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas de trabalho e amigos do Laboratório de Genética e Taxonomia de Bactérias da UEL, Gislayne Fernandes Trindade Vilas-Boas, Fernanda Aparecida Pires Fazon, Ana Paula Scaramal Ricieto, Fernanda Henrique, Priscilla Cardoso, André Rocha Barbosa, Kelly Christiane Constanski Silva, Janaina Zorzetti e André Luciano Nadal pelos ensinamentos, por toda a ajuda prestada nos experimentos, por me apoiarem em todos os momentos, pela boa companhia, pelo carinho, amizade e principalmente pelo incentivo.

A todos do Laboratório de Microbiologia Veterinária da UEL, principalmente aos técnicos José e Hélio e as residentes Joice, Roberta, Sara e Luana por toda colaboração na preparação dos materiais, identificação dos isolados e por todos ensinamentos.

A todos da Piscicultura da UEL que cederam o espaço para a realização da necropsia dos peixes, por toda ajuda e ao Heitor pela ajuda com os materiais de coleta.

As pisciculturas que cederam gentilmente os peixes colaborando muito para a realização deste trabalho.

Aos funcionários das pisciculturas que sempre me ajudaram nas coletas.

Aos motoristas da UEL que sempre me transportaram com segurança e gentilmente me ajudaram nas coletas.

A todos do Laboratório de Genética e Ecologia Animal da UEL, principalmente aos amigos Wilson e Dhiego por sempre prestativos, pela amizade companhia e ensinamentos.

A todos do Laboratório de Citogenética Animal da UEL, principalmente Natália, Juceli, Fábio, Mariane, Angélica, Prof^a. Dr^a. Renata, Prof^a. Dr^a. Lúcia, Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia, pelos ensinamentos e por sempre serem atenciosos e prestativos em tudo que precisei para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos do Laboratório de Marcadores Moleculares e Citogenética de Plantas da UEL pela companhia, ajuda e ensinamentos.

A coordenadora e secretaria do programa de pós-graduação do programa de Genética e Biologia Molecular da UEL, Prof^a Dr^a. Ana Lúcia Dias e a técnica administrativa Maria Sueli Trindade Miranda Sueli, por toda colaboração, apoio e voto de confiança.

Aos meus amigos da turma T56 de Ciências Biológicas da UEL, principalmente Thiago Vidotto, Natara, Angélica Tronco, Lauana, Rafaela, Pedro, Lilian, Tatiana, Paula, Angélica Alves, Mariane, Lilian, Marcela, Marina, Tamires, Larissa, pelo carinho, amizade e apoio em todos os momentos e por muitas vezes acreditar mais em mim que eu mesma.

Aos amigos de São José do Rio Preto, principalmente, Camila, Carolina, Renata, Nickele, Sabrina, Victor, Alessandra, Marília, que mesmo na distancia foram companheiros, carinhosos, dedicados e preocupados comigo.

Aos amigos de Londrina principalmente que estiveram do meu lado, sempre me dando força e carinho.

A todos do Grupo Yahweh Nessi por estarem ao meu lado e por terem me mostrado sempre o amor de Deus por mim.

Aos amigos Milene, Thiago Vidotto, Camila, Mário, Fernanda F, Fernanda H, Ana Paula, Priscilla, Kelly, André, Natara, Angélica, Karla, Marcio, Izidoro, Thais, Alenise por acompanharem de perto, sendo sempre um ponto de apoio e alegria em minha vida.

A Universidade Estadual de Londrina, professores, funcionários e ao Programa de Genética e Biologia Molecular, pela contribuição na minha formação profissional.

A Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida.

A todos aqueles que estiveram ao meu lado, seja ajudando, apoiando, incentivando, pois sozinha jamais teria conseguido realizar este trabalho.

Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado, com certeza vai mais longe (Clarice Lispector)

SCARPASSA, Josiane Aniele. **Detecção molecular e isolamento de *streptococcus agalactiae* em tilápia do nilo (*oreochromis niloticus*) com e sem sinais clínicos de doença bacteriana.** 2014. 54f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

RESUMO

A produção de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) está em intenso crescimento no Brasil e no mundo. *Streptococcus agalactiae* é considerado um sério problema sanitário em sistemas intensivo de cultivo de tilápias, causando prejuízos econômicos a atividade. O objetivo do presente trabalho foi verificar a eficácia de identificação de *S. agalactiae* pela técnica de amplificação por PCR e isolamento bacteriano de *S. agalactiae* em tilápia do Nilo com e sem sinais clínicos de doença bacteriana durante as quatro estações do ano de 2013. Foram coletados 200 peixes em cinco propriedades de criação em tanques-rede, no norte do Paraná, Brasil, sendo 50 animais por estação. O verão foi a estação com maior ocorrência de *S. agalactiae* tanto pela técnica de amplificação por PCR quanto pela técnica de isolamento. Dentre os peixes coletados, 17 apresentavam sinais clínicos de doença bacteriana e 183 estavam aparentemente saudáveis. De cada peixe foram colhidas amostras em duplicata de rim, encéfalo e fígado, para isolamento bacteriano e extração de DNA e posterior amplificação por PCR utilizando os iniciadores F1 e IMOD específicos para região do gene 16S *rRNA* de *S. agalactiae*. Em 56% (112/200) dos peixes avaliados a PCR foi eficaz na detecção de positivos para *S. agalactiae* e, somente, em 10% (20/200) dos peixes foi possível o isolamento da bactéria. Foi detectada por PCR em 100% (17/17) dos peixes com sinais clínicos e destes 94,11% (16/17) por isolamento. Dos 183 peixes assintomáticos, 51,91% foram positivos na PCR e somente 2,18% por isolamento. Esses dados sugerem que o próprio peixe pode ser o reservatório desta bactéria, podendo em condições adversas, os animais assintomáticos tornarem-se sintomáticos e disseminar a bactéria. Desta forma, a utilização de técnicas de detecção mais sensíveis como a PCR são importantes para monitorar a presença da bactéria nos tecidos de peixes assintomáticos e intervir no manejo sanitário antes do agravamento dos sinais clínicos e morte dos peixes.

Palavras-chave: PCR. Infecção subclínica. Sinais clínicos. Doença bacteriana.

SCARPASSA, Josiane Aniele. **Molecular detection and isolation of *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) with and without clinical signs of bacterial disease.** 2014. 54p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

ABSTRACT

Production of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is in intensive growth in Brazil and worldwide. *Streptococcus agalactiae* considered a serious health problem in tilapia intensive culture systems, causing economic losses for this activity. The objective of this current paper was to verify the effectiveness of PCR by means of amplification technique and bacterial isolation of *S. agalactiae* in Nile tilapia with clinical signs and asymptomatic during the four seasons of 2013. Two hundred fish were collected from five farming properties of net tank fish, at the North region of Paraná, Brazil, being 50 animals per season. Summer was the season with the greatest occurrence of *S. agalactiae* not only due to the amplification technique by means of PCR, but also by means of isolation technique. Among the collected fish, some presented clinical signs of bacterial disease and others do not. From each fish samples were obtained in duplicate from kidney, brain, liver for bacterial isolation and DNA extraction and following up amplification, by means of PCR amplification with F1 and IMOD primers, for the gene area 16 S rRNA specific for *S. agalactiae*. In 56% of evaluated fish, (112 out of 200) was detected positive for *S. agalactiae* by means of PCR and only in 10% (20 out of 200) of the fish the bacterium was detected by isolating. Were detected the presence of *S. agalactiae* by PCR in 100% (17 out of 17) of fish with clinical signs and, of these, 94.11% by isolation. Of the 183 asymptomatic fish, 51.91% was detected by PCR and only 2.18% by insulation. These data suggest that fish itself can be the reservoir of this bacterium, and it may in adverse conditions, the asymptomatic animals become symptomatic and disseminate the bacterium. Thus, the usage of more sensitive detection techniques like PCR are important in order to monitor the presence of the bacterium at the tissues of asymptomatic fish and intervene at the sanitary handling before the aggravation of the clinical signals and death of the fish.

Keywords: PCR. Subclinical infection. Clinical signs. Bacterial disease.

SUMÁRIO

1	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	12
1.1	CARACTERÍSTICAS GERAIS DA PRODUÇÃO	12
1.2	TILÁPIA DO NILO (<i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i>)	13
1.3	TANQUES-REDE	14
1.4	ESTREPTOCOCOSE EM PEIXES	15
1.5	CARACTERÍSTICAS DE <i>S. AGALACTIAE</i>	19
1.6	IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS	20
2	OBJETIVOS	33
2.1	OBJETIVO GERAL	33
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
3	ARTIGO CIENTÍFICO	34
4	INTRODUÇÃO	36
5	MATERIAL E MÉTODOS	38
5.1	COMITÊ DE ÉTICA	38
5.2	COLETAS	38
5.3	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DAS CEPAS BACTERIANAS	39
5.4	EXTRAÇÃO DE DNA DE CEPAS BACTERIANAS ISOLADAS DOS TECIDOS DE PEIXES	39
5.5	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR POR PCR	39
5.6	ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE DOS INICIADORES F1 E IMOD	40
5.7	EXTRAÇÃO DE DNA DOS TECIDOS	41
5.8	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE <i>S. AGALACTIAE</i> POR PCR NOS TECIDOS	42
6	RESULTADOS	42
7	DISCUSSÃO	45
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
	REFERÊNCIAS	50

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA PRODUÇÃO

A Organização das Nações Unidas (ONU) considera a pesca e a aquicultura importantes atividades para a geração de alimentos, visto que fornecem alimento proteico de alta qualidade, além de contribuir para a geração de empregos tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (ARANA, 1999). A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda o consumo anual de pescado de pelo menos 12 quilos por habitante/ano. No Brasil entre os anos de 2009 e 2010 o ritmo de crescimento da demanda por pescado foi de 7,9%. Em 2011 o país alcançou 11,17 quilos em média por habitante/ano chegando a ser 14,5% a mais do que em relação ao ano anterior. Atualmente estima-se, pela primeira vez, que o consumo interno de pescado deve alcançar a quantidade recomendada pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) (BRASIL, 2013a). Segundo a FAO há uma demanda crescente acelerada para a produção de pescado no mundo e a previsão para 2030 é de um aumento de 100 milhões de toneladas por ano na produção mundial (BRASIL, 2011).

O Brasil tem sido visto como um dos países com condições de atender a grande demanda de pescado mundial, podendo tornar-se um dos maiores produtores mundiais, com possibilidade de chegar a produzir até 20 milhões de toneladas por ano (BRASIL, 2011). Essa previsão é baseada no grande potencial que o Brasil detém em relação à piscicultura, visto que existe um vasto território com abundância em recursos hídricos. Contabilizando as águas continentais, há no país mais de dez milhões de hectares de lâmina d'água em reservatórios de usinas hidrelétricas, açudes e propriedades particulares, o que representa aproximadamente 13% da água no mundo (SIDÔNIO et al., 2012). Em adição a área disponível, o Brasil possui condições climáticas que favorecem o cultivo de peixes de água doce, além de disponibilidade de grãos para o processamento de rações balanceadas (CASTAGNOLLI, 1995; BORGHETTI et al., 2003).

A produção aquícola nacional, de origem continental, aumentou aproximadamente 40% no triênio 2008-2010, passando de 282.008,1 para 394.340,0 toneladas (BRASIL, 2010). A produção de 2011 foi de 544.490,0 toneladas, obtendo um crescimento de 38,1% em relação a 2010. Em 2011, o Paraná destacou-se na

produção de pescado continental como o estado de maior produção, com 73.831,1 toneladas. Um dos fatores para o crescimento significativo no setor da aquicultura pode estar vinculado à ampliação de políticas públicas que facilitam o acesso aos programas governamentais existentes, tal como o Plano Mais Pesca e Aquicultura desenvolvido pelo Ministério da Pesca e Aquicultura (BRASIL, 2013b).

1.2 TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) pertence à Ordem Perciformes, família Cichlidae. A espécie é proveniente do continente Africano na bacia do rio Nilo, no Leste da África e encontra-se amplamente disseminada nas regiões tropicais e subtropicais (CARVALHO, 2006). A introdução da tilápia para cultivo foi relatada em quase 100 países diferentes, tanto para melhorar a produtividade pesqueira como para auxiliar no desenvolvimento da aquicultura, pois existem muitas informações detalhadas sobre as características biológicas e zootécnicas do cultivo da espécie (COWARD; BROMAGE, 2000; LÈVEQUE, 2002; BOSCARDIN, 2008). No Brasil, a tilápia do Nilo foi introduzida em 1971 em açudes do nordeste e então difundiu-se para todo o país (PROENÇA; BITTENCOURT, 1994).

A tilápia do Nilo está entre os peixes mais consumidos no mundo (SINDÔNIO et al., 2012). Além disso, é considerada como a espécie de maior potencial aquícola pelas diversas características favoráveis de produção, tais como rápida taxa de crescimento, adaptação a diversas condições de criação, filé de alta qualidade, boa aceitação de mercado, elevado valor comercial, além de apresentar importantes requisitos para a indústria da filetagem (FITZSIMMONS, 2000; SHELTON, 2002; ONO; KUBTIZA, 2003; MOREIRA et al., 2007; RIGHETTI et al., 2011). Essa espécie é recomendada principalmente para produção em tanques-rede, pois, uma vez controlada a intensidade de sua propagação, adapta-se facilmente às práticas de manejo alimentar. Isso é possível, pois a espécie apresenta hábito alimentar onívoro, de amplo espectro, que possibilita a utilização de rações comerciais com baixas quantidades de proteínas quando comparados aos peixes carnívoros, diminuindo assim o custo de produção. Uma das principais características, da espécie é a capacidade de tolerar altas densidades de estocagem

(BALARIN; HALLER, 1982; PHILIPPART; RUWET, 1982; KEENLEYSIDE, 1991; BEVERIDGE, 1996; FITZSIMMONS, 2000).

