



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LETICIA CARANDINA

**UTILIZAÇÃO DA IMUNIZAÇÃO PASSIVA COM
ANTICORPOS ANTISTREPTOCOCCUS
AGALACTIAE NA PROTEÇÃO DE TILÁPIAS DO NILO
(*Oreochromis niloticus*)**

Londrina
2013

LETICIA CARANDINA

**UTILIZAÇÃO DA IMUNIZAÇÃO PASSIVA COM
ANTICORPOS ANTISTREPTOCOCCUS
AGALACTIAE NA PROTEÇÃO DE TILÁPIAS DO NILO
(*Oreochromis niloticus*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós –
Graduação (nível: Mestrado) em Ciência Animal da
Universidade Estadual de Londrina, como requisito
parcial para obtenção de título de mestre em Ciência
Animal.

Orientador: Prof. Dr. Julio Cesar de Freitas.

Londrina
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca
Central da Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

C261u Carandina, Letícia
Utilização da imunização passiva com anticorpos anti-*Streptococcus agalactiae* na proteção das tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) / Letícia Carandina. – Londrina, 2013.
45 f.: il.

Orientador: Júlio Cesar de Freitas
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2013.

Inclui bibliografia.

1. Tilápia (Peixe) – Doenças. 2. Estreptococo. 3. Peixe – Imunologia. 4. Imunoglobulinas. I. Freitas, Júlio Cesar de. II. Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 619:597.583.4

LETICIA CARANDINA

**UTILIZAÇÃO DA IMUNIZAÇÃO PASSIVA COM ANTICORPOS
ANTISTREPTOCOCCUS
AGALACTIAE NA PROTEÇÃO DE TILÁPIAS DO NILO
(*Oreochromis niloticus*)**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Ciência Animal (área de concentração Sanidade Animal) da Universidade Estadual de Londrina.

BANCA EXAMINADORA

Prof. orientador Dr. Julio Cesar de Freitas
UEL – Londrina –PR

Prof. Dr. João Luis Garcia
UEL – Londrina –PR

Prof. Dr. Wagner Loyola
EMBRAPA – Londrina – PR

Londrina, 28 de fevereiro de 2013.

O presente trabalho foi realizado no Centro de Ciências Agrárias, Laboratório de Imunopatologia de Peixes, Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP), Bandeirantes, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, sob a orientação do Prof. Dr. Julio Cesar de Freitas.

Os recursos financeiros para o desenvolvimento do projeto foram obtidos junto à agência e órgão de fomento à pesquisa abaixo relacionado:

1. CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Aos meus irmãos, os gêmeos **Ivo e Ivan**, pelo imenso amor fraternal.

Ao **Marco**, exemplo de profissional, homem e marido, mas acima de tudo, meu melhor
amigo.
Obrigada, sempre!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me presentear com a vida e me permitir ser o instrumento de Sua vontade;

Ao Prof. Dr. Rogério Salvador, a quem admiro muito, por me acompanhar desde a graduação e por todo o esforço e colaboração para que eu pudesse realizar o mestrado;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Julio Cesar de Freitas, por sempre depositar sua confiança em mim e pela ajuda concreta na finalização deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Wagner Loyola, por ter participado desta jornada, pelo carinho, amizade, bom-humor e ajuda fundamental;

Ao Prof. Dr. João Luis Garcia, pelas sugestões e por ter aceitado, gentilmente, participar da minha banca;

À Prof. Dra. Claudia Yurica Tamehiro, pelas sugestões e ajuda nos momentos difíceis;

À minha mãe, exemplo de mulher, por sempre acreditar em mim. A ela, minha admiração;

Ao meu pai, pelo carinho e preocupação;

As minhas avós, Jandira e Arlete, e a minha tia avó, Júlia, que estiveram sempre em meu coração, pelas bênçãos e infinitas horas de oração intercedendo por mim perante a Deus; por me fazerem acreditar e por dedicarem a mim todo o amor que há dentro delas;

Aos tios Euvaldo e João Batista (Bambú) e a tia Bia, por serem tão presentes em minha vida e estarem sempre dispostos a me ajudar;

Ao meu padrinho, Itamar, pela ajuda incontestável e por sempre deixar explícito o seu amor e admiração por mim;

A minha madrinha, Cristina, por me manter na fé cristã, pelas orações, carinho e ternura que nunca me deixou faltar;

A minha cunhada, Fernanda, por sempre me receber com carinho, ouvir minhas dúvidas e fazer meu irmão feliz;

À estimada família do meu marido, e agora também minha, pela torcida e palavras de ajuda. Aos tios, tias e primos que tive a felicidade de ganhar;

Ao Paulo e Silas, pela grande amizade que construímos e soubemos manter. Sem vocês, este trabalho não teria sido possível, obrigada por partilhar das tristezas, alegrias e infinitas horas de trabalho no laboratório;

Aos colegas do Laboratório de Imunopatologia de Peixes (LIPPE), Fausto, Maicon, Dayanne, Hilário e Isabela, pelo companheirismo nos laboriosos dias de experimento;

As amigas Geovana e Ana Beatriz, por estarem sempre ao meu lado e pela profunda e sincera amizade que soubemos construir;

À Fernanda e Geissiane, pela ajuda e por sempre me receberem com muito carinho em sua casa e tornarem meus dias mais alegres;

À Suellen, pela amizade desde a graduação e por me receber carinhosamente em sua casa em Londrina em todos os momentos que precisei;

À Priscilla e Karina, pela amizade, conversas e ajuda nos momentos em que eu estive distante;

Aos produtores de tilápias do Norte do Paraná, pela atenção e fornecimento dos peixes para que este trabalho se tornasse possível;

Ao meu adorável cão, Yvves, por me oferecer todo o amor que ele sabe dar e me permitir ser sua dona;

Aos animais que participaram com o que eles tinham de melhor: eles mesmos;

A todos os professores e funcionários da Universidade Estadual de Londrina (UEL), pela contribuição na minha formação profissional.

CARANDINA, Letícia. **Utilização da imunização passiva com anticorpos anti-*Streptococcus agalactiae* na proteção de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2013. 45f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal- área de concentração em Sanidade Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2013.

RESUMO

A piscicultura é uma atividade em amplo crescimento em todo mundo. O Brasil destaca-se nesta atividade pelo seu vasto território e condições climáticas favoráveis para o cultivo de peixes. A tilápia é uma das principais espécies cultivadas no Brasil, pois apresenta diversas qualidades, o que estimula o desenvolvimento de sistemas intensivo de criação, caracterizado por altas densidades de estocagem e práticas de manejo constantes, causando estresse aos peixes e propiciando o desenvolvimento de doenças. As maiores perdas econômicas na criação de tilápias são causadas por doenças de origem bacteriana, entre elas a estreptococose, tendo como principal forma de tratamento, o uso de antimicrobianos. Entretanto, o uso indevido destes quimioterápicos pode levar a seleção de bactérias resistentes, além do impacto ambiental pela contaminação de corpos hídricos. Métodos profiláticos tornam-se uma importante ferramenta para o controle da estreptococose e surgem como alternativa ao uso dos antimicrobianos. Diferentes vacinas inativadas foram desenvolvidas para uso comercial em diversos países, incluindo o Brasil, com a utilização de uma vacina contra *Streptococcus agalactiae*. Além das vacinas, estudos sobre a imunização passiva estão sendo realizados e vem demonstrando eficiência na proteção contra diferentes bactérias. O objetivo deste trabalho foi avaliar a transferência passiva de anticorpos anti- *S. agalactiae* em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Para isto, 36 tilápias foram distribuídas em quatro aquários, sendo dois para o grupo controle e dois para inoculação intraperitoneal (i.p.) da DL 50 para produção de anticorpos anti- *S. agalactiae*. No 21° e 28° dia foi coletado sangue para obtenção do soro hiperimune utilizado na transferência passiva. Em seguida, 30 tilápias foram distribuídas em três aquários e submetidas a três tratamentos (GI: controle; GII: imunizada i.p. com o soro hiperimune- inativado; GIII: imunizada i.p. com o soro hiperimune não-inativado). Após 48 horas e sete, 14, 21, 28 e 35 dias foram realizadas coletas de sangue para titulação de anticorpos anti- *S. agalactiae* utilizando o teste de aglutinação direta. Para avaliar a sobrevivência outras 30 tilápias foram distribuídas em três aquários e submetidas a três tratamentos (GI: controle; GII: imunizada i.p. com o soro hiperimune- inativado; GIII: imunizada i.p. com o soro hiperimune não-inativado). Após 48 horas da inoculação, as tilápias foram desafiadas i.p. com *S. agalactiae* e monitoradas duas vezes ao dia, por um período de 35 dias, para acompanhar a mortalidade. Os resultados deste trabalho mostraram que os títulos séricos de anticorpos foram detectados pela aglutinação direta até o 21° dia pós-transferência passiva, e neste mesmo período houve uma proteção de 80% entre os grupos imunizados com soro- inativado e soro não-inativado contendo anticorpos anti-*S. agalactiae*, após desafio com *S. agalactiae*. Ao final do experimento, o grupos soroinativado e soro não- inativado apresentaram 60 e 80% de proteção, respectivamente, enquanto que no grupo controle a mortalidade foi de 100%.

Palavras-chave: Estreptococose. Imunidade. Peixes. Imunoglobulina. Soro.

CARANDINA, Letícia. **Use of passive immunization with anti-*Streptococcus agalactiae* antibodies in protection of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)**. 2013. 45f. Dissertation (Master Degree in Animal Science – concentration area in Animal Sanity) - State University of Londrina, Londrina 2013.

ABSTRACT

Pisciculture is an activity in broad growth in the world and Brazil stands for it wide territory and favorable weather conditions for fish farming. Tilapia is one of the major cultivates species in Brazil for showing several qualities, stimulating the development of intensive growth systems, characterized by high densities of storage and constantly handling causing stress to fishes leading to occurrence of diseases. The biggest economic losses in tilapia farming are cause for bacterial diseases like streptococcosis, which is mostly treated using antimicrobials. However, the undue use of chemotherapics leads to development of resistant bacteria besides the environmental impact through water contamination. Prophylactic methods become an important tool for controlling streptococcosis and rises as an alternative to the use of antimicrobials. Different inactivated vaccines were developed for commercial use in several countries, including Brazil with the use of a vaccine against *Streptococcus agalactiae*. Beyond vaccines, studies about passive immunization are being realized and have demonstrated efficiency in protection against different bacteria. The aim of this work was to evaluate the passive transference of anti-*S. agalactiae* antibodies in Nile tilapias (*Oreochromis niloticus*). For this, 36 tilapias were distributed in four aquariums, two for the control group and two for the group intraperitoneally inoculated (i.p.) with the DL 50 for anti-*S. agalactiae* antibodies production. On the 21^o and 28^o day blood was collected for the obtainment of hiperimmune serum used in passive transference. Then, 30 tilapias were distributed in three aquariums and submitted to three treatments (GI: control; GII: i.p. immunized with inactivated- hiperimmune serum; GIII: i.p. immunized with noninactivated hiperimmune serum). After 48 hours and seven, 14, 21, 28 and 35 days there were realized blood collections for anti-*S. agalactiae* antibodies titration using the direct agglutination test. For survival evaluation 30 others tilapias were distributed in three aquariums and submitted to three treatments (GI: control; GII: i.p. immunized with inactivated- hiperimmune serum; GIII: i.p. immunized with non- inactivated hiperimmune serum). After 48 hours of inoculation tilapias were i.p. challenged with *S. agalactiae* and monitored twice a day for a 35 days period to following the mortality. The results showed that serum titers where detected by direct agglutination until the 21th day after passive transference and during the same period the protection between the groups immunized with inactivated serum and non- inactivated serum contending anti-*S. agalactiae* antibodies was of 80% after challenge with *S. agalactiae*. At the end of the experiment, the inactivated serum and non- inactivated serum groups showed 60 and 80% of protection, respectively, while in the control group the mortality was of 100%.

