



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JULIANA DELGADO MONTEIRO TAKAHAMA

**CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA E ESTUDO DE
PATOGENICIDADE DE DUAS CEPAS DE
STREPTOCOCCUS AGALACTIAE SOROTIPO III ISOLADAS
DE TILÁPIA-DO-NILO (*OREOCHROMIS NILOTICUS*)**

Londrina
2022

JULIANA DELGADO MONTEIRO TAKAHAMA

**CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA E ESTUDO DE
PATOGENICIDADE DE DUAS CEPAS DE
STREPTOCOCCUS AGALACTIAE SOROTIPO III ISOLADAS
DE TILÁPIA-DO-NILO (*OREOCHROMIS NILOTICUS*)**

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

Orientador: Prof. Dr. Laurival Antonio Vilas-Boas

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

Londrina
2022

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

Delgado Monteiro Takahama, Juliana.

Análise genômica e estudo de patogenicidade de duas cepas de *Streptococcus agalactiae* sorotipo III isoladas de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) / Juliana Delgado Monteiro Takahama. - Londrina, 2022.
91 f. : il.

Orientador: Laurival Antonio Vilas-Boas.

Coorientador: Lucienne Garcia Pretto-Giordano.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2022.

Inclui bibliografia.

1. *Streptococcus agalactiae* III - Tese. 2. Genoma - Tese. 3. Sequenciamento - Tese. 4. Tilápia-do-Nilo - Tese. I. Antonio Vilas-Boas, Laurival. II. Garcia Pretto-Giordano, Lucienne. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. IV. Título.

CDU 575.1

JULIANA DELGADO MONTEIRO TAKAHAMA

**CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA E ESTUDO DE PATOGENICIDADE
DE DUAS CEPAS DE *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE*
SOROTIPO III ISOLADAS DE TILÁPIA-DO-NILO (*OREOCHROMIS
NILOTICUS*)**

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

Prof. Dr. Laurival Antonio Vilas-Boas
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a. Dr^a. Elisete Pains Rodrigues
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Fernando Gomes Barcellos
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 19 de abril de 2022.

AGRADECIMENTOS

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.

Aos orientadores Prof. Dr. Laurival Antônio Vilas-Boas e Prof^a Dr^a. Lucienne Garcia Pretto-Giordano, pela oportunidade, confiança depositada, ensinamentos, dedicação e competência.

A Prof^a. Dr^a. Nilza Maria Diniz, pela amizade, confiança e incentivo.

A coordenação do programa de pós-graduação do programa de Genética e Biologia Molecular da UEL, Prof^a. Dr^a. Fernanda S. Almeida, Prof. Dr. André L. L. Vanzela e Prof^a. Dr^a. Gislayne Fernandes Trindade Vilas-Boas pela colaboração e apoio.

Aos colegas do Laboratório de Genética e Taxonomia de Bactérias da UEL, Priscilla Cardoso, Kátia Brumatti, Renan Appel, João Paulino, Karine Siqueira e Juliane Ribeiro pelos ensinamentos e valiosa ajuda nos experimentos.

A Patricia Pereira pelo suporte nos cálculos estatísticos.

Aos alunos de iniciação científica, Roberta Baldo, Luciano Carvalho, Bruna Silva, Felipe Raggi e Nicolas Polidorio pelos ensinamentos no manejo dos peixes e colaboração nos experimentos.

Aos colegas do mestrado Amanda, Hector, Jeferson, Nayane, Samantha, Santino, Tafarel, Talita, Larissa e em especial a amiga Kátia dos Santos pelo apoio, suporte e incentivo.

A todos do Laboratório de Microbiologia do Hospital Veterinário da UEL.

As pisciculturas que atenciosamente cederam os peixes para este estudo.

A minha família, meus pais Joveniano e Dora, meu marido Ademar, meus filhos Natália e César e Lola pela compreensão, ajuda e carinho.

Dedicatória

Aos meus filhos Natália e César

“Que ninguém se engane, só se consegue a simplicidade

através de muito trabalho.”

Clarice Lispector

TAKAHAMA, Juliana Delgado Monteiro. **Caracterização genômica e estudo de patogenicidade de duas cepas de *Streptococcus agalactiae* sorotipo III isoladas de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2022. 91f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular e Genética) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

RESUMO

A piscicultura é um segmento da aquicultura em expansão mundial e a tilápia é o peixe mais cultivado no mundo. Devido as características do manejo, a tilápia pode ser acometida pelo *Streptococcus agalactiae* - uma bactéria que induz sérios danos aos peixes, pode ser transmitida aos seres humanos e levar à septicemia e morte. Este trabalho tem como objetivo descrever a caracterização genética e a patogenicidade de duas cepas de *S. agalactiae* sorotipo III isoladas de tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) cultivadas no Brasil através de sequenciamento, montagem e comparação do genoma, identificando e relacionando a patogenicidade das duas cepas apresentando a DL50. A recuperação das bactérias foi realizada através da inoculação das cepas de *S. agalactiae* sorotipo Ib, *S. agalactiae* sorotipo III cepas Maranhão e Recife em juvenis de tilápia-do-Nilo. Após sua recuperação, foi realizada a inoculação dessas cepas em juvenis de tilápias-do-Nilo em diferentes concentrações com repetições em triplicata para observação dos sinais clínicos de estreptococose e avaliação do índice de mortalidade para determinar a dose letal 50. A inoculação nos peixes com as cepas recuperadas de *S. agalactiae* sorotipo Ib causou 83,4% de morte com a terceira concentração bacteriana inoculada em quatorze dias de observação. A concentração da DL50 para esse estudo foi de $1,1 \times 10^6$ UFC/mL. A cepa de *S. agalactiae* sorotipo III Maranhão recuperada causou 56,7% de morte com a menor concentração bacteriana inoculada em quatorze dias de observação. A concentração da DL50 para esse estudo foi de $1,5 \times 10^5$ UFC/mL. A cepa de *S. agalactiae* sorotipo III Recife recuperada causou 90% de morte no aquário com maior concentração bacteriana inoculada. A concentração da DL50 para esse estudo foi de $1,1 \times 10^6$ UFC/mL. Os principais sinais de estreptococose encontrados foram: escurecimento corporal, distensão abdominal, exoftalmia uni e bilateral, opacidade córnea e natação errática. O isolamento e detecção do *S. agalactiae* foi realizado através da técnica microbiológica de swabs do encéfalo e rim, semeado em ágar sangue e incubado a 30° C por 48h para observação da morfologia das colônias e as características hemolíticas. A análise genômica das duas cepas de *S. agalactiae* sorotipo III revelou um perfil semelhante entre ambas. A busca dos genes de virulência revelou a cobertura de 100% em dez genes presentes nas cepas de *S. agalactiae* Recife e Maranhão e em treze genes da cepa de *S. agalactiae* Ib. Diferentemente, em comparação com os genes alvo, o gene *rib* apontou 16% de cobertura e 74% de similaridade na cepa Maranhão, 15% de cobertura e 74% de similaridade na cepa Recife. O gene *bac* apresentou 51% de cobertura e 98% de similaridade nas cepas Maranhão e Recife. A cepa Ib apresentou 19% de cobertura e 74% de similaridade com o gene alvo do gene *rib*. Portanto, por ser uma cepa recentemente encontrada em tilapiculturas no Brasil, sugerimos aprofundar os estudos do *S. agalactiae* sorotipo III para diminuir as perdas econômicas e aumentar a segurança sanitária.

Palavras-chave: *Streptococcus agalactiae*, tilápia, genoma, sequenciamento, patogenicidade

TAKAHAMA, Juliana Delgado Monteiro. **Genomic characterization and pathogenicity study of two strains of *Streptococcus agalactiae* serotype III isolated from Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)**. 2022. 91f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular e Genética) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

ABSTRACT

Fish farming is a growing segment of aquaculture worldwide and tilapia is the most farmed fish in the world. Due to the management characteristics, tilapia can be affected by *Streptococcus agalactiae* - a bacterium that induces serious damage to fish, can be transmitted to humans and lead to septicemia and death. This work aims to describe a genetic genetics and pathogenicity of strains of *S. agalactiae* serotype III isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultivated in Brazil through sequencing, assembly and characterization, identification and comparison of the pathogenicity of the two strains delivering a LD50. Bacteria recovery was performed by inoculation of *S. agalactiae* serotype Ib, *S. agalactiae* serotype III strains Maranhão and Recife strains in Nile tilapia juveniles. After that, an inoculation of this recovery was performed in juveniles of the observation strain, as a repetition in triplicate of different strains and with repetition in triplicate of the strain of clinical signs, evaluation of the mortality rate to determine a lethal dose 50. Inoculation in fish with recovered strains of *S. agalactiae* serotype Ib caused 83.4% of death with the third bacterial concentration inoculated in fourteen days of observation. The LD50 concentration for this study was 1.1×10^6 CFU/mL. The recovered *S. agalactiae* serotype III Maranhão strain caused 56.7% of death with the lowest bacterial concentration inoculated in fourteen days of observation. The LD50 concentration for this study was 1.5×10^5 CFU/mL. The recovered strain of *S. agalactiae* serotype III Recife caused 90% of death in the aquarium with the highest bacterial concentration inoculated. The LD50 concentration for this study was 1.1×10^6 CFU/mL. The main signs of streptococcosis found were: body darkening, abdominal distension, uni and bilateral exophthalmos, corneal opacity and erratic swimming. The isolation and detection of *S. agalactiae* was performed using the microbiological technique of brain and kidney swabs, seeded on blood agar and incubated at 30°C for 48 hours to observe the morphology of the colonies and the hemolytic characteristics. The genomic analysis of the two strains of *S. agalactiae* serotype III revealed a similar profile between them. The search for virulence genes revealed 100% coverage in ten genes present in *S. agalactiae* Recife and Maranhão strains and in thirteen genes in the *S. agalactiae* Ib strain. Differently, in comparison with the target genes, the *rib* gene showed 16% coverage and 74% similarity in the Maranhão strain, 15% coverage and 74% similarity in the Recife strain. The *bac* gene showed 51% coverage and 98% similarity in the Maranhão and Recife strains. The Ib strain showed 19% coverage and 74% similarity with the target gene of the *rib* gene. Therefore, as it is a strain recently found in Brazilian tilapia farms, we suggest further studies of *S. agalactiae* serotype III to reduce economic losses and increase health security.

Key-words: *Streptococcus agalactiae*, tilapia, genome, sequencing, pathogenicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Aclimação dos juvenis de tilápia-do-Nilo.....	49
Figura 2 –	Abertura dos peixes para coleta de <i>S. agalactiae</i> através da técnica de swab.....	50
Figura 3 –	Contagem de colônias de <i>S. agalactiae</i> sorotipo III cepa Recife através da técnica de gotejamento.....	52
Figura 4 –	Experimentos.....	52
Figura 5 –	Placa de ágar-sangue com crescimento das colônias de <i>S. agalactiae</i> sorotipo III recuperadas dos peixes.....	55
Figura 6 –	Sinais clínicos observados em peixes infectados com <i>S. agalactiae</i> sorotipo Ib cepa E8 no experimento de coabitação.....	56
Figura 7 –	Tilápia-do-Nilo com sinal de estreptococose provocada pelo <i>S. agalactiae</i> sorotipo Ib cepa E8: escurecimento corporal, exoftalmia bilateral e opacidade córnea.....	61
Figura 8 –	Tilápia-do-Nilo com sinal de estreptococose provocada pelo <i>S. agalactiae</i> sorotipo III cepa Maranhão: natação errática.....	64
Figura 9 –	Tilápia-do-Nilo com sinal de estreptococose provocada pelo <i>S. agalactiae</i> sorotipo III cepa Recife: exoftalmia e opacidade córnea.....	66

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 -** Genoma de *S. agalactiae* sorotipo III cepa Recife..... 69
- Gráfico 2 -** Genoma de *S. agalactiae* sorotipo III cepa Maranhão..... 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Principais fatores de virulência descritos para <i>Streptococcus agalactiae</i>	42
Tabela 2 –	Mortalidade dos peixes após a inoculação para reativação da patogenicidade bacteriana.....	55
Tabela 3 –	Mortalidade dos peixes após o experimento de coabitação.....	56
Tabela 4 –	Mortalidade dos peixes após a primeira inoculação com cepas recuperadas.....	57
Tabela 5 –	Mortalidade dos peixes após a primeira inoculação com diferentes diluições de <i>S. agalactiae</i> sorotipo IB cepa E8 recuperada.....	59
Tabela 6 –	Mortalidade dos peixes após repetição da inoculação com diferentes diluições de <i>S. agalactiae</i> sorotipo Ib cepa E8, de acordo com o dia e a concentração.....	61
Tabela 7 –	Mortalidade dos peixes inoculados com <i>S. agalactiae</i> sorotipo III cepa Maranhão de acordo com o dia e a concentração.....	64
Tabela 8 –	Mortalidade dos peixes inoculados com <i>S. agalactiae</i> sorotipo III cepa Recife de acordo com o dia e a concentração.....	67
Tabela 9 –	Comparação da caracterização do perfil genômico de <i>S. agalactiae</i> sorotipo III cepas Recife e Maranhão.....	68

Tabela 10 –	Dados de sequências do Genbank para os genes de virulência descritos na literatura para <i>S. agalactiae</i> sorotipo Ib e III.....	70
Tabela 11 –	Similaridade e cobertura dos genes alvo de virulência da cepa de <i>S. agalactiae</i> sorotipo III Maranhão	71
Tabela 12 –	Similaridade e cobertura dos genes alvo de virulência da cepa de <i>S. agalactiae</i> sorotipo III Recife	71
Tabela 13 –	Similaridade e cobertura dos genes alvo de virulência da cepa de <i>S. agalactiae</i> sorotipo Ib E8.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>et al.</i>	E colaboradores
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
°C	Graus Celsius
°F	Graus Fahrenheit
NCBI	National Center for Biotechnology Information
RAST	Rapid Annotation using Subsystem Technology
sp	Espécie
UEL	Universidade Estadual de Londrina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	20
2.1	AQUICULTURA.....	20
2.2	SISTEMAS DE CULTIVO.....	21
2.2.1	Tanque Escavado.....	21
2.2.2	Tanques-Rede.....	23
2.3	A TILÁPIA-DO-NILO (<i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i>).....	25
2.4	CULTIVO DA TILÁPIA NO BRASIL E NO MUNDO.....	26
2.5	DOENÇAS NO CULTIVO DA TILÁPIA.....	28
2.5.1	Bacterioses.....	29
2.5.1.1	Estreptococose.....	30
2.5.1.1.1	<i>Streptococcus iniae</i>	32
2.5.1.1.2	<i>Streptococcus agalactiae</i>	33
2.6	CONTROLE DA DOENÇA.....	36
2.7	ESTUDO DO GENOMA DE <i>STREPTOCOCCUS AGALACTIAE</i>	39
2.8	ESTUDO DE PATOGENICIDADE DE <i>STREPTOCOCCUS AGALACTIAE</i>	40
2.8.1	Fatores de Virulência.....	41
2.8.1.1	Fatores de Virulência Descritos para <i>S. agalactiae</i>	43
3	OBJETIVOS.....	47
3.1	OBJETIVOS GERAIS.....	47
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	47
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	48
4.1	RECUPERAÇÃO DA PATOGENICIDADE BACTERIANA.....	48
4.1.1	Inoculação das Cepas para Recuperação da Patogenicidade.	48

4.1.2	Coabitação com Peixes Previamente Inoculados.....	49
4.2	TESTES DE PATOGENICIDADE.....	50
4.2.1	Linhagens e Condições de Cultivo.....	50
4.2.2	Detecção de <i>S. agalactiae</i> nos Testes de Patogenicidade.....	51
4.2.3	Infecção de Juvenis de Tilápia-do-Nilo.....	51
4.3	CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DO <i>STREPTOCOCCUS AGALACTIAE</i>	52
5	RESULTADOS	54
5.1	REATIVAÇÃO DA PATOGENICIDADE BACTERIANA	54
5.2	EXPERIMENTO DE COABITAÇÃO.....	55
5.3	PRIMEIRA INOCULAÇÃO DAS CEPAS RECUPERADAS.....	56
5.4	INOCULAÇÃO COM DIFERENTES DILUIÇÕES – CEPA IB.....	57
5.5	INOCULAÇÃO COM DIFERENTES DILUIÇÕES – CEPA MARANHÃO.....	61
5.6	INOCULAÇÃO COM DIFERENTES DILUIÇÕES – CEPA RECIFE.....	64
5.7	COMPARAÇÃO GENÔMICA.....	67
6	DISCUSSÃO	73
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	80
	REFERÊNCIAS	81

1 1 INTRODUÇÃO

2 A piscicultura é um segmento da aquicultura que tem apresentado um
3 crescimento mundial expressivo nos últimos anos. Na produção de pescado, a tilápia
4 é o peixe mais cultivado no mundo e o Brasil ocupa o 4º lugar na produção mundial.
5 O cultivo nacional da tilápia é realizado em sua maioria em tanques-rede e neste
6 sistema de criação, de acordo com Onaka (2009) e Pavanelli *et al.* (2008), devido as
7 características do seu manejo (como densidade de animais, intensidade de
8 arraçoamento e local de cultivo), os peixes podem ter a sua homeostase alterada,
9 tornando-se propensos ao acometimento de micro-organismos patogênicos. Como
10 apontam Salvador *et al.* (2005) e Park *et al.* (2009) as doenças de origem bacteriana
11 são as responsáveis por provocar os maiores danos na piscicultura, onde destacam-
12 se as estreptococoses, mais comumente causada pelo *Streptococcus agalactiae*.