No Brasil, a tilápia do Nilo é a espécie mais utilizada na piscicultura. Sua produção apresenta padrão de crescimento constante desde 1994. Entre os anos de 2003 a 2009 a tilapicultura cresceu 105%, passando de 65.857,5 para 132.957,8 toneladas. Em 2011, a produção foi de 253.824,1 que representa 46,6% do total da produção de pescado continental do Brasil e o Paraná destaca-se entre os estados de maior produção (BRASIL, 2013b).

1.3 TANQUES-REDE

Tanques-rede são estruturas flutuantes, que permitem a livre circulação de água no seu interior, usados para o confinamento de elevadas densidades de peixes. Geralmente são compostos por uma estrutura metálica, madeira ou material plástico onde são fixadas as redes ou telas, com diferentes formas geométricas (cilíndrico, paralelepípedo, cúbico) (COSTA, 2003; ONO, 2005).

A produção de peixes em tanque-rede é uma das modalidades de sistema intensivo de criação (SCHMITTOU, 1993) e em função de suas vantagens, vem sendo uma das formas de produção mais utilizadas no Brasil, assim como em diversos países com práticas em aquicultura (ZANIBONI FILHO et al., 2005). O sistema intensivo de produção de peixes é caracterizado por utilizar tecnologias sofisticadas e gestão da produção, gerando alta produtividade. Destaca-se entre os aspectos mais relevantes dessa modalidade de produção a total dependência de fornecimento da alimentação, contínua renovação de água e alta taxa de estocagem (BEVERIDGE, 2004).

As principais vantagens do sistema de produção em tanque-rede são: fácil manejo, aproveitamento de ambientes aquáticos já existentes, menor custo de implantação quando comparado com viveiros escavados, rápido retorno de investimento aliados a alta produtividade, alta e contínua renovação de água, menor variação dos parâmetros físico-químicos visando manter a qualidade da água, tecnologia facilmente assimilável, possibilidade de observação constante dos peixes, movimentação das gaiolas e despesca rápida (CONTE, 2002; BARBOSA, 2009).

Dentre as desvantagens observa-se a dependência total do sistema de arraçoamento com a necessidade de dietas nutricionalmente completas; altas

densidades de estocagem podem causar estresse aos peixes, deterioração da qualidade da água e acúmulo de fezes e metabólitos embaixo dos tanques-rede promovendo impacto ambiental. Possíveis doenças podem se dispersar rapidamente pela piscicultura com o risco de haver a introdução destas no ambiente, prejudicando a população natural. Necessidade de fluxo constante de água através das redes, risco de incrustamento e rompimento da tela das gaiolas com perda da produção, e conflitos para o uso de águas públicas sujeita a legislação (BEVERIDGE, 1986; SWANN et al., 1994; SCHMITTOU, 1993; CAMARGO, 2007; AYROZA, 2009).

A piscicultura intensiva deve ser planejada, administrada com critérios técnicos e científicos, embasada por diretrizes legais que assegure o desenvolvimento sustentável da atividade e o uso múltiplo do recurso hídrico (AYROZA et al, 2006). Perrez (1999) relatou que o crescimento desordenado da atividade e a ausência de controle sanitário em uma piscicultura contribuem para a produção de pescado de qualidade duvidosa e alta taxa de mortalidade decorrente, principalmente de doenças bacterianas.

1.4 ESTREPTOCOCOSE EM PEIXES

As bactérias no meio aquático fazem parte da microbiota da água, sendo encontradas também na superfície e nas brânquias dos peixes (PAVANELLI et al., 2002). Muitas bactérias também podem ser consideradas como patógenos oportunistas, podendo manifestar-se causando infecções bacterianas quando os animais estão em condições adversas (SOUTHGATE, 1993; BOIJINK; BRANDÃO, 2004).

Entre as espécies de bactérias patogênicas para peixes as principais são: *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus iniae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas hydrophila*, *Flavobacterium columnare*, *Edwardsiella tarda*, *Vibrio vulnificus* (ROBERTS; SOMMERVILLE, 1982; FIGUEIREDO; LEAL, 2008).

A estreptococose é considerada como o maior problema sanitário no cultivo intensivo de tilápias (SURESH, 1999). É relatada como um conjunto de doenças similares que possuem como agentes diferentes gêneros e espécies de bactérias, capazes de lesar o sistema nervoso central além de causar sinais clínicos típicos de septicemia. Entre as bactérias que podem causar estreptococose se

encontram *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus piscium*, *Lactococcus piscium*, *Streptococcus parauberis*, *S. iniae*, *S. agalactiae*, *Vagococcus salmoninarum* (PLUMB, 1999; TORANZO et al., 2005) *Streptococcus equi*, *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus zooepidemicus* (UGAJIN, 1981), *Streptococcus dysgalactiae* (NOMOTO et al., 2004).

A infecção de peixes por *Streptococcus* spp. foi primeiramente descrita em 1958 por Hoshima et al. em truta arco íris (*Oncorhynchus mykiss*), no Japão. O primeiro relato do isolamento de *Streptococcus* spp. em tilápia foi descrito por Wu (1970) e a partir disso, este patógeno foi encontrado e responsabilizado por grandes prejuízos, particularmente no Japão (KITAO et al., 1981), Taiwan (MING-CHEN et al., 1985), Israel (HUBERT, 1989), Arábia Saudita (AL-HARB, 1994), Estados Unidos da América e América Central (PLUMB, 1997). No Brasil este microrganismo foi identificado como patógeno por Salvador et al. (2003; 2005) (FIGUEIREDO et al., 2006).

De acordo com Evans et al. (2006) as espécies *S. iniae* e *S. agalactiae* foram descritas acometendo mais de 50 espécies em 29 famílias de peixes de água doce, estuarina e marinha, o que mostra a facilidade de adaptação desses agentes a diversos hospedeiros. Além disso, essas espécies destacam-se como os principais agentes etiológicos responsáveis por elevados prejuízos econômicos na tilapicultura mundial (EVANS et al., 2000; AGNEW; BARNES, 2007; MIAN et al. 2009). Embora as infecções por *S. agalactiae* tenham sido relatadas em diversas espécies de peixes e em ampla variedade de ambientes aquáticos as infecções por essa bactéria ocorrem principalmente em espécies de peixes de água quente, geralmente quando a temperatura das águas está, acima 15 °C (ELDAR et al., 1994; KAWAMURA et al., 2005; SITI - ZAHRAH et al., 2008).

Abuseliana et al. (2010), Zamri - Saad et al. (2010) estimaram que as perdas anuais por estreptococose causam elevados prejuízos mundialmente. A estreptococose em tilápias é apontada como uma doença comum, sendo uma das mais sérias enfrentadas por países produtores, incluindo o Brasil (FIGUEIREDO et al., 2007; FIGUEIREDO et al., 2009).

No norte do Paraná o isolamento de *Streptococcus* sp. foi realizado por Salvador et al. (2005), em tilápia do Nilo criadas em sistema intensivo, com sinais neurológicos. Figueiredo et al. (2006) identificaram *S. agalactiae* de tilápia do Nilo cultivadas em sistema intensivo em diversas regiões do Brasil, inclusive no

estado do Paraná. Esta espécie é o agente mais comum e o principal patógeno no que acomete criações de tilápias no Brasil (FIGUEIREDO, 2012).

As tilápias infectadas por *Streptococcus* spp. apresentam sinais clínicos similares aos de outras infecções bacterianas, o que torna o diagnóstico laboratorial importante para determinar a etiologia da infecção (PLUMB, 1997).

A estreptococose pode ser observada em peixes que apresentam massa corporal variando de 50 a 1000 gramas. No entanto, é mais predominante na fase da engorda, quando os indivíduos apresentam de 400 a 600 gramas. Em alevinos e juvenis de tilápias, a enfermidade parece não se manifestar. Entretanto a possibilidade destes serem portadores assintomáticos e levarem a bactéria para a produção não é descartada (FIGUEIREDO et al., 2007; FIGUEIREDO et al., 2009).

Os sinais clínicos mais frequentemente relatados em peixes infectados por *S. agalactiae* foram: natação errática, letargia, anorexia, ascite, exoftalmia uni ou bilateral, opacidade da córnea, hemorragias no olho, na base das barbatanas e no opérculo e escurecimento de pele (PLUMB, 1999; SALVADOR et al., 2005; SUANYUK et al., 2005; AUSTIN; AUSTIN, 2007; SITI - ZAHRAH et al., 2008; PRETTO - GIORDANO et al., 2010 ABUSELIANA et al., 2010, 2011).

Nem todos os sinais clínicos descritos ocorrem nos peixes afetados, de tal maneira que peixes doentes podem não apresentar estes sinais clínicos evidentes, ocorrendo morte súbita (ELDAR et al., 1995; MUSA et al., 2009; PRETTO - GIORDANO et al., 2010; RODKHUM et al., 2011; YE et al., 2011).

Em peixes infectados por *S. agalactiae*, o baço e fígado geralmente apresentam-se hipertrofiado, observa-se congestão difusa cerebral com líquido cefaloraquidiano hemorrágico e acúmulo de líquido na cavidade visceral (ELDAR et al., 1994; PLUMB, 1999 , 1995; SALVADOR et al., 2005; SUANYUK et al., 2005; PRETTO - GIORDANO et al., 2010).

As bactérias que levam à necrose de tecidos, entram e se multiplicam no interior dos macrófagos e subsequentemente invadem a corrente sanguínea (ELDAR et al., 1994; EVAN et al., 2002; MUSA et al., 2009). Com isso os macrófagos podem atuar como disseminadores de *S. agalactiae* permitindo a travessia da barreira hematoencefálica causando a entrada da bactéria no sistema nervoso. (EVANS et al., 2001; NGUYEN et al., 2001; BOWATER et al., 2012).

Shoemaker e Klesius (1997) descreveram dificuldades no tratamento de infecções por esse patógeno com antimicrobianos, em parte devido à

sobrevivência de *Streptococcus* spp. no interior de macrófagos, pois muitos antibióticos não penetram nestas células. Segundo os autores, os antibióticos podem minimizar os sinais clínicos, mas não eliminar o agente e os peixes doentes, devido a anorexia, não se alimentam da ração medicada, dificultando o tratamento e ainda predispondo à seleção de cepas mais resistentes do microrganismos.

Shoemaker e Klesius (1997) e Nakanishi et al. (2002) relataram que apenas o uso de antibióticos não é eficaz para eliminar a bactéria. Esta estratégia deve estar associada às práticas de manejo, como a adequação das densidades de estocagem, rápida retirada das fontes de infecção como peixes mortos, com sinais clínicos, fornecimento de quantidades balanceadas de ração e realização de testes laboratoriais com frequência para certificar que a produção está isenta do agente bacteriano.

S. agalactiae isolado de peixes infectados naturalmente apresentam resistência à gentamicina e estreptomicina e apresentam sensibilidade em ordem decrescente aos antibióticos oxitretetraciclina, ampicilina, ciprofloxacina, amoxicilina com ácido clavulônico, cloranfenicol, rifampicina e sulfa com trimetoprim (EVANS et al., 2002). Cepas isoladas no Brasil apresentaram sensibilidade à amoxicilina, cloranfenicol, eritromicina, norfloxacina, tetraciclina e sulfonamida (FIGUEIREDO, 2006).

O Aquaflor® nome comercial da formulação com florfenicol (FFC), é o único antibiótico com utilização autorizada para uso na aquicultura no Brasil. Este é indicado pela *Food and Drug Administration* (FDA), registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), recomendado para o tratamento de espécies de tilápia e seus híbridos com septicemias hemorrágicas causadas por *S. agalactiae* entre outros. O uso indiscriminado de antibióticos pode implicar em riscos à saúde pública, visto que existe a probabilidade dos genes de resistência serem disseminados por plasmídeos entre as diferentes bactérias, o que possivelmente acarretará na seleção de cepas bacterianas mais resistentes (CHELOSSI et al., 2003; AKINBOWALE et al., 2006; CABELLO, 2006; SCHERING-PLOUGH, 2009) .

Uma alternativa ao uso de antimicrobianos é a imunização dos peixes (SACCHETINI et al., 2010). No Brasil, Pretto-Giordano et al. (2010) avaliaram experimentalmente a eficácia de uma vacina autóctone com uma e duas doses intraperitoneal e obtiveram 83,6 e 96,6% de eficácia, respectivamente. Em 2011, foi aprovada a primeira vacina comercial, (Aquavac®Strep, SA MSD Saúde Animal),

inativada, administrada via intraperitoneal em tilápias para a prevenção de *S. agalactiae* (MSD SAÚDE ANIMAL, 2012). Salvador et al. (2011) obtiveram 84% de eficácia da vacina (Aquavac®Strep) em peixes vacinados e desafiados com *S. agalactiae* experimentalmente.

1.5 CARACTERÍSTICAS DE *S. AGALACTIAE*

S. agalactiae é pertencente ao grupo B de Lancefield (GBS), classificação sorológica baseada nas características antigênicas de um polissacarídeo de composição variável chamado carboidrato C, localizado na parede celular. As bactérias, do gênero *Streptococcus*, são identificadas pelos grupos sorológicos denominados grupos de Lancefield (A-H e K-V) (LANCEFIELD, 1933; TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

Esta espécie de bactéria possui células esféricas ou ovóides com 0,5 a 2,0 µm de diâmetro apresentando-se aos pares ou em cadeias, Gram-positiva, não formadora de esporos, imóvel, catalase negativa, esculina negativa, anaeróbia facultativa. A espécie obtém energia por meio da fermentação de carboidratos como a glicose, que resulta na maior parte em ácido láctico, é nutricionalmente exigente requerendo meios enriquecidos, geralmente pela adição de sangue, para desenvolvimento a temperaturas de 25 a 45 °C, com temperatura ótima de 37 °C. (HARDIE; WHILEY, 1997; KILLIAN, 1998; TRABULSI; ALTERTHUM, 2005). Suas colônias apresentam a coloração cinza, são circulares e levemente brilhantes em meio de cultivo contendo sangue. Os isolados de GBS podem apresentar alfa-hemólise, beta-hemólise e gama-hemólise (SPELLERBERG; BRANDT, 2007). As cepas de GBS possuem nove sorotipos diferentes de polissacarídeo capsular (CPS) designados Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII e são antigenicamente diferentes (JOHRI et al., 2006).