Key words: Streptococcosis. Immunity. Fishes. Immunoglobulin. Serum.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Média dos títulos séricos (Log2) de anticorpos anti-*Streptococcus agalactiae* produzidos em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) após duas inoculações com 14 dias de intervalo da DL 50 (1×10^8 UFC/mL) de *S. agalactiae* 39
- Figura 2** – Média dos títulos séricos (Log2) de anticorpos anti-*Streptococcus agalactiae* em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), inoculadas com soro- inativado e soro não- inativado contendo anticorpos anti- *S. agalactiae* 39
- Figura 3** – Porcentagem relativa de sobrevivência em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) inoculadas com soro- inativado e soro não- inativado contendo anticorpos anti-*Streptococcus agalactiae* e desafiadas 48 horas após com DL 50 (1×10^8 UFC/mL) de *S. agalactiae*..... 40

SUMÁRIO

1 REVISÃO DE LITERATURA	12
RESUMO	12
ABSTRACT	12
1.1 – Estreptococose em Peixes	13
REFERÊNCIAS	21
2 OBJETIVOS	27
2.1 – OBJETIVO GERAL	27
2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	28
Utilização da Imunização Passiva com Anticorpos Antistreptococcus Agalactiae na Proteção de Tilápias do Nilo (<i>Oreochromis Niloticus</i>)	28
Resumo	28
Abstract	28
Introdução	29
Material e Métodos	30
Local e Acondicionamento dos Peixes	30
Controle da Qualidade da Água	31
Anestesia e Coleta de Sangue	31
Preparação do <i>S. agalactiae</i> para Determinação da DL 50	31
Produção de Soro Hiperimune	32
Titulação de Anticorpos Séricos	32
Inoculação de Anticorpos Anti-<i>S. agalactiae</i>	33
Desafio Bacteriano e Sobrevivência	33
Análise Estatística	34
Resultados	34
Discussão	34
Conclusões	36
Referências	36

4 CONCLUSÕES.....	41
ANEXO	42
ANEXO A – Normas para Publicação	43

1 REVISÃO DE LITERATURA

RESUMO

A piscicultura é um dos segmentos da aquicultura que mais cresce no mundo e no Brasil, esta atividade apresenta potencial para expansão devido ao seu vasto território e condições climáticas favoráveis. Dentre as espécies de peixes, a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) se tornou a espécie mais cultivada no Brasil principalmente em sistemas intensivos de criação, porém este tipo de cultivo torna os peixes mais susceptíveis a doenças infecciosas, entre elas a estreptococose, considerada uma das mais importantes enfermidades na aquicultura. A alta densidade de estocagem gera alterações na qualidade da água e pode gerar estresse aos peixes predispondo-os a infecção. Os principais sinais clínicos da estreptococose são anorexia, letargia, natação errática e escurecimento da pele, além de grave septicemia. O tratamento da estreptococose é realizado pelo uso de antibióticos, entretanto seu uso de forma indevida pode acarretar no desenvolvimento de estirpes resistentes e grande impacto ambiental. A vacinação surge como uma alternativa na prevenção de infecções e seu uso pode reduzir consideravelmente a morbidade e mortalidade nos peixes. A maioria das vacinas são administradas por via oral, imersão ou inoculação intraperitoneal (i.p.), sendo esta última, a mais eficaz. Diversos estudos relatam a eficiência da vacinação, porém apresenta desvantagens como o alto custo e não ser adequada para peixes jovens. Trabalhos sobre imunização passiva com anticorpos específicos contra diferentes espécies de estreptococos demonstraram eficiência na proteção de peixes após desafio bacteriano. No mundo, diversas vacinas comerciais inativadas já são utilizadas e no Brasil está disponível comercialmente uma vacina inativada administrada via i.p. em tilápias (*O. niloticus*) contra *Streptococcus agalactiae*.

Palavras-Chave: Estreptococose. Imunidade. Peixes. Imunoglobulina. Soro.

ABSTRACT

Pisciculture is one of the segments in aquaculture with more growth in the world and in Brazil this activity presents great potential for expansion due it wide territory and favorable weather conditions. Among the species of fishes, Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) became the most cultivated in Brazil majorly in intensive growth system, however this kind of growth makes fishes more susceptible to infectious diseases like streptococcosis, considered one of the most important disease in aquaculture. The high density of storage causes alterations in water quality stressing and predisposing fishes to infections. The major clinical signs of streptococcosis are anorexia, lethargy, spin swimming and skin darkening, besides severe septicemia. The treatment of streptococcosis is realized through the use of antibiotics, however using it wrongly can result in resistant bacteria and huge environmental impact. Vaccination rises as an alternative to prevent infections and its use can reduce morbidity and mortality in fishes. Most of vaccines are administrated by oral via, immersion or intraperitoneal inoculation (i.p.), being that the most effective. Several studies review the efficiency of vaccination but it presents disadvantages like high cost and is not adequate for youth fishes. Papers about passive immunization with specifics antibodies against different species of streptococcus showed efficiency in protection of fishes after bacterial challenge. In

the world several commercial inactivated vaccines are used and in Brazil is commercially available an inactivated vaccine administrated i.p. in Nile tilapias (*O. niloticus*) against *Streptococcus agalactiae*.

Keywords: Streptococcosis. Immunity. Fishes. Immunoglobulin. Serum.

1.1 – ESTREPTOCOCOSE EM PEIXES

A aquicultura, especialmente a piscicultura, é um dos segmentos da produção animal que mais cresce no Brasil e no mundo, sendo importante em praticamente todos os continentes (CONTE, 2004). Em 2006, a produção mundial de pescados, destinada ao consumo humano, foi de 106 milhões de toneladas. Desse total, 43% (45,5 milhões de toneladas) corresponderam à aquicultura. Globalmente, pescados e aquicultura suportam a subsistência de aproximadamente 540 milhões de pessoas (FAO, 2009; 2010).

O Brasil se insere no contexto mundial como um dos países com grande potencial para a piscicultura, pois além de possuir um vasto território, suas condições climáticas favorecem o cultivo de peixes de água doce (KUBITZA, 1999). Dentre os peixes que apresentam potencial para criação em tanques-rede, a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), se tornou a espécie mais cultivada no Brasil, sendo responsável por aproximadamente 40% do volume da aquicultura nacional. Esta espécie está entre aquelas que possuem características desejáveis por terem boa aceitação, elevado valor comercial, excelente conversão alimentar e custos de produção relativamente baixos (ZIMMERMANN; HASPER, 2003).

Em 2009, a produção de tilápias no Brasil foi de 132.957,8 toneladas, sendo a Bahia e Ceará no Nordeste, São Paulo no Sudeste e Paraná no Sul, os principais polos de produção (ANUALPEC, 2011). Neste mesmo ano, o Paraná contribuiu com 27.044 toneladas, correspondendo a 20,3% da produção total de tilápias (PARANÁ, 2011).

Plumb (1997) declarou que com a criação de tilápia em sistemas intensivos, os aspectos sanitários tornaram-se um problema para os piscicultores. A alta densidade de estocagem, conseqüentemente, arrazoamento intensivo, com diminuição da qualidade da água devido à diminuição de oxigênio, aumento de amônia, nitrito e gás carbônico, levam a uma situação de estresse para os peixes, favorecendo enfermidades infecciosas e parasitárias (PLUMB, 1997; SURESH, 1998).

Perez (1999) afirmou que o crescimento, muitas vezes, desordenado da atividade foi acompanhado de um descontrole sanitário, o que colaborou com a produção de

pescado com qualidade duvidosa e alta taxa de mortalidade, decorrente principalmente de doenças bacterianas.

Entre as enfermidades infecciosas em peixes, destacam-se as bacterioses causadas por *Streptococcus* spp. (WU, 1970), *Aeromonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Vibrio* sp., *Flavobacterium columnare*, *Edwardsiella* sp. (ROBERTS; SOMMERVILLE, 1982).

A estreptococose em peixes foi relatada pela primeira vez em 1957, em truta arco íris no Japão, por Hoshina et al. (1958) e desde então, esta enfermidade têm sido descrita em outras espécies (INGLIS et al., 1993), devendo ser considerada como um complexo de doenças similares causadas por diferentes gêneros e espécies capazes de lesar o sistema nervoso central (TORANZO et al., 2005). A septicemia causada por *Streptococcus* spp. é um importante problema sanitário em sistemas de criação intensiva de tilápia (*Oreochromis* spp.) (SURESH, 1998).

Os estreptococos têm sido identificados como sendo o principal agente de infecções bacterianas em peixes, responsável por elevados prejuízos, no Japão (KITAO et al., 1981), Taiwan (MING-CHEN et al., 1985), Israel (HUBERT, 1989), Arábia Saudita (AL-HARBI, 1994), Estados Unidos e América Central (PLUMB, 1997) e no Brasil (SALVADOR et al., 2003; 2005; FIGUEIREDO et al., 2006).

Várias espécies de estreptococos foram descritas como causadora de doenças em peixes como *S. faecium* (KUSUDA et al., 1976; MINAMI et al., 1979), *S. equisimilis* (MINAMI et al., 1979), *S. equi*, *S. pyogenes*, *S. zooepidemicus* (UGAJIN, 1981) e *S. dysgalactiae* (NOMOTO et al., 2004). Em tilápias, o primeiro relato de isolamento de *Streptococcus* spp. foi descrito por Wu (1970), e atualmente, o *S. iniae*, isolado de abscessos subcutâneos de golfinhos (*Inia geoffrensis*) de água doce na Amazônia, (PIÉR; MADIN, 1976) e o *S. agalactiae* (KUSUDA; KOMATSU, 1978) são considerados os mais importantes patógenos de tilápia (SHOEMAKER; KLESIUS, 1997).

Eldar et al. (1994) examinando tilápia e truta com meningoencefalite descreveram duas novas espécies de estreptococos, uma delas não hemolítica e a outra alfa hemolítica, denominadas, respectivamente, *S. difficile* e *S. shiloi*. Posteriormente, Eldar et al. (1995) determinaram homologia genotípica de 70,0% a 100,0% entre as cepas de *S. iniae* e *S. shiloi*, sugerindo que *S. shiloi* poderia ser considerado sinônimo do *S. iniae*. Bunch e Bejerano (1997) observaram que em criações de tilápia do Nilo em baixas temperaturas (15,0°C a 16,0°C) predominava o *S. iniae* e em temperaturas mais altas (26,0°C a 28,0°C) o *S. difficile*.

O *S. iniae* foi isolado de diversas espécies de peixes em várias partes do mundo (KITAO et al., 1981; OHNISHI; JO, 1981; UGAJIN, 1981; KAWAHARA; KUSUDA, 1987; SAKAI et al., 1989), sendo considerado o mais importante patógeno na criação de tilápias pela American Tilapia Association (1998). Vários autores apontaram o *S. iniae*, entre o gênero estreptococos, como um dos agentes mais frequentes em tilápia (PERERA; JOHNSON, 1994; ELDAR et al., 1995; BOWSER et al., 1998; EVANS et al., 2000).

Evans et al. (2006) afirmaram existir mais de 50 espécies em 29 famílias de peixes de água doce, estuarina e marinha, sensíveis ao *S. iniae* e *S. agalactiae*, mostrando facilidade de adaptação desses agentes a diferentes hospedeiros.

No Brasil, o primeiro isolamento de *S. difficile* identificado por homologia de perfil bioquímico com a cepa referência (ND 2-22), foi realizado por Salvador et al. (2005), a partir de tilápia do Nilo com sinais neurológicos (meningoencefalite), criadas em sistema intensivo na região norte do estado do Paraná.

Vandamme et al. (1997) observaram que o *S. difficile* apresentava o antígeno capsular Ib e proteína celular indistinguível do *S. agalactiae*. Berridge et al. (2001) também verificaram homologia significativa (97,7%) na sequência de ácidos nucléicos, entre o 16S-23S rDNA, do *S. difficile* e *S. agalactiae*. Kawamura et al. (2005) por meio de técnicas de biologia molecular sugeriram que *S. difficile* é sinônimo de *S. agalactiae*.

Os estreptococos são bactérias oportunistas amplamente distribuídas no ambiente aquático e sua patogenicidade está associada às condições de estresse relacionadas à qualidade da água e condições de criação intensiva (BUNCH; BEJERANO, 1997). As características físicas e químicas da água estão diretamente relacionadas, sendo que a mudança de um parâmetro interfere com o outro, podendo acarretar problemas na criação primária (fitoplâncton), secundária (zooplâncton) e finalmente nos peixes (CASTAGNOLLI, 1992). Baixas concentrações de oxigênio dissolvido, níveis tóxicos de amônia e nitrito, mudanças bruscas de temperatura, alcalinidade total, pH, transparência da água e dureza total, são algumas das características de água responsáveis pela ocorrência de mortalidade durante o cultivo (ALABASTER; LLOYD, 1982; MCGEACHIN, 1987; PÁDUA, 1993; FERNANDES; RANTIN, 1994).