13 O *Streptococcus agalactiae* é uma bactéria que apresenta sorotipos
14 diversos que induz sérios danos aos peixes e que pode, inclusive, ser transmitida aos
15 seres humanos, ocasionando graves danos à saúde, podendo levar à septicemia e
16 morte. No Brasil, de acordo com Mian *et al.* (2009) os sorotipos Ib e III estão presentes
17 nos cultivos intensivos de tilápia, sendo a espécie tilápia-do-Nilo (*Oreochromis*
18 *niloticus*) a principal hospedeira desse patógeno (BARONY *et al.*, 2017). Em surtos,
19 *S. agalactiae* é transmitido rapidamente a todos os peixes do local do cultivo,
20 resultando em consideráveis perdas econômicas. De acordo com Serrano (2005) e
21 Swain *et al.* (2002) para o controle dos patógenos são utilizados diversos agentes
22 químicos, incluindo antibióticos, que muitas vezes são empregados de modo
23 indiscriminado. Este uso descontrolado pode causar danos severos ao meio ambiente
24 além de promover a seleção de cepas bacterianas resistentes, implicando em risco à
25 saúde pública. Atualmente, o controle mais eficiente dessa doença é realizado através
26 da vacinação por via visceral dos juvenis, exclusiva para cada sorotipo do *S.*
27 *agalactiae*; portanto o desenvolvimento de vacinas com maior especificidade para
28 cada sorotipo que esteja acometendo o cultivo torna-se essencial.

29 Baseado na importância comercial da tilápia e considerando o
30 interesse sanitário no controle desta bactéria é primordial que se qualifique e melhor
31 compreenda a patogenicidade, além de se caracterizar aspectos genéticos do *S.*
32 *agalactiae* sorotipo III causador dessa patologia no cultivo. A caracterização genômica
33 e o teste de patogenicidade são essenciais para que, em breve, possam ser

34 desenvolvidas vacinas específicas que apresentem maior efetividade e atuem frente
35 ao patógeno específico, reduzindo as perdas comerciais e prevenindo a sua
36 disseminação para os seres humanos.

37 Através desse estudo obtivemos a caracterização genética de duas
38 cepas de *S. agalactiae* sorotipo III isoladas de surtos no Brasil (cepa Recife e cepa
39 Maranhão) e caracterizamos perfil de patogenicidade destas cepas frente a juvenis de
40 tilápia-do-Nilo, permitindo a associação dos perfis genômicos e de patogenicidade.
41 Estes resultados estabelecerão as bases para uma melhor compreensão do processo
42 de patogenicidade frente a tilápia-do-Nilo nas condições estudadas, fornecendo bases
43 para o desenvolvimento de uma vacina anti-estreptocócica específica para o sorotipo
44 III de *S. agalactiae*.

45 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

46 2.1 AQUICULTURA

47

48 A aquicultura é definida como o cultivo de espécies cujo
49 desenvolvimento ocorre em água salgada ou doce; abrange peixes, moluscos e
50 crustáceos. Iniciou-se na Ásia e atualmente é praticada em todos os continentes nos
51 mais variados ambientes aquáticos. De acordo com a FAO (Organização das Nações
52 Unidas para a Alimentação e a Agricultura, 2020) o pescado hoje representa 30%
53 do consumo mundial anual de proteína animal, contra 23% dos suínos, 23% dos
54 frangos, 13% dos bovinos e 11% de outras proteínas. Para Telles (2013) este setor
55 tem gerado um importante crescimento na economia global, pois proporciona a
56 geração de empregos, diminuição da pobreza além de maior oferta de alimentos
57 nutritivos e de relativo baixo custo para a população. Ressalta-se o significativo valor
58 nutricional do pescado, com quantidades expressivas de proteínas, vitaminas e
59 minerais, características estas que o tornam uma alternativa saudável em relação aos
60 outros tipos de carnes. A produção mundial de peixes de criação já superou a
61 produção de carne bovina. Em 2021, de acordo com a Sociedade Brasileira de
62 Piscicultura a produção da piscicultura atingiu 179 milhões toneladas, em comparação
63 com a produção de carne bovina de 63 milhões de toneladas.

64 A piscicultura é o cultivo de peixes, especialmente em água doce e é
65 considerada um importante segmento de produção animal mundial. Atualmente o
66 fornecimento de produtos da pesca e aquicultura abastece mais de 4,3 bilhões de
67 pessoas, o que equivale a 15% de toda proteína animal consumida no planeta. De
68 acordo com Larsen e Matthew (2012) a aquicultura tem apresentado um crescimento
69 expressivo devido à limitação dos estoques pesqueiros, causada pela pesca
70 extrativista. Segundo Conte (2004) desde o início dos anos 1990, a piscicultura tem
71 apresentado um crescente desenvolvimento no Brasil, sendo o país, então,
72 classificado mundialmente como uma importante indústria de produção aquícola.
73 Segundo a Sociedade Brasileira de Piscicultura (2021), o Brasil produziu 802.930
74 toneladas de peixes de cultivo em 2020 com crescimento de 5,93% sobre as 758.006
75 toneladas do ano anterior (2019). O desempenho da tilápia foi o melhor entre todas
76 as espécies de peixes de cultivo. A produção alcançou 486.155 toneladas em 2020,
77 representando um aumento de expressivos 12,5% em relação ao ano anterior

78 (432.149 toneladas em 2019). Este crescimento é justificado, segundo Bozano (2002)
79 e Kubitzka (2003), pelas condições propícias ao cultivo, como clima tropical favorável,
80 profusão de áreas, além de favorecer outros segmentos da cadeia produtiva, entre
81 eles as safras de grãos abundantes fornecedoras de matérias primas para rações
82 animais que são empregadas no cultivo (como soja, milho, trigo, entre outros).

83 Ressalta-se ainda o potencial hídrico brasileiro, com a existência de
84 estuários, rios, grandes reservatórios e lagos naturais, características significativas
85 que favorecem o emprego da piscicultura no sistema de tanques-rede, além da
86 presença de extensas áreas de terra propícias para a construção de viveiros para o
87 sistema de cultivo em tanque escavado. Devido a todas as características citadas, o
88 Brasil pode ser considerado um promissor produtor mundial de pescado (KUBITZA,
89 2003 e ROUBACH *et al.* 2003).

90

91 2.2 SISTEMAS DE CULTIVO

92

93 2.2.1 Tanque Escavado

94

95 A criação de tilápias em tanque escavado é um sistema semi-intensivo
96 de produção que apresenta características específicas no que se refere a sua
97 implantação e manutenção. A área a ser empregada deve possuir características
98 específicas como ser preferencialmente plana e conter um teor ideal de argila no solo
99 para evitar a perda de água (Sansuy, 2000).

100 A água utilizada nos tanques escavados deve apresentar uma boa
101 qualidade, livre de contaminações com produtos químicos e ser renovada sempre que
102 necessário, repondo as perdas por evaporação e infiltração. A utilização de filtros no
103 mecanismo de abastecimento é essencial para evitar a entrada de outros peixes e
104 demais organismos prejudiciais à criação. Outro ponto significativo a ser observado é
105 a temperatura da água. As tilápias apresentam conforto térmico entre 26 e 28°C e em
106 temperaturas fora desse limite os peixes apresentam redução no metabolismo,
107 diminuição do apetite e do crescimento e queda na resposta imunológica. Apesar de
108 possuírem uma certa tolerância a limitação de oxigênio na água, é necessário que
109 seus níveis sejam mantidos constantes para evitar situações que provoquem estresse
110 nos animais, fato que aumenta as chances de desenvolverem doenças devido a
111 depressão do seu sistema imunológico (Sansuy, 2000).

112 Os tanques-escavados devem possuir um solo com alcalinidade ideal
113 para melhorar a produtividade do viveiro. O processo de colocação de calcário ou cal
114 nos viveiros é denominada de calagem e pode ser feita com os tanques secos ou
115 aplicado diretamente na água. A calagem tem a função de efeito tampão nas
116 oscilações do pH da água causada pela atividade fotossintética excessiva do
117 fitoplâncton (Sansuy, 2000). Segundo Kubitza (2009) a correta manutenção do
118 plâncton e a presença de outros alimentos naturais contribuem com o ganho de peso
119 das tilápias, além de promover a oxigenação a água dos tanques, remove a amônia e
120 impede o desenvolvimento de plantas aquáticas submersas.

121 A concentração de amônia no viveiro deve ser verificada
122 constantemente pois ela é um fator determinante da mortalidade dos peixes.
123 (KUBITZA, 2009). A amônia é um composto resultante da excreção nitrogenada dos
124 peixes e da decomposição do material orgânico presente no viveiro. Sua forma não
125 ionizada é tóxica para as tilápias, uma vez que ela é responsável pelo aumento do pH
126 da água, portanto deve ser rigorosamente controlada. Esse controle é realizado
127 através do equilíbrio do arraçoamento, troca de água constante e monitoramento do
128 pH. Por fim, o povoamento ideal do tanque escavado é feito com dois a três alevinos
129 por metro quadrado de lâmina d'água, considerando as características desse sistema
130 de criação (EMBRAPA, 2009).

131 Em comparação aos demais sistemas intensivos de criação, os
132 tanques escavados apresentam de maneira geral um menor custo de produção, além
133 de apresentar diversas vantagens como maior durabilidade, resistência a variações
134 térmicas, é um sistema de fácil manutenção pois além de conseguir reproduzir o
135 ambiente natural dos peixes, é muito semelhante a um lago artificial (Sansuy 2020).
136 Kubitza (2009) enfatiza que a produtividade do cultivo é aumentada com a utilização
137 de rações de alta qualidade, pois esta traz inúmeros benefícios tanto para a saúde
138 dos peixes como para a manutenção da qualidade da água.

139 Como desvantagens esse sistema de cultivo demanda um maior
140 investimento inicial para construção dos tanques escavados, além de necessitar de
141 uma manutenção constante para verificar as condições de cultivo (níveis de
142 compostos tóxicos). Destaca-se também o alto custo para o fornecimento de uma
143 alimentação de boa qualidade, com nutrientes balanceados visto que os peixes do
144 viveiro dependem exclusivamente desse meio de subsistência. Os peixes cultivados
145 em tanques escavados podem apresentar uma complicação denominada *off-flavor*,

146 que é caracterizada como um desagradável sabor de terra adquirido em decorrência
147 da ação de microrganismos que se desenvolvem devido ao alto arraçoamento e
148 estocagens inadequadas ou prolongadas no cultivo, além da eutrofização da água,
149 causando essa piora da sua da qualidade (KUBITZA, 2009).

150 Outra adversidade encontrada no cultivo em tanques escavados é a
151 infecção dos peixes por microrganismos patogênicos. Segundo Kubitza (2009) um dos
152 fatores que podem favorecem essa infecção é o procedimento de despesca realizado
153 de modo incorreto ou repetidas vezes, pois o movimento da água promove a
154 suspensão da argila e dos materiais orgânicos presentes no viveiro, causando
155 inflamações nas brânquias dos peixes, situação que facilita o acometimento por
156 patógenos.

157

158 2.2.2 Tanques-Rede

159

160 De acordo com Ono e Kubitza (1999) os tanques-rede são estruturas
161 flutuantes desenvolvidas para o cultivo intensivo de peixes; produzidas com metal,
162 madeira ou plástico onde são fixadas redes ou telas que permitem a circulação de
163 água no seu interior e comportam uma grande densidade de peixes. O cultivo de
164 peixes em tanques-rede é classificado como intensivo, pois aplica-se tecnologia
165 avançada, utiliza-se uma alta densidade de peixes e o manejo alimentar é
166 rigorosamente controlado de forma a suprir as necessidades nutricionais das espécies
167 cultivadas (EMBRAPA, 2009) alcançando, dessa maneira, uma alta produtividade
168 (BEVERIDGE *et al.*, 2004). No sistema de cultivo em tanques-rede a qualidade da
169 água se mantém pois é continuamente renovada e há uma menor variação dos
170 parâmetros físico-químicos; os peixes confinados ficam protegidos do ataque de
171 animais predadores e competidores, além de receberem a quantidade ideal de
172 alimento e facilitando o manejo e os procedimentos de despesca (EMBRAPA, 2009).

173 Para Zamboni Filho *et al.* (2005) a produção intensiva de peixes em
174 tanques-rede é atualmente uma das formas de cultivo mais utilizadas no Brasil e
175 demais países praticantes da aquicultura, visto que apresentam vantagens em
176 comparação aos demais sistemas de produção como baixo custo de implantação e
177 manutenção. O aproveitamento de águas de represas, rios e lagos reduzem
178 investimento inicial em torno de 70 % em comparação aos tanques escavados, evitam
179 o desmatamento e movimentação de terra, reprimindo problemas de erosão e

180 assoreamento de lagos e rios. O manejo dos peixes é facilitado, sendo uma excelente
181 alternativa para a produção em corpos d'água onde a prática da piscicultura
182 convencional não é viável (SCHMITTOU, 1993). Como resultado, obtêm-se um
183 produto de qualidade, com baixa incidência de *off-flavor*, além de possibilitar a
184 produção durante todos os meses do ano (EMBRAPA, 2009).

185 A seleção do local para instalação dos tanques-rede é fundamental
186 para o sucesso da produtividade. A qualidade da água é um fator importante para
187 garantir um ambiente saudável para o crescimento e desenvolvimento dos peixes do
188 cultivo. Agentes poluidores como detergentes, subprodutos agrícolas, esgotos
189 domésticos, resíduos industriais, gases, metais, óleos dispersantes e restos tóxicos
190 orgânicos podem influenciar negativamente no cultivo. Desse modo é importante que
191 a instalação dos tanques-rede em locais passíveis de poluição seja evitada
192 (EMBRAPA, 2009).

193 No cultivo em tanques-rede os peixes são totalmente dependentes do
194 sistema, por isso, algumas desvantagens a serem consideradas são: risco de
195 rompimento das redes e consequente perda dos animais e a alimentação dos peixes
196 depende exclusivamente de ração de qualidade e adequada às exigências nutricionais
197 da espécie cultivada. Como é um sistema implantado em águas livres, pode ser difícil
198 a correção da sua qualidade, como índices de salinidade e pH. O fluxo constante de
199 águas através das redes pode causar a incrustação de organismos nas malhas e telas
200 dos tanques-rede, fenômeno conhecido como colmatação. Esse processo constitui
201 um dos maiores problemas nesse sistema de cultivo, pois a obstrução das telas
202 diminui a passagem de água e a sua renovação, reduz sua qualidade e permite o
203 aumento de microrganismos patogênicos que podem atacar os peixes do cultivo. Por
204 isso a manutenção e limpeza dos tanques é fundamental (EMBRAPA, 2009).

205 De acordo com Barcellos (2004) é importante ressaltar o surgimento
206 de doenças devido ao maior estresse a que são submetidos os animais e que podem
207 se dispersar rapidamente em alto adensamento de cultivo. Ressalta-se também a
208 possibilidade de haver a introdução destes microrganismos patogênicos no ambiente,
209 causando danos à população natural. Portanto, apesar dos tanques rede
210 apresentarem algumas desvantagens, este demonstra ser mais vantajoso
211 comparando-se com os demais sistemas de criação e é preferencialmente escolhido
212 pelos produtores de pescado em território nacional (EMBRAPA, 2009).

213

214 2.3 Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*)

215

216 A tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma espécie pertencente à
217 família *Cichlidae*, nativa da bacia do rio Nilo no Leste do continente africano e
218 atualmente está presente em regiões tropicais e subtropicais (CARVALHO, 2006).
219 Segundo a Sociedade Nacional de Agricultura (2019) há registros históricos que
220 demonstram que a tilápia era cultivada pelos egípcios desde 4000 a.C., era uma
221 espécie de fácil manejo, resistente a doenças e alimento de sabor agradável, muito
222 apreciado em festas egípcias e romanas.

223 De acordo com Coward e Bromage (2000), Lèveque (2002) e
224 Boscardin (2008) a tilápia para cultivo está presente todos os continentes do planeta,
225 em mais de 100 países diferentes. Em comparação aos peixes de água doce, a tilápia
226 foi a espécie que apresentou uma maior migração entre os continentes, tendo de se
227 adaptar aos diversos habitats com temperaturas, altitudes e longitudes variadas,
228 superar ambientes aquáticos poluídos, contaminados e de diferentes salinidades
229 (Sociedade Nacional de Agricultura, 2019).

230 De acordo com Kubitzka (2000) a tilápia-do-Nilo é uma espécie tropical
231 adaptada a viver em águas rasas (rios, lagos, lagoas, lagoas, represas, açudes e
232 reservatórios) com temperatura ideal entre 27 e 32°C, alimenta-se de fitoplâncton,
233 perifíton, plantas aquáticas, pequenos invertebrados, organismos bentônicos, detritos
234 e filmes bacterianos. A tilápia é um peixe ovíparo, prolífico, reproduz-se até 6 vezes
235 ao ano e sua expectativa de vida é de aproximadamente 10 anos. A maturidade sexual
236 ocorre entre 06 e 12 meses, variando entre espécies e fatores ambientais. Os machos
237 apresentam características anatômicas fenotípicas visíveis e são maiores do que as
238 fêmeas. A reprodução ocorre em períodos de temperatura mais elevada, onde a
239 fêmea incuba os ovos na boca até a completa absorção do saco vitelínico. Sendo
240 assim, o número de ovos por desova é pequeno. Neste período, a fêmea alimenta-se
241 pouco. Em temperaturas mais frias, a reprodução é diminuída (Sociedade Nacional
242 de Agricultura, 2019).

243 Atualmente existem aproximadamente cem espécies e subespécies
244 de tilápias no Brasil. As espécies mais estudadas em razão de suas características
245 genéticas e zootécnicas desejáveis para o sistema de cultivo intensivo são: tilápia-do-
246 Nilo (*Oreochromis niloticus*), tilápia de Moçambique (*Oreochromis mossambicus*),
247 tilápia Azul (*Oreochromis aureus*), tilápia Rendalli (*Coptodon rendallie*) e tilápia de

248 Zanzibar (*Sarotherodon hornorum*) (Sociedade Nacional de Agricultura, 2019). De
249 acordo com Fitzsimmons (2000) a tilápia-do-Nilo possui características que a torna
250 uma espécie ideal para o cultivo em tanques, como ser facilmente adaptável, tolera
251 altas densidades de estocagem, adapta-se a utilização de rações comerciais com
252 baixas quantidades de proteínas (comparando-se com a alimentação ofertada a
253 peixes carnívoros) reduzindo, deste modo, os custos da produção. A tilápia é um peixe
254 de alto potencial de aceitação mercadológica e conseqüentemente sua produção tem
255 aumentado gradativamente com o passar dos anos.