S. agalactiae é capaz de infectar naturalmente uma ampla gama de hospedeiros como animais terrestres e aquáticos, incluindo humanos. Está frequentemente associada com meningoencefalite em peixes com alta mortalidade, mastite em bovinos, em recém-nascidos pode causar pneumonia septicemia e meningites (EVANS et al., 2002; MITCHELL, 2003; JOHRI et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2006; MIAN et al., 2009).

1.6 IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS

Apesar de um histórico clínico e sinais da doença proporcionarem informações importantes sobre os possíveis agentes etiológicos, a caracterização taxonômica é frequentemente necessária para identificar com segurança um patógeno específico (FRERICHS; MILLAR, 2003). Em peixes, os sinais clínicos não são patognomônicos, ou seja, não são específicos para uma doença, além disso, as infecções podem ocorrer como infecções subclínicas, sendo os animais portadores assintomáticos do patógeno. Assim, uma abordagem confiável para o diagnóstico de doenças em peixes encontra-se na identificação específica dos agentes patogênicos usando métodos laboratoriais. Os métodos de diagnósticos descritos para triagem ou diagnóstico de doenças em peixes são baseados tanto no isolamento do patógeno seguido por sua identificação específica, ou na demonstração de antígenos específicos dos agentes patogênicos através de um método de detecção imunológica. No entanto, nos últimos anos, técnicas de biologia molecular, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), sondas de DNA para hibridação *in situ* tem sido constantemente avaliados para esses fins (OIE, 2012).

As técnicas fenotípicas para identificação de microrganismos exigem diversos testes bioquímicos, entre eles verificação de reações metabólicas, caracterização de colônias e morfologia celular em esfregaços corados pelo método de Gram. Além disso, essas técnicas podem determinar até 1 a 10% de resultados falso-negativos, devido a interferência de fatores ambientais sobre a expressão gênica (ZSCHÖCK et al., 2005; BANDO, 2008).

O cultivo de microrganismos é considerado a técnica ouro do diagnóstico, pois é possível a visualização dos mesmos para a sua identificação. No entanto, muitas vezes surgem dificuldades para coletar o material clínico a campo, além da necessidade desse material estar em boas condições, podendo levar a contaminação por bactérias oportunistas impossibilitando o isolamento dos microrganismos e, assim, a sua identificação (CARDOSO et al., 2006). Em adição, quando existe similaridade fisiológica, nutricional e sorológica entre os isolados os métodos de avaliação fenotípica, muitas vezes são incapazes de distinguir espécies e linhagens diferentes. Devido a estas limitações, muitos pesquisadores preferem utilizar métodos moleculares, como a PCR (JAFAR et al., 2009). Tecnologias baseadas nos aspectos genéticos possibilitam a detecção do patógeno diretamente

no material biológico, complementando ou até podendo substituir o cultivo microbiológico e as técnicas sorológicas e histológicas (CUNNINGHAM, 2002). No entanto, as provas bioquímicas são de elevada importância para a verificação da sensibilidade dos microrganismos a diferentes compostos, além de auxiliarem na investigação de enzimas estruturais, estudo de metabólitos e catabólitos (MARTINEZ; TADDEI, 2008). Kämpfer e Glaeser, (2011, 2012) relataram que a interação entre o conjunto de dados genéticos e fenotípicos fornecem uma base sólida para a descrição da diversidade em procariotos.

O método de PCR, quando comparado com métodos tradicionais de diagnóstico, apresenta maior capacidade de discriminação e tipificação, maior seletividade, especificidade, rapidez, apresenta bom limite de detecção e possibilita trabalhar com material preservado inadequadamente para detecção de bactérias (MARTINEZ et al., 2001; PHUERKTES et al., 2001).

Os oligonucleotídeos utilizados na PCR influenciam diretamente na especificidade e sensibilidade da reação, por isso é necessário a utilização de sequências específicas, direcionadas para o patógeno alvo (TAMAPARU, 2001). Martinez et al. (2001) propuseram um conjunto de iniciadores denominados F1 e IMOD que permite a amplificação apenas para as amostras de DNA genômico de *S. agalactiae* de isolados humanos e bovinos, além do diagnóstico desta bactéria em leite. Jafar et al. (2009) realizaram a identificação espécie-específica de *S. agalactiae* com os iniciadores F1 e IMOD em isolados de diversos órgãos de peixes. Os resultados obtidos por estes autores foram comparados com testes microbiológicos e bioquímicos e obtiveram resultados similares, comprovando a robustez e confiabilidade da técnica de PCR com esses iniciadores. Os iniciadores F1 e IMOD permitem a amplificação de sequências de DNA específicas para a espécie *S. agalactiae* com o tamanho de 220 pares de bases (pb). Essas sequências específicas estão localizadas dentro de sequências de nucleotídeos que codificam para o rRNA 16S (MARTINEZ et al., 2001).

O gene 16S *rRNA* é utilizado como uma região genômica padrão para a identificação de espécies, gêneros e famílias de bactérias (WOESE, 1987; GURTLER; STANISICH, 1996). Os ribossomos possuem sua estrutura altamente conservada em todas as espécies, essenciais para a sobrevivência de todos os organismos, pois são moléculas que compõem a maquinaria de síntese de proteínas. Nas bactérias os ribossomos são compostos por duas subunidades, uma

é denominada subunidade maior 50S formada pelo rRNA 23S, RNA 5S e mais 30 proteínas e uma outra subunidade menor 30S que é formada pelo rRNA 16S e mais 20 proteínas (PEI et al., 2009).

Os genes ribossomais rRNA 23S e rRNA 5S e rRNA 16S estão organizados em um *operon* onde são sintetizados como um único RNA, podendo estar presente em múltiplas cópias no genoma (WOESE, 1987; PEI et al., 2010). Composto por um conjunto de aproximadamente 1550 nucleotídeos, o gene 16S *rRNA* possui sequências conservadas (regiões universais) e regiões variáveis. Em geral o 16S *rRNA* apresenta nove "regiões hipervariáveis". Essas regiões apresentam diversidade de sequências entre as diferentes espécies bacterianas, sendo por isso usadas para o enquadramento taxonômico, além de ser geralmente um das regiões preferidas na seleção de iniciadores para amplificação por PCR e construção de relações filogenéticas entre as espécies (CHAKRAVORTY et al., 2007; PEI et al., 2009).

As técnicas de biologia molecular têm propiciado melhora significativa na eficiência e qualidade do diagnóstico de enfermidades de peixes (FIGUEIREDO; LAEL, 2008). A identificação, classificação e caracterização genética de muitos patógenos de peixes, incluindo agentes bacterianos, parasitas, fungos e vírus, tem sido realizadas por técnicas como a PCR, Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), hibridização e sequenciamento (CUNNINGHAM, 2002; EAST, 2008). Muitas das técnicas moleculares foram incorporadas a legislação de sanidade de peixes como uma ferramenta para controlar a disseminação de enfermidades, como descritas pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2012).

REFERÊNCIAS

- ABUSELIANA, A.; DUAD, H.; AZIZ, S.A.; BEJO, S.K; ALSAID, M. *Streptococcus agalactiae* the etiological agent of mass mortality on farmed red tilapia (*Oreochromis sp.*). **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 9, n. 20, p. 2640-2646, 2010.
- ABUSELIANA, A.F.; MOHD DAUD, H.H.; AZIZ, S.A.; BEJO, S.K.; ALSAID, M. Pathogenicity of *Streptococcus agalactiae* isolated from a fish farm in Selangor to juvenile red tilapia (*Oreochromis sp.*). **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 10, n. 7, p. 914-919, 2011.
- AGNEW, W.; BARNES, A.C. *Streptococcus iniae*: an aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination. **Veterinary Microbiology**, v. 122, n. 1-2, p. 1–15, 2007.
- AKINBOWALE, O.L.; PENG, H.; BARTON, M.D. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, n. 5, p. 1103-1113, 2006.
- AL-HARBI, A.H. First isolation of *Streptococcus sp.* from hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*) in Saudi Arabia. **Aquaculture**, v. 128, n.3-4, p. 263-271, 1994.
- ARANA, L. V. **Aquicultura e desenvolvimento sustentável**. Florianópolis, Editora da UFSC. 1999, 310 p.
- AUSTIN, B.; AUSTIN, D.A. **Bacterial Fish Pathogens. Diseases of Farmed and Wild Fish**. 4th ed. Springer/Prazis Publishing, Chichester. 2007, 552 p.
- AYROZA, D.M.M.R.; FURLANETO, F.P.B; AYROZA, L.M.S. **Regularização dos projetos de tanques-rede em águas públicas continentais de domínio da união no Estado de São Paulo**. Boletim Técnico do Instituto de Pesca, São Paulo, v. 36, 2006.
- AYROZA, Luiz Marques da Silva. **Criação de tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus*, em tanques-rede, na Usina Hidrelétrica de Chavantes, Rio Paranapanema**. 2009. 104 p. Tese (Doutorado em Aqüicultura) –Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.
- BALARIN, J.D.; R.D. HALLER. The intensive culture of tilapia in tanks, raceways and cages. In: MUIR, J.F.; R.J. ROBERTS (Ed). **Recent advances in aquaculture**, London: Croom Helm, 1982. p. 267-355.
- BANDO, SILVIA Y. Taxonomia Bacteriana. In: TRABULSI, LUIZ R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 2008. p. 51-55.
- BARBOSA, A.C.A. **Cultivo de tilápias em gaiolas**. Sistemas de Produção 07, Governo do Estado do Rio Grande do Norte, Natal/RN, 2009, 27p.
- BEVERIDGE, M.C.M. **Cage aquaculture**, 2. ed. Oxford: Fishing News Books. 1996. 346 p.

BEVERIDGE, M.C.M. **Cage Aquaculture**, 3. ed. Blackwell Publishing Company. 2004. 376 p.

BEVERIDGE, M.C.M. **Piscicultura en jaulas y corrales. Modelos para calcular la capacidad de carga y las repercusiones en el ambiente**, Documento Técnico de Pesca, 255. República de Filipinas: FAO, 1986. 100 p.

BEVERIDGE, M.C.M.; BAIRD, D.J. (1998). Feeding mechanism and feeding ecology. In BEVERIDGE, M.C.M.; MCANDREW B.J. (Eds.), **Tilapias: Their biology and exploitation**. London: Chapman and Hall, 1998. p. 505.

BOIJINK, C. L.; BRANDÃO, D. A. 2004. Avaliação da inoculação de suspensões bacterianas de *Aeromonas hydrophyla*, em juvenis de jundiá, *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). **Biodiversidade Pampeana**. v. 2, n. 1, p.3-8, 2004.

BORGHETTI, N. R. B.; OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R. **Aquicultura: uma visão geral sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no mundo**. Curitiba: Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais (GIA), 2003. 128 p. Disponível em:
<http://gia.org.br/site/images/livros/livros/AquiculturaumavisaoCV01.pdf> Acesso em: 10 set 2013.

BOSCARDIN, N. R. Produção Aquícola. In: OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R.; SOTO, D. (Org.). **Aquicultura no Brasil**, o desafio é crescer. Brasília: 2008. p. 27-72.

BOWATER, R.O.; FORBES-FAULKNER, J.; ANDERSON, I.G.; CONDON, K.; ROBINSON, B.; KONG, F.; GILBERT, G.L.; REYNOLDS, A.; HYLAND, S.; MCPHERSON, G.; BRIEN, J.O.; BLYDE, D. 2012. Natural outbreak of *Streptococcus agalactiae* (GBS) infection in wild giant Queensland grouper, *Epinephelus lanceolatus* (Bloch), and other wild fish in northern Queensland, Australia. **Journal of Fish Diseases**, v. 35, n. 3, p. 173-186, 2012.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura: Brasil 2008-2009**. 2010. Disponível em:
<<http://www.mpa.gov.br/mpa/seap/Jonathan/mpa3/docs/anu%E1rio%20da%20pesca%20completo2.pdf>>. Acesso em: 15 set. 2013

BRASIL, MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. **O potencial brasileiro para a aquicultura**. 2011. Disponível em:
<<http://www.mpa.gov.br/index.php/aquiculturampa/informacoes/potencial-brasileiro>>. Acesso em: 15 set. 2013.

BRASIL, Ministério da pesca e aquicultura. **Consumo de pescado no Brasil aumenta 23,7% em dois anos**. 2013a. Disponível em:
<http://www.mpa.gov.br/index.php/imprensa/noticias/2226-consumo-de-pescado-no-brasil-aumenta-237-em-dois-anos>. Acesso em: 10 fevereiro. 2014.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2011. 2013b** Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20MPA%202011FINAL.pdf>. Acesso em: 18 out 2013.

CABELLO, F.C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. **Environmental Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 1137-1144, 2006.

CAMARGO, A. L. S. **Desempenho zootécnico da tilápia tailandesa, linhagem Chitralada, em tanques-rede no Reservatório de Nova Avanhandava, Buritama, SP: modelo empírico de classificação e repicagem**, 64 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

CARDOSO, M.V.; TEIXEIRA, S.R.; MIYASHIRO, S.; VASCONCELLOS, S.A.; GREGORY, L.; GENOVEZ, M.E. Estudo comparativo entre técnicas de isolamento e pcr para detecção de mycoplasma e ureaplasma diversum em muco prepucial e sêmen in natura de touros de monta natural e central de inseminação artificial. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, n. 1, p.33-40, 2006.

CARVALHO, E.D. **Avaliação dos impactos da piscicultura em tanques-rede nas represas dos grandes tributários do alto Paraná (Tietê e Paranapanema): o pescado, a ictiofauna agregada e as condições limnológicas**. Relatório Científico (FAPESP). Botucatu, SP. 2006. 46 p..