Shoemaker et al. (2000) observaram em infecção experimental com *S. iniae* um aumento da taxa de mortalidade das tilápias submetidas à alta densidade de estocagem, devido a maiores quantidades de ração e conseqüente redução da disponibilidade de oxigênio dissolvido e qualidade da água.

Kitao et al. (1979) descreveram a presença de elevado número de estreptococos na água e em sedimentos de piscicultura durante os meses de verão, enquanto que este número diminuiu durante o outono e inverno. Perera et al. (1997) sugeriram que quando as condições ambientais são favoráveis, como grande quantidade de matéria orgânica, o meio aquático torna-se fonte permanente de estreptococos, permitindo a multiplicação deste microrganismo e consequente surto nos peixes.

O aumento da densidade de estocagem determina maior ocorrência de abrasões de pele, consequentemente uma importante via de infecção (CLARK et al., 2000), pois a ausência de muco sobre a pele constitui-se em porta de entrada para patógenos obrigatórios ou oportunistas (PLUMB, 1997). Chang e Plumb (1996) tiveram dificuldades em infectar tilápia com *Streptococcus* spp. antes que a pele sofresse injúria mecânica, enquanto Clark et al. (2000), trabalhando em tanques com altas densidades de estocagem, observaram maiores taxas de mortalidade de tilápia por *S. iniae*, provavelmente pela carga bacteriana mais elevada e maior contato direto entre os peixes.

Evans et al. (2000) demonstraram que a mucosa do órgão olfativo e em menor proporção, receptores da mucosa ocular, são pontos em que se pode processar o mecanismo de infecção com *S. iniae* em tilápia e robalo híbrido (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*) imersos em águas contendo o microrganismo. No robalo híbrido, o *S. iniae* pode invadir o epitélio dos filamentos branquiais, penetrar na corrente sanguínea e disseminar por todo o organismo, como nadadeiras, rins, coração e cérebro (EVANS et al., 2000; MCNULTY et al., 2003).

Minami (1979) considerou os peixes refugos como fonte de infecção de *Streptococcus* spp., enquanto Shoemaker et al. (2000) sugeriram que a ingestão de olhos e vísceras de peixes mortos, por peixes saudáveis, acarreta em infecção estreptocócica pela via oral e olfatória.

Segundo Rasheed e Plumb (1984) a introdução do *Streptococcus* spp. Diretamente no trato digestório, provavelmente não seja capaz de afetar populações de peixes saudáveis, porém se houver injúrias na parede do intestino e/ou estômago produzida por outras bactérias, produtos químicos ou poluentes da água, o agente pode então penetrar nestes locais e causar infecção.

Os peixes infectados por estreptococos podem apresentar anorexia e natação errática com movimentos giratórios, como consequência da meningite. Macroscopicamente, observasse o escurecimento da pele, exoftalmia uni ou bilateral, opacidade da córnea, pan-oftalmite aguda com perda da visão, hemorragias no opérculo e base das nadadeiras,

ulceração da epiderme à superfície do corpo e hemorragias cutâneas difusas ou petéquias. Outra consequência é a septicemia, observando-se ascite com líquido hemorrágico e esplenomegalia e no crânio, congestão difusa cerebral com líquido cefalorraquídeo hemorrágico (PLUMB, 1999; PAVANELLI et al., 2008).

Em muitas espécies de peixes os olhos são particularmente afetados, havendo edema e necrose do nervo óptico e coróide, hemorragias dos vasos da retina para o humor vítreo e necrose do cristalino. Nas brânquias, pode haver hiperemia e necrose dos vasos, provocando hemorragias massivas e morte. No fígado ocorrem áreas de necrose focal e no baço, a arquitetura do tecido hematopoiético é destruída, e a pericardite é frequente (PAVANELLI et al., 2008). Histologicamente ocorre severa inflamação granulomatosa, pnoftalmite, meningoencefalite, necrose e vacuolização dos hepatócitos (EVANS et al., 2000).

Um diagnóstico presumível da estreptococose é a presença de sinais clínicos característicos da doença e a demonstração da ocorrência de bactérias cocos Gram-positivas no cérebro, rim ou outros órgãos internos, porém o isolamento e subsequente verificação das características sorológicas das bactérias permite a confirmação do diagnóstico (PAVANELLI et al., 2008). Para o diagnóstico laboratorial, os peixes doentes devem ser coletados e encaminhados preferentemente vivos, além de fragmentos renais e cerebrais para a realização de exames histológicos e bacteriológicos (KUBITZA, 2000; FIGUEIREDO et al., 2007a; FIGUEIREDO et al., 2009).

Diferentemente dos mamíferos, o sistema imune adquirido dos peixes é subdividido em resposta imune humoral e celular, envolvendo os órgãos e tecidos linfóides (primários e secundários), células apresentadoras de antígeno (APCs), linfócitos T e B, imunoglobulinas e 22 moléculas do sistema complemento. A resposta imune humoral dos peixes diferencia-se dos vertebrados superiores por não apresentar a produção de anticorpos de classe IgG na resposta imune humoral secundária, apresentando a imunoglobulina IgM como principal anticorpo da resposta imune humoral primária e secundária (WATTS et al., 2001).

Shoemaker e Klesius (1997) relataram dificuldades na utilização de antibióticos para as infecções por *Streptococcus* spp., pois o patógeno pode sobreviver no interior de macrófagos onde as drogas antimicrobianas não os alcançam em concentrações efetivas. Nesta situação, apenas os sinais clínicos são eliminados, havendo possibilidade de ocorrer o desenvolvimento de estirpes bacterianas resistentes (NAKANISHI et al., 2002).

A expansão da aquicultura tem por consequência o aumento da utilização de produtos químicos para o controle de parasitos e bactérias (RIGOS et al., 2005). Evans et al. (2002) relataram que o *S. agalactiae* isolado de peixes naturalmente infectados foi sensível a oxitetraciclina, ampicilina, ciprofloxacina, amoxicilina com ácido clavulônico, cloranfenicol, rifampicina e sulfa com trimetoprim, em ordem decrescente de sensibilidade e resistentes a gentamicina e estreptomicina. No Brasil, Figueiredo et al. (2006) verificaram que o *S. agalactiae* isolado de tilápias naturalmente infectadas, foram sensíveis a amoxicilina, cloranfenicol, eritromicina, norfloxacina, tetraciclina, e a sulfonamida e resistentes ao ácido nalidíxico, gentamicina e neomicina. Akinyemi e Fajana (2011) isolaram *Streptococcus* spp da pele, cavidade bucal e brânquias de peixes apresentando sensibilidade aos antibióticos gentamicina, oflaxacin, sparfloxacina, cefuroxime, ciprofloxacina e caflazidime.

Segundo Rigos et al. (2005), os antibióticos mais utilizados na aquicultura para tratar infecções bacterianas, são a oxitetraciclina (OTC) e o florfenicol (FFC). A OTC tem amplo espectro de ação contra as bactérias de peixes (BARRAGY, 1994) e o FFC é caracterizado por alta biodisponibilidade em peixes, boa penetração nos tecidos e rápida eliminação (HORSBERG et al., 1996), sendo estas importantes características para uma substância utilizada no tratamento de animais produzidos para o consumo humano (CARRASCHI, 2010). Apesar da indicação da OTC, no Brasil, apenas o FFC tem autorização da Food and Drug Administration (FDA) para uso na aquicultura.

Os antibióticos podem ser administrados adicionados à ração ou em banhos de imersão, sendo que a utilização na alimentação é mais conveniente do que o tratamento diretamente na água, pois a quantidade necessária de antibiótico nesse tipo de tratamento é menor, assim como o resíduo gerado para o ambiente (FERREIRA et al., 2007).

Segundo Carraschi (2010), no Brasil há poucas informações sobre as concentrações de antibióticos e como devem ser administrados na produção aquícola, levando a utilização indevida em grandes quantidades. Ainda são escassas as informações sobre o monitoramento da concentração e do impacto ambiental nos corpos hídricos, especialmente, em relação à toxicidade aguda, risco de intoxicação das espécies de criação e possíveis efeitos adversos deste tratamento.

Na piscicultura a utilização de imunização por diferentes vias de aplicação é considerada uma alternativa ao uso de antimicrobianos (SACCHETINI et al., 2010), entretanto este método apresenta vantagens e desvantagens (GUDDING et al., 1999).

Koca et al. (2011) relataram o uso de probióticos na aquicultura como uma nova abordagem para tentar reduzir os impactos ecológicos causados pela antibioticoterapia,

devido a ação imunoestimulante dos probióticos, e segundo Romano e Mejía (2003), a vacinação surge como alternativa na prevenção de infecções. O primeiro relato sobre imunização de peixes é datado de 1930 (NYBELIN, 1935), mas somente na década de 70 ocorreu a intensificação das pesquisas e incentivo ao desenvolvimento de vacinas comerciais (NEWMAN, 1993). Gudding (1999) relatou que a prática da vacinação reduziu consideravelmente a morbidade e mortalidade dos peixes, acarretando uma menor utilização de antibióticos.

A maioria das vacinas bacterianas é inativada e administrada por via oral, imersão ou injeção i.p., sendo este último, dentre todos, o método mais confiável e eficaz. Entretanto, apresenta desvantagens como estresse extra para os peixes, custos, segurança e tempo requerido para administração e para o desenvolvimento de imunidade, além de não ser adequada para peixes jovens, pequenos e frágeis. Em contraste, a vacinação por imersão é prática para uso em grande escala, principalmente para peixes pequenos, porém apresenta desvantagens pela necessidade de maior volume e a proteção geralmente é menor (NAKANISHI; OTOTAKE, 1997).

Evans et al. (2004) pesquisaram duas vacinas inativadas elaboradas com *S. iniae* e *S. agalactiae* inoculadas via i.p.. Na vacinação de tilápias com *S. agalactiae* e posterior desafio 24 i.p. com cepa homóloga a vacina demonstrou alta proteção, ocorrendo o mesmo na vacinação com *S. agalactiae* por imersão, sendo uma alternativa para vacinação de peixes pequenos. Os autores ainda vacinaram tilápias com *S. iniae* e desafiaram com *S. agalactiae*, acarretando no óbito de todos os peixes, o que sugeriu não existir imunidade cruzada entre estas duas espécies.

Shoemaker et al. (2006) avaliaram em tilápia a eficácia de vacina inativada e liofilizada de *S. iniae*, administrada i.p. e via oral incorporada à ração utilizando a tecnologia Oralject[™] (vacina protegida). A porcentagem de sobrevivência relativa (PSR) na vacinação via oral foi de 63,1% e 100,0% na i.p., sugerindo que a vacinação oral é menos estressante, eficaz e econômica para grandes populações, embora a vacina injetável tenha apresentado maior taxa de sobrevivência.

Shelby et al. (2002), imunizaram tilápias passivamente i.p., utilizando soro contendo anticorpo anti- *S. iniae* não- inativado (GI), soro- inativado pelo calor (GII) e soro de peixes não- imunizados (GIII) e desafiaram com cepas de *S. iniae* inoculadas via i.p.. Os grupos GI e GII apresentaram maiores taxas de sobrevivência, diferentemente do grupo GIII, o que sugeriu que a imunização é dada pelos anticorpos anti- *S. iniae* presentes no soro (não-inativado ou inativado).

Pasnik et al. (2006) utilizaram soro hiperimune para imunizar tilápias passivamente. Este soro foi produzido após a vacinação (vacina preparada para o experimento) de peixes contra *S. agalactiae* e após 90 dias, desafiados com *S. agalactiae*. Com 25 dias de desafio, o sangue foi colhido e o soro obtido foi utilizado na imunização passiva de outros peixes, os quais foram desafiados com *S. agalactiae* 72 horas após a imunização. Os autores relataram uma mortalidade acumulada de 10% no grupo imunizado passivamente e 72,7% no grupo controle, sugerindo que o anticorpo específico anti- *S. agalactiae* tem um papel primário na imunidade contra infecção por *S. agalactiae*.