256 2.4 CULTIVO DE TILÁPIA NO BRASIL E NO MUNDO

257 O principal peixe de cultivo no mundo é a tilápia. De acordo com
258 Oliveira *et al.* (2007) a introdução dessa espécie no Brasil ocorreu em 1971 com
259 exemplares vindos da Costa do Marfim, país da África Ocidental, através do
260 Departamento Nacional de Obras Contra a Seca (DNOCS) na região Nordeste com a
261 finalidade de povoar os açudes e assim promover a produção de alimentos,
262 principalmente para essa região. Em 1996, o Brasil importou da Tailândia, a tilápia
263 tailandesa (*Oreochromis niloticus*), que se adaptou muito bem à região tropical, devido
264 as suas características biológicas. A expansão do cultivo ocorreu a partir de 2000,
265 com a implantação dos tanques-rede em águas dos reservatórios de hidrelétricas;
266 alcançando assim um crescimento inigualável em relação a outros pescados
267 (Sociedade Nacional de Agricultura, 2019).

268 De acordo com a Sociedade Brasileira de Piscicultura (2021), em
269 2020 foram produzidos aproximadamente 6,2 milhões de toneladas de tilápia. Seu
270 maior produtor é a China, que produziu 1,95 milhão de toneladas em 2020, seguida
271 pela Indonésia e Egito. O Brasil ocupa a 4ª posição, tendo produzido cerca de 486.000
272 toneladas, o que representa 6,67% do total global. Ressalta-se também o seu
273 potencial de exportação, sendo o principal peixe de cultivo exportado no ano de 2020.
274 Segundo o Censo Agropecuário IBGE, a tilápia está presente em todos os estados
275 brasileiros.

276 No estado do Paraná, de acordo com Kubitza, (2003), a criação de
277 tilápia para fins comerciais iniciou-se na década de 1990 e devido apoio
278 governamental, cooperativismo, melhoramento genético das espécies e
279 industrialização dos produtos o estado alcançou um expressivo sucesso. O

280 investimento em tecnologia e o apoio na cadeia produtiva em todas as suas etapas
281 (insumos, produção, beneficiamento e comercialização foi decisivo para que o estado
282 apresentasse um contínuo crescimento na produção até os dias de hoje. Segundo a
283 Sociedade Brasileira de Piscicultura (2021) a produção de tilápias no Paraná cresceu
284 11,5% em 2020, produzindo 172.000 toneladas, fazendo com que o estado mantenha
285 o posto de maior produtor de peixes de cultivo dos últimos três anos.

286 Kubitza (2000) aponta que, no sistema de criação em tanques-rede,
287 há uma preferência pelo cultivo da espécie tilápia-do-Nilo (*O. niloticus*) pois observa-
288 se nessa espécie uma alta tolerância a condições adversas devido às suas
289 características biológicas e ecológicas, além de ser uma espécie com alto potencial
290 mercadológico. Porém, o cultivo de tilápias em tanques-rede apresentam algumas
291 adversidades, evidenciadas por Thatcher e Brites Neto (1994), como a falta de
292 controladores biológicos naturais e a limitação do espaço físico e por consequência
293 uma maior proximidade aos focos de contaminação.

294 Evans *et al.* (2002) e Oba *et al.* (2002) descrevem que a baixa
295 qualidade da água empregada no cultivo (com pouco oxigênio e níveis elevados de
296 amônia tóxica e nitrito), manejo inadequado e nutrição insuficiente dos peixes
297 provocam uma situação de estresse nos animais em razão da liberação de cortisol,
298 onde os peixes exibem sinais de anorexia, além de esgotamento de reservas de
299 glicogênio e imunossupressão, que ocasionam a diminuição da resistência aos
300 patógenos. Para Kubitza (2009), o alto adensamento no cultivo e a despesca realizada
301 de maneira incorreta causam atritos entre os animais com consequente perda de
302 muco e escamas, produzindo lesões na pele que facilitam a entrada dos patógenos.

303 Balcázar *et al.* (2006) ressaltam também que a condição de estresse
304 dos animais e a deterioração das condições ambientais podem contribuir para o
305 insucesso do cultivo, pois dificultam o controle de doenças e levam a um aumento
306 expressivo da utilização de medicamentos de uso veterinário. Outro fator importante
307 que predispõe os peixes às doenças, determinados por Kubitza (2005), inclui a
308 presença de resíduos orgânicos na água que se tornam substrato para a multiplicação
309 bacteriana. Devido a esses problemas citados, os autores reforçam a necessidade
310 dos piscicultores em controlar os patógenos para obter sucesso em suas criações.

311 Cabello (2006) e Defoirdt *et al.* (2007) apontam que a
312 antibioticoterapia é o método de tratamento e profilaxia de enfermidades bacterianas
313 na aquicultura. Telles (2013) ressalta que o uso descontrolado de antimicrobianos

314 pode levar ao surgimento de cepas bacterianas resistentes e isto eleva o risco
315 associado à exposição a altos níveis de resíduos pelos consumidores. Portanto se faz
316 necessário que se regulamente o uso desses fármacos, além de difundir as
317 informações sobre o seu uso incorreto, a fim de evitar prejuízos a saúde dos
318 consumidores.

319 De acordo com Suresh (1998), nos sistemas de criação intensiva de
320 tilápia, a septicemia por estreptococos é a maior causa de mortalidade dos peixes em
321 todo o mundo. Chang e Plumb (1996) consideram que a intensidade da doença está
322 associada com a estirpe do *Streptococcus agalactiae* e a dose infectante. Bunch e
323 Bejerano (1997) destacam que o *Streptococcus spp* são bactérias oportunistas
324 amplamente distribuídas no ambiente aquático e, segundo Pilarsky e Sakabe (2009),
325 o aumento da susceptibilidade dos peixes a doenças infecciosas ocorre pelo aumento
326 da concentração plasmática de cortisol e depressão dos mecanismos de defesa
327 orgânica dos peixes, além das condições de criação intensiva, como variação de
328 temperatura e níveis de oxigênio da água.

329 A maior incidência de doenças em tilápias ocorre em períodos de
330 temperatura mais fria pois, de acordo com Kubitzka (2000), temperaturas em torno de
331 16 a 18°C diminuem a sua resposta imune. Em temperaturas maiores, os peixes
332 conservam seu sistema imunológico e conseguem uma melhor resposta frente a ação
333 das bactérias, que por sua vez, em temperaturas mais altas, apresentam seu
334 mecanismo ótimo de atuação.

335

336 2.5 DOENÇAS NO CULTIVO DA TILÁPIA

337

338 O atual sistema superintensivo de cultivo de tilápias predispõe o
339 aparecimento de diversas enfermidades nos peixes. Em virtude das características de
340 manejo, como por exemplo a alta estocagem, a rápida disseminação dos patógenos
341 para todos os peixes do cultivo é favorecida, além da dificuldade dos produtores em
342 identificar os patógenos para uma rápida intervenção, ocasionando grandes perdas
343 econômicas na produção (LEIRA *et al.*, 2017). Portanto é necessário que se conheça
344 as principais doenças que possam acometer o cultivo a fim de se criar estratégias
345 efetivas para o seu controle. Dentre as parasitoses destacam-se:

346 Protozoários parasitos, organismos unicelulares presentes na água
347 do cultivo com as espécies *Ichthyophthirius multifiliis*, *Chilodonella*, *Trichodina*

348 *Epistylis sp*, *Ambiphrya (Scyphidia sp)*, *Apiosoma sp*, *Ichthyobodo Piscinoodinium*
349 *pillulare* e *Amyloodinium*. Os esporozoários, endoparasitas do filo *Myxozoa*, família
350 *Myxobolidae (Myxobolus e Henneguya)*, encontrados em tilápias em condições de
351 cultivo intensivo: *Myxobolus cerebralis* e *Henneguya*. Os Trematodos monogenéticos,
352 ectoparasitas platelmintos: *Girodactilus* e *Dactylogyrus* espécies que ocorrem em
353 viveiros de tilápias com alto adensamento e níveis elevados de matéria orgânica. Os
354 Crustáceos parasitos, que são responsáveis por uma alta mortalidade em tilápias de
355 cultivo no Brasil quando em temperaturas mais baixas: *Lernaea sp*, *Ergasilus sp*,
356 *Argulus sp* e *Dolops sp* (KUBIZTA,2000). A Saprolegniose doença causada por
357 fungos da família *Saprolegniaceae* e, de acordo com Kubitzza (2000), atinge ovos,
358 larvas, alevinos e peixes adultos. Os gêneros mais encontrados são *Saprolegnia*,
359 *Achlya* e *Dictyuchus*. *Saprolegnia parasítica* é o gênero mais comum em peixes e
360 acomete a tilápia nos períodos de inverno e início da primavera, quando a temperatura
361 da água está entre 18 e 26° C, condição em que os peixes apresentam uma resposta
362 imunológica diminuída.

363

364 2.5.1 Bacterioses

365

366 Leira *et al.* (2017) aponta que as bacterioses são responsáveis por
367 ocasionar uma alta mortalidade em peixes de cultivo resultando em consideráveis
368 prejuízos econômicos na piscicultura. Estão presentes naturalmente na água do
369 cultivo e na microbiota dos peixes. Desenvolvem-se quando encontram um ambiente
370 propício, como alterações na qualidade da água ou mesmo nos peixes debilitados
371 devido ao estresse causado por intensificação e alto adensamento do cultivo. Na
372 criação de tilápias, segundo Kubitzza (2005), a queda brusca de temperatura,
373 infestações por parasitos, manejo inadequado que causa perda de muco e de
374 escamas (que provocam lesões na pele) e a alta salinidade combinada com
375 temperaturas extremas são fatores que favorecem a ocorrência de doenças
376 bacterianas em tilápia.

377

378 Segundo Kubitzza (2005) os sinais clínicos que evidenciam a
379 contaminação bacteriana dos peixes incluem a presença de áreas despigmentadas,
380 lesões ulcerativas no corpo, nadadeiras erodidas ou com lesões hemorrágicas (lesão
381 conhecida como podridão das nadadeiras), hemorragia em diversas partes do corpo,
exoftalmia, olhos com aspecto opaco e/ou hemorrágico, brânquias necrosadas,

382 acúmulo de fluídos na cavidade abdominal que provocam distensão abdominal,
383 hiperplasia nos órgãos internos (fígado, rim, baço e coração), vesícula biliar
384 escurecida e repleta. Os peixes acometidos por bacterioses exibem um escurecimento
385 do corpo, dificuldade respiratória, diminuição do apetite e alterações comportamentais
386 como letargia e natação errática. Segundo Leira *et al.* (2017) os principais agentes
387 causadores das bacterioses em peixes de cultivo são: *Aeromonas spp*, *Yersinia*
388 *ruckeri*, *Edwardsella spp*, *Flavobacterium columnare*, *Francisella spp* e *Streptococcus*
389 *spp*.

390

391 2.5.1.1 Estreptococose

392

393 Estreptococose é o nome dado a doenças septicêmicas de etiologia
394 bacteriana originadas por cocos gram-positivos, incluindo os gêneros *Streptococcus*,
395 *Lactococcus*, *Vagococcus* e *Carnobacterium* (MATA *et al.*, 2004) e primeiramente
396 descrita no Japão, em 1956, em surto de septicemia em truta arco-íris (*Oncorhynchus*
397 *mykiss*) (HOSHINA *et al.*, 1958). No Brasil, a doença foi relatada pela primeira vez no
398 ano de 2003 em tilapiculturas no Norte do Paraná (SALVADOR, 2008). O gênero
399 *Streptococcus* pertence à família *Streptococcaceae* e são descritas 67 espécies e 12
400 subespécies, dentre elas, bactérias que são associadas a processos etiológicos em
401 seres humanos e animais além de microrganismos saprofitos e não patogênicos
402 (GLAZUNOVA *et al.*, 2009). De acordo com Plumb (1999), Toranzo *et al.* (2005) e
403 Nomoto *et al.* (2004) as bactérias causadoras de estreptococose são: *Lactococcus*
404 *garvieae*, *Lactococcus piscium*, *Lactococcus piscium*, *Streptococcus parauberis*,
405 *Streptococcus iniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Vagococcus*, *Streptococcus equi*,
406 *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus zooepidemicus* e
407 *Streptococcus dysgalactiae*.

408

409 O gênero *Streptococcus* é caracterizado por um conjunto de cocos
410 gram-positivos, de 0,5 a 2µm que se agrupam em pares ou em cadeias de tamanhos
411 diversos, não móveis, não formadores de esporos, catalase-negativos, anaeróbios
412 facultativos ou desenvolvem-se em anaerobiose. Apresentam o metabolismo
413 fermentativo sendo o ácido láctico o produto predominante da fermentação da glicose.
414 São microrganismos que podem ser encontrados em diversos ambientes; integram a
415 microbiota normal dos seres humanos, principalmente as vias aéreas e trato
gastrointestinal. Algumas espécies de estreptococos são patógenos reconhecidos,

416 outras são oportunistas e consideradas agentes infecciosos de relevância clínica. A
417 caracterização dos estreptococos é fundamentada em suas características
418 hemolíticas (segundo o tipo de hemólise em meios contendo sangue), fisiológicas
419 (segundo o comportamento em testes fisiológicos) e antigênicas (conforme sua
420 composição antigênica), além da análise das propriedades fenotípicas (TRABULSI-
421 ALTERTHUN, 2017).

422 Em seres humanos o *Streptococcus agalactiae* causa pneumonia,
423 septicemia e meningite em neonatos, elevadas taxas de morbidade em gestantes e
424 mortalidade em adultos imunocomprometidos (JOHRI *et al.*, 2006). De acordo com
425 Hernández *et al.* (2009) as espécies causadoras de septicemia e meningoencefalite
426 em peixes são: *Streptococcus iniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus*
427 *parauberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus phocae* e *Streptococcus*
428 *ictaluri*. Para Garcia *et al.* (2008) as principais espécies patogênicas para peixes são
429 o *S. iniae* e *S. agalactiae*, responsáveis por grandes perdas econômicas na
430 aquicultura mundial, incluindo o Brasil. De acordo com Evans *et al.* (2002) o *S.*
431 *agalactiae* é responsável por septicemia e meningoencefalite em peixes de água doce,
432 marinhos e estuarinos, com altas taxas de morbidade e mortalidade, além de ser
433 associado a outras doenças em diversos animais como aves, camelos, cães, equinos,
434 gatos, rãs, hamsters, camundongos, macacos e demais espécies (GARCIA, *et al.*,
435 2008).

436 O primeiro surto de estreptococose foi descrito em 2003 em cultivo de
437 tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) no norte do Paraná. Posteriormente outros
438 episódios foram relatados em tilapiculturas nos estados de São Paulo, Espírito Santo,
439 Minas Gerais, Bahia e Ceará. Surto provocados por *S. agalactiae* são considerados
440 de elevado risco sanitário para a tilapicultura no Brasil e são potencialmente
441 desencadeados pelo manejo intensivo, altas densidades de estocagem e temperatura
442 da água superior a 27°C (MIAN *et al.*, 2009). Os sinais clínicos observados em peixes
443 infectados são melanose, taquipneia, anorexia, excitabilidade, natação errática,
444 rigidez dorsal, exoftalmia unilateral ou bilateral, ascite e morte súbita. Em tilápias, as
445 principais alterações são pericardite, epicardite, miocardite, endocardite, meningite e
446 septicemia (CHEN *et al.*, 2007).

447

448

449

450 2.5.1.1.1 *Streptococcus inae*

451

452 *Streptococcus inae* é uma das principais espécies bacterianas do
453 gênero *Streptococcus*. A doença causada pelo *S. inae*, denominada estreptococose,
454 acomete várias espécies de peixes de água doce e marinhos. De acordo com Pier e
455 Madin (1976) o *S. inae* foi isolado e identificado primeiramente no Brasil na espécie
456 *Inia geoffrensis*, um golfinho de água doce presente na região amazônica. Figueiredo
457 *et al.* (2012) apontam que esse microrganismo foi associado pela primeira vez a um
458 surto em cultivos de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) em 2012. Atualmente o *S.*
459 *inae* é encontrado em todos os continentes e a infecção por ele provocada se
460 manifesta como septicemia, meningoencefalite, ocasionando altos índices de
461 mortalidade nos peixes e perdas econômicas significativas. Nos últimos anos, através
462 do controle sanitário, esse patógeno tem diminuído e o *S. agalactiae* tem ocupado seu
463 lugar de destaque na infecção da tilapicultura.

464 A infecção por *S. inae* já foi caracterizada em seres humanos (EL
465 AAMRI *et al.* 2014), em golfinhos (PIER e MADIN, 1976), em morcegos (NAWAWI *et*
466 *al.*, 2008) e em peixes. Nos cultivos intensivos o *S. inae* pode ser transmitido por
467 contato direto entre peixes contaminados e sadios ou por contato indireto, onde o
468 patógeno se encontra no ambiente aquático, no biofilme que se forma nos tanques,
469 filtros e tubulações desse sistema de cultivo (MILLARD *et al.*, 2016). Esse contato é
470 facilitado, de acordo com Figueiredo *et al.* (2012), através do sistema de criação
471 intensivo em tanques-rede, onde há um excesso de estocagem dos peixes, causando
472 estresse nos animais, além de lesões por contato nas escamas. A temperatura
473 elevada da água do cultivo é outro fator importante a ser destacado pois facilita a
474 reprodução bacteriana (FIGUEIREDO *et al.*, 2009). Zhou *et al.* (2011) relatam que
475 casos de contaminação por *S. inae* em seres humanos ocorrem por meio da
476 manipulação de peixes de cultivos vivos infectados, promovendo pneumonia,
477 septicemia e meningite em pessoas imunossuprimidas.

478 O controle da doença causada pelo *S. inae* nos peixes de cultivo é
479 realizado através de antibioticoterapia. Segundo Padua *et al.* (2012) apenas
480 antibióticos a base de florfenicol e oxitetraciclina são liberados para utilização em
481 surtos em pisciculturas comerciais no Brasil; sendo que o florfenicol se mostrou
482 eficiente para o controle da doença em tilápias-do-Nilo (GAUNT *et al.* 2010). Uma
483 alternativa para o controle sanitário é a vacinação. Entretanto, de acordo com Millard

484 *et al.* (2012) as vacinas não oferecem proteção aos peixes durante longos períodos
485 devido a mutação no polissacarídeo capsular do *S. inae*, sendo então necessário o
486 desenvolvimento de novas vacinas que possam abranger todos os sorotipos
487 existentes.