CASTAGNOLLI, N. Status of Aquaculture in Brazil. **World Aquacult**, v.26, n.4, p.35-39, 1995.

CHAKRAVORTY, S.; HELB, D.; BURDAY, M.; CONNELL, N.; ALLAN, D. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. **Journal Microbiological Methods**, v. 69, n. 2, p. 330–339, 2007.

CHELOSSI, E.; VEZZULLI, L.; MILANO, A.; BRANZONI, M.; FABIANO, M.; RICCARDI, G.; BANAT, I. M. Antibiotic resistance of benthic bacteria in fish-farm and control sediments of the Western Mediterranean. **Aquaculture**, v. n. 219, p. 83-97, 2003.

CONTE, L. **Produtividade e economicidade da tilapicultura em gaiolas na região sudoeste do Estado de São Paulo**. 2002. 73p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2002.

COSTA, F.J.C.B. **Cartilha cultura de peixes em tanques-rede**. Maceió. Ed. Sebrae Alagoas, 2003. p. 33.

COWARD, K.; BROMAGE N. R. Reproductive physiology of female tilapia broodstock. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.10, n. 1, p. 1-25, 2000.

CUNNINGHAM, C.O. Molecular diagnosis of fish and shellfish diseases: present status and potential use in disease control. **Aquaculture**, v. 206, n. 1-2, p.19-55, 2002.

- ELDAR, A.; BEJERANO, Y.; BERCOVIER, H. *Streptococcus shiloi* and *Streptococcus difficile*: two new streptococcal species causing a meningoencephalitis in fish. **Current Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 139–143, 1994.
- ELDAR, A.; BEJERANO, Y.; LIVOFF, A.; HOROVITCZ, A.; BERCOVIER, H. Experimental streptococcal meningo-encephalitis in cultured fish. **Veterinary Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 33–40, 1995.
- EVANS, J.J.; KLESZIUS, P.H.; GILBERT, P.M. Characterization of b-hemolytic group B *Streptococcus agalactiae* in culture sea bream (*Sparus auratus*) (L.), and wild mullet (*Liza klunzingeri*), in Kuwait. **Journal of Fish Diseases**, v. 25, n. 3, p. 505-513, 2002.
- EVANS, J.J.; KLESZIUS, P.H.; SHOEMAKER, C.A. An overview of *Streptococcus* in warmwater fish. **Aquaculture Health International**, v. 7, p. 10–4, 2006.
- EVANS, J.J.; SHOEMAKER, C.A.; KLESZIUS, P.H. Distribution of *Streptococcus iniae* in hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*) following nares inoculation. **Aquaculture**, v. 194, n. 3-4, p. 233-243, 2001.
- EVANS, J.J.; SHOEMAKER, C.A.; KLESZIUS, P.H. Experimental *Streptococcus iniae* infection of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*) by nares inoculation. **Aquaculture**, v. 189, p. 197-210, 2000.
- FIGUEIREDO, H. C. P. Estreptococose em tilápia do Nilo - parte 1. **Panorama da Aqüicultura**, v. 19, n. 103, 2007.
- FIGUEIREDO, H. C. P; LEAL, C. A. G. Infecções por *Streptococcus* spp. em peixes. in: SILVA-SOUZA, Ângela Teresa LIZAMA, Maria de los Angeles, TEKEMOTO, Ricardo Massato. **Patologia e Sanidade de Organismos Aquáticos**. 1 Edição. Maringá: ABRAPOA., 2012. 275 p.
- FIGUEIREDO, H.C.P.; CARNEIRO, D.O.; FARIA, F.C.; COSTA, G.M. *Streptococcus agalactiae* associado a meningoencefalite e infecção sistêmica em tilapia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 4, p. 678-680, 2006.
- FIGUEIREDO, H.C.P.; LEAL, C.A.G. Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 8-14, 2008.
- FIGUEIREDO, H.C.P.; NETTO, L.N.; LEAL, C.A. *Streptococcus iniae*: um grande vilão da aquicultura mundial identificado no Brasil. **Panorama da Aqüicultura**, v. 19, n. 112, p. 26-29, 2009.
- FITZSIMMONS, K. Future trends of tilapia Aquaculture in the Americas. In: COSTA PIERCE, B.A.; RAKOCY, J.E. (Eds.). **Tilapia Aquaculture in Americas**. The World Aquaculture Society. Vol. 2. Baton Rouge, Louisiana, United States 2000. p. 252-264.
- FRERICHS, G.; MILLAR, N.; STUART D. **Manual for the Isolation & Identification of fish bacterial pathogens**. Press in association and Institute of Aquaculture, University of Stirling, 2003. 60 p.

GURTLER, V.; STANISICH, V. A. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16s-23s rDNA spacer region. **Microbiology**, 142, n. 1, p. 3-16, 1996.

HARDIE, J.M.; WHILEY, R.A. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**, v. 83, n. S1, p. 1S-11S, 1997.

HUBERT, R. M. Bacterial diseases in warm water aquaculture. In: SHILO, M.; SARIG, S. **Fish culture in warm water systems: problems and trends**. Florida: Boca Raton, 1989. p. 194-197.

JAFAR, Q. A.; AL-ZINKI, S.; AL-MOUQATI S.; AL-AMAD S.; AL-MARZOUK A.; AL-SHARIFI F. Molecular investigation of *Streptococcus agalactiae* isolates from environmental samples and fish specimens during a massive fish kill in Kuwait Bay. **African Journal of Microbiology Research**, v. 3, n. 21, p. 022-026, 2009.

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

KÄMPFER, P.; GLAESER, S. P. Prokaryotic taxonomy in the sequencing era and the role of MLSA in classification. **Microbiology Australia**, v. 32, n. 2, p. 66-70, 2011.

KÄMPFER, P.; GLAESER, S. P. Prokaryotic taxonomy in the sequencing era the polyphasic approach revisited. **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 2, p. 291-317, 2012.

KAWAMURA, Y.; ITOH, Y.; MISHIMA, N.; OHKUSU, K.; KASAI, H.; EZAKI, T. High genetic similarity of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus difficilis*: *S. difficilis* Eldar *et al.* 1995 is a later synonym of *S. agalactiae* Lehmann and Neumann 1896 (Approved Lists 1980). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 2, p. 961-965, 2005.

KEENLEYSIDE, M.H.A. **Cichlid fishes: Behavior, ecology and evolution**. London Chapman & Hall. 1991. 378 p.

KILLIAN, M. *Streptococcus* and *Lactobacillus*. In: TOPLEY; WILSON'S, **Microbiology And Microbial Infections**. COLLIER, L.; BALOWS, A.; SUSSMAN, M. (eds). Volume 2: Systematic Bacteriology. 2^a Ed. LOCAL. 1998. p. 635-658.

KITAO, T.; AOKI, T.; SAKOH, R. Epizootic caused by beta-haemolytic *Streptococcus* species in cultured freshwater fish. **Fish Pathology**, v. 15, n. 3-4, p. 301-307, 1981.

LANCEFIELD, R.C. A serological differentiation of human and other groups of streptococci. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 59, n. 4, p. 441-458, 1933.

LÈVEQUE, C. Out of Africa: the success story of tilapias. **Environmental Biology of Fishes**, v. 64, n. 4, p. 461-464, 2002.

- MARTINEZ, G.; HAREL, J.; GOTTSCHALK, M. Specific detection by PCR of *Streptococcus agalactiae* in milk. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 65, n. 1, p. 68-72, 2001.
- MARTINEZ, MARINA B.; TADDEI, CARLA R. Métodos de diagnóstico. In: TRABULSI, LUIZ R. A. (Eds). **Microbiologia**. Atheneu, São Paulo. 2008. p. 117-125.
- MIAN, G.F.; GODOY, D.T.; LEAL, C.A.G.; YUHARA, T.Y.; COSTA, G.M.; FIGUEIREDO, H.C.P. Aspects of the natural history and virulence of *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia. **Veterinary Microbiology**, v. 136, n. 1-2, p. 180–183, 2009.
- MING-CHEN, T.; CHEN, S. C.; TSAI, S. S. General septicemia of streptococcal infection in cage cultured tilapia in southern Taiwan. **Fisheries Series**, n. 4, Fish Disease Research (VII), 1985.
- MITCHELL, T.J. The pathogenesis of streptococcal infections: from tooth decay to meningitis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 1, n. 3, p. 219–230, 2003.
- MOREIRA, A. A.; HILSDORF, A. W. S.; DA SILVA, J. V.; DE SOUZA, V. R. Variabilidade genética de duas variedades de tilápia nilótica por meio de marcadores microsatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 4, p. 521-526, 2007.
- MSD SAÚDE ANIMAL. AQUAVAC® STREP Sa: resumo da bula. 2012. Disponível em: <http://www.msd-saude-animal.com.br/products/Copy_of_AQUAVAC_/020_Resumo_da_Bula.aspx>. Acesso em: 2 set. 2013.
- MUSA, N.; WEI, L.S.; MUSA, N.; HAMDAN, R.H.; LEONG, L.K.; WEE, W.; AMAL, M.N.; KUTTY, B.M.; ABDULLAH, S.Z. Streptococcosis in red hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*) commercial farms in Malaysia. **Aquaculture Research**, v. 40, n. 5, p. 630-632, 2009.
- NAKANISHI, T.; KIRYU, I.; OTOTAKE, M. Development of a new vaccine delivery method for fish: percutaneous administration by immersion with application of a multiple puncture instrument. **Vaccine**, v. 20, n. 31-32, p.3764-3769, 2002.
- NGUYEN, H.T.; KANAI, K.; YOSHIKOSHI, K. Immunohistochemical examination of experimental *Streptococcus iniae* infection in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. **Fish Pathology**, v. 36, n. 3, p. 169-178, 2001.
- NOMOTO, R.; MUNASINGHE, L.I.; JIN, D.H.; SHIMAHARA, Y.; YASUDA, H.; NAKAMURA, A.; MISAWA, N.; ITAMI, T.; YOSHIDA, T. Lancifield group C *Streptococcus dysgalactiae* infection responsible for fish mortalities in Japan. **Journal of Fish Diseases**, v. 27; n. 12, p. 679-686, 2004.
- OIE. World Organisation for Animal Health. **Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals**. 2012. Disponível em: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/0.01_INTRODUCTION.pdf. Acesso em: 10 jan 2014.

OIE. World Organisation for Animal Health. **Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals**. 2003. Disponível em: <http://www.oie.int/doc/ged/D6505.PDF>. Acesso em: 10. jan. 2014.

OLIVEIRA, I.C.M.; MATTOS, M.C. DE; PINTO, T.A.; FERREIRA-CARVALHO, B.T.; BENCHETRIT, L.C.; BOHNSACK, J.F.; WHITING, A.A.; FIGUEIREDO, A.M.S. Genetic relatedness between group B originating from bovine mastitis and human group B streptococcus type V cluster displaying an identical pulsed-field gel electrophoresis pattern. **Clinical Microbiology Infection**, v. 12, p. 887–893, 2006.

ONO, E. A. Criação de peixes em tanque-rede. In: ZOOTEC, 2005, Campo Grande. **Anais**. Campo Grande: ZOOTEC, 2005. CD-ROOM.

ONO, E. A.; KUBITZA, F. **Cultivo de peixes em tanque-rede**. 3° Ed. Ver. E ampl. Jundiaí: Eduardo A. Ono, 2003. 112 p.

PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M. **Fish Diseases: Prevention, diagnosis and treatment**. Maringá, Brasil. 2002, 305 p.

PEI, A.; NOSSA, C. W.; CHOKS, P.; BLASER, M.J.; YANG, L.; ROSMARIN, D.M.; PEI, Z. Diversity of 23S rRNA Genes within Individual Prokaryotic Genomes. **Plos One**, v. 4, n. 5, p. 1-9 e 54 37, 2009.

PEREZ, A. C. 1999. Empreendimentos piscícolas e o médico veterinário. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, n 2, 43-65.

PEI, A.; OBERDORF, W. E.; NOSSA, C. W.; AGARWAL, A.; CHOKS, P.; GERZ, E. A.; JIN, Z.; LEE, P.; YANG, L.; POLES, M.; BROWN, S. M.; SOTERO, S.; DESANTIS, T.; BRODIE, E.; NELSON, K.; PEI, Z. Diversity of 16S rRNA Genes within Individual Prokaryotic Genomes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 12, p. 3886–3897, 2010.

PHILIPPART, J.C.; J.C. RUWET. 1982. Ecology and distribution of tilapias. In: PULLIN, R.S.V.; R.H. LOWE McCONNEL (Ed.). **Biology and culture of tilapias**. Manila: ICLARM. Baton Rouge, Louisiana, United States, 1982. p. 15-59.

PLUMB, J. A. **Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes**. Ames, Iowa: Iowa State University Press, 1999. 328 p.

PLUMB, J. A. Infections diseases of tilapia. In: COSTA–PIERCE, B.A.; RAKOCY, J.E. **Tilapia aquaculture in the Americas**. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 1997. p. 212-218.

PRETTO-GIORDANO, L.G.; MÜLLER, E.E.; FREITAS, J.C.D.; SILVA, V.G. Evaluation on the pathogenesis of *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 1, p. 87-92, 2010.

PROENÇA, C.E.M.; BITTENCOURT, P.R.L. **Manual de piscicultura tropical**. Brasília: IBAMA, 1994. p. 195.

PHUEKTES, P.; MANSELL, P. D.; BROWNING, G. F. Multiplex Polymerase Chain Reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and Streptococcal causes of bovine mastitis. **Journal of Dairy Science.**, v. 84, p. 1140-1148, 2001.

RIGHETTI, J.S. Redução da proteína em dietas para a tilápia-do-Nio pela suplementação de aminoácidos com base no conceito de proteína ideal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 3, p. 469-476, 2011.