Shoemaker et al. (2012) testaram uma vacina morta bivalente (*S. iniae* e *Vibrio vulnificus*) inoculada via i.p., em dois grupos de tilápias. No grupo desafiado com *S. iniae* foi observada um Percentual Relativo de Sobrevivência (PRS) de 69 a 100% e no grupo desafiado com *V. vulnificus* o PSR foi de 79 a 89%. Os autores concluíram que devido ao estresse do manuseio e os custos para vacinar cada peixe, a melhor estratégia seria combinar vacinas monovalentes em vacinas bivalentes.

Na Ásia, já existem vacinas inativadas comerciais para doenças de peixes, como a elaborada com *S. iniae* e *Lactococcus garviae* (AquaVac™ Garvetil™, SHERING-PLOUGH), administradas via i.p. e somente com *S. iniae* (Norvax® Strep Si, INTERVET), administrada por imersão ou via i.p..

No Brasil, atualmente já está disponível uma vacina comercial inativada administrada via i.p. em tilápias (*O. niloticus*) contra *S. agalactiae* (AQUAVAC® STREP SA, MSD Saúde Animal). Segundo o fabricante, a vacina deve ser aplicada na dose de 0,05 mL/peixe, via i.p., em tilápias pesando pelo menos 15 gramas. Em 2011, SALVADOR et al. realizaram um estudo para testar a eficácia desta vacina, a qual apresentou uma proteção de 84% no grupo vacinado e posteriormente desafiado com *S. agalactiae*.

REFERÊNCIAS

- AKINYEMI, A. A.; FAJANA, O. P. Antibiotics sensitivity and occurrence of bacteria originated from skin, gill and buccal cavity of *Chrysichthys nigrodigitatus*, *Distichodus engycephalus* and *Synodontis schall* sampled in Arakanga reservoir, Abeokuta, Ogun State, Nigeria. **Journal of Fisheries Sciences**, v. 5, p. 164-171, 2011.
- ALABASTER, J. S.; LLOYD, R. **Water quality for freshwater fish**. London: Butterworth Scientific, 1982, 2 ed.
- AL-HARBI, A. H. First isolation of *Streptococcus* sp. from hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*) in Saudi Arabia. **Aquaculture**, v. 128, p. 263-271, 1994.
- AMERICAN TILAPIA ASSOCIATION. **Tilapia situation and outlook report: 1997**. California, 1998. 7 p.
- ANUALPEC 2011. **Anuário da Pecuária Brasileira**. Instituto FNP. Ed. FNP Consultoria e Comércio. São Paulo/SP, 400p., 2011.
- BARRAGY, T. B. **Veterinary drug therapy**. Malvern: Lea e Febinger, 1994.
- BERRIDGE, B. R.; BERCOVIER, H.; FRELIER, P. F. *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus difficile* 16S-23S intergenic rDNA: genetic homogeneity and species-specific PCR. **Veterinary Microbiology**, v. 78, n. 2, p. 165-173, 2001.
- BOWSER, P. R.; WOOSTER, G. A.; GETCHELL, R. G. *Streptococcus iniae* infection of *Oreochromis niloticus* in a recirculation production facility. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 29, n. 3, p. 335-339, 1998.
- BUNCH, E. C.; BEJERANO, I. The effect of environmental factors on the susceptibility of hybrid tilapia *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus* to streptococcosis. **The Israeli Journal of Aquaculture**, v. 49, n. 2, p. 67-76, 1997.
- CARRASCHI, S. P. **Ecotoxicidade e eficácia da oxitetraciclina e do florfenicol contra infecção experimental por *Aeromonas hydrophila* e aspectos histopatológicos em Pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**. 2010. 78f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Curso de Pós-graduação em Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, 2010.
- CASTAGNOLLI, N. **Criação de peixes de água doce**. Jaboticabal: FUNEP, 1992.
- CHANG, P. H.; PLUMB, J. A. Histopathology of experimental *Streptococcus* sp. Infection in tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) and channel catfish, *Ictalurus punctatus*, (Rafinesque). **Journal of Fish Diseases**, v. 19, p. 235-241, 1996.
- CLARK, J. S.; PALLER, B.; SMITH, P. D. Preventions of streptococcosis in tilapia vaccination: the Philippine experience. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TILAPIA AQUACULTURE, 5, 2000. Rio de Janeiro, RJ. **Proceedings...** Rio de Janeiro, 2000. v. 2, p. 545-551.

CONTE, F. S. Stress and the welfare of cultured fish. **Applied Animal Behavior Science**, v. 86, p. 205-223, 2004.

ELDAR, A.; BEJERANO, Y.; BERCOVIER, H. *Streptococcus shiloi* and *Streptococcus diffcile*: two new streptococcal species causing a meningoencephalitis in fish. **Current Microbiology**, v. 28, p. 139-143, 1994.

ELDAR, A. et al. *Streptococcus shiloi*, the name for an agent causing septicemic infection in fish is a junior synonym of *Streptococcus iniae*. **International Journal Systematic Bacteriology**, v. 45, p. 840-842, 1995.

EVANS, J. J.; SHOEMAKER, C. A.; KLESIOUS, P. H. Experimental *Streptococcus iniae* infection of hybrid striped bass (*Morone chrysops* X *Morone saxatilis*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*) by nares inoculation. **Aquaculture**, v. 189, p. 197-210, 2000.

EVANS, J. J. et al. Characterization of b-hemolytic group B *Streptococcus agalactiae* in cultured sea bream (*Sparus auratus*) (L.), and wild mullet (*Liza klunzingeri*), in Kuwait. **Journal of Fish Diseases**, v. 25, p. 505-513, 2002.

_____. Survival of *Streptococcus agalactiae* from fish following natural and experimental infections. **Aquaculture**, v. 233, p. 15-21, 2004.

EVANS, J. J.; KLESIOUS, P. H.; SHOEMAKER, C. A. Streptococcus in warm-water fish. **Aquaculture Health International**, p. 10-14, 2006.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. The State of world aquaculture. Rome: **FAO**. 196p., 2009.

_____. Fisheries and Aquiculture Department (FAO). The world states of fisheries and Aquiculture 2010. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/013/i1820e/i1820e00.htm>>. Acesso em: 28 jul. 2012.

FERNANDES, M. N.; RANTIN, F. T. Relationship between oxygen availability and metabolic cost of breathing in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): aquacultural consequences. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 127, p. 339-346, 1994.

FIGUEIREDO, H. P. C. et al. *Streptococcus agalactiae* associado a meningoencefalite e infecção sistêmica em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, p. 678-680, 2006.

FIGUEIREDO, H. C. P. et al. Estreptococose em tilápia do Nilo - parte 1. **Panorama da Aqüicultura**, v. 19, n. 103, 2007a.

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.

GUDDING, R.; LILLEHAUG, A.; EVENSEN, O. Recent developments in fish vaccinology. **Veterinary and Immunopathology**, v. 72, p. 203-212, 1999.

HORSBERG, T. E., HOFF, K. E., NORDMO, R., Pharmacokinetics of florfenicol and its metabolite florfenicol amine in Atlantic salmon. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 8, p. 292-301, 1996.

HOSHIMA, T.; SANO, T.; MORIMOTO, Y. A Streptococcus pathogenic to fish. **Journal of the Tokyo University of Fisheries**, v. 44, p. 57-58, 1958.

HUBERT, R. M. **Bacterial diseases in warm water aquaculture**. In: FISH CULTURE IN WARM WATER SYSTEMS. PROBLEMS AND TRENDS. Boca Raton: CRC, 1989, p. 194-197.

INGLIS, V.; ROBERTS, R. J.; BROMAGE, N. R. **Streptococcal Infections**. In: BACTERIAL DISEASES OF FISH. New York: Halsted, 1993, p. 196-197.

KAWAHARA, E.; KUSUDA, R. Direct fluorescent antibody technique for differentiation between alpha and beta-hemolytic *Streptococcus* spp. **Fish Pathology**, v. 22, p. 77-82, 1987.

KAWAMURA, Y. et al. High genetic similarity of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus difficile*: *S. difficile* Eldar et al.; 1995 is a later synonym of *S. agalactiae* Lehmann and Neumann 1896. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 961-965, 2005.

KITAO, T., AOKI, T.; IWATA, K. Epidemiological study on streptococcosis of cultured yellowtail (*Seriola quinqueradiata*-I). Distribution of *Sfrepfococcus* sp. in seawater and muds round yellowtail farms. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, v. 45 (5), p. 67-572, 1979.

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

KOCA, S. B. et al. Applications of probiotic in Aquaculture. **Journal of Fisheries Sciences**, v. 5, p. 326-335, 2011.

KUBITZA, F. **Principais parasitoses e doenças dos peixes cultivados**. Jundiaí: Fernando Kubitza, 1999. 96p. 3 ed.

_____. **Tecnologia e planejamento na produção comercial**. Jundiaí: Fernando Kubitza, 2000. 289p.

KUSUDA, R. et al. A new pathogenic bacterium belonging to the genus *Streptococcus*, isolated from an epizootic of cultured yellowtail. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, v. 42, p. 1345-1352, 1976.

KUSUDA, R.; KOMATSU, I. A comparative study of fish pathogenic *Streptococcus* isolated from saltwater and freshwater fishes. **Bulletin of Japanese Society of Scientific Fisheries**, v. 44, p. 1073-1078, 1978.

MCGEACHIN, R. B. et al. Growth of tilapia aurea in seawater cages. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 18, p. 31-34, 1987.

- MCNULTY, S. T. et al. *Streptococcus Iniae* infection and tissue distribution in hybrid striped bass (*Morone Chrysops* x *Morone Saxatilis*) following inoculation of the gills. **Aquaculture**, v. 220, p. 165-173, 2003.
- MINAMI, T.; NAKAMURA, M.; IKEDA, Y.; OZAKI, H. A beta-hemolytic *Streptococcus* isolated from cultured yellowtail. **Fish Pathology**, v. 14, p. 15-19, 1979.
- MING-CHEN, T.; CHEN, S. C.; TSAI, S. S. General septicemia of streptococcal infection in cage cultured tilapia in southern Taiwan. **Fisheries Series**, v. 2, n. 4, 1985.
- NAKANISHI, T.; OTOTAKE, M. Antigen uptake and immune responses after immersion vaccination. In: GUDDING, R. et al. **Fish Vaccinology**, p. 59-68, 1997.
- 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, p. 3764-3769, 2002.
- NEWMAN, S. G. Bacterial vaccines for fish. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 3, p. 145-185, 1993.
- NOMOTO, R. et al. Lancefield group C *Streptococcus dysgalactiae* infection responsible fish mortalities in Japan. **Journal of Fish Diseases**, v. 21, p. 679-686, 2004.
- NYBELIN, O. Untersuchungen über den bei Fischen Krankheitsgegen en Spatpilz *Vibrio anguillarum*. **Meddelanden frau Statens Undersoknings-och Fasoksanstalt fur Sotvattenfieskt**, v. 8, p. 5-62, 1935.
- OHNISHI, K.; JO, Y. Studies of streptococcal infection in pound-culture fishes. Characteristics of a beta-hemolytic *Streptococcus* isolated from cultured ayu and amago in 1977-1978. **Fish Pathology**, v. 16, p. 63-67, 1981.
- PADUA, H. B. Conhecimento e utilização das variáveis físicas, químicas e biológicas na aquicultura dulcícola brasileira. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE CULTIVO DE CAMARÃO, 4., SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 1., FEIRA DE TECNOLOGIA E PRODUTOS PARA AQUICULTURA, 1993, João Pessoa. **Anais...João Pessoa**, 1993. p. 315-363.
- PARANÁ. Secretaria da Agricultura e do Abastecimento. **Levantamento de dados piscicultura do estado do Paraná**, 2009. Departamento de Economia Rural - DERAL/PR, 2011.
- PASNIK, D. J.; EVANS, J. J.; KLESIUS, P. H. Passive immunization of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) provides significant protection against *Streptococcus agalactiae*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 21, p. 365-371, 2006.
- PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M. **Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento**. Maringá: EDUEM, 2008, 311p., 3 ed.
- PERERA, R. P.; JOHNSON, S. K. *Streptococcus iniae* associated with mortality of Tilapia nilotica x Tilapia aurea hybrids. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 6, p. 335-340, 1994.

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. Empreendimentos piscícolas e o médico veterinário. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, São Paulo, v. 2, n. 2, p. 43-65, 1999.

PIER, G. B.; MADIN, S. H. *Streptococcus inae* sp. nov. a beta hemolytic streptococcus isolated from a Amazon freshwater dolphin, *Inia geoffrensis*. **International Journal Systematic Bacteriology**, v. 26, p. 545-553, 1976.