488 Portanto, o manejo adequado da piscicultura é imprescindível para o
489 controle da infecção por *S. inae*. Por isso é necessário, de acordo com Figueiredo *et*
490 *al.* (2009) a manutenção correta dos viveiros com boas práticas de manejo, obtenção
491 alevinos saudáveis e previamente livres de patógenos, retirar do viveiro animais
492 mortos ou com sinais clínicos de doença, realizar tratamento com antibióticos e
493 vacinação. Através dessas práticas é possível reduzir a incidência de infecção e
494 perdas significativas no cultivo (SHOEMAKER *et al.*, 2010).

495

496 2.5.1.1.2 *Streptococcus agalactiae*

497

498 O *Streptococcus agalactiae* é um coco gram-positivo, não formador
499 de esporos, não ácido resistente, não móvel, anaeróbio- facultativo, oxidase-negativo,
500 catalase-negativo e beta hemolítico: “A beta-hemólise (β) é caracterizada pela lise
501 completa das hemácias que rodeiam a colônia, ocorrendo uma zona transparente
502 (zona de lise total) ao redor da colônia. Os estreptococos com esta característica são
503 denominados beta-hemolíticos” (ANVISA, 2008). Apresenta-se com um diâmetro de
504 cerca de 2 μ m, em pares ou cadeias curtas.

505 Marcadores sorológicos e imunológicos são utilizados para a
506 caracterização desses microrganismos. O *S. agalactiae* é denominado *Streptococcus*
507 do Grupo B (SGB) pois está presente o antígeno Lancefield do Grupo B:

508

509

510

511

512

513

514

515

516

517

518

519

A classificação dos estreptococos em grupos sorológicos baseia-se nas características antigênicas de um polissacarídeo, de composição variável, chamado carboidrato C, localizado na parede celular, que pode ser detectado por diferentes técnicas imunológicas, destacando-se, entre elas, a precipitação em tubo capilar e a aglutinação pelo látex. Tomando por base este polissacarídeo, os estreptococos foram divididos em 20 grupos sorológicos (grupos de Lancefield), designados por letras maiúsculas do alfabeto (A, B, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, O, P, Q, R, S, T, U e V). (...) O método de sorogrupagem desenvolvido por Lancefield é conveniente, sendo amplamente aceito para a identificação dos estreptococos β -hemolíticos. (TRABULSI-ALTERTHUN, 2015, p. 195).

520

521

522

De acordo com Murray *et al.* (2009) na avaliação do antígeno polissacarídico presente da parede celular, o *S. agalactiae* apresenta o antígeno do grupo B; na observação de existência de proteínas de superfície, o *S. agalactiae*

523 apresenta mais comumente o antígeno C além de apresentar polissacarídeos
524 capsulares específicos: Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII e IX. Os sorotipos de SGB são
525 caracterizados por métodos moleculares ou baseadas nos antígenos capilares através
526 da precipitação capilar (LANCEFELD, 1934), coaglutinação (HAKASSON, 1992),
527 imunodifusão dupla (JOHNSON; FERRIERI, 1984), métodos de ensaio
528 imunoenzimático (ARAKERE *et al.*, 1999), e aglutinação em látex (PARK, 2001).
529 Estão especificados dez sorotipos capsulares distintos (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII),
530 incluindo o mais novo, IX, descrito em 2007 por Slotvet e colaboradores (SLOTVET *et*
531 *al.*, 2007). De acordo com Kong *et al.* (2002) a variabilidade sorotípica capsular está
532 relacionada com a organização dos compostos Glucose, Galactose, N-Acetil-
533 glucosamida e Ácido Neuro- Acetil-Neuramicina (Ácido Siálico) presentes cápsula do
534 microrganismo e suas diversas combinações formam tipos capsulares distintos em
535 SGB. A cápsula possibilita a aderência do microrganismo às superfícies epiteliais para
536 posterior invasão do tecido além de inibir a fagocitose realizada pelos macrófagos e
537 neutrófilos do hospedeiro, sendo esse seu papel mais importante como fator de
538 virulência. (NIZET & RUBENS, 2008). Na cápsula do SGB sorotipo III é encontrada
539 uma alta concentração de ácido siálico, característica intimamente ligada ao fator de
540 patogenicidade pois este impede a deposição do componente C3b do sistema
541 complemento e a fagocitose, portanto o SGB é considerado o mais virulento (JARVA
542 *et al.*, 2003).

543 Os estudos de Yildirim *et al.* (2002) apontam que linhagens isoladas
544 de seres humanos são hemolíticas e não usam a lactose como fonte de energia e
545 linhagens isoladas de animais (bovinos) não produzem hemólise em ágar sangue e
546 utilizam a lactose como fonte de energia. Em peixes, as linhagens isoladas foram
547 descritas como não hemolíticas por Figueiredo *et al.* (2006). De acordo com Stevens
548 (2000) os sorotipos Ia, Ib, II, III e V tem maior potencial infectante em seres humanos.
549 No Brasil há prevalência dos sorotipos Ia e II (Dutra *et al.*, 2014). Para Keefe *et al.*
550 (1997) o SGB é um patógeno de relevância para mamíferos terrestres; coloniza
551 naturalmente o trato gastrointestinal e geniturinário de aproximadamente 50% dos
552 adultos saudáveis (HANSEN *et al.* (2004) e 18% das mulheres grávidas em nível
553 mundial (RUSSEL *et al.*, 2017). Em condições específicas, SGB pode levar a um sério
554 comprometimento em adultos (BROCHET *et al.*, 2006), recém-nascidos (ARMISTEAD
555 *et al.*, 2019), mulheres grávidas, idosos e adultos imunocomprometidos (FARLEY,
556 2001). Para Seale *et al.*, (2017) estudos apontam que possivelmente existem fatores

557 específicos do hospedeiro que determinam a sensibilidade de um indivíduo à doença
558 invasiva, como sepse, meningite, infecções do trato urinário, pele e tecidos moles
559 (LYHS *et al.*, 2016).

560 Para Madri *et al.*, (2017) o SGB é responsável pela maior morbidade
561 e mortalidade neonatal no mundo, causando sepse, pneumonia, meningite e
562 encefalopatia. A bacteremia causada por SGB do neonato pode ocorrer intraútero ou
563 durante o parto vaginal, onde há o contato do bebê com o trato geniturinário materno
564 e sua prevenção é feita com a profilaxia antibiótica intraparto (IAP) na parturiente
565 (ARMISTEAD *et al.*, 2019). De acordo com Bianchi-Jassir *et al.* (2017) e Seale *et al.*
566 (2017) há uma relação entre colonização materna por SGB parto prematuro e
567 natimortos. Aos neonatos podem ocorrer sequelas relevantes como displasia bronco
568 pulmonar. De acordo com Hall *et al.* (2017) uma das principais causas de mortalidade
569 materna, em nível mundial, é a sepse provocada pelo SGB, que pode ocorrer no
570 período peri ou pós-parto. Segundo seus estudos, a vacinação materna no final do
571 segundo ou início do terceiro trimestre pode contribuir para a prevenção da bacteremia
572 por SGB materna e em neonatos. Nos demais mamíferos, como ruminantes, o SGB
573 pode colonizar as glândulas mamárias e permanecer neste local por longos períodos,
574 sendo responsável por desenvolver a mastite clínica e subclínica, prejudicando a
575 qualidade do leite (DERMER *et al.* 2004).

576 De acordo com Johri *et al.* (2006) o SGB é a principal bactéria
577 causadora de estreptococose em peixes. Os estudos de Evans *et al.* (2002),
578 Duremdez *et al.* (2004) e Mian *et al.* (2009) demonstram que a infecção por SGB causa
579 septicemia e meningoencefalite, principalmente em espécies de peixes de água
580 quente e doce, marinhos ou estuarinos. No Brasil, de acordo com Mian *et al.* (2009),
581 os sorotipos Ib e III estão presentes nos cultivos intensivos de tilápia, sendo a espécie
582 tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) a principal hospedeira desse patógeno
583 (BARONY *et al.*, 2017). Os principais sinais clínicos descritos pela FAO (2020) e por
584 Marcusso (2015) foram pigmentação escura da pele, diminuição do apetite, desvio de
585 coluna vertebral, exoftalmia uni ou bilateral, com opacidade e hemorragia, distensão
586 abdominal, hemorragia difusa no opérculo e natação errática e circular. Na necropsia
587 foram observadas petéquias na pele, ascite aquosa de coloração amarelada,
588 hepatomegalia leve, vesícula biliar repleta, esplenomegalia moderada, congestão
589 renal, encefalomalácia e congestão cerebral.

590 Lim e Webster (2006) relatam que a principal via de transmissão do

591 SGB é a horizontal, onde há o contato com peixes infectados, por canibalismo ou
592 contato indireto mediado pela água dos sistemas de criação e pela ingestão de
593 alimentos contaminados. Outra via importante de transmissão, evidenciada por Clark,
594 Paller e Smith (2000), é a cutânea, através de abrasões na pele dos peixes devido ao
595 aumento da densidade populacional do local de cultivo.

596 Surtos provocados por essa bactéria, segundo os estudos de Zamri-
597 Saad *et al.* (2010) resultam em altas taxas de morbidade e mortalidade dos peixes,
598 acarretando sérios prejuízos econômicos na tilapicultura, com uma incidência de
599 aproximadamente 20% a 30% e taxa de mortalidade de peixes doentes superior a
600 95% (SU *et al.*, 2017). De acordo com Ye *et al.* (2011) ocorreram surtos de
601 estreptococose em 95% das fazendas de tilápia na China entre 2009 e 2011,
602 resultando em uma alta mortalidade. As cepas prevalentes de doença estreptocócica
603 de tilápia na China que ocorreram até 2008 foram classificadas como *Streptococcus*
604 *iniae* e as cepas dominantes atuais (2009-2011) foram classificadas como *S.*
605 *agalactiae* (SGB) (CHEN *et al.*, 2012).

606 A antibioticoterapia é o método de tratamento e profilaxia de
607 enfermidades bacterianas na aquicultura, entretanto, de acordo com Cabello (2006) e
608 Defoirdt *et al.* (2007) o uso frequente de antibióticos contra bacterioses promove a
609 seleção de cepas resistentes e essa resistência pode ser transferida para bactérias
610 patogênicas ambientais e humanas (ABUTBUL *et al.* 2004, SMITH *et al.* 1994).
611 Portanto, o acúmulo de antibióticos em peixes, segundo Romano e Mejía (2003),
612 produz efeitos nocivos para o meio ambiente e seres humanos e a vacinação revela-
613 se uma alternativa ao uso de antibióticos e demais fármacos na prevenção de
614 infecções nas pisciculturas. De acordo com Li *et al.*, (2020) a vacinação é um método
615 alternativo para o controle das doenças estreptocócicas, apesar de atualmente existir
616 poucas vacinas comerciais (CHEN *et al.*, 2012) e escassas terapêuticas químicas,
617 como alimentos medicamentosos com antibióticos (DARWISH, 2007) para o controle
618 da bacteremia causada por SGB.

619

620 2.6 CONTROLE DA DOENÇA

621

622 De acordo com Munang'andu *et al.* (2016) a aquicultura intensiva tem
623 causado danos para a tilapicultura, pois este sistema de criação possui características
624 que provocam a inibição do sistema imunológico dos peixes, principalmente o alto

625 adensamento do cultivo, tornando-os mais susceptíveis a diversas infecções. Uma
626 importante doença que acomete a produção de tilápia é a estreptococose causada
627 pelo *Streptococcus agalactiae*, que pode induzir a doença em peixes adultos e juvenis.
628 Até o momento já foram isolados três sorotipos de *S. agalactiae* (Ia, Ib e III) em
629 tilapiculturas ao redor do mundo e observaram-se mudanças no genótipo PFGE
630 destas cepas (YE *et al.* 2011) (OLIVARES-FUSTER *et al.* 2008). Na China, a principal
631 cepa de SGB identificada foi a cepa Ia, ST7 (ZHANG *et al.*, 2017).

632 Segundo Kubitza (2008a) as boas práticas de manejo irão garantir
633 que o cultivo de tilápia seja realizado de forma otimizada, onde o produto oferecido
634 seja seguro para o consumo. O manejo adequado minimiza os prejuízos ambientais
635 com o uso consciente dos recursos hídricos, energéticos, bem como a alimentação e
636 demais insumos, manutenção das condições sanitárias e de saúde, promovendo um
637 melhor desenvolvimento dos peixes.

638 O preparo dos viveiros é indispensável para garantir a saúde dos
639 peixes que ali se desenvolverão, pois evitam a presença de predadores e fornecem
640 quantidades suficientes de alimentos naturais necessários para os alevinos. Os
641 alimentos naturais são produzidos através da adubação dos viveiros com fertilizantes
642 químicos e orgânicos. O nitrogênio é primordial para o desenvolvimento do
643 fitoplâncton e os fertilizantes orgânicos promovem o crescimento de bactérias,
644 protozoários, rotíferos, cladóceros, copépodos que são alimentos naturais para as
645 pós-larvas e alevinos. A adubação em excesso pode provocar deficiência de oxigênio,
646 desenvolvimento excessivo de fitoplâncton que leva ao aumento de pH e torna o
647 ambiente nocivo para os alevinos do viveiro. Ao final de um ciclo de cultivo, o tanque
648 deve ser esvaziado, adicionar cal virgem para eliminar microrganismos
649 remanescentes e expostos ao ar livre por 3 a 5 dias para decomposição de matéria
650 orgânica presente no fundo do viveiro (KUBITZA, 2008c).

651 Em viveiros com baixa taxa de renovação de água, o fitoplâncton é
652 responsável pela manutenção níveis de oxigênio, além de remover a amônia e nitrato,
653 pois utiliza esses compostos para seu desenvolvimento. Pequenos organismos
654 aquáticos alimentam-se desse fitoplâncton e servem de complemento alimentar para
655 os peixes do viveiro, uma vez que fornecem aminoácidos, vitaminas e minerais,
656 reduzindo possíveis deficiências nutricionais. O fitoplâncton também atua no processo
657 de decantação das partículas de argila e silte que estejam suspensas na água devido
658 a movimentação dos peixes nos procedimentos de despesca e da ação de aeradores,

659 diminuindo a turbidez da água. Por fim, o fitoplâncton impede que algas filamentosas
660 e demais plantas se desenvolvam nos viveiros pois formam uma barreira impedindo a
661 entrada de luz (KUBITZA, 2008b).

662 O fornecimento de aeração constante na água dos viveiros mostra-se
663 benéfico para a saúde dos peixes porque, segundo Kubitza (2008b), reduz a
664 incidência de déficits de oxigênio. A melhor qualidade da água promove uma nutrição
665 adequada, pois oferece aos peixes condições ambientais ideais para seu crescimento
666 e desenvolvimento. Ao final do ciclo de produção, a restauração da qualidade da água
667 é realizada com a aeração, promovendo a normalização dos níveis de oxigênio, a
668 degradação do material orgânico e oxidação da amônia. Desse modo, a água pode
669 ser utilizada novamente no cultivo ou devolvida para o meio ambiente sem riscos de
670 causar danos ambientais.

671 Condições ambientais inadequadas, alto adensamento do cultivo,
672 procedimentos incorretos de despesca que geram atritos entre os peixes e demais
673 condições estressantes podem aumentar a susceptibilidade dos peixes ao surgimento
674 de doenças, principalmente doenças bacterianas (KUBITZA, 2009). De acordo com
675 Cabello (2006) e Defoirdt *et al.* (2007), a antibioticoterapia oral é um método de
676 tratamento e profilaxia de enfermidades bacterianas que atingem os peixes de cultivo
677 e tem sido amplamente utilizada como medida profilática na aquicultura (SERRANO,
678 2005). Atualmente, no Brasil, o único antibiótico aprovado para uso em pisciculturas é
679 o florfenicol, que é fornecido aos peixes juntamente com a ração, sendo estável na
680 água e com amplo espectro de atuação (FIGUEIREDO *et al.*, 2007). Entretanto, como
681 aponta Heuer *et al.* (2009), esse tipo de tratamento pode não ser eficaz devido a
682 anorexia presente nos peixes diante do quadro infeccioso. Como aponta Serrano
683 (2005), o uso indiscriminado de antimicrobianos pode levar à poluição e degradação
684 do meio ambiente, além de promover o surgimento de cepas bacterianas resistentes,
685 elevando o risco associado à exposição a altos níveis de resíduos pelos consumidores
686 (TELLES, 2013).

687 A vacinação pode ser considerada uma estratégia para o controle das
688 doenças que acometem o cultivo e pode reduzir ou substituir a utilização de
689 antibióticos (SKOV *et al.*, 2018) promovendo uma reposta imune específica de longa
690 duração visto que, atualmente, a maioria das vacinas são formuladas com patógenos
691 inativados e inoculados por injeção nos peixes dos viveiros (ADAMS e SUBASINGHE,
692 2019). Para imunização em massa, a vacinação por imersão é um método a ser

693 considerado, pois reduz o estresse sobre os peixes (MUNANG'ANDU *et al.*, 2015).
694 Portanto, de acordo com Figueiredo *et al.* (2007) a manutenção das condições
695 ambientais e controle sanitário dos peixes (promovendo a remoção de animais mortos
696 ou que apresentem sinais de doença no cultivo) além da realização de exames
697 laboratoriais frequentes para análise da presença de agentes bacterianos e
698 administração de vacinas são medidas fundamentais para o controle da
699 estreptococose em tilápias (LIU *et al.*, 2016).

700

701 2.7 ESTUDO DO GENOMA DE *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE*

702

703 Os primeiros métodos de sequenciamento genômico, de acordo com
704 França, Carrilho e Kist (2002), surgiram no início da década de 70, mas somente em
705 1995 foi realizado o primeiro sequenciamento completo de um genoma – da bactéria
706 *Haemophilus influenzae*, através do método de Sanger (FLEISCHMANN *et al.*, 1995).
707 De acordo com Meldrum (2001) o sequenciamento genético permite demonstrar as
708 sequências de bases nucleicas para compreender o complexo funcionamento dos
709 organismos através do estudo estrutural e funcional do genoma. As reações de
710 sequenciamento, a reação em cadeia da polimerase e sequenciadores de DNA
711 fluorescentes automatizados permitiram que os processos para a análise da
712 sequência de DNA fossem automatizados e realizados mais rapidamente. De acordo
713 com Olson (2001) a análise da sequência de DNA é um processo que envolve
714 variadas etapas, como a preparação, fragmentação e análise de bases do DNA e a
715 interpretação da sequência resultante.