ROBERTS, R. J.; SOMMERVILLE, C. Disease of tilapias. In: PULLIN, S. V.; LOWE-MAC CONNEL, R. H. (Ed.). **Biology and culture of tilapias**. Manilla: International Center for Living Aquatic Resources Management, 1982. p.247-263.

RODKHUM, C., KAYANSAMRUJ, P.; PIRARAT, N. Effect of water temperature on susceptibility to *Streptococcus agalactiae* serotype Ia infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **The Thai Journal of Veterinary Medicine**, v. 41, n. 3, p. 309-314, 2011.

SACCHETIN, P.S.C.; MORAES, A.M.; LEAL, C.A.G.; FIGUEIREDO, H.C.P. Produção e micropartículas de alginate contendo *Flavobacterium columnare* inativada pelo método de emulsão para vacinação de peixes por via oral. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 263-268, 2010.

SALVADOR, R. MÜLLER, E.E.; FREITAS, J.C.; LEONHARDT, J.H.; PRETTO-GIORDANO, L.G.; DIAS, J.A. Isolation and characterization of *Streptococcus* spp. group B in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in hapas nets and earth nurseries in the northern region of Parana State, Brazil. **Ciência Rural**, v. 35, n. 6, p. 1374-1378, 2005.

SALVADOR, R. MÜLLER, E.E.; LEONHARDT, J.H.; PRETTO-GIORDANO, L.G.; DIAS, J.A.; FREITAS, J.C.; MORENO, A.M. Isolamento de *Streptococcus* spp. de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e qualidade da água de tanques rede na Região Norte do Estado do Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 24, n.1, p. 35-42, 2003.

SALVADOR, R.; ZANOLO, R.; CERICATO, L. The impact of streptococcosis on tilápia in Brazil and efficacy of AquaVac^R Strep Sa for managing the disease under controlled conditions. In: **World Aquaculture Society Conference**, Natal, Brazil. Proceedings Natal: Was, 2011. p. 6-10.

SCHERING-PLOUGH ANIMAL HEALTH. Aquaflo. Florfenicol. Technical Monograph for catfish health professionals, 2009, 36 p.

SCHMITTOU, H. R. **Produção de peixes em alta densidade em tanques-rede de pequeno volume**. Campinas: Mogiana Alimentos e Associação Americana de Soja, 1993. 78 p.

SHELTON, W. L. Monosex tilápia production through androgenesis. In: MCELWEE, K.; LEWIS, K.; NIDFFER, M.; BUITRAGO, P. (eds). **Nineteenth Annual Technical Report. Pond Dynamica/Aquaculture CRSP**, Oregon State University, Corvallis, Oregon, 2002, p. 1-9.

SHOEMAKER, C.; KLESIUS, P. Streptococcal disease problems and control: a review. **Tilapia Aquaculture**, v. 2, n.1, p. 671-680, 1997.

SIDÔNIO, L.; CAVALCANTI, I.; CAPANEMA, L.; MORCH, R.; MAGALHÃES, G.; LIMA, J.; BURNS, V.; ALVES JÚNIOR, A.J.; MUNGIOLI, R. Panorama da aquicultura no Brasil: desafios e oportunidades. **BNDES Setorial**, n. 35, p. 204, 2012.

SITI-ZAHRAH, A.; PADILAH, B.; AZILA, A.; RIMATULHANA, R.; SHAHIDAN, R. Multiple streptococcal species infection in cage-cultured red tilapia but showing similar clinical signs. In: BONDAD-REANTASO, M.G.; MOHAN, C.V.; CRUMLISH, M.; SUBASINGHE, R.P. (eds.). **Diseases in Asian Aquaculture VI**. Manila: Fish Health Section, Asian Fisheries Society, 2008. p. 313-320.

SOUTHGATE, P. Disease in Aquaculture. In: **Aquaculture for Veterinarians: fish husbandry and medicine**. England: Pergamon Press, Oxford, 1993. p. 91-130.

SPELLERBERG, B.; BRANDT, C. *Streptococcus*. **Manual of Clinical Microbiology**, 9ªed. Washington, DC: ASM Press; p.412-429, 2007.

SUANYUK, N.; KANGHEAR, H.; KHONGPRADIT, R.; SUPAMATTAYA, K. *Streptococcus agalactiae* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 27, p. 307-319, 2005.

SURESH, A. V. Tilapia update 1998. *World Aquaculture*, v. 30, p. 8-68, 1999.

SWANN, L.D.; MORRIS, J.E; SELOCK, D.; RIEPE, J. **Cage culture of fish in the north central region**. United States: Department of Agriculture, (Technical Bulletin Series 110). 1994. Disponível em: <http://aquanic.org/publicat/usda_rac/tr/ncrac/tb110.pdf>. Acesso em: 15 set. 2013.

TAMAPARU, S.; MCKILLIP, J.; DRAKE, M. Development of a polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of *Staphylococcus aureus* in dairy products. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 5, p. 664-668, 2001.

TORANZO, A. E.; MAGARIÑOS, B.; ROMALDE, J. L. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. **Aquaculture**, v. 246, n. 1-4, p. 37-61, 2005.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4ª ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 2005. 718 p.

UGAJIN, M. Studies on *Streptococcus* sp. as a causative agent of an epizootic among the cultured ayu (*Plecoglossus altivelis*) in Tochigi Prefecture, Japan, 1980. **Fish Pathology**, v. 16, n.3, p. 119-127, 1981.

WOESE, C. R. Bacterial Evolution. **Microbiological Reviews**, v. 51, n. 2, p. 221-271, 1987.

WU, S. Y. New bacterial disease of tilapia. **Fish Culture Bulletin**, v. 23, p. 3-40, 1970.

YE, X.; LI, J.; LU, M.; DENG, G.; JIANG, X.; TIAN, Y.; QUAN, Y.; JIAN, Q. Identification and molecular typing of *Streptococcus agalactiae* isolated from pond-cultured tilapia in China. **Fish Sciences**, v. 77, p. 623-632, 2011.

ZAMRI-SAAD, M.; AMAL, M.N.A.; SITI-ZAHRAH, A. Pathological changes in red tilapias (*Oreochromis* spp.) naturally infected by *Streptococcus agalactiae*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 143, n. 2-3, p. 227-229, 2010.

ZANIBONI FILHO, E. Cultivo de peixes em tanques-rede e impactos ambientais. In: **CULTIVO de peixes em tanques-rede: desafios e oportunidades para um desenvolvimento sustentável**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2005. 104 p.

ZSCHÖCK, M.; MANHOLD-MAURER, S.; WESCHER, A.; MERL, K.; KHAN, I.; LÄMMLER, C. Evaluation of tRNA intergenic spacer length polymorphism analysis as a molecular method for species identification of streptococcal isolates from bovine mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 3, p. 333-337, 2005.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a eficácia da amplificação por PCR e isolamento bacteriano de *Streptococcus agalactiae* em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com sinais clínicos e assintomáticos durante as quatro estações do ano de 2013.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar a ocorrência de *Streptococcus agalactiae* em peixes durante o verão, outono, inverno e primavera do ano de 2013 em propriedades de criação do norte do Paraná.

Identificar cepas de *S. agalactiae* isoladas de órgãos de tilápias.

Verificar a presença de *S. agalactiae* em peixes com e sem sinais clínicos de doença bacteriana.

Verificar a eficácia da detecção de *S. agalactiae* por PCR em relação ao isolamento bacteriano de órgãos de tilápias sem sinais clínicos.

3 ARTIGO CIENTÍFICO

DETECÇÃO MOLECULAR E ISOLAMENTO DE *Streptococcus agalactiae* EM TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*) COM E SEM SINAIS CLÍNICOS DE DOENÇA BACTERIANA

RESUMO

A produção de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) está em intenso crescimento no Brasil e no mundo. *Streptococcus agalactiae* é considerado um sério problema sanitário em sistemas intensivo de cultivo de tilápias, causando prejuízos econômicos a atividade. O objetivo do presente trabalho foi verificar a eficácia de identificação de *S. agalactiae* pela técnica de amplificação por PCR e isolamento bacteriano de *S. agalactiae* em tilápia do Nilo com e sem sinais clínicos de doença bacteriana durante as quatro estações do ano de 2013. Foram coletados 200 peixes em cinco propriedades de criação em tanques-rede, no norte do Paraná, Brasil, sendo 50 animais por estação. O verão foi a estação com maior ocorrência de *S. agalactiae* tanto pela técnica de amplificação por PCR quando pela técnica de isolamento. Dentre os peixes coletados, 17 apresentavam sinais clínicos de doença bacteriana e 183 estavam aparentemente saudáveis. De cada peixe foram colhidas amostras em duplicata de rim, encéfalo e fígado, para isolamento bacteriano e extração de DNA e posterior amplificação por PCR utilizando os iniciadores F1 e IMOD específicos para região do gene 16S *rRNA* de *S. agalactiae*. Em 56% (112/200) dos peixes avaliados a PCR foi eficaz na detecção de positivos para *S. agalactiae* e, somente, em 10% (20/200) dos peixes foi possível o isolamento da bactéria. Foi detectada por PCR em 100% (17/17) dos peixes com sinais clínicos e destes 94,11% (16/17) por isolamento. Dos 183 peixes assintomáticos, 51,91% foram positivos na PCR e somente 2,18% por isolamento. Esses dados sugerem que o próprio peixe pode ser o reservatório desta bactéria, podendo em condições adversas, os animais assintomáticos tornarem-se sintomáticos e disseminar a bactéria. Desta forma, a utilização de técnicas de detecção mais sensíveis como a PCR são importantes para monitorar a presença da bactéria nos tecidos de peixes assintomáticos e intervir no manejo sanitário antes do agravamento dos sinais clínicos e morte dos peixes.

Palavras-chave: PCR, infecção subclínica, sinais clínicos, doença bacteriana.

MOLECULAR DETECTION AND ISOLATION OF *Streptococcus agalactiae* IN NILE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) WITH AND WITHOUT CLINICAL SIGNS OF BACTERIAL DISEASE.

ABSTRACT

Production of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is in intensive growth in Brazil and worldwide. *Streptococcus agalactiae* considered a serious health problem in tilapia intensive culture systems, causing economic losses for this activity. The objective of this current paper was to verify the effectiveness of PCR by means of amplification technique and bacterial isolation of *S. agalactiae* in Nile tilapia with clinical signs and asymptomatic during the four seasons of 2013. Two hundred fish were collected from five farming properties of net tank fish, at the North region of Paraná, Brazil, being 50 animals per season. Summer was the season with the greatest occurrence of *S. agalactiae* not only due to the amplification technique by means of PCR, but also by means of isolation technique. Among the collected fish, some presented clinical signs of bacterial disease and others do not. From each fish samples were obtained in duplicate from kidney, brain, liver for bacterial isolation and DNA extraction and following up amplification, by means of PCR amplification with F1 and IMOD primers, for the gene area 16 S rRNA specific for *S. agalactiae*. In 56% of evaluated fish, (112 out of 200) was detected positive for *S. agalactiae* by means of PCR and only in 10% (20 out of 200) of the fish the bacterium was detected by isolating. Were detected the presence of *S. agalactiae* by PCR in 100% (17 out of 17) of fish with clinical signs and, of these, 94.11% by isolation. Of the 183 asymptomatic fish, 51.91% was detected by PCR and only 2.18% by insulation. These data suggest that fish itself can be the reservoir of this bacterium, and it may in adverse conditions, the asymptomatic animals become symptomatic and disseminate the bacterium. Thus, the usage of more sensitive detection techniques like PCR are important in order to monitor the presence of the bacterium at the tissues of asymptomatic fish and intervene at the sanitary handling before the aggravation of the clinical signals and death of the fish.

Keywords: PCR, subclinical infection, clinical signs, bacterial disease.

4 INTRODUÇÃO

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma das espécies de peixe mais produzidas no mundo e no Brasil (SIDÔNIO, 2012). O mercado mundial registrou a produção de 3.497.391 toneladas de tilápia em 2010, totalizando US\$ 14 bilhões ao ano, de acordo com dados da FAO (BRASIL, 2013a). Mundialmente, na última década houve um acréscimo médio na produção de 10,4% ao ano. No Brasil o padrão de crescimento foi constante desde 1994, sendo que entre os anos de 2003 a 2009 a tilapicultura cresceu 105%, passando de 65.857,5 para 132.957,8 toneladas. Em 2011, a produção foi de 253.824,1 o que representa 46,6% do total produção de pescado continental do Brasil (BRASIL, 2013b).

Esta espécie tem destaque na produção por diversas características como a adaptação a diferentes ambientes, rusticidade, facilidade de criação, excelente conversão alimentar, custos de produção relativamente baixos e boa aceitação no mercado consumidor (BEVERIDGE; BAIRD, 1998; NANDLAL; PICKERING, 2004).

No Brasil, o sistema intensivo de produção mais utilizado é o tanque-rede, que tem como característica a alta densidade de estocagem e o arraçoamento intensivo. Essas características podem levar ao acúmulo local de matéria orgânica que fornece substrato para a multiplicação de microrganismos patogênicos, deterioração da qualidade da água, promovendo uma situação de estresse aos peixes que os torna susceptíveis às enfermidades. Em adição, o estado nutricional e a temperatura da água podem atuar diretamente no sistema imune dos peixes, tornando-os susceptíveis a doenças (PLUMB, 1997; SHOEMAKER et al., 2000).

Perez (1999) relatou que o crescimento desordenado da atividade, seguido de um descontrole sanitário, favorece elevada mortalidade principalmente por doenças bacterianas, além da produção de pescado com qualidade duvidosa. Com o intuito de diminuir os problemas sanitários, os produtores utilizam antibióticos de forma indiscriminada, que prejudicam o ambiente e qualidade do pescado (KLESIOUS et al., 2004).