PLUMB, J. A. **Infectious diseases of tilapia**. In: TILAPIA AQUACULTURE IN THE AMERICAS, edited by Costa-Pierre, B. A. Rakocy, J. E. World Aquaculture Society, Baton Rouge, L. A, USA, 1997, v. 1, p. 212-218.

_____. **Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes**. Ames, Iowa: Iowa State University Press, v. 328, p. 1-64, 1999.

RASHEED, V.; PLUMB, J. A. Pathogenicity of a non-hemolytic group B *Streptococcus* sp. in gulf killifish. **Aquaculture**, v. 37, p. 97-105, 1984.

RIGOS, G., TROISI, G. M. Antibacterial agents in Mediterranean finfish farming: A synopsis of drug pharmacokinetics in important euryhaline fish species and possible environmental implications. **Reviews and Fish Biology and Fisheries**, v. 15, p. 53, 2005.

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

ROMANO, L. A.; MEJÍA, J. Infección por *Streptococcus iniae*: Una enfermedad emergente que afecta a peces de cultivo y a humanos. **Revista Aquatic**, n. 18, 2003.

SACCHETIN, P. S. C. et al. Produção e micropartículas de alginate contend *Flavobacterium columnare* inativada pelo método de emulsão para vacinação de peixes por via oral. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 263-268, 2010.

SAKAI, M.; ATSUTA, S.; KOBAYASHI, M. Protective immune response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, vaccinated with beta-hemolytic streptococcal bacterin. **Fish Pathology**, v. 24, p. 169-173, 1989.

SALVADOR, R. et al. Isolamento de *Streptococcus* spp. de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e qualidade da água de tanques redes na Região Norte do Estado do Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 24, p. 35-42, 2003.

_____. Isolation and characterization of group B *Streptococcus* spp from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) breeding in hapas nets and in earth nurseries in the north region of Parana State, Brazil. **Ciência Rural**, v. 35, n. 6, p. 1374-1378, 2005.

- SALVADOR, R.; ZANOLO, R.; CERICATO, L. The impact of streptococcosis on tilapia in Brazil and efficacy of AquaVac® Strep Sa for managing the disease under controlled conditions. In: WORLD AQUACULTURE SOCIETY CONFERENCE, 2011, Natal, Brazil. **Proceedings...**Natal: WAS, 2011. p. 6-10.
- SHELBY, R. A. et al. Passive immunization of tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), with anti-*Streptococcus iniae* whole sera. **Journal of Fish Diseases**, n. 25, p. 1-6, 2002.
- SHOEMAKER, C.; KLESIUS, P. Streptococcal disease problems and control: a review. **Tilapia Aquaculture**, v. 2, p. 671-680, 1997.
- SHOEMAKER, C. A.; EVANS, J. J.; KLESIUS, 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. A. et al. Efficacy of a *Streptococcus iniae* modified bacterin delivered using Oralject™ technology in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 255, p. 151-156, 2006.
- SHOEMAKER, C. A.; LAFRENTZ, B. R.; KLESIUS, P. H. Bivalent vaccination of sex reversed hybrid tilapia against *Streptococcus iniae* and *Vibrio vulnificus*. **Aquaculture**, v. 354-355, p. 45-49, 2012.
- SURESH, A. V. Tilapia Update 1998. **World Aquaculture**, v. 30, n. 4, p. 8-68. 1998.
- TORANZO, A. E.; MAGARIÑOS, B.; ROMALDE, J. L. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. **Aquaculture**, v. 246, p. 37-61, 2005.
- 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, p. 119-127, 1981.
- VANDAMME, P. et al. *Streptococcus difficile* is a nonhemolytic Group B, type Ib *Streptococcus*. **International Journal Systematic Bacteriology**, v. 47, n. 1, p. 81-85, 1997.
- WATTS, M.; MUNDAY, B. L.; BURKE, C. M. DNA sequences and organization of IgM heavy chain genes in two holostean fish. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 19, p. 153-164, 2001.
- WU, S. Y. New bacterial disease of tilapia. **Fish Culture Bulletin**, v. 23, p. 3-40. 1970.
- ZIMMERMANN, S.; HASPER, T.O.B. Piscicultura no Brasil: o processo de intensificação da tilapicultura. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 40., 2003, Santa Maria, RS. **Anais...**Santa Maria: SBZ. 2003. CD ROOM.

2 OBJETIVOS

2.1 – OBJETIVO GERAL

Avaliar a proteção da transferência passiva de anticorpos anti-*Streptococcus agalactiae* em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) desafiadas com cepa virulenta de *S. agalactiae*.

2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir soro hiperimune contendo anticorpos anti- *S. agalactiae*;
- Determinar a proteção da imunização passiva após desafio com *S. agalactiae*;
- Determinar a titulação e a persistência de anticorpos nos grupos inoculados com soro anti- *S. agalactiae*- inativado e não- inativado.

3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO¹

**Utilização da Imunização Passiva com Anticorpos Antistreptococcus
Agalactiae na Proteção de Tilápias do Nilo
(*Oreochromis niloticus*)**

**Use of Passive Immunization with Antistreptococcus
Agalactiae Antibodies in Protection of Nile Tilapia
(*Oreochromis Niloticus*)**

Resumo: O estresse provocado pela alta densidade de estocagem, arraçoamento intensivo e diminuição da qualidade da água torna a tilápia mais susceptível às doenças infecciosas entre elas a estreptococose, considerada uma das mais importantes enfermidades na aquicultura, causando altas taxas de mortalidade. O objetivo deste trabalho foi avaliar a proteção da transferência passiva de anticorpos anti-*Streptococcus agalactiae* em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) desafiadas com cepa virulenta de *S. agalactiae* e a taxa sobrevivência pós-desafio i.p. com *S. agalactiae*. Após determinação da DL 50 de *S. agalactiae*, 36 tilápias foram distribuídas em quatro aquários, dois para o grupo controle e dois para inoculação i.p. com a DL 50 para produção de anticorpos anti- *S. agalactiae*. No 21° e 28° dia foi coletado sangue para obtenção do soro hiperimune utilizado na transferência passiva. Em seguida, 30 tilápias foram distribuídas em três aquários e submetidas a três tratamentos (GI: controle; GII: imunizada com o soro- inativado; GIII: imunizada com soro não-inativado). Após 48 horas, e 7, 14, 21, 28 e 35 dias foram realizadas coletas de sangue para titulação de anticorpos anti-*S. agalactiae* utilizando o teste de aglutinação direta. Para avaliar a taxa de sobrevivência outras 30 tilápias foram distribuídas em três aquários e submetidas a três tratamentos (GI: controle; GII: imunizada com soro- inativado; GIII: imunizada com soro não-inativado). Após 48 horas da inoculação, as tilápias foram desafiadas i.p. com 100 µL de *S. agalactiae* e monitoradas duas vezes ao dia, por um período de 35 dias. Os resultados deste trabalho mostraram que os títulos séricos de anticorpos foram detectados pela aglutinação direta até o 21° dia pós-transferência passiva, e neste mesmo período houve uma proteção de 80% entre os grupos imunizados com soro- inativado e soro não-inativado contendo anticorpos anti-*S. agalactiae*, após desafio com *S. agalactiae*. Ao final do experimento, o grupos soro- inativado e soro não-inativado apresentaram 60 e 80% de proteção, respectivamente, enquanto que no grupo controle a mortalidade foi de 100%. Não houve diferença estatística significativa na taxa proteção entre os grupos imunizados.

Palavras-chave: Estreptococose. Imunidade. Peixes. Imunoglobulina. Soro.

Abstract: The stress caused by the high density of storage, intensive feeding and lower water quality makes tilapia more susceptible to infectious diseases like streptococcosis, considered one of the most important diseases in aquacultures, causing high rates of mortality. The aim of this work was to evaluate the persistency and the titers of anti-*Streptococcus agalactiae* antibodies passively transferred by intraperitoneal inoculation (i.p.) and the rate of mortality after i.p. challenge with *S. agalactiae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). After

¹ Artigo editado de acordo com as normas de publicação do periódico Ciência Rural.

determining the DL 50 of *S. agalactiae*, 36 tilapias were distributed in four aquariums, two for the control group and two for the group intraperitoneally inoculated (i.p.) with the DL 50 for anti-*S. agalactiae* antibodies production. On the 21° and 28° day blood was collected for the obtainment of hiperimmune serum used in passive transference. Then, 30 tilapias were distributed in three aquariums and submitted to three treatments (GI: control; GII: i.p. immunized with inactivated- serum; GIII: i.p. immunized with non- inactivated serum). After 48 hours and seven, 14, 21, 28 and 35 days there were realized blood collections for anti-*S. Agalactiae* antibodies titration using the direct agglutination test. For survival evaluation 30 others tilapias were distributed in three aquariums and submitted to three treatments (GI: control; GII: i.p. immunized with inactivated- serum; GIII: i.p. immunized with noninactivated serum). After 48 hours of inoculation tilapias were i.p. challenged with 100 µL of *S. agalactiae* and monitored twice a day for 35 days. The results of this work showed that titers of antibodies were detected by direct agglutination until the 21° day after passive transference and during the same period the protection between the groups immunized with inactivated serum and non- inactivated serum contending anti-*S. agalactiae* antibodies was of 80% after challenge with *S. agalactiae*. At the end of the experiment, the inactivated serum and non- inactivated serum groups showed 60 and 80% of protection, respectively, while in the control group the mortality was of 100%. There was not statistical significant difference in the survival rate between the immunized groups.

Keywords: Streptococcosis. Immunity. Fishes. Immunoglobulin. Serum.

Introdução

A produção de tilápias tem apresentado um crescimento acelerado no Brasil e no mundo (LOPERA BARRERO et al., 2006), principalmente em sistemas de criação intensivos, devido à aceitação no mercado, rusticidade e alta produtividade (KUBITZA, 1997). Este tipo de sistema associado às práticas de manejo inadequadas e a falhas nutricionais podem alterar a qualidade da água propiciando a ocorrência de enfermidades infecciosas (BARCELLOS et al., 2000).

Entre as enfermidades infecciosas em peixes, destacam-se as bacterioses causadas por *Streptococcus* spp (WU, 1970) consideradas como um complexo de doenças similares causadas por diferentes espécies capazes de lesar o sistema nervoso central (TORANZO et al., 2005) e causar septicemia. As estreptococoses são um importante problema sanitário em sistemas de criação intensivo de tilápias (*Oreochromis* spp.) (SURESH, 1998) e atualmente, o *Streptococcus iniae* e o *Streptococcus agalactiae* são considerados os mais importantes patógenos de tilápia no mundo (SHOEMAKER; KLESIUS, 1997).

Os antibióticos são os produtos mais utilizados no tratamento de infecções em peixes, porém, o seu uso indiscriminado favorece a seleção de bactérias, acarreta grande impacto ambiental e pode deixar resíduos nos alimentos destinados ao consumo humano

(HÖLMSTROM et al., 2003). Uma alternativa à utilização destas drogas é a utilização de anticorpos, os quais podem prevenir doenças infecciosas promovendo uma proteção imune passiva artificial (ZEITLIN, 2000), realizada através da transferência do soro de animais imunizados para animais susceptíveis (TURGEON; ELAZHARY, 1992).

Na piscicultura a utilização de imunização por diferentes vias de aplicação é considerada uma alternativa ao uso de antimicrobianos (SACCHETIN et al., 2010), entretanto esse método apresenta vantagens e desvantagens (GUDDING et al., 1999). Especificamente quanto à imunização passiva em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) os estudos ainda são escassos e justificam o presente trabalho que teve como objetivo avaliar a proteção da transferência passiva de anticorpos anti- *Streptococcus agalactiae* em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) desafiadas com cepa virulenta de *S. agalactiae* e o percentual relativo de sobrevivência em tilápias do Nilo (*O. niloticus*).

Material e Métodos

Local e Acondicionamento dos Peixes

O experimento foi realizado no Laboratório de Imunopatologia de Peixes (LIPPE), da Universidade Estadual do Norte do Paraná . *Campus* Luiz Meneghel (UENP/CLM), Bandeirantes.