716

717 O surgimento das tecnologias de sequenciamento de próxima
718 geração “*Next- Generation Sequencing - NGS*” ocorrido após a finalização do projeto
719 genoma, em 2005 (SHENDURE e HANLEE (2008), EL-METWALLY *et al.* (2013)),
720 permitiu a obtenção dos dados genômicos de maneira mais eficaz, visto que
721 comparadas com o método de Sanger, possuem melhores características como leitura
722 aprimorada do DNA em menor tempo de execução, além de reduzirem
723 significativamente o custo de cada sequenciamento, possibilitando, inclusive, a sua
724 aplicação para demais organismos procariotos. Segundo Tettelin *et al.* (2008) o
725 desenvolvimento de métodos de sequenciamento de genomas eficientes e de custo
726 reduzido possibilitou a análise aprofundada da diversidade intraespecífica dos
patógenos bacterianos. As plataformas 454 FLX (Roche, Bélgica), Illumina (Genome

727 Analyzer), SOLiD e Ion Torrent (Applied Biosystems, EUA) viabilizam o
728 sequenciamento de milhões de fragmentos de DNA simultaneamente, além de uma
729 acurada análise de genomas e transcriptomas de modo rápido e de custo reduzido
730 (LOMAN *et al.*, 2012; MARDIS, 2008; SHENDURE; JI, 2008). Para realizar o
731 sequenciamento de genomas em grande escala pode ser utilizado o método de
732 sequenciamento shotgun hierárquico, também denominado "clone por clone" usado
733 pelo International Human Genome Sequencing Consortium ou a abordagem shotgun
734 do genoma completo usado pela Celera Genomics. De acordo com Monnet *et al.*
735 (2010) e Richards *et al.* (2011) a genômica comparativa pode ser um recurso relevante
736 para esclarecer processos evolutivos, dado que caracteriza os elementos do genoma
737 ligados a virulência e adaptação hospedeiros.

738 De acordo com banco de dados do NCBI, atualmente existem 1538
739 genomas totais e parciais sequenciados de *S. agalactiae*. Segundo Glaser *et al.*
740 (2002) o primeiro genoma completo de *S. agalactiae* sequenciado pelo método de
741 Sanger corresponde a cepa NEM316 do sorotipo III. Este genoma possui o tamanho
742 de 2.211.485 pb e 2118 genes anotados e está depositado no banco de dados do
743 GenBank desde 2002. As linhagens de *Streptococcus agalactiae* possuem o genoma
744 entre 1,8Mb a 2,2 Mb, número de tRNA variando de 63 a 81, número de rRNA de 18
745 a 21 e conteúdo GC de 35,3% a 35,9%. As linhagens de *S. agalactiae* isoladas a partir
746 de peixes no Brasil apresentam diversidade genética específica, possuem sequências
747 genômicas heterogêneas e estão distribuídas em diferentes regiões do país de acordo
748 com seu genótipo (GODOY *et al.*, 2013; BARONY *et al.*, 2017).

749

750 2.8 ESTUDOS DE PATOGENICIDADE DO STREPTOCOCCUS AGALACTIAE

751

752 Os peixes de cultivo podem ser acometidos por patógenos diversos
753 quando expostos a ambientes de baixa qualidade de água, com baixo teor de oxigênio
754 e elevados níveis de amônia e nitrito, deficiência nutricional, acúmulo de material
755 orgânico, mudanças de temperatura, manejo e transporte incorreto. Esses fatores
756 provocam estresse nos animais e conseqüente diminuição de sua resposta
757 imunológica frente a microrganismos patogênicos (FRANCESCHINI, 2012).

758 A disseminação de *S. agalactiae* para os peixes do cultivo pode
759 ocorrer por via horizontal, através das fezes de peixes previamente contaminados
760 (EVANS *et al.*, 2002) ou pela coabitação com peixes mortos, resultando na infecção

761 de peixes saudáveis (IREGUI *et al.*, 2016), onde os microrganismos patogênicos
762 podem entrar através das guelras (MIAN *et al.*, 2009) e pele, transpondo o muco lumial
763 e epitélio, onde atingem o trato gastrointestinal, promovendo a disseminação
764 sistêmica acometendo principalmente cérebro, rim e intestino (PRETTO-GIORDANO
765 *et al.*, 2010).

766

767 2.8.1 Fatores de virulência

768

769 De acordo com Casadevall e Pirofski (2001) a virulência pode ser
770 definida como a capacidade de um patógeno em lesar um hospedeiro evadindo suas
771 defesas imunes. Os mecanismos de infecção ocorrem a partir de uma série de
772 interações entre patógenos e hospedeiro e pode ser expressa como a toxicidade do
773 patógeno, invasividade, colonização e capacidade de ser transmitido para outro
774 organismo. Dutra *et al.* (2014) e Barnett *et al.* (2015) referem os fatores de virulência
775 como os principais agentes mediadores dessa correlação entre o patógeno e a célula
776 do hospedeiro, promovendo a disseminação bacteriana através da alteração dos
777 mecanismos da resposta imune. Assim como diversos patógenos, o *S. agalactiae*
778 adere-se às células do organismo hospedeiro através das suas proteínas de superfície
779 e estas são responsáveis pelas interações com a matriz extracelular, bem como com
780 o escape da resposta imunológica do hospedeiro (TENENBAUM, T.B. *et al.*, 2007).
781 Os principais fatores de virulência do *S. agalactiae* já descritos estão representados
782 na tabela 1.

783

784 A cápsula bacteriana é o principal fator de virulência do *S. agalactiae*
785 pois é responsável pela fagocitose e reconhecimento pelo sistema imunológico, assim
786 permitindo a sua multiplicação e disseminação para vários órgãos (ANVISA). De
787 acordo com Gody (2011) a partir do momento em que o *S. agalactiae* adentra no
788 organismo, ele se adere as barreiras endoteliais, liberando os fatores de virulência,
789 como fator CAMP, responsável por produzir poros na membrana do hospedeiro,
790 liberação da proteína C, responsável por facilitar a aderência nas células epiteliais,
791 liberação de β -hemolisina que provoca a lise das células do hospedeiro, induzindo a
792 resposta inflamatória e apoptose. A presença do ácido siálico na cápsula bacteriana
793 é similar ao ácido siálico presente na célula do hospedeiro e impede que o
794 microrganismo patogênico seja reconhecido pelo sistema imune.

794

795 **Tabela 1.** Principais fatores de virulência descritos para *Streptococcus agalactiae*

Categoria	Gene	Fator de Virulência
<i>Adesão e colonização</i>	<i>gap</i>	GAPDH - Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
	<i>dltA</i>	Proteína de alanilação do ácido lipoteicóico
	<i>fbsA</i>	Proteína A de ligação ao fibrinogênio
	<i>fbsB</i>	Proteína B de ligação ao fibrinogênio
	<i>lmb</i>	Proteína de ligação à laminina
	<i>pavA</i>	Proteína de ligação ao fibrinogênio
	PI-1	Pili-1
	PI-2a	Pili-2a
	PI-2b	Pili-2b
	<i>Evasão imune</i>	<i>alpha C</i>
<i>bca</i>		Proteína da família C
<i>epsilon</i>		Proteína da família alpha
<i>gbs0470</i>		Proteína da família alpha
<i>gbs1195</i>		Proteína da família alpha
<i>cspA</i>		Serine protease
<i>Invasão</i>	<i>bac</i>	Proteína C-β
	<i>cfb</i>	Fator cAMP
	<i>cylA</i>	β - hemolisina / citolisina
	<i>cylB</i>	β - hemolisina / citolisina
	<i>cylE</i>	β - hemolisina / citolisina
	<i>dltR</i>	Proteína reguladora
	<i>gbs2018-6</i>	Gene associado a invasão
	<i>hylB</i>	Hialuronato liase
	<i>iagA</i>	Proteína reguladora de invasão
	<i>pbp1A/ponA</i>	Proteína 1A de ligação à penicilina
<i>rib</i>	Proteína rib	

Fonte: Elaborada por Lima, S. C. (2020) com base em Brochet *et al.*, 2006; Corrêa *et al.*, 2009; Creti *et al.*, 2004; Delannoy *et al.*, 2016; Dutra *et al.*, 2014; Kayansamruaj *et al.*, 2014; Godoy *et al.*, 2013; Kannika *et al.*, 2017; Morach *et al.*, 2018; Springman *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2016.

796

797 Para o isolamento e detecção de *S. agalactiae* em juvenis de tilápia-
798 do-Nilo utiliza-se mais comumente a técnica microbiológica (padrão ouro) de swabs
799 do encéfalo, rim, fígado, coração, líquido visceral e olhos. Encéfalo e rim são
800 conhecidamente órgãos de predileção do *S. agalactiae*. O meio de crescimento das
801 culturas bacterianas mais usado é o ágar sangue e incubação realizada a 37°C por 24
802 a 48h para observação da morfologia das colônias e as características hemolíticas
803 (LONGHI, PRETTO-GIORDANNO, MULLER; 2013).

804

805 Segundo Figueiredo *et al.* (2012) existe ainda uma insuficiente
806 compreensão acerca dos mecanismos moleculares envolvidos na patogenicidade do
S. agalactiae em peixes portanto torna-se imprescindível a análise e comparação

807 genômica das possíveis diferenças que possam estar ligadas aos perfis de
808 patogenicidade de cada cepa para assim desenvolver estratégias para o controle da
809 estreptococose provocada pelo *S. agalactiae* sorotipo III.

810

811 2.8.1.1 Fatores de virulência descritos para *S. agalactiae*

812

813 Fatores de virulência são considerados vantagens evolutivas para
814 inúmeras espécies de patógenos, pois proporcionam a colonização do hospedeiro
815 através de mecanismos variados, como melhor adesão aos tecidos do hospedeiro ou
816 maior capacidade invasiva. Fatores de virulência podem atuar inclusive suprimindo a
817 resposta do sistema imunológico do hospedeiro e desativando mecanismos
818 citoprotetores (SEIDLER, 2013). Os principais fatores de virulência descritos são:

819

820 **Fibrinogen-binding protein**

821 A patogenicidade de um organismo está intimamente ligada à sua
822 capacidade de se ligar ao fibrinogênio. As proteínas ligantes de fibrinogênio, durante
823 a infecção, ligam-se ao fibrinogênio e leva à agregação plaquetária, sendo
824 responsável por complicações médicas graves, podendo levar o hospedeiro à morte
825 (COLLINS *et al.*, 2012).

826

827 **C5a peptidase**

828 A peptidase C5a em *S. agalactiae* é uma serina protease associada à
829 superfície que atua clivando o componente quimiotático do complemento C5a, onde
830 liga-se à fibronectina permitindo a invasão celular (CHENG *et al.*, 2002).

831

832 **Laminin-binding protein**

833 Proteína de ligação à laminina (Lmb) é uma lipoproteína que
834 desempenha um papel na colonização e invasão do epitélio danificado, atuando como
835 mediadora da ligação do *S. agalactiae* a laminina do hospedeiro, além de atuar como
836 uma invasina, favorecendo a invasão do *S. agalactiae* em células endoteliais
837 microvasculares do cérebro (TENENBAUM *et al.*, 2007)

838

839 **B-hemolysin**

840 Formadas por proteínas e lipídeos, as hemolisinas do tipo beta são

841 responsáveis pelo rompimento da membrana celular ao promover a lise dos glóbulos
842 vermelhos. (MAHESWARAN *et al.*, 1967).

843

844 **cAMP factor**

845 O fator cAMP foi descoberto pela primeira vez em *S. agalactiae*, mas
846 genes homólogos já foram descritos em outros patógenos Gram-positivos. São
847 responsáveis pela formação de poros na membrana e possibilitam a entrada do
848 patógeno na célula hospedeira, dando suporte a sobrevivência do patógenos bem
849 como a sua disseminação pelo hospedeiro (CHUZEVILLE *et al.*, 2012).

850

851 **Pili-2b protein**

852 Os pilli são apêndices produzidos pelo GBS e são considerados um
853 dos mais importantes fatores de virulência. Contribuem para a adesividade do GBS e
854 promovem a adesão bacteriana a matriz extracelular ou aos receptores do hospedeiro
855 (PEZZICOLI *et al.*, 2008), além de serem responsáveis pela formação do biofilmes
856 bacterianos (KONTO-GHIORGHI *et al.*, 2009).

857

858 **Hyaluronato lyase**

859 A Hyaluronato liase é uma proteína codificada pelo gene *hylB*
860 responsável pela degradação da da N-acetilglicosamina, que compõe o ácido
861 hialurônico. Sua degradação altera a viscosidade da matriz extracelular do hospedeiro
862 e facilita a invasão bacteriana. O ácido hialurônico é um glicosaminoglicano linear
863 presente em tecidos de mamíferos compondo grande parte da matriz extracelular.
864 Sintetizado por uma grande variedade de bactérias, apresenta-se como um
865 componente importante da cápsula bacteriana de patógenos Gram-positivos como
866 *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*,
867 *Streptomyces* e *Clostridium*, sendo um (HYNES & WALTON, 2000). Em
868 estreptococos, as hialuronato liases foram identificadas em bactérias dos grupos A,
869 B, C e G de Lancefield, (GRANLUND *et al.*, 1998).

870

871 **Surface protein rib**

872 Proteína de superfície celular presente em estreptococos do grupo B
873 (GBS), designada proteína *Rib* (resistência a proteases, imunidade, grupo B), que
874 concede imunidade protetora e é expresso pela maioria das cepas do tipo III

875 (STALHAMMAR-CARLEMALM *et al.*, 1993)

876

877 **C alpha protein**

878 A proteína alfa C (ACP) na superfície do GBS contribui para o
879 processo de infecção e colonização do hospedeiro, permitindo a transposição das
880 barreiras epiteliais e invasão das camadas celulares, através da ligação dessa
881 proteína ao glicosaminoglicano da superfície da célula hospedeira (GAG). Portanto
882 considera-se a proteína alfa C (ACP) como um fator de virulência do GBS que interage
883 com as células epiteliais e pode ser expresso em diversas cepas dos sorotipos Ia, Ib
884 e II e além de outros organismos gram-positivos (MADOFF *et al.*, 1991)

885

886 **C-beta protein**

887 Os antígenos da proteína C-beta são componentes imunodominantes
888 da superfície do *Streptococcus agalactiae*, sendo principalmente expressas pelos
889 sorotipos Ia, Ib e II. Seu mecanismo de atuação ocorre com a sua ligação a porção Fc
890 da IgA humana e é responsável pela resistência bacteriana aos mecanismos de
891 defesa imunológica da mucosa (SCHALEN, 1993).

892

893 **Serine Protease**

894 As proteases de serina bacterianas atuam em diversas etapas do
895 processo de infecção bacteriana, desde burlar os sistemas de defesa do organismo
896 hospedeiro, atuando na modulação do sistema imunológico bem como na destruição
897 dos tecidos infectados. Essa etapa ocorre com a introdução de um conjunto adicional
898 de proteases na célula hospedeira; esse excesso de enzimas e leva a um desequilíbrio
899 entre as proteases e seus inibidores, que ficam incapacitados de realizar sua função
900 regulatória e ocasiona a degradação dos tecidos infectados (BURCHACKA &
901 WITKOWSKA, 2016).

902

903 **Penicilim binding protein**

904 As proteínas de ligação à penicilina (PBPs) são proteínas sintetizadas
905 por bactérias que se ligam à penicilina e a outros antibióticos da classe dos β -
906 lactâmicos e são responsáveis pela síntese de peptidoglicanos, componente
907 essencial da parede celular bacteriana, promovendo a sua adesão na célula
908 hospedeira (LECLERCQ *et al.*, 2017)

909 **Immunogenic bacterial adhesion**

910 BibA foi encontrado covalentemente associado à parede celular
911 bacteriana e sua expressão é regulada pelo sistema que codificam fatores de
912 virulência conhecidos, como β -hemolisinas, responsáveis pela degradação de
913 esfingomielina da membrana celular das células hospedeiras (SANTI et al., 2009).

914

915 **GAPDH**

916 GAPDH é uma enzima encontrada em todas as células vivas e atua
917 principalmente nos processos de glicólise, além de participar da organização
918 estrutural da célula, transmissão de informação genética e redes de transdução de
919 sinal celular onde forma complexos funcionais com diversos componentes
920 celulares. Em estreptococos, o GAPDH encontra-se no citoplasma e é a principal
921 proteína de superfície desse patógeno, onde se liga à fibronectina dérmica do
922 hospedeiro, colaborando para sua colonização (PANCHOLI & FISCHETTI, 1992),
923 (BERGMANN *et al.*, 2004)

924

925 **Beta hemolisina**

926 As hemolisinas têm o papel de lise dos eritrócitos, onde a beta
927 hemolisina é responsável por degradar a esfingomielina presente na membrana
928 celular da célula do organismo hospedeiro. (LINEHAN *et al.*, 2003)

929

930

931 3 OBJETIVOS

932 3.1 OBJETIVOS GERAIS

933

934 Caracterização genética e comparação de patogenicidade de duas
935 cepas de *Streptococcus agalactiae* sorotipo III isoladas em tilápias-do-Nilo
936 (*Oreochromis niloticus*) cultivadas no Brasil.

937

938 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

939 • Inocular as cepas estocadas de *S. agalactiae* em tilápia-do-Nilo
940 para reativar a sua patogenicidade;

941 • Determinar a DL 50 de *S. agalactiae* sorotipo III em juvenis de
942 tilápia-do-Nilo, promovendo o desafio dessas duas cepas pelo método
943 de injeção intra visceral;

944 • Promover a caracterização genética de duas cepas de *S.*
945 *agalactiae* sorotipo III através de sequenciamento e montagem do
946 genoma;

947 • Comparar parcialmente os genomas das duas cepas de *S.*
948 *agalactiae* sorotipo III entre si;

949 • Identificar e relacionar a patogenicidade e fatores de virulência
950 das duas cepas de *S. agalactiae* sorotipo III entre si e entre a cepa de
951 *S. agalactiae* sorotipo Ib.