A estreptococose é considerada como um conjunto de doenças similares, causada por diferentes gêneros e espécies bacterianas que atingem o sistema nervoso central e determinam septicemia em peixes (TORANZO et al., 2005). Esta doença tornou-se um dos maiores problemas no cultivo intensivo de

tilápias, contribuindo para grandes perdas econômicas (SHOEMAKER; KLESIUS, 1997). A espécie *Streptococcus agalactiae* é uma das principais espécies bacterianas do complexo que afetam a produção de tilápias no mundo e no Brasil (EVANS et al., 2006; FIGUEIREDO et al., 2006; FIGUEIREDO; LEAL, 2008).

Um dos mecanismos de manutenção da doença ocorre devido portadores aparentemente saudáveis, que foi demonstrado em salmão, truta prateada, robalo e tilápia (TORANZO et al, 1993; . ELDAR et al.1995; AKHLAGHI et al, 1996; ROMALDE et al, 1996). Outros potenciais reservatórios das bactérias incluem os peixes que sobrevivem a surtos de doença, a água e a própria lama dos locais onde estão instaladas as propriedades de criação intensiva (TORANZO et al., 1993 , AKHLAGHI et al., 1996; SHOEMAKER; KLESIUS,1997; BROMAGE et al . , 1999).

A transmissão do patógeno por sua vez, pode ser por contato direto entre peixes doentes com peixes saudáveis ou por contato indireto, por meio da água contaminada (SHOEMAKER et al., 2000; FIGUEIREDO et al., 2007). A infecção pode ocorrer quando peixes infectados mortos, vivos, moribundos ou aparentemente saudáveis liberam a bactéria na água, permitindo-lhe colonizar outros peixes, e ainda, por ingestão de olhos e vísceras (MINAMI, 1979; SURESH, 1999; SHOEMAKER et al., 2000).

Isolamentos bacterianos em peixes sem sinais clínicos de bacteriose têm sido descritos, no entanto, em baixas quantidades, como relatados por Abuseliana et al. (2010), na Malásia, que isolaram 100% de *S. agalactiae* de peixes com sinais clínicos e somente 5% dos peixes sem sinais clínicos de bacteriose. O uso de métodos moleculares de diagnóstico tem possibilitado aumentar a sensibilidade e a especificidade no processo de detecção de patógenos, reduzindo erros na interpretação de dados biológicos, morfológicos, pois os métodos moleculares utilizam sequências específicas do genoma de um dado organismo (MARTINS, 2006). Por estas características, diagnosticar infecções com base em PCR tem sido efetivamente aplicado para uma ampla gama de microrganismos (YANG; ROTHMAN, 2004; TORANZO et al., 2005).

O objetivo deste trabalho foi verificar a eficácia da amplificação por PCR e isolamento bacteriano de *Streptococcus agalactiae* em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com sinais clínicos e assintomáticos durante as quatro estações do ano de 2013.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 COMITÊ DE ÉTICA

Projeto aprovado pela comissão de ética da Universidade Estadual de Londrina OF.CIRC.CEUA nº 249/12.

5.2 COLETAS

Foram estudadas cinco propriedades, denominadas A, B, C, D e E, de criação intensiva em tanque-rede, de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), localizadas no rio Paranapanema, região norte do Paraná, Brasil. As pisciculturas continham 780, 375, 120, 80, 130 tanques-rede de 6m³, respectivamente, e todas com densidade de estocagem com 800 peixes em média por gaiolas. Realizou-se uma coleta em cada propriedade durante o verão, outono, inverno e primavera, no período de janeiro a dezembro do ano de 2013. Em cada coleta foi selecionado aleatoriamente um tanque-rede e coletados 10 peixes com massa média de 300 gramas. No total foram coletados 200 peixes, sendo 50 em cada estação do ano.

No momento da coleta, foi avaliada a temperatura da água e observado a presença de animais com sinais clínicos como escurecimento de pele lesões, letargia, natação errática, exoftalmia, distensão visceral. Os peixes foram transportados vivos em sacos plásticos, contendo água do próprio local e oxigênio sob pressão, para o Laboratório de Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), da Universidade Estadual de Londrina – UEL.

Os peixes foram anestesiados com Benzocaína, na proporção de 1 g de Benzocaína para 10 mL de álcool 96°GL em 10 L de água, segundo Stoskopf (1993) e submetidos ao exame externo físico e à necropsia.

Foram coletadas amostras em duplicata, individualmente e assepticamente de rim, fígado e encéfalo de cada um dos 200 peixes. As amostras para o isolamento bacteriano foram semeadas imediatamente após a coleta e para as extração de DNA armazenadas em microtubos, esterilizados, a - 20 °C até o processamento de extração de DNA para a realização das reações de PCR.

5.3 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DAS CEPAS BACTERIANAS

Para o isolamento bacteriano foram utilizadas um total de 600 amostras, sendo 150 por período. Estas foram semeadas em ágar Columbia (Difco Laboratories, Sparks, MD) suplementado com 5% de sangue ovino desfibrinado (ACS) e incubadas a 30 °C, em aerofilia, por 48 horas. Após incubação, foi observado o crescimento bacteriano e das colônias obtidas observou-se características como a morfologia e a presença de hemólise. As colônias consideradas típicas foram submetidas à coloração de Gram, prova da catalase, esculina e realizada a classificação no grupo de Lancifield pelo Slidex Strepto kit (BioMerriex – França) (EVANS et al., 2002). As cepas previamente caracterizadas por esses testes foram submetidos a extração de DNA e amplificação por PCR com iniciadores específicos para a espécie *S. agalactiae* F1 e IMOD, descritos por Martinez et al. (2001). As cepas caracterizadas como *S. agalactiae* foram armazenadas em microtubos contendo 2 mL do caldo com crescimento bacteriano com 100 µL de glicerina estéril, e estocadas à, - 20 °C no Banco de cepas do Laboratório de Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas – DMVP-UEL.

5.4 EXTRAÇÃO DE DNA DE CEPAS BACTERIANAS ISOLADAS DOS TECIDOS DE PEIXES

Para a extração do DNA genômico dos isolados previamente identificadas por testes bacteriológicos, três colônias isoladas foram coletadas e adicionadas a 200 µL de tampão TE (10 mM Tris HCL e, 1 mM EDTA) pH 8,0, homogeneizadas por 10 segundos em Vortex e submetido à fervura (100 °C) em banho-maria modelo EVLAB EV: 015-T, por 10 minutos, seguido de centrifugação a 12.000 rpm por três minutos. O sobrenadante foi coletado e estocado a -20 °C até o momento de uso. Para reações de PCR com DNA genômico foram utilizados 2µL desta solução.

5.5 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR POR PCR

Para identificação molecular foi utilizada a técnica de amplificação por PCR, utilizando iniciadores F1 e IMOD descritos por Martinez et al. (2001) que

amplificam especificamente indivíduos da espécie *S. agalactiae*, a partir da região ribossomal 16S.

A reação de PCR para os iniciadores F1 e IMOD apresentou um volume final de 20 µL contendo 2,0 µL de tampão (10x); 1,0 µL de MgCl₂ (50 mM); 0,4 µL da solução de trifosfatos de desoxinucleotídeos (25 mM); 1,5 µL de cada iniciador (10 µM); 0,2 µL de Taq DNA polimerase (5u/µL), 2,0 µL da amostra de DNA bacteriano e 11,4 µL de H₂O ultra pura. Cada reação foi submetida a 32 ciclos de amplificação no termociclador (TECHNE – TC 512). O primeiro ciclo foi precedido de uma fase de desnaturação inicial de 4 minutos, a 94 °C. Cada ciclo de amplificação consistia em uma desnaturação a 94 °C, durante 30”, pareamento dos iniciadores a 55 °C, durante 30”, nos primeiros 10 ciclos e a 51 °C, nos 22 ciclos restantes, e extensão a 72 °C, por 30”. O último ciclo foi sucedido por passo de extensão final por 4 minutos, a 72 °C.

Após amplificação, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com Sybr Safe® (Invitrogen) e registrado com foto documentador L PIX Locus Biotecnologia. Os géis foram analisados quanto à presença ou ausência de amplicons e foram consideradas amostras positivas as que obtiveram um amplicon com tamanho de 220 pb, os quais são os previstos para os iniciadores utilizados.

5.6 ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE DOS INICIADORES F1 E IMOD

O DNA da linhagem de referência *S. agalactiae* (ATCC 13813) foi extraído e amplificado por meio dos iniciadores F1 e IMOD. Em seguida, utilizando o kit para purificação de produto de PCR, E.Z.N.A Cycle-Pure Kit (OMEGA bio-tek), conforme as instruções do fabricante, os amplicons foram purificados, quantificados e sequenciados. A sequência obtida foi comparada com o banco de dados visando à confirmação da amplificação específica utilizando os iniciadores F1 e IMOD. A sensibilidade dos iniciadores foi de $5,84 \times 10^1$ UFC.

5.7 EXTRAÇÃO DE DNA DOS TECIDOS

A extração de DNA das 600 amostras dos órgãos foi pelo método de extração por fenol-clorofórmio com lise enzimática por proteinase K descrito por Sambrook et al. (1989) com adaptações.

Foram macerados individualmente 25 mg de rim, fígado e encéfalo. Cada amostra foi resuspendida e homogeneizada com 300 µL de solução de lise (1,8 µL NaCl 5M; 450 µL TrisHCl 1M, pH 8, 90 µL SDS 10%; 36 µL EDTA 0,5M pH 8; 322,2 µL de água ultra pura) e 12 µL de Proteinase K 20 mg/mL. As amostras foram incubadas a 70 °C em banho-maria durante uma hora e 30 minutos, com homogeneização a cada 15 minutos.

Em seguida as amostras passaram por três etapas para a purificação do DNA, sendo adicionado na etapa inicial um volume de fenol (300 µL), na etapa intermediária um volume (180 µL) de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico na proporção de 25:24:1 e na etapa final um volume (80 µL) de clorofórmio/álcool isoamílico na proporção de 24:1. A cada etapa as amostras foram centrifugadas a 15.000 (x g) por 10 minutos e a fase aquosa coletada. Após a última etapa de purificação, foi adicionado álcool absoluto, gelado, na proporção de duas vezes o volume obtido (60 µL) e NaCl 1M na proporção de 0,1 volume (3 µL). Em seguida, as amostras foram armazenadas a - 20 °C por 24 horas.

Após a precipitação do DNA, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 18.000 (x g) a 4 °C, o sobrenadante foi desprezado e o "pellet" foi lavado com 200 µL de etanol 70%. A solução foi novamente centrifugada por 10 min a 14.000 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e o "pellet" foi resuspendido em 30 µL de água ultra pura esterilizada e armazenado a - 20 °C. Dessa solução, 2 µL foram utilizados como DNA molde para as reações de PCR.

As extrações de DNA ocorreram em grupos de 30 amostras. Em cada grupo de extração foi utilizado como controle positivo, um órgão do qual foi isolado de *S. agalactiae*, e um controle negativo contendo, água ultra pura esterilizada.

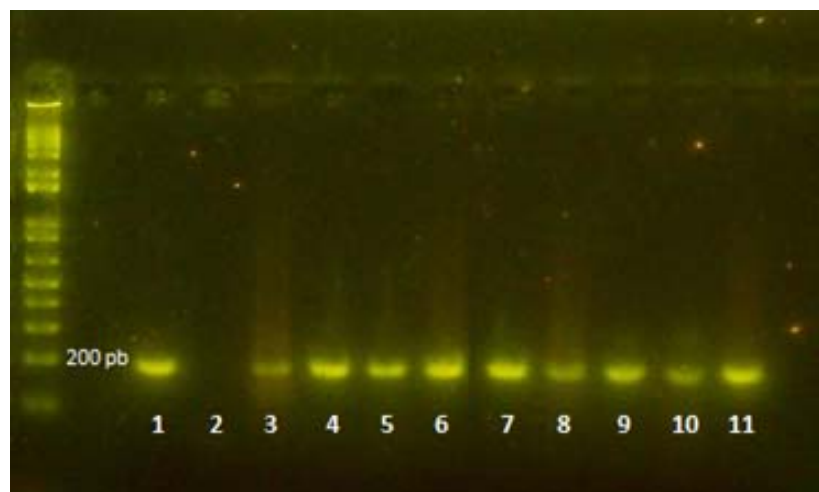
5.8 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *S. AGALACTIAE* POR PCR NOS TECIDOS

As 600 amostras de DNA dos órgãos, foram submetidas a amplificação por PCR para identificação molecular de *S. agalactiae*. Essas reações de PCR foram realizadas nas mesmas condições descritas anteriormente para as colônias no item 5.5, exceto pela adição de albumina de soro bovino (BSA) 2,5 mg/μL, purificada 100x, na quantidade de 1μL por reação. As condições de análise dos amplicons foram as mesmas realizadas para identificação dos isolados.

6 RESULTADOS

Dos 600 órgãos avaliados foram obtidos 36 isolados, com colônias translúcidas, pequenas, com aproximadamente 1 mm de diâmetro, superfície lisa brilhante e contorno circular em meio sólido. Estas foram caracterizadas como cocos Gram positivos, catalase e esculina negativos, não hemolíticas, classificadas no grupo B de Lancefield. Na PCR, estas cepas apresentaram amplicons de 220 pares de bases e foram confirmadas como *S. agalactiae* (Figura 1).