No LIPPE, os peixes foram submetidos à quarentena em caixas de fibra de vidro com capacidade para 500L de água e taxa de renovação de 2L por minuto, por um período de 30 dias e, posteriormente, transportados e mantidos em aclimação por sete dias, tempo necessário para que a concentração plasmática de cortisol voltasse aos níveis basais (BARTON, 2002), na Unidade de Infecção Experimental de Organismos Aquáticos, dotada de adequada infraestrutura com biossegurança para descontaminação da água e de todo o material utilizado nos procedimentos de infecção experimental.

Foram utilizadas 126 tilápias do Nilo (*O. niloticus*) com peso médio de 100 gramas (± 10), provenientes da mesma desova. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia com ração extrusada (FISHTM 30% de proteína bruta, Cooperativa Integrada), na proporção de 3% do peso vivo, atendendo as exigências nutricionais para tilápias (FURUYA et al., 2001; GONÇALVES, 2003).

Controle da Qualidade da Água

Os aquários continham água de poço artesiano declorificada com fluxo contínuo e aeração realizada por compressor de ar, distribuídas por mangueiras de PVC (6mm) e pedra porosa. A limpeza foi realizada diariamente por sifonagem. Diariamente, o oxigênio dissolvido e a temperatura foram medidos com o equipamento YSI 55 (Yellow Spring Instrument, Yellow Springs, OH, USA) e semanalmente, o pH, nitrito e amônia foram mensurados pelo teste bioquímico Acqua-imagen®. Durante o experimento, a média da concentração de oxigênio dissolvido foi mantida em 5.3 ± 0.5 mg/L, temperatura em 28 ± 0.9 °C, pH em 6.8 ± 0.4 , nitritos em 0.30 mg/L e amônia em 0.04 mg/L, valores dentro da referência para o bem-estar dos peixes.

Anestesia e Coleta de Sangue

Os peixes foram anestesiados com solução aquosa de óleo de cravo (Eugenol®) na proporção de três mL para 10 L de água. Inicialmente, 1 mL da solução concentrada de óleo de cravo foi diluído em 10 mL de álcool 70°GL. Desta diluição, foram adicionados 3 mL em um recipiente com 10 L de água (DELBON, 2006), onde os peixes foram alocados. Estes eram considerados anestesiados quando, após aproximadamente dois minutos, estivessem quase imóveis no fundo do recipiente, mantidos ativos os movimentos operculares.

A coleta de sangue dos animais foi realizada através de punção da veia caudal, com auxílio de seringas e agulhas descartáveis. Após a coleta, o sangue foi centrifugado a 2000 g durante cinco minutos e o soro obtido foi mantido a -40C até o momento de sua utilização.

Preparação do *S. Agalactiae* para Determinação da DL50

Para a determinação da DL 50 de *S. agalactiae* foi utilizada amostra de *S. agalactiae* isolada de tilápias infectadas naturalmente e identificadas segundo as características culturais, morfológicas, tintoriais e bioquímicas (VANDAMME et al., 1997; SALVADOR et al., 2005). A cepa de *S. agalactiae* foi semeada em 500 mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion-DIFICO®) e incubada por cinco dias a 29°C, em aerofilia. Após centrifugação a 4000 g (4°C)/20 min. o sobrenadante foi desprezado e a massa bacteriana

ressuspensa em 500 ml de PBS e novamente centrifugada. Essa operação foi realizada por mais três vezes e a massa bacteriana obtida foi diluída em PBS de modo a conter 10^4 , 10^6 e 10^8 UFC/mL, correspondente ao grau quatro, seis e oito da escala de MacFarland. Foram utilizados 30 peixes distribuídos ao acaso em três aquários, contendo 10 peixes cada. Os peixes dos aquários um, dois e três foram inoculados i.p. com as concentrações 10^4 , 10^6 e 10^8 UFC/ml de *S. agalactiae* respectivamente e a DL 50 foi determinada após observação por 15 dias (SALVADOR, 2008).

Produção de Soro Hiperimune

Foram utilizados 36 peixes distribuídos ao acaso em quatro aquários, contendo nove peixes cada. O controle, mantido em dois aquários, foi inoculado i.p. com 0,5 mL PBS/MI 0,15M, pH 7,2 estéril/animal. Os peixes produtores foram inoculados i.p. com 0,5 mL de 1×10^8 UFC/mL (DL 50) de *S. agalactiae* inativado ($40^\circ\text{C}/30$ min. em banho-maria) /animal. Previamente à primeira inoculação foi coletado sangue de todos os peixes. Os peixes foram inoculados duas vezes com intervalo de 14 dias e tiveram o sangue coletado no 21º e 28º dia. As amostras de soro obtidas foram tituladas individualmente e reunidas em um .pool. e então formada duas alíquotas, uma de soro- inativado a $56^\circ\text{C}/30$ min. em banho-maria para inativação do complemento e outra de soro não- inativado. Estas alíquotas foram mantidas a -4°C até o momento de sua utilização.

Titulação de Anticorpos Séricos

O título de imunoglobulinas M nas amostras de soro foi determinado pela técnica de aglutinação direta de *S. agalactiae* na presença de anticorpos específicos no soro (LARSEN; MELLERGAARD, 1984).

A prova de aglutinação direta modificada por Eto et al. (2011) foi realizada com amostras de soro inativadas a $56^\circ\text{C}/30$ min. e foram depositadas em placas de microtitulação de 12 poços com fundo em U. Em todos os poços foram adicionados 25 μL de PBS e no primeiro poço 25 μL de soro- inativado. Após a homogeneização da solução foram transferidos 25 μL para o poço seguinte, sendo repetido este processo até o 11º poço, e então desprezado o mesmo volume da solução. Em seguida, foi adicionado volume igual de antígeno bacteriano inativado de *S. agalactiae* em cada poço, e a placa mantida inicialmente em estufa a $37^\circ\text{C}/1$ hora e a seguir a $4^\circ\text{C}/22$ horas. A leitura visual das placas foi realizada

comparando-se o padrão de sedimentação do poço controle (12° poço) contendo apenas PBS e antígeno bacteriano de *S. agalactiae*, com os padrões de sedimentação dos demais poços. O título de anticorpos total foi identificado como a maior diluição em que se observou uma reação de aglutinação. O resultado da titulação foi expresso em números decimais após o cálculo do logaritmo base dois (Log₂) dos títulos detectados. Este procedimento foi realizado em todas as amostras de soro analisadas neste trabalho.

Inoculação de Anticorpos Anti-*S. Agalactiae*

Foram utilizados 30 peixes distribuídos ao acaso em três aquários, contendo 10 peixes cada. Cada peixe do grupo I (controle) foi inoculado com 100 µL PBS 0,15M, pH 7,2 estéril via i.p.; do grupo II com 100 µL do “pool” de soro- inativado via i.p. e do grupo III com 100 µL do “pool” de soro não- inativado via i.p.. Antes da imunização passiva foram coletadas amostras de sangue de cada peixe dos três grupos para avaliar a titulação de anticorpos anti-*S. agalactiae*. Foram realizadas coletas de sangue de todos os peixes dos três grupos com 48 horas e com sete, 14, 21, 28 e 35 dias após a inoculação. A titulação dos anticorpos séricos foi realizada em cada amostra de soro pelo método de aglutinação direta (LARSEN; MELLERGAARD, 1984).

Desafio Bacteriano e Sobrevivência

Foram utilizados 30 peixes, distribuídos ao acaso em três aquários, contendo 10 peixes cada e submetidos ao mesmo tratamento do experimento anterior, sendo o grupo I (controle) inoculado via i.p. com 100 µL PSB 0,15M, pH 7,2 estéril, o grupo II com 100 µL do “pool” de soro-inativado e o grupo III com 100 µL do “pool” de soro não- inativado e após 48 horas da inoculação, os 30 peixes foram desafiados via i.p. com a DL 50 (1 x 10⁸ UFC/mL de *S. agalactiae*). Os grupos foram observados diariamente, no período da manhã e da tarde, acompanhando-se os sinais clínicos e sobrevivência, seguindo até o final do experimento, aos 35 dias. Todos os peixes mortos foram submetidos à necropsia para observação de lesões macroscópicas e cultura microbiológica para confirmação de *S. agalactiae*.

Análise Estatística

Para análise estatística dos resultados foi empregado o software GraphPad Prim, aplicando o teste Qui- quadrado e Graph Prisma para análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Resultados

Nos peixes inoculados com *S. agalactiae* para a produção de soro hiperimune, foram detectados títulos médios (Log₂) de anticorpos nas amostras de soro, coletado no 21° e no 28° dia, de 1,44 e 2,39, respectivamente (Figura 1).

Na inoculação de anticorpos anti- *S. agalactiae*, a maior média de títulos de anticorpos nos peixes do Grupo II (soro- inativado) foi detectada na coleta realizada no 7° dia e no Grupo III (soro não-inativado), na coleta com 48 horas. No Grupo II foi detectado aos 14 dias a diminuição da média do título de anticorpos que se manteve igual no 21° dia, enquanto no Grupo III, a diminuição da média do título de anticorpos ocorreu no sétimo dia, diminuindo gradativamente no 14° e 21° dia. Em ambos os grupos os títulos de anticorpos foram detectados somente até o 21° dia pós- inoculação (Figura 2).

Na avaliação da sobrevivência após desafio bacteriano, o Grupo I (controle) apresentou 100% de mortalidade no 10° dia de experimento. Nos Grupos II e III, no 21° dia de experimento a porcentagem relativa de sobrevivência (PRS) foi de 80%, e ao final do experimento, com 35 dias, o grau de proteção foi de 40% no Grupo II e 70% no Grupo III (Figura 3). Não houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os Grupos II e III, apenas quando comparados ao Grupo I.

Discussão

As duas inoculações, realizadas com 14 dias de intervalo, mostrou nas coletas realizadas no 21° e 28° dia uma elevação média dos títulos séricos (Log₂) de anticorpos. Diferentemente deste trabalho, que utilizou *S. agalactiae* inativado, Shelby et al. (2002) utilizaram sub-dose de *S. iniae* virulento, e também obtiveram aos 28 dias pós- inoculação, elevação na média do título de anticorpos.

Na transferência passiva de anticorpos anti- *S. agalactiae*, os grupos inoculados com soro- inativado e com soro não-inativado não mostraram diferenças

estatísticas significativas ($p < 0,05$) nas médias de títulos de anticorpos, obtidas pela prova de aglutinação direta, na coleta realizada com 48 horas e sete dias pós- inoculação. Entretanto, nas coletas com 14 e 21 dias houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) quando comparadas aos tempos anteriores, tanto para o grupo inoculado com soro- inativado como para o grupo soro não-inativado.

Na literatura não há dados sobre o acompanhamento de títulos de anticorpos produzidos e transferidos passivamente em peixes. Entretanto, Akhlaghi et al. (1996) após produzirem anticorpos anti- *Streptococcus* spp em ovelhas e coelhos e inocular em peixes detectaram, pelo ELISA, aumento dos títulos séricos de anticorpos 24 horas após a inoculação, e significante diminuição aos 30 dias, porém títulos muito baixos foram detectados até 90 dias. É provável que a detecção de anticorpos por este longo período tenha sido possível pelo alto limiar de detecção do ELISA, quando comparado com a aglutinação direta.

Na avaliação da taxa de sobrevivência foi observado no Grupo I, 100% de mortalidade até o 10º dia do experimento. Neste mesmo período houve apenas uma morte em cada um dos grupos II e III. Nestes mesmos grupos, até o 24º dia do experimento, foram observadas duas mortes por grupo, correspondendo a 80% de proteção. No Grupo II foram observadas do 25º ao 28º dia, outras duas mortes, proteção de 60%, enquanto no Grupo III, a terceira morte ocorreu somente no 33º dia do experimento, correspondendo a 70% de proteção. O Grupo II apresentou ao final do experimento, uma proteção de 40%.

Shelby et al. (2002) imunizaram passivamente tilápias via i.p. com soro anti- *S. iniae* inativado e soro anti- *S. iniae* não- inativado e desafiaram via i.p. com *S. iniae* virulento após 48 horas. Estes autores observaram que não houve diferença estatística significativa entre a taxa de mortalidade observada no grupo soro anti- *S. iniae* inativado (3,3%) e no grupo soro não- inativado (0,0%), concluindo que o complemento ou as citocinas presentes no soro não- inativado não foram responsáveis pela proteção contra o *S. iniae*.