952

953 4 MATERIAL E MÉTODOS

954 4.1 RECUPERAÇÃO DA PATOGENICIDADE BACTERIANA

955

956 4.1.1 Inoculação das cepas para recuperação de patogenicidade

957

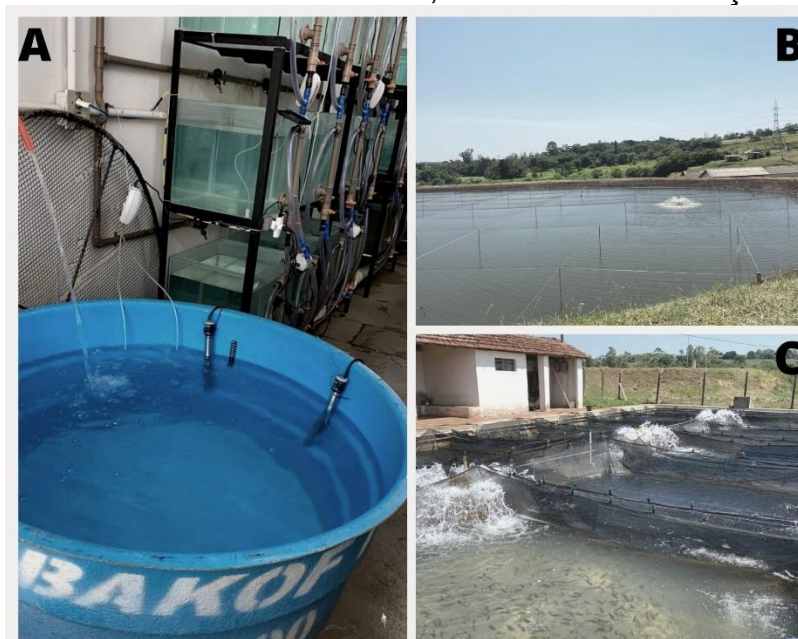
958 Para a recuperação da patogenicidade bacteriana foram utilizadas as
959 duas linhagens de *Streptococcus agalactiae* sorotipo III isoladas após surto de
960 estreptococose em tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil: cepas de *S.*
961 *agalactiae* sorotipo III Maranhão (proveniente do estado do Maranhão), *S. agalactiae*
962 sorotipo III Recife (proveniente da cidade de Recife, PE) além da cepa de *S. agalactiae*
963 sorotipo Ib E8 (proveniente da cidade de Londrina, PR). Todas as cepas estavam
964 armazenadas no laboratório de Microbiologia de Medicina Veterinária da UEL. Foram
965 semeadas 30µl do estoque em ágar columbia (semeadura por esgotamento) e
966 incubadas a 30°C por 48 horas. A partir das colônias isoladas, sua identificação foi
967 realizada por coloração de Gram. Duas a três colônias foram cultivadas em tubos de
968 ensaio contendo 10mL de TSB (Caldo de Triptona Soja) e incubadas a 30°C por 24 a
969 48 horas.

970 Os peixes utilizados em todos os estudos desse trabalho foram
971 provenientes de uma piscicultura da cidade de Londrina – PR, onde ficaram
972 armazenados para aclimatação durante dez dias em tanque de fibra com capacidade
973 para 500L, aquecimento a 28°C e renovação de água constante (Figura 1- A). A
974 alimentação foi oferecida duas vezes ao dia, com ração específica na proporção de
975 2% do peso de cada juvenil de tilápia-do-Nilo. Para a inoculação das bactérias nos
976 peixes foram utilizados três aquários d'água, um para cada cepa, com dez peixes
977 cada um, de peso semelhante e não foram alimentados no dia do experimento. Os
978 aquários continham aeração constante e temperatura média de 28°C (Figura 4). Cada
979 peixe foi inoculado com 0,1mL de solução de uma das cepas bacterianas a ser
980 recuperada. Os peixes foram acompanhados duas vezes ao dia, durante dez dias para
981 observação dos sinais clínicos como: nível de atividade, apetite, padrão de natação,
982 cor e formato dos olhos e distensão ventral. A alimentação foi oferecida duas vezes
983 ao dia com quantidade de ração equivalente de 2 a 3% de seu peso. Animais com
984 sinais clínicos evidentes de doença (como exoftalmia uni ou bilateral e opacidade
985 córnea uni ou bilateral) foram usados para isolamento de cepas. Amostras de rim e

986 encéfalo foram coletadas assepticamente através da técnica de swab, semeadas em
987 placas contendo ágar columbia sangue 5% (Acumedia®), incubadas a 30°C por 48
988 horas, protocolo adaptado de Pretto-Giordano *et al.* (2010).

989

990 **Figura 1** – Aclimação dos juvenis de tilápia-do-Nilo. **A** – Tanque de aclimação; **B**
991 – Piscicultura de Londrina-PR; **C** – Sistema de criação em tanque-escavado.



992

993

Fonte: do próprio autor

994

995 4.1.2 Coabitação com peixes previamente inoculados

996

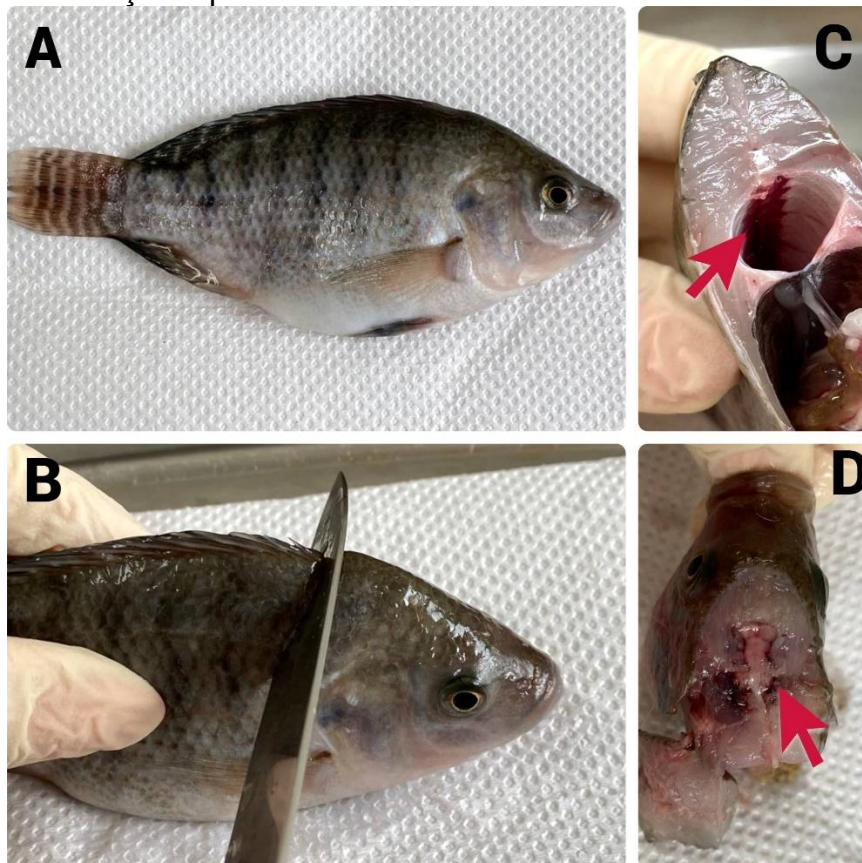
997 Peixes previamente inoculados com as cepas *Streptococcus*
998 *agalactiae* sorotipo III Maranhão, *S. agalactiae* sorotipo III Recife e *S. agalactiae*
999 sorotipo Ib E8 foram utilizados para recuperação das bactérias pelo método de
1000 coabitação. Dois peixes com sinais clínicos de estreptococose de cada cepa foram
1001 transferidos para novos aquários contendo cinco peixes saudáveis não inoculados.
1002 Os aquários continham aeração constante e temperatura média de 28°C. O
1003 acompanhamento foi feito durante quatorze dias para observação dos sinais clínicos
1004 como: nível de atividade, apetite, padrão de natação, cor e formato dos olhos e
1005 distensão ventral. A alimentação foi oferecida uma vez ao dia, com ração na proporção
1006 de 1,5% do peso de cada peixe.

1007

1008

1009

1010 **Figura 2** – Abertura dos peixes para coleta de *S. agalactiae* através da técnica de
1011 swab. **A** – Peixe com sinal clínico de estreptococose; **B** – Incisão realizada
1012 sagitalmente na região anterior da nadadeira dorsal; **C** – Exposição do rim (seta
1013 vermelha); **D** – Exposição do encéfalo (seta vermelha) após corte realizado na região
1014 da cabeça do peixe.



1015

1016 **Fonte:** do próprio autor

1017

1018 4.2 TESTES DE PATOGENICIDADE

1019

1020 4.2.1 Linhagens e Condições de Cultivo

1021

1022 Para os experimentos de patogenicidade foram utilizadas duas
1023 linhagens de *S. agalactiae* sorotipo III isoladas após surto de estreptococose em
1024 tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil: cepas de *S. agalactiae* sorotipo III
1025 Maranhão e *S. agalactiae* sorotipo III Recife, além da cepa de *S. agalactiae* sorotipo
1026 Ib E8 recuperadas previamente. Para os testes de patogenicidade, as linhagens foram
1027 cultivadas em caldo triptona de soja (Acumedia®) a 30°C sem agitação por 48 horas.
1028 A quantidade de células para cada linhagem foi estimada por contagem de UFC/mL.

1029

1030

1031 4.2.2 Detecção de *S. agalactiae* nos Testes de Patogenicidade

1032

1033 Para confirmação da presença de *S. agalactiae* nos juvenis de tilápia-
1034 do-Nilo utilizados no presente estudo, amostras de rim e encéfalo foram coletadas
1035 assepticamente através da técnica de swab dos peixes mortos e com sinais de
1036 estreptococose e semeadas em placas contendo ágar columbia sangue 5%
1037 (Acumedia®) e incubadas a 30°C por 48 horas, protocolo adaptado de Pretto-
1038 Giordano *et al.* (2010).

1039

1040 4.2.3 Infecção de Juvenis de Tilápia-do-Nilo

1041

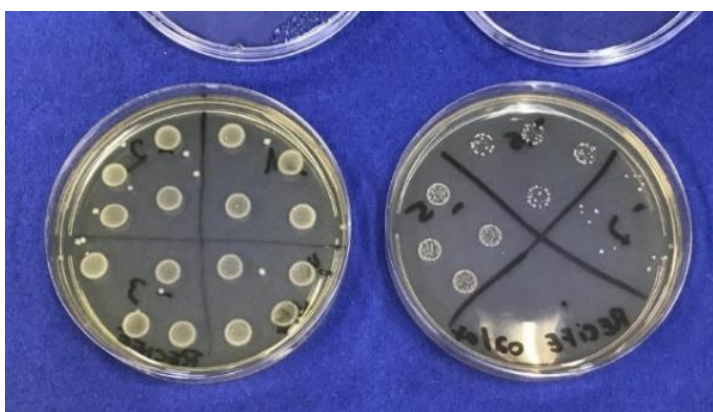
1042 Juvenis de tilápia-do-Nilo provenientes de uma estação de piscicultura
1043 da região de Londrina - PR com peso médio de 20g foram aclimatados por dez dias
1044 em tanque com capacidade para 500L, aeração constante, sistema para renovação
1045 de água, temperatura média de 28°C (Figura 1 - A) e alimentados com ração numa
1046 proporção de 2% do peso vivo, duas vezes ao dia. Peixes com sinais clínicos
1047 evidentes de doença como manchas corporais, alterações orbiculares ou mortos
1048 foram retirados do tanque durante todo o período de aclimação para evitar a
1049 contaminação dos demais juvenis por possíveis patógenos.

1050 Os ensaios foram realizados em triplicata em aquários d'água
1051 contendo 10 juvenis cada um, com sistema de renovação de água, aeração constante
1052 e temperatura média de 28°C. Em cada peixe foi aplicado por via visceral, um volume
1053 de 0,1 mL de cultura bacteriana. Os inóculos da cepa Ib continham $1,4 \times 10^8$ UFC/mL,
1054 $1,4 \times 10^7$ UFC/mL, $1,4 \times 10^6$ UFC/mL e $1,4 \times 10^5$ UFC/mL de *S. agalactiae* sorotipo Ib, os
1055 inóculos da cepa Maranhão continham $1,2 \times 10^7$ UFC/mL, $1,2 \times 10^6$ UFC/mL, $1,2 \times 10^5$
1056 UFC/mL e $1,2 \times 10^4$ UFC/mL de *S. agalactiae* sorotipo III Maranhão e os inóculos da
1057 cepa Recife continham $1,0 \times 10^7$, $1,0 \times 10^6$, $1,0 \times 10^5$ e $1,0 \times 10^4$ UFC/mL de *S. agalactiae*
1058 sorotipo III Recife. A contagem das colônias bacterianas utilizadas na inoculação foi
1059 realizada logo após a diluição em solução salina através do gotejamento do inóculo
1060 em suas diferentes concentrações em placa contendo meio TSA (Figura 3). Um
1061 aquário d'água foi utilizado como controle, ao qual foram adicionados dez juvenis
1062 saudáveis, afincados com agulha, mas sem inoculação. Após a inoculação, os peixes
1063 foram alimentados com ração numa proporção de 2% do peso vivo, duas vezes ao dia
1064 e observados durante quatorze dias para verificação de sinais clínicos e mortalidade.

1065 A partir de cada diluição de cada uma das linhagens, os animais mortos foram
1066 submetidos a coleta de amostras por swab de rim e encéfalo (Figura 2) e semeadura
1067 em placa contendo ágar columbia sangue 5% (Acumedia®) e incubadas a 30°C por
1068 48 horas, protocolo adaptado de Pretto-Giordano *et al.* (2010) para visualização das
1069 colônias bacterianas e confirmação da presença de *S. agalactiae* nos órgãos
1070 analisados.

1071

1072 **Figura 3** - Contagem de colônias de *S. agalactiae* sorotipo III cepa Recife através da
1073 técnica de gotejamento



1074

1075 **Fonte:** o próprio autor.

1076

1077 **Figura 4** – Experimentos. **A** – Peixes no aquário de experimento logo após a
1078 inoculação; **B** - Aquário com renovação de água, aquecimento e aeração; **C** –
1079 Aquários com experimentos em andamento



1080

1081

1082

Fonte: do próprio autor

1083 4.3 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DO *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE*

1084

1085 Para o sequenciamento do genoma, as culturas foram cultivadas
1086 como descrito previamente. O DNA foi extraído usando o kit Wizard® Genomic DNA
1087 Purification kit (Promega). Posteriormente foi avaliado em gel de agarose 0,85%
1088 corado com SyberSafe (Promega) e quantificado em NanoDrop. O sequenciamento
1089 foi realizado em plataforma Illumina Hiseq/Miseq. A qualidade foi avaliada pelo
1090 programa FAsTQC onde leituras com qualidade inferior a 30 (PhredScore) foram
1091 removidas. A montagem do genoma foi realizada através do programa Spades
1092 V.3.9.0. O genoma montado foi usado para busca e anotação dos genes através do
1093 programa RAST. Os dados de anotação foram utilizados para caracterização do perfil
1094 genômico de cada linhagem, na busca de semelhanças nos perfis gênicos entre as
1095 cepas de *S. agalactiae* sorotipo Ib e III e cepas de *S. agalactiae* III Recife e Maranhão
1096 entre si. Foi realizada a busca de fatores de virulência presentes em cada cepa para
1097 posterior comparação desses perfis de virulência das cepas de *S. agalactiae* Ib e III e
1098 cepas de *S. agalactiae* III Recife e Maranhão entre si.

1099 5 RESULTADOS

1100 5.1 REATIVAÇÃO DA PATOGENICIDADE BACTERIANA

1101

1102 Após a inoculação para reativação da patogenicidade das bactérias
1103 obtivemos os seguintes resultados após dez dias de observação: para a cepa Recife,
1104 dos dez peixes inoculados, três morreram na primeira semana e nenhum na segunda
1105 semana. A mortalidade nesse experimento foi de 30%. Dos peixes sobreviventes, dois
1106 juvenis com sinais clínicos de estreptococose foram passados, na primeira semana,
1107 para o aquário da coabitação, com cinco peixes saudáveis. Um (1) peixe com sinal
1108 clínico de estreptococose foi passado para a coabitação na segunda semana. Os
1109 sobreviventes (quatro peixes) apresentaram leve exoftalmia e leve distensão
1110 abdominal. Todos os peixes deste aquário apresentaram sinais de estreptococose.

1111 A cepa Maranhão, dos dez peixes inoculados, cinco morreram na
1112 primeira semana e nenhum na segunda semana. A mortalidade nesse experimento
1113 foi de 50%. Dois peixes com sinais clínicos de estreptococose foram passados na
1114 primeira semana para o aquário da coabitação com cinco peixes saudáveis.
1115 Sobreviveram três peixes que apresentaram leve exoftalmia, leve natação errática e
1116 coloração corporal escurecida. Todos os peixes deste aquário apresentaram sinais de
1117 estreptococose.

1118 A cepa Ib, dos dez peixes inoculados, três morreram na primeira
1119 semana e nenhum morreu na segunda semana. A mortalidade nesse experimento foi
1120 de 30%. Dois peixes com sinais clínicos de estreptococose foram passados na
1121 primeira semana para o aquário da coabitação. Ao final do experimento, cinco peixes
1122 sobreviveram e apresentaram leve exoftalmia, manchas corporais e leve distensão
1123 abdominal. Todos os peixes deste aquário apresentaram sinais de estreptococose.

1124 Antes de iniciar esse experimento, durante a aclimação dos juvenis,
1125 um (1) peixe apresentou sinais de estreptococose. Este foi retirado do tanque e após
1126 análise microbiológica foi constatado que o peixe estava contaminado com *S.*
1127 *agalactiae* sorotipo Ib, mas diferente da cepa de *S. agalactiae* recuperada neste
1128 estudo. Esta nova cepa foi denominada cepa Ib novo e estocada para posteriores
1129 estudos.

1130

1131

1132 **Tabela 2.** Mortalidade dos peixes após a inoculação para reativação da
1133 patogenicidade bacteriana

	Cepa Recife	Cepa Maranhão	Cepa Ib
Mortos na primeira semana	3	5	3
Mortos na segunda semana	0	0	0
Total	3	5	3
Mortalidade	30%	50%	30%
Coabitação primeira semana	2	2	2
Coabitação segunda semana	1	0	0
Sobreviventes com sinais	4	3	5

1134 Fonte: do próprio autor

1135

1136

1137 **Figura 5** – Placa de ágar-sangue com crescimento das colônias de *S. agalactiae*
1138 sorotipo III recuperadas dos peixes.