Figura 1 - Gel de agarose 1,2%, corado com Sybr Safe® (Invitrogen), com a presença de amplicons, contendo o tamanho esperado de 220pb para os iniciadores F1 e IMOD. Marcador de peso molecular de 100 pb DNA (Invitrogen, Inglaterra). Canaletas: 1 - controle positivo, cepa referência *S. agalactiae* (ATCC 13813), 2 - controle negativo (água Milli-Q esterilizada), 3 a 11 amostras de DNA genômico dos isolados



Fonte: SCARPASSA (2013)

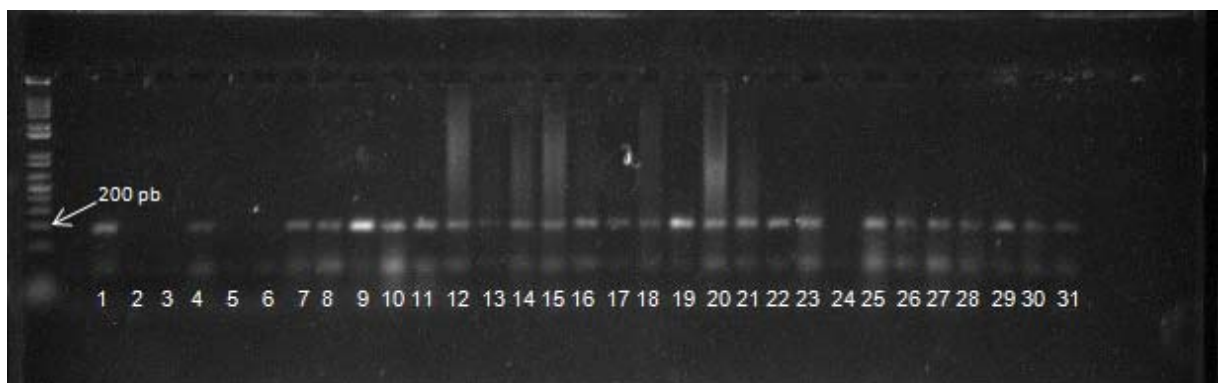
O encéfalo foi o órgão com o maior número de isolamento de *S. agalactiae*, 15/36 (41,67%) seguido de rim 12/36 (33,33%) e fígado 9/36 (25%).

No período do verão e da primavera foram observados o maior número de isolados 17/150 e 10/150, respectivamente. No outono 7/150 e no inverno e 2/150.

A amplificação específica foi confirmada por sequenciamento do fragmento amplificado. O produto do sequenciamento foi comparado com sequências depositadas no banco de dados do Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov), indicando 100 % de identidade com a mesma região do genoma do isolado de *S. agalactiae* da sequência, JN907341.1.

Das 600 amostras de órgãos avaliadas, 207 apresentaram amplificação por PCR (Figura 2). O encéfalo foi o órgão que apresentou maior número de amplificações 85/207 (41,06%), o fígado menor número 52/207 (25,12%) e o rim apresentou o número de 70/207 (33,82%). Em todas as amostras de órgãos que apresentaram isolamento de *S. agalactiae* obteve-se amplificação positiva com os iniciadores utilizados indicando correlação de 100%.

Figura 2 - Gel de agarose 1,2%, corado com Sybr Safe® (Invitrogen), evidenciando amplicons com tamanho esperado de 220pb para os iniciadores F1 e IMOD em amostras de tecidos de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) Marcador de tamanho molecular de 100 pb DNA (Invitrogen, Inglaterra). Canaletas: 1 controle positivo reação de PCR, cepa referência *S. agalactiae* (ATCC 13813), 2 controle negativo reação de PCR (água Milli-Q esterilizada), 3 controle negativo extração de DNA (água Milli-Q esterilizada), 4 controle positivo extração de DNA (tecido positivo para isolamento de *S. agalactiae*), 5 a 31 amostras de DNA genômico dos de órgãos de tilápia do Nilo. De 5 a 13 amostras de DNA de fígado, 14 a 22, amostras de DNA de rim e de 23 a 31 amostras de DNA de encéfalo



Fonte: SCARPASSA (2013)

Foram obtidas ampliações a partir de amostras de peixes coletados nas quatro estações do ano. O maior número de amplificação ocorreu no verão 96/150 e outono 58/150 e os menores números ocorreram no inverno 26/150 e na primavera 27/150.

Dos 200 peixes avaliados, 20 foram considerados como peixes positivos pela técnica de isolamento, pois em pelo menos um dos órgãos coletados apresentou isolamento de *S. agalactiae*. Dos peixes positivos que apresentavam sinais clínicos de doença bacteriana, em 16/17 (94,11%) foi isolado *S. agalactiae*. Dos 183 peixes sem sinais clínicos foi isolado *S. agalactiae* de 4 (2,18%) (Tabela 1).

O maior número de peixes positivos ocorreu no período do verão 08/50, e destes, 7 apresentavam sinais clínicos. No outono e primavera 5/50 em cada estação, e destes, 3 e 4 peixes apresentavam sinais clínicos, respectivamente. No inverno, dos 50 peixes avaliados foi isolado *S. agalactiae* somente em 2 peixes com sinais clínicos (Tabela 1).

Tabela 1 - Peixes positivos para *S. agalactiae* por isolamento e amplificação com e sem sinais clínicos de doença bacteriana nas cinco propriedades de criação intensiva estudadas, nos diferentes períodos do ano de 2013

		A	B	C	D	E	Total
Verão	T - SS/CS	10/0	9/1	7/3	10/0	6/4	42/8
	A - SS/CS	9/0	9/1	7/3	5/0	4/4	34/8
	I - SS/CS	0/0	0/1	0/3	0/0	1/3	1/7
	N-AI	1	0	0	5	2	8
Outono	T - SS/CS	10/0	9/1	10/0	10/0	8/2	47/3
	A - SS/CS	4/0	8/1	9/0	2/0	7/2	30/3
	I - SS/CS	0/0	1/1	0/0	0/0	1/2	2/3
	N-AI	6	1	1	8	1	17
Inverno	T - SS/CS	10/0	10/0	10/0	10/0	8/2	48/2
	A - SS/CS	1/0	7/0	2/0	2/0	6/2	18/2
	I - SS/CS	0/0	0/0	0/0	0/0	0/2	0/2
	N-AI	9	3	8	8	2	30
Primavera	T - SS/CS	10/0	10/0	10/0	10/0	6/4	46/4
	A - SS/CS	1/0	5/0	2/0	1/0	4/4	13/4
	I - SS/CS	0/0	0/0	0/0	0/0	1/4	1/4
	N-AI	9	5	8	9	2	33

A,B,C,D,E Propriedades de criação intensiva de tilápia do Nilo.

T - SS/CS Total de peixes: sem sinal clínico/ com sinal clínico.

A - SS/CS Amplificação em peixes: sem sinal/com sinal.

I - SS/CS Isolamento em peixes: sem sinal/ com sinal.

N-AI Peixes negativos (sem amplificação e sem isolamento)

Na amplificação por PCR, 112/200 (56%) peixes foram considerados como peixes positivos, pois apresentaram pelo menos uma amplificação em um dos órgãos coletados. Todos os 17 peixes com sinais clínicos, inclusive o que foi negativo pela técnica de isolamento, foram positivos na PCR. Dos peixes sem sinais clínicos 95/183 (51,91%) apresentaram amplificação.

O maior número de peixes positivos por PCR ocorreram no período do verão 42/50 e destes 7 apresentavam sinais clínicos. No outono 33/50 amplificaram e no inverno 20/50, e destes, 3 e 2 apresentavam sinais clínicos respectivamente. O menor número de peixes positivos foi na primavera 17/50 sendo 4 os que apresentavam sinais clínicos (Tabela 1).

A maior temperatura média da água foi registrada no verão e a menor no inverno (Tabela 2).

Tabela 2 - Temperatura da água aferida a partir dos tanques no momento das coletas de tilápia do Nilo nas cinco propriedades de criação intensiva (A,B,C,D e E) estudadas nas quatro estações do ano de 2013

	A	B	C	D	E	Média
Verão	26	25	25	28	28	26.4
Outono	25	24,5	24	24,5	23	25.2
Inverno	20	20	21	20,5	20	20.3
Primavera	26	26	26	26	25	25.8

Temperatura em grau Celsius (°C)

7 DISCUSSÃO

O presente estudo foi o primeiro no Brasil a detectar *S. agalactiae* por PCR de tilápias assintomáticas, evidenciando a importância da detecção precoce do patógeno. A maioria dos trabalhos de estreptococose no Brasil descreveram isolamento de *S. agalactiae* de tilápia a partir de surtos com alta taxa de mortalidade, de peixes com sinais clínicos ou infectados experimentalmente (SALVADOR et al., 2005; FIGUEIREDO et al., 2006; MIAN et al., 2009; PRETTO-GIORDANO et al., 2010).

Tecnologias baseadas em DNA têm sido cada vez mais utilizadas para auxiliar o diagnóstico de doenças de peixes (HINEY; SMITH, 1998). A reação de amplificação por PCR foi já utilizada por Suanyuk et al. (2008), Jafar et al. (2009)

e Itsaro, Suanyuk e Tantikitti (2012) com iniciadores F1 e IMOD, a fim de identificar cepas de *S. agalactiae* provenientes de tilápias, permitindo a detecção em tecidos de diferentes órgãos.

A relação de isolamento e amplificação de DNA de *S. agalactiae* dos órgãos foi de 100%. Isso comprova que os órgãos utilizados e os métodos empregados foram eficientes para o diagnóstico molecular de *S. agalactiae* em tilápia do Nilo (*O. niloticus*).

Dos peixes avaliados, em 56% (112/200) a PCR foi eficaz na detecção de peixes positivos para *S. agalactiae*, entretanto, em somente 10% (20/200) dos peixes foi detectado a bactéria por isolamento.

O encéfalo foi o órgão em que foi observado o maior número de resultados positivos, seja por isolamento ou por amplificação para *S. agalactiae*. Figueiredo et al. (2007, 2009) afirmaram que o encéfalo é o órgão de predileção do estreptococos, causando encefalite, natação errática e perda de equilíbrio nos peixes acometidos. Salvador et al. (2003) isolaram 70,6 % dos *Streptococcus* spp. a partir de encéfalo.

A taxa de isolamento de *S. agalactiae* em encéfalo, rim e fígado foi de 7,5%, 6,% e 4,5% e amplificação por PCR, 42,5%, 35% e 26%, respectivamente. Shoemaker et al. (2001) relataram baixo número de isolamento de *S. iniae* em encéfalo, rim e pele de tilápias cultivadas em propriedades comerciais nos EUA. Esses autores sugeriram o uso de técnicas mais sensíveis para detecção de patógenos em peixes, pois permitiriam a detecção precoce da bactéria.

Na amplificação por PCR, em 51,91% dos peixes sem sinais clínicos e em 100% dos peixes com sinal clínico foi detectada a presença de *S. agalactiae*. Por isolamento, somente em 2,18% dos peixes sem sinais e em 94,11% dos peixes com sinal clínico, foram positivos (Tabela 1). Isto indica que a amplificação por PCR foi mais eficiente em detectar *S. agalactiae* tanto de peixes com sinais clínicos como sem sinais de doença bacteriana quando comparado ao isolamento microbiológico. Da mesma maneira, Zlotkin et al. (1998) identificaram *Lactococcus garvieae* por técnica molecular usando a amplificação por PCR em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) sem sinais clínicos.

Os resultados demonstraram maior sensibilidade e especificidade da técnica de PCR em relação a técnica de isolamento bacteriano em detectar patógenos. A avaliação da especificidade dos iniciadores F1 e IMOD foi realizada

por Martinez (2001) e Souza (2012), a partir de cultura bacteriana e encontraram ausência de reação cruzada com outras bactérias. O presente estudo confirmou a especificidade por sequenciamento e a alta sensibilidade por diluição para a detecção de *S. agalactiae*.

Os dados sugerem que em tilápia do Nilo, o próprio peixe pode manter populações viáveis desta bactéria em peixes assintomáticos, sendo que estes reservatórios podem ser fonte de infecção, onde em condições adversas que levem a redução de imunidade dos peixes, os tornam mais suscetíveis à estreptococose. Li et al. (2013) relataram estreptococose crônica em tilápias do Nilo causada por *S. agalactiae*. Os autores descreveram a mortalidade de peixes, tanto em surtos como em experimentos de inoculação, sem sinais clássicos de estreptococose e sem isolamento nos tecidos como encéfalo, fígado, baço e rim pós-infecção. No entanto, *S. agalactiae* foi detectado nesses animais por meio de testes sorológicos e em nódulos nos músculos.

As condições de infecção subclínica demonstraram a importância da utilização de técnicas de diagnóstico mais sensíveis, o que permite detectar a bactéria nos tecidos de peixes assintomáticos. Segundo Martins (2006) as técnicas de biologia molecular são úteis para a detecção do patógeno antes que se desenvolvam enfermidades. Essas técnicas podem contribuir para o manejo de doenças em criações pela detecção precoce da bactéria. Este controle auxilia no tratamento precoce com antibióticos, quando necessário, permitindo um uso mais racional, contribuindo ainda para a diminuição da mortalidade e desenvolvimento de cepas resistentes. No entanto, a presença do patógeno não significa que o animal esteja doente, pois de maneira geral as doenças resultam em uma complexa interação entre o hospedeiro, o meio ambiente e o patógeno (LIGHTNER; REDMAN, 1998).

Foi detectado *S. agalactiae* por PCR em peixes de todas as propriedades, durante as quatro estações do ano, o que não ocorreu para a técnica de isolamento. Entretanto, nos diversos locais de coleta pode ser observada uma diferente taxa de isolamento e de amplificação por PCR de *S. agalactiae* entre as propriedades estudadas (Tabela 1). Estas diferenças podem ter ocorrido pelos diferentes manejos adotados em cada propriedade, que contribuem para o aumento dos níveis de infecções bacterianas (PLUMB, 1997; PASNIK et al., 2005 MIAN et al.,

2009). No entanto, densidade de estocagem, qualidade da água, estado nutricional, imunológico dos peixes entre outros não foram avaliados neste estudo.