Neste trabalho analisando os resultados obtidos na titulação de anticorpos (Figura 2) com a porcentagem relativa de sobrevivência (Figura 3), observa-se, nos grupos soro-inativado e soro não-inativado, relação direta entre a diminuição dos títulos de anticorpos transferidos passivamente e a diminuição da taxa de sobrevivência, entretanto não houve diferença estatística significativa na taxa de sobrevivência, entre os grupos inoculados com soro- inativado e não- inativado, sugerindo que anticorpos específicos contra *S. agalactiae* foram importantes para a proteção dos peixes imunizados passivamente e que o complemento presente no soro não- inativado não implicou em proteção extra.

A imunização passiva quando comparada à vacinação, apresenta uma proteção imediata, pois as imunoglobulinas estão sendo inoculadas diretamente no animal, enquanto que a vacina exige um tempo mínimo de resposta de 7 dias após a inoculação do antígeno para a formação de anticorpos pelo próprio sistema imune do animal.

Conclusões

Os peixes que receberam a imunização passiva e posteriormente desafiados com *S. agalactiae* tiveram uma proteção parcial de 80% (Grupo II e III) até o 21º dia de experimento e ao final deste, uma proteção de 40% (Grupo II) e 70% (Grupo III) quando comparados ao grupo controle (0%, Grupo I).

A inoculação da DL 50 de *S. agalactiae* em tilápias do Nilo (*O. niloticus*) produziu títulos de anticorpos anti- *S. agalactiae* suficiente para ser utilizado na transferência passiva.

Anticorpos anti- *S. agalactiae* foram detectados, pelo método de aglutinação direta, até o 21º dia pós- inoculação em tilápias do Nilo (*O. niloticus*).

Futuramente, estes dados mostram a possibilidade da utilização profilática do soro hiperimune anti- *S. agalactiae* na proteção imediata em casos de surto de *S. agalactiae*, em tilápias no Nilo (*O. niloticus*).

Referências

AKHLAGHI, M.; MUNDAY, B.; WHITTINGTON, R. Comparison of passive and active immunization of fish against streptococcosis (enterococcosis). **Journal of Fish Diseases**, v. 19, p. 251-258, 1996.

BARCELLOS, L. J. G.; SOUZA, S. M. G.; WOEHL, V. M. Estresse em peixes: fisiologia da resposta ao estresse, causa e consequência (Revisão). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 26, n. 1, p. 99-111, 2000.

BARTON, B. A. Stress in fishes: A diversity of response with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Oxford Journals: Integrative and Comparative Biology**, v. 42, n. 3, p. 517-525, 2002.

DELBON, M. C. **Ação da benzocaína e do óleo de cravo sobre parâmetros fisiológicos de tilápia, *Oreochromis niloticus***. 2006. 91p. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Curso de Pós-graduação em Aquicultura, Universidade Estadual Paulista. 2006.

- ETO, S. F. et al. Effect of inoculation route on the production of antibodies and histological characteristics of the spleen in laying hens. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 14, n. 1, p. 63-66, 2011.
- FURUYA, W. M. et al. Coeficientes de Digestibilidade e Valores de Aminoácidos Digestíveis de Alguns Ingredientes para Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 4, p. 1143-1129, 2001.
- GOMES, S.; AFONSO, A.; GARTNER, F. Fish vaccination against infections by Streptococcal species and the particular case of Lactococcosis. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 101, p. 25-35, 2006.
- GONÇALVES, E. G., CARNEIRO, D. J. Coeficientes de Digestibilidade Aparente da Proteína e Energia de Alguns Ingredientes Utilizados em Dietas para o Pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 4, p. 779-786, 2003.
- GUDDING, R.; LILLEHAUG, A.; EVENSEN, O. Recent developments in fish vaccinology. **Veterinary and Immunopathology**, v. 72, p. 203-212, 1999.
- HÖLMSTROM, K. et al. Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health. **Internacional Journal of Food Science and Technology**, v. 38, p. 255-266, 2003.
- KUBITZA, F. Qualidade do alimento, qualidade da água e manejo alimentar na produção de peixes. In: SIMPÓSIO SOBRE O MANEJO E NUTRIÇÃO DE PEIXES, 1997. **Anais...**Campinas: CBNA, 1997. p. 63-101.
- LARSEN, J. L.; MELLERGAARD, S. Agglutination typing of *Vibrio anguillarum* isolates from diseased fish and from the environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47, n. 6, p. 1261-1265, 1984.
- LOPERA BARRERO, N. M. Tilapicultura semi-intensiva em tanques: alternativas de fertilização e produção (Revisão). **Arquivos de Ciências Veterinária e Zoologia**, v. 9, n. 1, p. 67-76, 2006.
- SACCHETIN, P. S. C. et al. Produção e micropartículas de alginate contend *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. et al. Isolation and characterization of group B *Streptococcus* spp from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) breeding in hapas nets and in earth nurseries in the north region of Parana State, Brazil. **Ciência Rural**, v. 35, n. 6, p. 1374-1378, 2005.
- SALVADOR, R. **Imunização e inflamação por *Streptococcus agalactiae* em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com ração suplementada com parede celular de *Saccharomyces cerevisiae***, 2008. Tese (Doutorado em Aquicultura). Curso de Pós-Graduação em Aquicultura, Universidade Estadual Paulista.

- SHELBY, R. A. et al. Passive immunization of tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), with anti-*Streptococcus iniae* whole sera. **Journal of Fish Diseases**, n. 25, p. 1-6, 2002.
- SHOEMAKER, C.; KLESIUS, P. Streptococcal disease problems and control: a review. **Tilapia Aquaculture**, v. 2, p. 671-680, 1997.
- SURESH, A. V. Tilapia Update 1998. **World Aquaculture**, v. 30, n. 4, p. 8-68. 1998.
- TORANZO, A. E.; MAGARIÑOS, B.; ROMALDE, J. L. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. **Aquaculture**, v. 246, p. 37-61, 2005.
- VANDAMME, P.; DEVRIESE, L. A.; POT, B.; KERSTERS, K.; MELIN, P. *Streptococcus difficile* is a nonhemolytic Group B, type Ib *Streptococcus*. **International Journal Systematic Bacteriology**, v. 47, n. 1, p. 81-85, 1997.
- WU, S. Y. New bacterial disease of tilapia. **Fish Culture Bulletin**, v. 23, p. 3-40, 1970.

Figura 1 – Média dos títulos séricos (Log2) de anticorpos anti- *Streptococcus agalactiae* produzidos em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) após duas inoculações com 14 dias de intervalo da DL 50 (1×10^8 UFC/mL) de *S. agalactiae*.

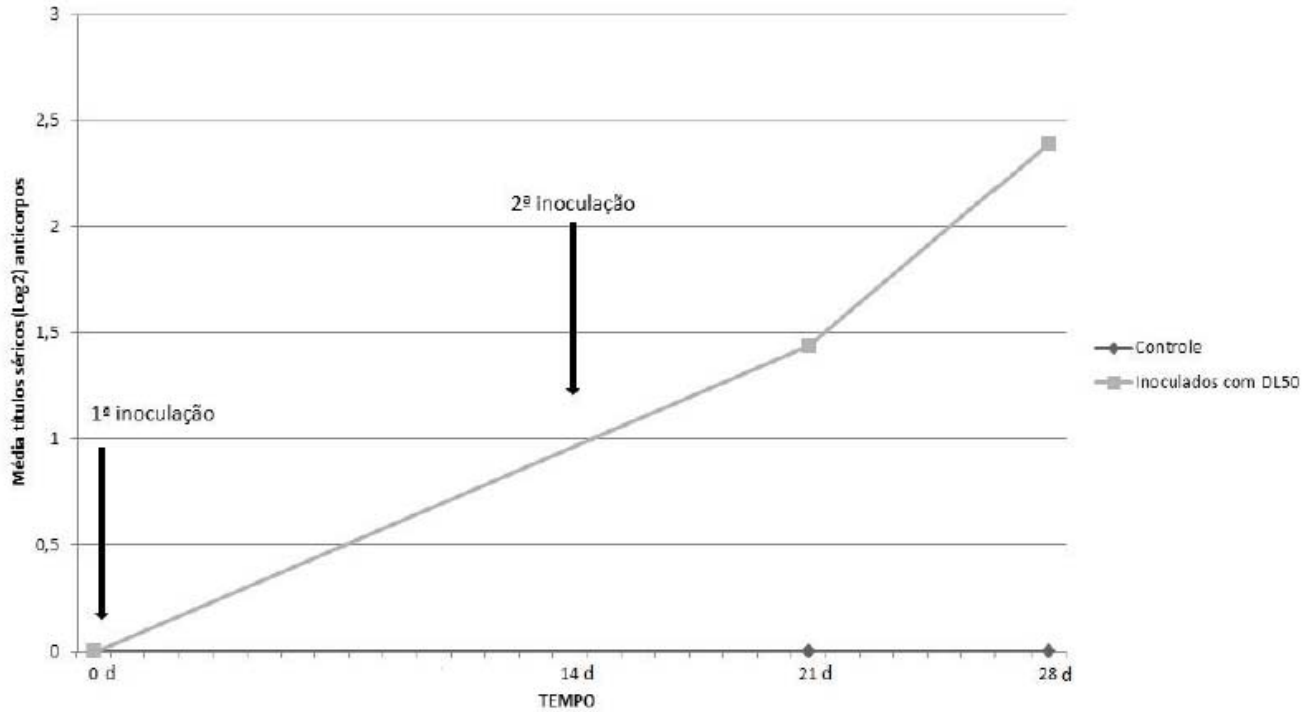


Figura 2 – Média dos títulos séricos (Log2) de anticorpos anti- *Streptococcus agalactiae* em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), inoculadas com soro- inativado e soro não-inativado contendo anticorpos anti- *S. agalactiae*.

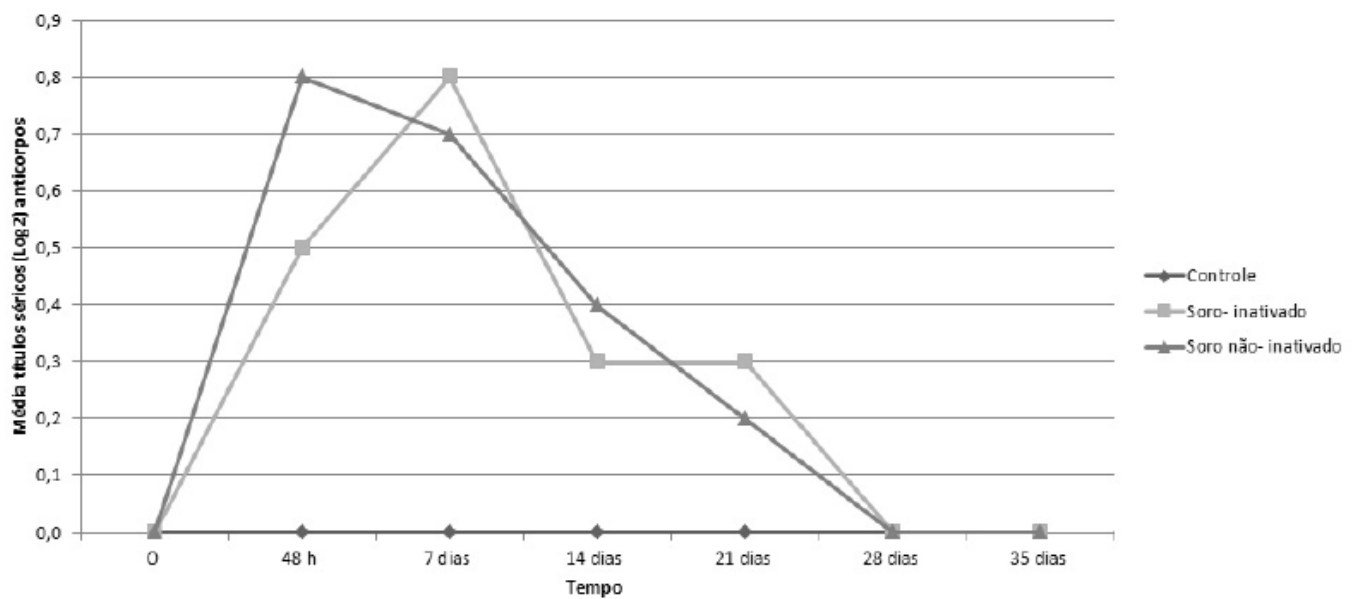
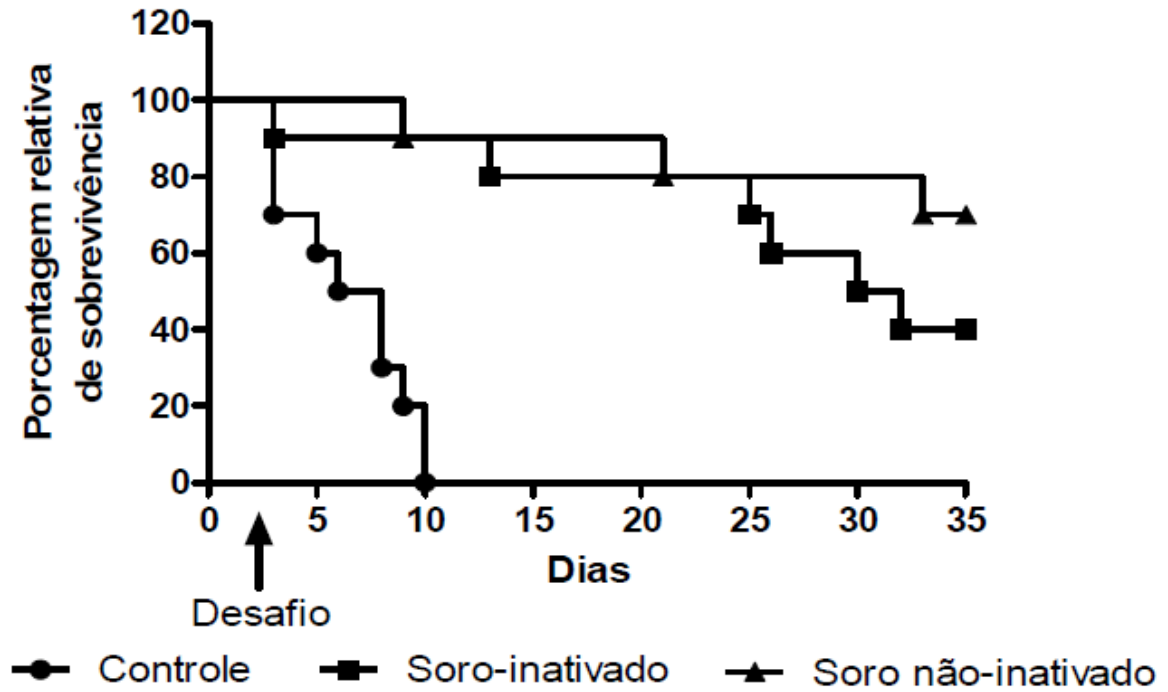