1139

1140 Fonte: do próprio autor

1141

1142 5.2 EXPERIMENTO DE COABITAÇÃO

1143

1144 No experimento de coabitação obtivemos os seguintes resultados
1145 após quatorze dias de observação: no aquário da cepa Recife, dois peixes inoculados
1146 mais cinco peixes saudáveis, nenhum morreu na primeira semana e um (1) morreu na
1147 segunda semana. Quatro peixes sobreviveram e apresentaram sinais de
1148 estreptococose como leve exoftalmia, leve distensão abdominal e manchas corporais.
1149 Todos os peixes deste aquário apresentaram sinais de estreptococose.

1150

1151 No aquário da cepa Maranhão, dois peixes inoculados mais 5 peixes
1152 saudáveis, um (1) morreu na primeira semana e um (1) morreu na segunda semana.
1153 Três peixes sobreviveram e apresentaram exoftalmia, leve opacidade córnea e
manchas corporais. Todos os peixes deste aquário apresentaram sinais de

1154 estreptococose.

1155 No aquário da cepa lb, dois peixes inoculados mais cinco peixes
1156 saudáveis, nenhum morreu na primeira semana, nenhum morreu na segunda semana.
1157 Cinco peixes sobreviveram e apresentaram exoftalmia, opacidade córnea, leve
1158 distensão abdominal e manchas corporais. Todos os peixes deste aquário
1159 apresentaram sinais de estreptococose (Figura 6).

1160

1161

1162 **Tabela 3.** Mortalidade dos peixes após o experimento de coabitação

	Cepa Recife	Cepa Maranhão	Cepa lb
Mortos na primeira semana	0	1	0
Mortos na segunda semana	1	1	0
Mortalidade	20%	40%	0
Sobreviventes	4	3	5

1163 Fonte: do próprio autor

1164

1165

1166 **Figura 6** - Sinais clínicos observados em peixes infectados com *S. agalactiae* sorotipo
1167 lb cepa E8 no experimento de coabitação. **A** – distensão abdominal e manchas
1168 corporais, **B** – exoftalmia bilateral, **C** – opacidade córnea.



1169 Fonte: do próprio autor

1170

1171

1172 **5.3 PRIMEIRA INOCULAÇÃO DAS CEPAS RECUPERADAS**

1173

1174
1175 Após a primeira inoculação com as bactérias recuperadas obtivemos
1176 os seguintes resultados após quatorze dias de observação: no aquário da cepa Recife,
1177 dez peixes inoculados, três peixes morreram na primeira semana, nenhum morreu na

1178 segunda semana. Sobreviveram sete peixes que apresentaram sinais de
1179 estreptococose como leve exoftalmia, manchas corporais e leve distensão abdominal.

1180 No aquário da cepa Maranhão, dez peixes inoculados, três peixes
1181 morreram na primeira semana, nenhum morreu na segunda semana. Sobreviveram
1182 sete peixes que apresentaram sinais de estreptococose como leve exoftalmia,
1183 manchas corporais e leve distensão abdominal, sendo um (1) peixe com início de
1184 natação errática.

1185 No aquário da cepa lb, dez peixes inoculados, um (1) peixe morreu na
1186 primeira semana, um (1) peixe morreu na segunda semana. Sobreviveram oito peixes
1187 com sinais de estreptococose como leve exoftalmia, manchas corporais e leve
1188 distensão abdominal.

1189 Foi realizada a inoculação com a nova cepa encontrada em nosso
1190 experimento, a cepa lb novo. No aquário, dez peixes inoculados, dois peixes morreram
1191 na primeira semana e um (1) peixe morreu na segunda semana. Sobreviveram sete
1192 peixes com sinais de estreptococose como leve exoftalmia, manchas corporais e leve
1193 distensão abdominal.

1194

1195 **Tabela 4.** Mortalidade dos peixes após a primeira inoculação com cepas recuperadas

	Cepa Recife	Cepa Maranhão	Cepa lb	Cepa lb novo
Mortos na primeira semana	3	3	1	2
Mortos na segunda semana	0	0	1	3
Mortalidade	30%	30%	20%	50%
Sobreviventes com sinais	7	7	8	7

1196 Fonte: do próprio autor

1197

1198

1199 5.4 INOCULAÇÃO COM DIFERENTES DILUIÇÕES – CEPA LB

1200

1201 Após a primeira inoculação com a **cepa lb** recuperada, obtivemos os
1202 seguintes resultados após sete dias de observação:

1203 **Diluição 10⁸ UFC/mL:** o experimento foi realizado em triplicata, onde
1204 no aquário 1 foram inoculados dez peixes, cinco peixes morreram na primeira semana.
1205 Cinco peixes sobreviveram e apresentaram sinais de estreptococose como manchas
1206 corporais, exoftalmia e opacidade córnea e um (1) peixe com natação errática e desvio
1207 de coluna. A mortalidade nesse aquário foi de 50%. No aquário 2 foram inoculados

1208 dez peixes e os dez peixes morreram na primeira semana. A mortalidade nesse
1209 aquário foi de 100%. No aquário 3 foram inoculados dez peixes e os dez peixes
1210 morreram na primeira semana. A mortalidade nesse aquário foi de 100%. Todos os
1211 peixes inoculados apresentaram sinais de estreptococose. A mortalidade para essa
1212 concentração foi de 83,4%.

1213 **Diluição 10⁷ UFC/mL:** o experimento foi realizado em triplicata, onde
1214 no aquário 1 foram inoculados dez peixes, seis peixes morreram na primeira semana.
1215 Quatro peixes sobreviveram e três apresentaram sinais de estreptococose: dois
1216 peixes apresentaram manchas corporais, exoftalmia, opacidade córnea e início de
1217 natação errática e um (1) peixe apresentou escurecimento corporal, exoftalmia,
1218 opacidade córnea, natação errática e desvio de coluna. Um (1) peixe não apresentou
1219 sinais de doença. No aquário 2 foram inoculados dez peixes, sete peixes morreram
1220 na primeira semana. Três peixes sobreviveram, sendo 2 peixes com manchas
1221 corporais, exoftalmia, opacidade córnea e um (1) peixe com natação errática. No
1222 aquário 3 foram inoculados dez peixes e os dez morreram na primeira semana. A
1223 mortalidade para essa concentração foi de 76,7%.

1224 **Diluição 10⁶ UFC/mL:** o experimento foi realizado em triplicata, onde
1225 no aquário 1 foram inoculados dez peixes, oito peixes morreram na primeira semana.
1226 Dois peixes sobreviveram, sendo um (1) peixe com escurecimento corporal,
1227 exoftalmia, opacidade córnea, natação errática e um (1) peixe sem sinais de doença.
1228 No aquário 2 foram inoculados dez peixes, nove peixes morreram na primeira semana.
1229 Um (1) peixe sobreviveu e apresentou manchas corporais. No aquário 3 foram
1230 inoculados dez peixes, seis peixes morreram na primeira semana. Quatro peixes
1231 sobreviveram e apresentaram com manchas corporais, exoftalmia e opacidade
1232 córnea. A mortalidade para essa concentração foi de 76,7%.

1233 **Diluição 10⁵ UFC/mL:** o experimento foi realizado em triplicata, onde
1234 no aquário 1 foram inoculados dez peixes, oito peixes morreram na primeira semana.
1235 Dois peixes sobreviveram e apresentaram sinais de doença, sendo um (1) peixe com
1236 escurecimento corporal, exoftalmia e opacidade córnea e um (1) peixe com desvio de
1237 coluna. No aquário 2 foram inoculados dez peixes, oito peixes morreram na primeira
1238 semana. Dois peixes sobreviveram, sendo um (1) peixe com escurecimento corporal
1239 e natação errática e um (1) peixe sem sinais de doença. No aquário 3 foram
1240 inoculados dez peixes, nove peixes morreram na primeira semana. Um (1) peixe
1241 sobrevivente com manchas corporais, exoftalmia e opacidade córnea. A mortalidade

1242 para essa concentração foi de 83,4%.

1243 No aquário controle para esse experimento, um (1) peixe morreu no
1244 primeiro dia de observação. Ao final do experimento sobreviveram nove peixes sem
1245 sinais clínicos de doença.

1246

1247 **Tabela 5.** Mortalidade dos peixes após a primeira inoculação com diferentes diluições
1248 de *S. agalactiae* sorotipo IB cepa E8 recuperada

	Diluição 10 ⁸	Diluição 10 ⁷	Diluição 10 ⁶	Diluição 10 ⁵
Aquário 1	5	6	8	8
Aquário 2	10	7	9	8
Aquário 3	10	10	6	9
Total 7 dias	25	22	23	25
Mortalidade	83,4%	73,4%	76,7%	83,4%

1249 Fonte: do próprio autor

1250

1251 Após a segunda inoculação da **cepa Ib** recuperada, obtivemos os
1252 seguintes resultados após quatorze dias de observação:

1253 **Diluição 1,4x10⁸ UFC/mL:** o experimento foi realizado em triplicata,
1254 onde no aquário 1 foram inoculados dez peixes, cinco peixes morreram na primeira
1255 semana e dois peixes morreram na segunda semana. Três peixes sobreviveram e
1256 apresentaram manchas corporais. No aquário 2 foram inoculados dez peixes, sete
1257 peixes morreram na primeira semana e dois peixes morreram na segunda semana.
1258 Um (1) peixe sobreviveu e apresentou natação errática, desvio de coluna e olhos
1259 escurecidos. No aquário 3 foram inoculados dez peixes, seis peixes morreram na
1260 primeira semana e dois peixes morreram na segunda semana. Dois peixes
1261 sobreviveram, sendo que um (1) peixe apresentou opacidade córnea bilateral e um
1262 (1) peixe não apresentou sinais clínicos de doença. A mortalidade para essa
1263 concentração foi de 80%.

1264 **Diluição 1,4x10⁷ UFC/mL:** o experimento foi realizado em triplicata,
1265 onde no aquário 1 foram inoculados dez peixes, sete peixes morreram na primeira
1266 semana e nenhum morreu na segunda semana. Três peixes sobreviveram, sendo que
1267 dois peixes apresentaram escurecimento corporal e um (1) peixe não apresentou
1268 sinais clínicos de doença. No aquário 2 foram inoculados dez peixes, seis peixes
1269 morreram na primeira semana e dois peixes morreram na segunda semana. Dois
1270 peixes sobreviveram, sendo que um (1) peixe apresentou escurecimento corporal e
1271 um (1) peixe não apresentou sinais clínicos de doença. No aquário 3 foram inoculados

1272 dez peixes, três peixes morreram na primeira semana e três peixes morreram na
1273 segunda semana. Quatro peixes sobreviveram, sendo que um (1) peixe apresentou
1274 natação errática, um (1) peixe apresentou opacidade córnea unilateral e dois peixes
1275 não possuíam sinais clínicos de doença. A mortalidade para essa concentração foi de
1276 70%

1277 **Diluição $1,4 \times 10^6$ UFC/mL:** o experimento foi realizado em triplicata,
1278 onde no aquário 1 foram inoculados dez peixes, oito peixes morreram na primeira
1279 semana e um (1) peixe morreu na segunda semana. Um (1) peixe sobreviveu e não
1280 possuía sinais clínicos de doença. No aquário 2 foram inoculados dez peixes, sete
1281 peixes morreram na primeira semana e nenhum morreu na segunda semana. Três
1282 peixes sobreviveram e não apresentaram sinais clínicos de doença. No aquário 3
1283 foram inoculados dez peixes, oito peixes morreram na primeira semana e um (1) peixe
1284 morreu na segunda semana. Um (1) peixe sobreviveu e não apresentou sinais clínicos
1285 de doença. A mortalidade para essa concentração foi de 83,4%.

1286 **Diluição $1,4 \times 10^5$ UFC/mL:** o experimento foi realizado em triplicata,
1287 onde no aquário 1 foram inoculados dez peixes, cinco peixes morreram na primeira
1288 semana e dois peixes morreram na segunda semana. Três peixes sobreviveram,
1289 sendo que um (1) peixe apresentou opacidade córnea unilateral e dois peixes não
1290 apresentaram sinais clínicos de doença. No aquário 2 foram inoculados dez peixes,
1291 quatro peixes morreram na primeira semana e um (1) peixe morreu na segunda
1292 semana. Cinco peixes sobreviveram e não apresentaram sinais clínicos de doença.
1293 No aquário 3 foram inoculados dez peixes, cinco peixes morreram na primeira semana
1294 e dois peixes morreram na segunda semana. Três peixes sobreviveram e não
1295 possuíam sinais clínicos de doença. A mortalidade para essa concentração foi de
1296 63,4%.

1297 No aquário controle para esse experimento não houve mortes e os
1298 dez peixes não apresentaram sinais clínicos de doença.

1299 Para essa concentração inoculada, a análise das concentrações
1300 realizadas pelo programa Prisma evidenciou a DL50 na concentração $1,1 \times 10^6$
1301 UFC/mL, com $R = 0,3278$.

1302

1303

1304

1305

1306 **Tabela 6.** Mortalidade dos peixes após repetição da inoculação com diferentes
1307 diluições de *S. agalactiae* sorotipo Ib cepa E8, de acordo com o dia e a concentração

Dia	$1,4 \times 10^8$ UFC/mL	$1,4 \times 10^7$ UFC/mL	$1,4 \times 10^6$ UFC/mL	$1,4 \times 10^5$ UFC/mL
1	1	3	0	1
2	4	4	8	5
3	0	0	0	0
4	2	1	3	0
5	8	7	3	1
6	1	1	1	2
7	3	0	5	5
7 dias	19	16	21	14
8	1	3	0	1
9	2	1	1	1
10	1	0	0	0
11	1	0	1	1
12	0	0	0	1
13	0	0	0	0
14	0	0	0	0
Total 14 dias	24	20	23	18

1308 Fonte: do próprio autor

1309

1310

1311 **Figura 7** – Tilápia-do-Nilo com sinal de estreptococose provocada pelo *S. agalactiae*
1312 sorotipo Ib cepa E8: escurecimento corporal, exoftalmia bilateral e opacidade córnea.



1313

1314 Fonte: do próprio autor

1315

1316

1317 5.5 INOCULAÇÃO COM DIFERENTES DILUIÇÕES – CEPA MARANHÃO

1318

1319 Após a inoculação de *S. agalactiae* sorotipo III **cepa Maranhão**
1320 recuperada, obtivemos os seguintes resultados após quatorze dias de observação:

1321

Diluição $1,2 \times 10^7$ UFC/mL: o experimento foi realizado em triplicata,

1322 onde no aquário 1 foram inoculados dez peixes, um (1) peixe morreu na primeira
1323 semana e nenhum morreu na segunda semana. Nove peixes sobreviveram, sendo um
1324 (1) peixe com natação errática, dois peixes com escurecimento corporal, exoftalmia e
1325 opacidade córnea bilateral, dois peixes com manchas corporais e 3 peixes não
1326 apresentaram sinais clínicos de doença. No aquário 2 foram inoculados 10 peixes,
1327 nenhum morreu na primeira e segunda semana. Os dez peixes sobreviveram, sendo
1328 que quatro peixes apresentaram escurecimento corporal e opacidade córnea
1329 unilateral, quatro peixes apresentaram apenas o escurecimento corporal e dois peixes
1330 apresentaram manchas corporais. No aquário 3 foram inoculados dez peixes, um (1)
1331 peixe morreu na primeira semana e nenhum morreu na segunda semana. Nove peixes
1332 sobreviveram, sendo que um (1) peixe apresentou escurecimento corporal, exoftalmia
1333 e opacidade córnea unilateral e oito peixes apresentaram manchas corporais. A
1334 mortalidade para essa concentração foi de 6,7%.

1335 **Diluição $1,2 \times 10^6$ UFC/mL:** o experimento foi realizado em triplicata,
1336 onde no aquário 1 foram inoculados dez peixes, quatro peixes morreram na primeira
1337 semana e nenhum morreu na segunda semana. Seis peixes sobreviveram, onde
1338 quatro peixes apresentaram escurecimento corporal e dois peixes não apresentaram
1339 sinais clínicos de doença. No aquário 2 foram inoculados dez peixes, um (1) peixe
1340 morreu na primeira semana e um (1) peixe morreu na segunda semana. Oito peixes
1341 sobreviveram e apresentaram manchas corporais. No aquário 3 foram inoculados dez
1342 peixes, três peixes morreram na primeira semana e nenhum morreu na segunda
1343 semana. Sete peixes sobreviveram, onde dois peixes apresentaram manchas
1344 corporais e opacidade córnea unilateral e cinco peixes apresentaram somente
1345 manchas corporais. A mortalidade para essa concentração foi de 30%.

1346 **Diluição $1,2 \times 10^5$ UFC/mL:** o experimento foi realizado em triplicata,
1347 onde no aquário 1 foram inoculados dez peixes, um (1) peixe morreu na primeira
1348 semana e nenhum morreu na segunda semana. Nove peixes sobreviveram, onde
1349 quatro peixes apresentaram um leve escurecimento corporal e quatro peixes não
1350 apresentaram sinais clínicos de doença. No aquário 2 foram inoculados dez peixes,
1351 dois peixes morreram na primeira semana e nenhum morreu na segunda semana.
1352 Oito peixes sobreviveram, onde um (1) peixe apresentou escurecimento corporal, três
1353 peixes apresentaram leve escurecimento corporal e quatro peixes não apresentaram
1354 sinais clínicos de doença. No aquário 3 foram inoculados dez peixes, três peixes
1355 morreram na primeira semana e nenhum morreu na segunda semana. Sete peixes

1356 sobreviveram e apresentaram manchas corporais. A mortalidade para essa
1357 concentração foi de 20%.