Durante o verão foi verificado mais peixes coletados com sinais clínicos, maior número de isolamentos, ampliações e peixes positivos para *S. agalactiae* tanto com sinal e sem sinal clínico de doença bacteriana. Fatores ambientais tem sido associados à mortalidade de tilápias por *Streptococcus* spp. (SHOEMAKER et al., 2000) e entre esses fatores está a temperatura (MCGEACHIN et al., 1987). Pesquisadores relacionaram temperaturas mais elevadas com maior ocorrência de infecções por estreptococos em peixes (ROBERTS; SOMERVILLE, 1982; KITAO, 1993), sendo que o período do verão é considerado o de maior risco para surtos de estreptococose causados por *S. agalactiae*. Segundo Chang e Plumb (1996), tilápia do Nilo foram mais susceptíveis a infecção por estreptococos em temperaturas que oscilaram de 25 °C e 30 °C. No presente estudo, apenas no inverno essas temperaturas não foram atingidas (Tabela 2). No entanto, a temperatura não é o único fator ambiental que pode ter influenciado, visto que isolou-se *S. agalactiae* de peixes doentes e detectou-se por PCR em peixes aparentemente saudáveis no inverno.

Alguns autores relataram que *S. agalactiae* está no ambiente e sofrem sua influência. Kitao et al. (1979) descreveram elevado número de estreptococos na água e em sedimentos de piscicultura nos meses de verão diminuindo durante o outono e inverno. Perera et al. (1997) observaram padrões de mortalidade em pisciculturas do Texas, e sugeriram que no meio aquático ocorre uma fonte permanente de *Streptococcus* e em condições favoráveis, com grande quantidade de matéria orgânica, as bactérias presentes na água multiplicam-se e provocam surtos nos peixes.

O presente estudo indicou que a bactéria *S. agalactiae* esta presente em peixes com e sem sinais clínicos, em todas as estações do ano e nas propriedades de criação intensiva de tilápias estudadas. Ainda mostrou a importância do diagnóstico molecular para identificação de peixes assintomáticos, pois os mesmos podem ser reservatórios naturais da bactéria nas propriedades contribuindo para a manutenção da doença e para o risco de surtos.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

S. agalactiae foi detectado durante as quatro estações e nas cinco propriedades estudadas. Demonstrando que essa bactéria permanece nos peixes ao longo do ano. No entanto houve diferenças de ocorrência entre as diferentes propriedades utilizadas, o que remete a um estudo dos fatores de risco particulares de cada local de coleta, para uma melhor compreensão da doença.

Foram avaliados peixes positivos, tanto com e sem sinais clínicos de doença bacteriana utilizando tanto a técnica de isolamento bacteriano como a de amplificação por PCR. A PCR foi a técnica mais eficiente na identificação de peixes infectados, com e sem sinais clínicos. Isto demonstra que essa técnica foi a mais sensível na detecção de *S. agalactiae* em tecidos de peixes não só para o diagnóstico de casos clínicos, mas de grande importância na identificação de infecções subclínicas, onde irá auxiliar na detecção precoce da doença nas propriedades e monitoramento sanitário.

A técnica da PCR pode auxiliar no monitoramento da estreptococose, auxiliando no manejo da doença nas criações, bem como no controle dos surtos otimizando a utilização de antibióticos e reduzindo a perda por mortalidade.

REFERÊNCIAS

- ABUSELIANA, A.; DUAD, H.; AZIZ, S.A.; BEJO, S.K; ALSAID, M. *Streptococcus agalactiae* the etiological agent of mass mortality on farmed red tilapia (*Oreochromis* sp.). **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 9, n. 20, p. 2640-2646, 2010.
- AKHLAGHI, M.; MUNDAY, B.L.; WHITTINGTON, R.J. Comparison of passive and active immunization of fish against streptococcosis (enterococcosis). **Journal of Fish Diseases**, v.19, n.3, p. 251-258, 1996.
- BEVERIDGE, M.C.M.; BAIRD, D.J. **Feeding mechanism and feeding ecology**. In BEVERIDGE, M.C.M.; MCANDREW B.J. Eds, Tilapias: Their biology and exploitation. London: Chapman and Hall. 1998. p. 505.
- BRASIL, Ministério da pesca e aquicultura. **Consumo de pescado no Brasil aumenta 23,7% em dois anos**. 2013a. Disponível em:<http://www.mpa.gov.br/index.php/imprensa/noticias/2226-consumo-de-pescado-no-brasil-aumenta-237-em-dois-anos>. Acesso em: 10 fevereiro. 2014.
- BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2011**. 2013b Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20MPA%202011FINAL.pdf>. Acesso em: 18 out 2013.
- BROMAGE, E.; THOMAS, A.; OWENS, L. *Streptococcus iniae*, a bacterial infection in barramundi *Lates calcarifer*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 36: 177-181, 1999.
- CHANG, P. H.; PLUMB, J. A. Effects of salinity on *Streptococcus* infection of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Journal of Applied Aquaculture**. v. 6, n. 1, p. 39-45, 1996.
- ELDAR, A.; BEJERANO, Y.; LIVOFF, A.; HOROVITCZ, A.; BERCOVIER, H. Experimental streptococcal meningo-encephalitis in cultured fish. **Veterinary Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 33–40, 1995.
- EVANS, J.J.; KLESIUS, P.H.; GILBERT, P.M. Characterization of b-hemolytic group B *Streptococcus agalactiae* in culture sea bream (*Sparus auratus*) (L.), and wild mullet (*Liza klunzingeri*), in Kuwait. **Journal of Fish Diseases**, v. 25, n. 3, p. 505-513, 2002.
- EVANS, J.J.; KLESIUS, P.H.; SHOEMAKER, C.A. An overview of *Streptococcus* in warmwater fish. **Aquaculture Health International**, v. 7, p. 10–4, 2006.
- FIGUEIREDO, H. C. P. Estreptococose em tilápia do Nilo - parte 1. **Panorama da Aqüicultura**, v. 19, n. 103, 2007.

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

FIGUEIREDO, H.C.P.; LEAL, C.A.G. Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 8-14, 2008.

HINEY, M.P.; SMITH, P.R. Validation of polymerase chain reaction-based techniques for proxy detection of bacterial fish pathogens: framework, problems and possible solutions for environmental applications. **Aquaculture**, v.162, p. 41-68. 1998.

ITSARO, A.; SUANYUK. N.; TANTIKITTI. C. Multiplex PCR for simultaneous detection of *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus iniae* and *Lactococcus garvieae*: a case of *S. agalactiae* infection in cultured Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and red tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis mossambicus*). Songklanakarin. **Journal of Science and Technology**, v. 34, n. 5, p. 495-500, 2012.

JAFAR, Q. A.; AL-ZINKI, S.; AL-MOUQATI S.; AL-AMAD S.; AL-MARZOUK A.; AL-SHARIFI F. Molecular investigation of *Streptococcus agalactiae* isolates from environmental samples and fish specimens during a massive fish kill in Kuwait Bay. **African Journal of Microbiology Research**, v.3, n. 21, p.022-026, 2009.

KITAO, T., AOKI, T., IWATA, K. **Epidemiological study on streptococciosis of cultured yellowtail (*Seriola quinquiradiata*) 1. Distribution of *Streptococcus* sp.** in sea water and muds around yellowtail farm. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 45, 1979. p.567-572.

KITAO, T. Streptococcal infections. In: INGLIS, V.;ROBERTS, R. J.; BROMAGE, N. R. **Bacterial Diseases of Fish**. Oxford: Blackwell, 1993. p. 196-210.

KLESZIUS, P. H.; EVANS, JOYCE, J.; SHOEMAKER, C. A. Warmwater fish vaccinology in catfish production. **Animal Health Research**, v. 5, n. 2, p. 305-311, 2004.

Li, Y. W., Liu, L., Huang, P. R., Fang, W., Luo, Z. P., Peng, H. L., Wang, Y. X. and Li, A. X. Chronic streptococcosis in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), caused by *Streptococcus agalactiae*. **Journal of Fish Diseases**, p. 1-7, 2013.

LIGHTNER, D.V.; REDMAN, R.M. Shrimp diseases and current diagnostic methods. **Aquaculture**, v. 164, n. 1-4, p. 201-220, 1998.

MARTINEZ, G.; HAREL, J.; GOTTSCHALK, M. Specific detection by PCR of *Streptococcus agalactiae* in milk. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 65, n. 1, p. 68-72, 2001.

MARTINS, P.C.C. **Cultivo de camarões marinhos** in SILVA-SOUZA, Ângela Teresa. Sanidade de organismos aquáticos no Brasil. Maringá: ABRAPOA, 2006. p. 127.

MCGEACHIN, R.B., ROBINSON, E.H. AND NEILL, W.H. Effect of feeding high levels of andro- gens on the sex ratio of *Oreochromis aureus*. **Aquaculture**, V. 61, n. 3–4, p. 317–321, 1987.

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

MINAMI, T.; NAKAMURA, M.; IKEDA, Y.; OAKI, H. A beta-hemolytic *Streptococcus* isolated from cultured yellowtail. **Fish Pathology**, v. 14, p. 15-19, 1979.

MURRAY, A.G.; HALL M. MUNRO, L. A.; WALLACE I.S. Modelling control options for a disease with hidden sub- clinical infection: bacterial kidney disease in Scottish aquaculture, 2011, Australia, **19th International Congress on Modelling and Simulation**, 2011. p.12–16.

NANDLAL, S.; PICKERING, T. **Tilapia fish farming in Pacific Island countries**. Vol 1. New Caledonia: Tilapia Hatchery Operation, Secretariat of the Pacific Community, 2004. 41p.

OIE. World Organisation for Animal Health. **Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals**. 2012. Disponível em: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/0.01_INTRODUCTION.pdf. acesso em: 10 jan 2014.

PASNIK, D.J.; EVANS, J.J.; PANANGALA, V.S.; KLESIOUS, P.H.; SHELBY, R.A.; SHOEMAKER, C.A. Antigenicity of *Streptococcus agalactiae* extracellular products and vaccine efficacy. **Journal of fish diseases**, v.28, p.205-212, 2005.

PERERA, R. P.; JOHNSON, S. K.; LEWIS, D.H. Epizootiological aspects of *Streptococcus iniae* affecting tilapia in Texas. **Aquaculture**, v. 152, p. 25-33, 1997.

PEREZ, A. C. 1999. Empreendimentos piscícolas e o médico veterinário. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, n 2, 43-65.

PLUMB, J. A. Infections diseases of tilapia. In: COSTA–PIERCE, B.A.; RAKOCY, J.E. **Tilapia aquaculture in the Americas**, Baton Rouge: World Aquaculture Society, p. 212-218, 1997.

PRETTO-GIORDANO, L.G.; MÜLLER, E.E.; FREITAS, J.C.D.; SILVA, V.G. Evaluation on the pathogenesis of *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 1, p. 87-92, 2010.

ROBERTS, R. J.; SOMMERVILLE, C. Disease of tilapias. In: PULLIN, S. V.; LOWE-MAC CONNELL, R. H. (Ed.). **Biology and culture of tilapias**. Manilla: International Center for Living Aquatic Resources Management, 1982. p.247-263.

ROMALDE, J.L.; SILVA, R.; RIAZA, A.; TORANZO, A.E. Long-lasting protection against turbot streptococcosis obtained with a toxoid-enriched bacterin. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathology*. v. 16 (1996), p. 169–171, 1996.

SALVADOR, R. MÜLLER, E.E.; FREITAS, J.C.; LEONHARDT, J.H.; PRETTO-GIORDANO, L.G.; DIAS, J.A. Isolation and characterization of *Streptococcus* spp. group B in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in hapas nets and earth nurseries in the northern region of Parana State, Brazil. *Ciência Rural*, v. 35, n. 6, p. 1374-1378, 2005.

SALVADOR, R. MÜLLER, E.E.; LEONHARDT, J.H.; PRETTO-GIORDANO, L.G.; DIAS, J.A.; FREITAS, J.C.; MORENO, A.M. Isolamento de *Streptococcus* spp. de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e qualidade da água de tanques rede na Região Norte do Estado do Paraná, Brasil. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 24, n.1, p. 35-42, 2003.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, 2. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, v. 1, 1989. 2028 p.

SHOEMAKER, C. A.; EVANS, J. J.; KLESIOUS, P. H. Density and dose: factors affecting mortality of *Streptococcus iniae* infected tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, v. 188, n. 3-4, p. 229-235, 2000.

SHOEMAKER, C.; KLESIOUS, P. Streptococcal disease problems and control: a review. *Tilapia Aquaculture*, v. 2, n.1, p. 671-680, 1997.

SHOEMAKER, C.A., KLESIOUS, P.H., EVANS, J.J. Prevalence of *Streptococcus iniae* in tilapia, hybrid striped bass, and channel catfish on commercial fish farms in the United States. *American Journal of Veterinary Research*, v. 62, n.2, p. 174 – 177, 2001.

SIDÔNIO, L.; CAVALCANTI, I.; CAPANEMA, L.; MORCH, R.; MAGALHÃES, G.; LIMA, J.; BURNS, V.; ALVES JÚNIOR, A.J.; MUNGIOLI, R. Panorama da aquicultura no Brasil: desafios e oportunidades. *BNDES Setorial*, n. 35, p. 204, 2012.

SOUZA, Gabriel Marcos De. **Deteção molecular de *Streptococcus agalactiae* em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2012. 56 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

STOSKOPF, M.K. *Fish medicine*. 9th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co., 1993.

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

SURESH, A. V. Tilapia update 1998. *World Aquaculture*, v. 30, p. 8-68, 1999.

- TORANZO, A. E.; MAGARIÑOS, B.; ROMALDE, J. L. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. **Aquaculture**, v. 246, n. 1-4, p. 37-61, 2005.
- TORANZO, A.; NOVOA, B.; BAYA, A.; HETRICK, F.; BARJA, J.; FIGUERAS, A. Histopathology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), and striped bass, *Morone saxatilis* (Walbaum), experimentally infected with *Carnobacterium piscicola*. **Journal of Fish Diseases**, v. 16, p. 261-267, 1993.
- YANG, S.; ROTHMAN, R. E. Review: PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. **The Lancet Infectious Diseases** v.4, p 337–48, 2004.
- ZLOTKIN, A.; ELDAR, A., GHITTINO, C. BERCOVIER H. Identification of *Lactococcus garvieae* by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36 n. 4, p. 983-985, 1998.