Figura 3 – Porcentagem relativa de sobrevivência em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) inoculadas com soro- inativado e soro não- inativado contendo anticorpos anti- *Streptococcus agalactiae* e desafiadas 48 horas após com DL 50 (1×10^8 UFC/mL) de *S. agalactiae*.



4 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que:

- A inoculação da DL 50 (1 x 10⁸ UFC/mL) de *S. agalactiae* em tilápias do Nilo (*O. niloticus*) foi eficiente para estimular a produção de anticorpos anti- *S. agalactiae*;
- A detecção dos títulos séricos de anticorpos anti- *S. agalactiae*, pelo teste de aglutinação direta, foi possível até o 21º dia pós- inoculação com soro- inativado e não-inativado;
- Na avaliação da porcentagem relativa de sobrevivência, a inoculação i.p. em tilápias do Nilo (*O. niloticus*) com soro anti- *S. agalactiae*- inativado e não- inativado e desafiadas com *S. agalactiae* demonstrou proteção de 40 e 70%, respectivamente, sugerindo que a imunização passiva foi eficiente na proteção imediata dos peixes.

ANEXO

ANEXO A

Normas de Publicação do Periódico Ciência Rural.



Normas para publicação

1. CIÊNCIA RURAL - Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria publica artigos científicos, revisões bibliográficas e notas referentes à área de Ciências Agrárias, que deverão ser destinados com exclusividade.

2. Os artigos científicos, revisões e notas devem ser encaminhados via [eletrônica](#) e editados em idioma Português ou Inglês. Todas as linhas deverão ser numeradas e paginadas no lado inferior direito. O trabalho deverá ser digitado em tamanho A4 210 x 297mm com, no máximo, 25 linhas por página em espaço duplo, com margens superior, inferior, esquerda e direita em 2,5cm, fonte Times New Roman e tamanho 12. **O máximo de páginas será 15 para artigo científico, 20 para revisão bibliográfica e 8 para nota, incluindo tabelas, gráficos e figuras.** Figuras, gráficos e tabelas devem ser disponibilizados ao final do texto e individualmente por página, sendo que **não poderão ultrapassar as margens e nem estar com apresentação paisagem.**

3. O artigo científico deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução com Revisão de Literatura; Material e Métodos; Resultados e Discussão; Conclusão e Referências; Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição; Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão** (Modelo [.doc](#), [.pdf](#)).

4. A revisão bibliográfica deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução; Desenvolvimento; Conclusão; e Referências. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão** (Modelo [.doc](#), [.pdf](#)).

5. A nota deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Texto (sem subdivisão, porém com introdução; metodologia; resultados e discussão e conclusão; podendo conter tabelas ou figuras); Referências. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** (Modelo [.doc](#), [.pdf](#)).

6. Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no formato pdf no endereço eletrônico da revista www.scielo.br/cr.

7. Descrever o título em português e inglês (caso o artigo seja em português) - inglês e português (caso o artigo seja em inglês). Somente a primeira letra do título do artigo deve ser maiúscula exceto no caso de nomes próprios. Evitar abreviaturas e nomes científicos no título. O nome científico só deve ser empregado quando estritamente necessário. Esses devem aparecer nas palavras-chave, resumo e demais seções quando necessários.

8. As citações dos autores, no texto, deverão ser feitas com letras maiúsculas seguidas do ano de publicação, conforme exemplos: Esses resultados estão de acordo com os reportados por MILLER & KIPLINGER (1966) e LEE et al. (1996), como uma má formação congênita (MOULTON, 1978).

9. As Referências deverão ser efetuadas no estilo ABNT (NBR 6023/2000) conforme normas próprias da revista.

9.1. Citação de livro:

JENNINGS, P.B. **The practice of large animal surgery.** Philadelphia : Saunders, 1985. 2v.

TOKARNIA, C.H. et al. (Mais de dois autores) **Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros**. Manaus : INPA, 1979. 95p.

9.2. Capítulo de livro com autoria:

GORBAMAN, A. A comparative pathology of thyroid. In: HAZARD, J.B.; SMITH, D.E. **The thyroid**. Baltimore : Williams & Wilkins, 1964. Cap.2, p.32-48.

9.3. Capítulo de livro sem autoria:

COCHRAN, W.C. The estimation of sample size. In: _____. **Sampling techniques**. 3.ed. New York : John Wiley, 1977. Cap.4, p.72-90.

TURNER, A.S.; McILWRAITH, C.W. Fluidoterapia. In: _____. **Técnicas cirúrgicas em animais de grande porte**. São Paulo : Roca, 1985. p.29-40.

9.4. Artigo completo:

O autor deverá acrescentar a url para o artigo referenciado e o número de identificação DOI (Digital Object Identifiers), conforme exemplos abaixo:

MEWIS, I.; ULRICH, CH. Action of amorphous diatomaceous earth against different stages of the stored product pests *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) and *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Stored Product Research**, Amsterdam (Cidade opcional), v.37, p.153-164, 2001. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X\(00\)00016-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X(00)00016-3)>. Acesso em: 20 nov. 2008. doi: 10.1016/S0022-474X(00)00016-3.

PINTO JUNIOR, A.R. et al (Mais de 2 autores). Resposta de *Sitophilus oryzae* (L.), *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) e *Oryzaephilus surinamensis* (L.) a diferentes concentrações de terra de diatomácea em trigo armazenado a granel. **Ciência Rural**, Santa Maria (Cidade opcional), v. 38, n. 8, p.2103-2108, nov. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 25 nov. 2008. doi: 10.1590/S0103-84782008000800002.

9.5. Resumos:

RIZZARDI, M.A.; MILGIORANÇA, M.E. Avaliação de cultivares do ensaio nacional de girassol, Passo Fundo, RS, 1991/92. In: JORNADA DE PESQUISA DA UFSM, 1., 1992, Santa Maria, RS. **Anais...** Santa Maria : Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa, 1992. V.1. 420p. p.236.

9.6. Tese, dissertação:

COSTA, J.M.B. **Estudo comparativo de algumas características digestivas entre bovinos (Charolês) e bubalinos (Jafarabad)**. 1986. 132f. Monografia/Dissertação/Tese (Especialização/ Mestrado/Doutorado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade

9.7. Boletim:

ROGIK, F.A. **Indústria da lactose**. São Paulo : Departamento de Produção Animal, 1942. 20p. (Boletim Técnico, 20).

9.8. Informação verbal:

Identificada no próprio texto logo após a informação, através da expressão entre parênteses. Exemplo: ... são achados descritos por Vieira(1991 - Informe verbal). Ao final do texto, antes das Referências Bibliográficas, citar o endereço completo do autor (incluir E-mail), e/ou local, evento, data e tipo de apresentação na qual foi emitida a informação.

9.9. Documentos eletrônicos:

MATERA, J.M. **Afecções cirúrgicas da coluna vertebral: análise sobre as possibilidades do tratamento cirúrgico**. São Paulo : Departamento de Cirurgia, FMVZ-USP, 1997. 1 CD.

GRIFON, D.M. Arthroscopic diagnosis of elbow displasia. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY CONGRESS, 31., 2006, Prague, Czech Republic. **Proceedings**. Prague: WSAVA, 2006. p.630-636. Acessado em 12 fev. 2007. Online. Disponível em: <http://www.ivos.org/proceedings/wsava/2006/lecture22/Griffon1.pdf?LA=1>

UFRGS. **Transgênicos**. Zero Hora Digital, Porto Alegre, 23 mar. 2000. Especiais. Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em: <http://www.zh.com.br/especial/index.htm>

ONGPHIPHADHANAKUL, B. Prevention of postmenopausal bone loss by low and conventional doses of calcitriol or conjugated equine estrogen. **Maturitas**, (Ireland), v.34, n.2, p.179-184, Feb 15, 2000. Obtido via base de dados MEDLINE. 1994-2000. Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em: <http://www.Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm>

MARCHIONATTI, A.; PIPPI, N.L. Análise comparativa entre duas técnicas de recuperação de úlcera de córnea não infectada em nível de estroma médio. In: SEMINARIO LATINOAMERICANO DE CIRURGIA VETERINÁRIA, 3., 1997, Corrientes, Argentina. **Anais...** Corrientes : Facultad de Ciencias Veterinarias - UNNE, 1997. Disquete. 1 disquete de 31/2. Para uso em PC.

10. Desenhos, gráficos e fotografias serão denominados figuras e terão o número de ordem em algarismos arábicos. A revista não usa a denominação quadro. As figuras devem ser disponibilizadas individualmente por página. Os desenhos figuras e gráficos (com largura de no máximo 16cm) devem ser feitos em editor gráfico sempre em qualidade máxima com pelo menos 300 dpi em extensão .tiff. As tabelas devem conter a palavra tabela, seguida do número de ordem em algarismo arábico e não devem exceder uma lauda.

11. Os conceitos e afirmações contidos nos artigos serão de inteira responsabilidade do(s) autor(es).

12. Será obrigatório o cadastro de todos autores nos metadados de submissão. O artigo não tramitará enquanto o referido item não for atendido. Excepcionalmente, mediante consulta prévia para a Comissão Editorial outro expediente poderá ser utilizado.

13. Lista de verificação (Checklist .doc, .pdf).

14. Os artigos serão publicados em ordem de aprovação.
15. Os artigos não aprovados serão arquivados havendo, no entanto, o encaminhamento de uma justificativa pelo indeferimento.
16. Em caso de dúvida, consultar artigos de fascículos já publicados antes de dirigir-se à Comissão Editorial.



Ministério da
Ciência e Tecnologia

Ministério
da Educação



Ciência Rural
Universidade Federal de Santa Maria - Centro de Ciências Rurais
Prédio 42, Sala 3104 97105-900 - Santa Maria, RS, Brasil
E-mail: cienciarural@mail.ufsm.br
Fone/Fax: (55) 32208698
Fax: (55) 32208695