1358 **Diluição $1,2 \times 10^4$ UFC/mL:** o experimento foi realizado em triplicata,
1359 onde no aquário 1 foram inoculados dez peixes, dois peixes morreram na primeira
1360 semana e um (1) peixe morreu na segunda semana. Sete peixes sobreviveram, onde
1361 um (1) peixe apresentou leve escurecimento corporal e opacidade córnea unilateral e
1362 seis peixes apresentaram manchas corporais. No aquário 2 foram inoculados dez
1363 peixes, seis peixes morreram na primeira semana e três peixes morreram na segunda
1364 semana. Um (1) peixe sobreviveu e apresentou leve distensão abdominal. No aquário
1365 3 foram inoculados dez peixes, cinco peixes morreram na primeira semana e nenhum
1366 morreu na segunda semana. Cinco peixes sobreviveram onde um (1) peixe
1367 apresentou natação errática, opacidade córnea bilateral e leve escurecimento
1368 corporal, um (1) peixe apresentou somente a natação errática e três peixes não
1369 apresentaram sinais clínicos de doença. A mortalidade para essa concentração foi de
1370 56,7%.

1371 No aquário controle para esse experimento, um (1) peixe morreu no
1372 primeiro dia de observação e um (1) peixe morreu no segundo dia de observação. Ao
1373 final do experimento sobreviveram oito peixes sem sinais clínicos de doença.

1374 Para essa concentração inoculada, a análise das concentrações
1375 realizadas pelo programa Prisma evidenciou a DL50 na concentração $1,5 \times 10^5$
1376 UFC/mL, com $R=0,5184$.

1377

1378

1379

1380

1381

1382

1383

1384

1385

1386

1387

1388

1389 **Tabela 7.** Mortalidade dos peixes inoculados com *S. agalactiae* sorotipo III cepa
 1390 Maranhão de acordo com o dia e a concentração

Dia	1,2x10 ⁷ UFC/mL	1,2x10 ⁶ UFC/mL	1,2x10 ⁵ UFC/mL	1,2x10 ⁴ UFC/mL
0	0	0	1	2
1	1	3	0	2
2	0	0	3	1
3	0	0	0	1
4	1	2	0	1
5	0	1	0	3
6	0	0	1	4
7	0	2	1	0
7 dias	2	8	6	13
8	0	1	0	2
9	0	0	0	0
10	0	0	0	1
11	0	0	0	0
12	0	0	0	0
13	0	0	0	0
14	0	0	0	1
total 14 dias	2	9	6	17

1391 **Fonte:** do próprio autor.

1392

1393 **Figura 8** – Tilápia-do-Nilo com sinal de estreptococose provocada pelo *S. agalactiae*
 1394 sorotipo III cepa Maranhão: natação errática.



1395
 1396
 1397

Fonte: do próprio autor

1398 5.6 INOCULAÇÃO COM DIFERENTES DILUIÇÕES – CEPA RECIFE

1399

1400 Após a inoculação de *S. agalactiae* sorotipo III **cepa Recife**
 1401 recuperada, obtivemos os seguintes resultados após quatorze dias de observação:

1402 **Diluição 10⁷ UFC/mL:** o experimento foi realizado em triplicata, onde
 1403 no aquário 1 foram inoculados dez peixes e todos morreram na primeira semana. No

1404 aquário 2 foram inoculados dez peixes, seis peixes morreram na primeira semana e
1405 um (1) peixe morreu na segunda semana. Três peixes sobreviveram apresentando
1406 escurecimento corporal e opacidade córnea unilateral, e natação errática. No aquário
1407 3 foram inoculados dez peixes e todos morreram na primeira semana. A mortalidade
1408 para essa concentração foi de 90%.

1409 **Diluição 10⁶ UFC/mL:** o experimento foi realizado em triplicata, onde
1410 no aquário 1 foram inoculados dez peixes, seis peixes morreram na primeira semana
1411 e dois peixes morreram na segunda semana. Dois peixes sobreviveram, onde um (1)
1412 apresentou início de natação errática e o outro não apresentou sinais clínicos de
1413 doença. No aquário 2 foram inoculados dez peixes, quatro peixes morreram na
1414 primeira semana e quatro peixes morreram na segunda semana. Dois peixes
1415 sobreviveram, onde um (1) apresentou natação errática, desvio de coluna e opacidade
1416 córnea bilateral e o outro apresentou natação errática e opacidade córnea unilateral.
1417 No aquário 3 foram inoculados dez peixes, sete peixes morreram na primeira semana
1418 e nenhum morreu na segunda semana. Três peixes sobreviveram, onde um (1)
1419 apresentou natação errática e opacidade córnea unilateral, um (1) apresentou natação
1420 errática e opacidade córnea bilateral e um (1) peixe não apresentou sinais clínicos de
1421 doença. A mortalidade para essa concentração foi de 76,7%.

1422 **Diluição 10⁵ UFC/mL:** o experimento foi realizado em triplicata, onde
1423 no aquário 1 foram inoculados dez peixes, três peixes morreram na primeira semana
1424 e um (1) peixe morreu na segunda semana. Seis peixes sobreviveram, onde um (1)
1425 peixe apresentou natação errática e escurecimento corporal e cinco peixes não
1426 apresentaram sinais clínicos de doença. No aquário 2 foram inoculados dez peixes,
1427 seis peixes morreram na primeira semana e um (1) peixe morreu na segunda semana.
1428 Três peixes sobreviveram onde um (1) peixe apresentou natação errática e opacidade
1429 córnea bilateral, um (1) peixe apresentou opacidade córnea unilateral e um (1) peixe
1430 não apresentou sinais clínicos de doença. No aquário 3 foram inoculados dez peixes,
1431 quatro peixes morreram na primeira semana e um (1) peixe morreu na segunda
1432 semana. Cinco peixes sobreviveram, onde um (1) peixe apresentou natação errática
1433 e opacidade córnea unilateral e os demais não apresentaram sinais clínicos de
1434 doença. A mortalidade para essa concentração foi de 53,4%.

1435 **Diluição 10⁴ UFC/mL:** o experimento foi realizado em triplicata, onde
1436 no aquário 1 foram inoculados dez peixes, cinco peixes morreram na primeira semana
1437 e nenhum morreu na segunda semana. Cinco peixes sobreviveram, onde um (1) peixe

1438 apresentou natação errática e opacidade córnea unilateral e os demais peixes não
1439 apresentaram sinais clínicos de doença. No aquário 2 foram inoculados dez peixes,
1440 sete peixes morreram na primeira semana e nenhum morreu na segunda semana.
1441 Três peixes sobreviveram, onde um (1) peixe apresentou natação errática, opacidade
1442 córnea unilateral e escurecimento corporal, um (1) peixe apresentou natação errática,
1443 escurecimento corporal e um (1) peixe não apresentou sinais clínicos de doença. No
1444 aquário 3 foram inoculados dez peixes, quatro peixes morreram na primeira semana
1445 e nenhum morreu na segunda semana. Seis peixes sobreviveram, onde um (1) peixe
1446 apresentou natação errática, desvio de coluna e opacidade córnea unilateral, um (1)
1447 peixe apresentou início de opacidade córnea unilateral e os demais peixes não
1448 apresentaram sinais clínicos de doença. A mortalidade para essa concentração foi de
1449 53,4%.

1450 No aquário controle para esse experimento, um (1) peixe morreu no
1451 primeiro dia de observação. Ao final do experimento sobreviveram nove peixes sem
1452 sinais clínicos de doença.

1453 Para essa concentração inoculada, a análise das concentrações
1454 realizadas pelo programa Prisma evidenciou a DL50 na concentração $1,1 \times 10^6$
1455 UFC/mL, com $R = 0,6792$.

1456
1457

1458 **Figura 9** – Tilápia-do-Nilo com sinal de estreptococose provocada pelo *S. agalactiae*
1459 sorotipo III cepa Recife: exoftalmia e opacidade córnea.



1460
1461
1462

Fonte: do próprio autor

1463

1464 **Tabela 8.** Mortalidade dos peixes inoculados com *S. agalactiae* sorotipo III cepa
 1465 Recife de acordo com o dia e a concentração

Dia	10⁷ UFC/mL	10⁶ UFC/mL	10⁵ UFC/mL	10⁴ UFC/mL
1	13	1	8	9
2	2	4	1	3
3	4	4	2	1
4	1	3	0	0
5	5	1	0	2
6	1	0	1	1
7	0	1	1	0
7 dias	28	14	13	16
8	1	2	0	0
9	0	1	0	0
10	0	0	1	0
11	0	0	1	0
12	0	0	1	0
13	0	0	0	0
14	0	2	0	0
total em 14 dias	29	19	16	16

1466 **Fonte:** do próprio autor.

1467

1468

1469 5.7 COMPARAÇÃO GENÔMICA

1470

1471 Por se tratar de duas cepas diferentes, seu estudo genômico foi
 1472 realizado separadamente. O programa utilizado para a caracterização genômica –
 1473 RAST: (Rapid Annotation using Subsystem Technology) - realizou a anotação dos
 1474 genomas bacterianos completos ou quase completos e forneceu os dados com alta
 1475 qualidade para esses genomas em toda a árvore filogenética a qual o organismo
 1476 encontra-se próximo. Ao examinar detalhadamente as características dos
 1477 subsistemas fornecidos pelo programa RAST encontramos poucas diferenças entre
 1478 as cepas estudadas. A caracterização do perfil genômico das cepas de *S. agalactiae*
 1479 sorotipo III Recife e Maranhão revelou padrões muito semelhantes, como
 1480 demonstrados na tabela a seguir:

1481

1482

1483

1484

1485 **Tabela 9.** Comparação da caracterização do perfil genômico de *S. agalactiae* sorotipo
 1486 III cepas Recife e Maranhão

Perfil Genômico	Cepa Recife	Cepa Maranhão
contigs (\geq 0 bp)	43	37
contigs (\geq 1000 bp)	21	19
contigs (\geq 5000 bp)	20	17
contigs (\geq 10000 bp)	17	16
contigs (\geq 25000 bp)	14	13
contigs (\geq 50000 bp)	11	11
Total length (\geq 0 bp)	2053131	2052547
Total length (\geq 1000 bp)	2046987	2047507
Total length (\geq 5000 bp)	2042015	2041414
Total length (\geq 10000 bp)	2019513	2031741
Total length (\geq 25000 bp)	1962921	1975122
Total length (\geq 50000 bp)	1871847	1917512
contigs	23	21
Largest contig	712666	490994
Total length	2048635	2048858
GC (%)	35.22	35.22
N50	352641	262165
N75	91365	91543
L50	2	3
L75	7	6

1487 **Fonte:** RAST (2021)

1488

1489

1490

1491

1492

1493

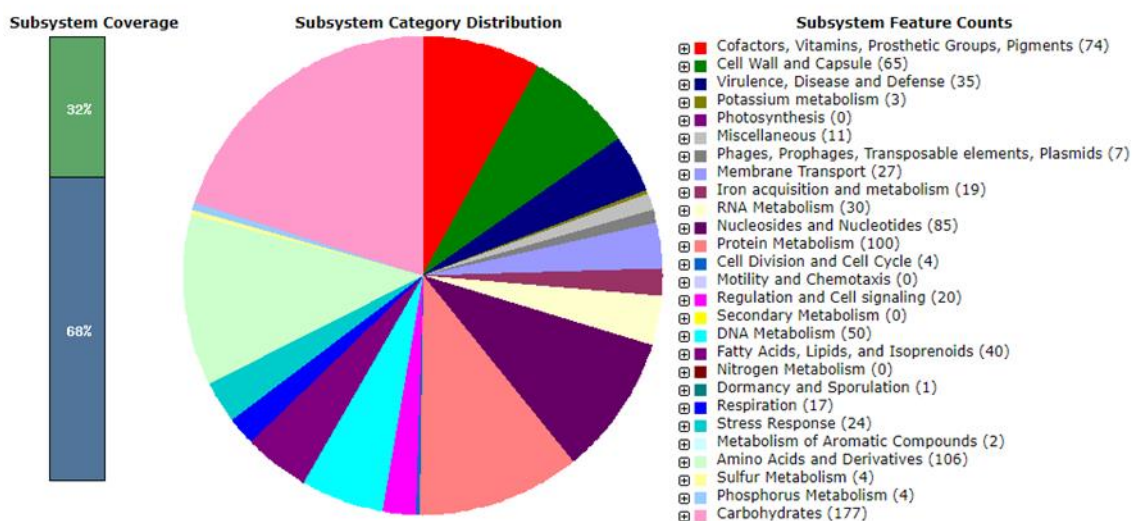
1494

1495

1496

1497

1498 **Gráfico 1** – Genoma de *S. agalactiae* sorotipo III cepa Recife



1499

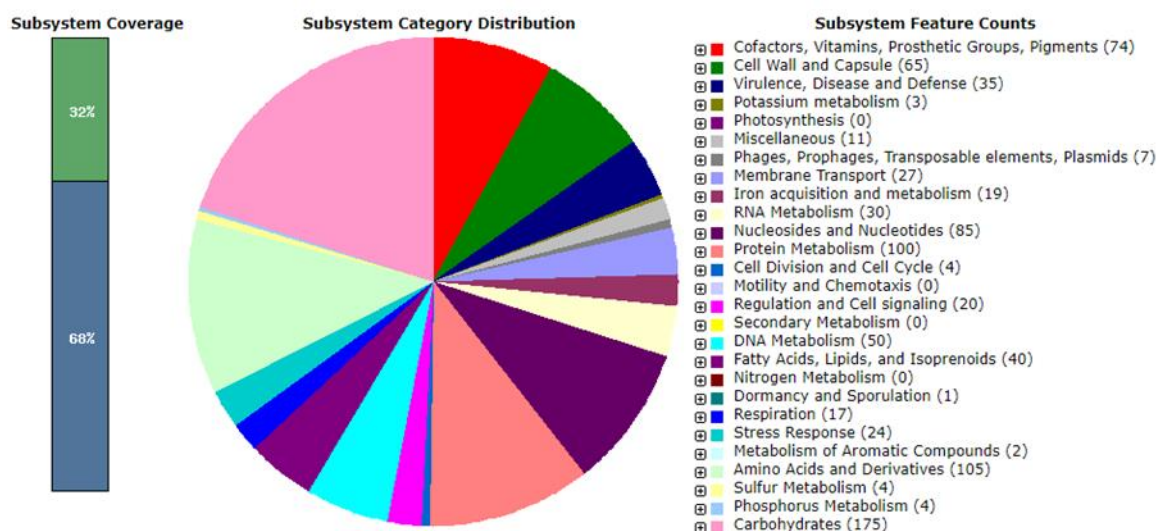
1500 **Fonte:** RAST, 2021

1501

1502

1503

1504 **Gráfico 2** – Genoma de *S. agalactiae* sorotipo III cepa Maranhão



1505

1506 **Fonte:** RAST, 2021

1507

1508 A caracterização genética das cepas de *S. agalactiae* sorotipo III

1509 Recife e Maranhão demonstrou grandes semelhanças genômicas como número de

1510 contigs, comprimento total do genoma e conteúdo GC. As cepas diferem apenas em

1511 dois subsistemas: dos aminoácidos (diferença na ramificação da fenilalanina e tirosina

1512 que são produzidas a partir do corismato) e do metabolismo de carboidratos (diferença

1513 na captação e utilização de glicerol e glicerol-3-fosfato). A comparação entre os dois

1514 genomas se mostra relevante pois através dela podemos identificar com maior
 1515 precisão a presença dos genes de virulência e se existem semelhanças entre esses
 1516 genes, já que nos estudos de patogenicidade as cepas de *S. agalactiae* Recife e
 1517 Maranhão demonstraram diferenças nos perfis de infecção, sinais e evolução da
 1518 doença.

1519 A busca dos genes de virulência para *S. agalactiae* sorotipo III revelou
 1520 os seguintes genes apontados na tabela 10, onde são descritos com maior frequência:

1521

1522 **Tabela 10.** Dados de sequências do Genbank para os genes de virulência descritos
 1523 na literatura para *S. agalactiae* sorotipo Ib e III

Cepa	Hospedeiro	Gene	Fator de virulência
SA20-06	Fish	<i>fbsA</i>	Fibrinogen-binding protein A
SGEHI2015-113	Fish	<i>fbsB</i>	Fibrinogen-binding protein B
2603V/R	Human	<i>pavA</i>	Fibrinogen-binding protein
A909	Human	<i>scpB</i>	C5a peptidase
2603V/R	Human	<i>lmb</i>	Laminin-binding protein
2603V/R	Human	<i>cylE</i>	B-hemolysin
2603V/R	Human	<i>cfb</i>	cAMP factor
SA220	Fish	<i>sbp1</i>	Pili-2b protein sbp1
SA220	Fish	<i>hylB</i>	Hyaluronate lyase
2603V/R	Human	<i>rib</i>	Surface protein rib
A909	Human	<i>bca</i>	C alpha protein
A909	Human	<i>bac</i>	C-B protein
2603V/R	Human	<i>cspA</i>	Serine protease
SA102	Fish	<i>pbp1A/ponA</i>	penicillin-binding protein 1A Immunogenic bacterial
NEM316	Human	<i>bibA</i>	adhesion
SA102	Fish	<i>gap</i>	GAPDH
2603V/R	Human	<i>cylA</i>	B-hemolysin

1524 **Fonte:** Siqueira, K. (2022)

1525

1526 Ao realizar o alinhamento e comparação dos genes de virulência das
 1527 cepas de *S. agalactiae* sorotipo III Recife e Maranhão, encontramos os seguintes
 1528 perfis descritos nas tabelas a seguir:

1529

1530

1531

1532

1533

1534 **Tabela 11.** Similaridade e cobertura dos genes alvo de virulência da cepa de *S.*
1535 *agalactiae* sorotipo III Maranhão

Cepa	Hospedeiro	Gene	Fator de virulência	Node	Coverage	Id	Gaps
SA20-06	Fish	<i>fbsA</i>	Fibrinogen-binding protein A	4	100%	94.24%	1%
SGEHI2015-113	Fish	<i>fbsB</i>	Fibrinogen-binding protein B	2	100%	100%	0%
2603V/R	Human	<i>pavA</i>	Fibrinogen-binding protein	1	100%	99.46%	0%
A909	Human	<i>scpB</i>	C5a peptidase	***	***	***	***
2603V/R	Human	<i>lmb</i>	Laminin-binding protein	***	***	***	***
2603V/R	Human	<i>cylE</i>	B-hemolysin	2	100%	99.95%	0%
2603V/R	Human	<i>cfb</i>	cAMP factor	3	100%	99.48%	0%
SA220	Fish	<i>sbp1</i>	Pili-2b protein sbp1	***	***	***	***
SA220	Fish	<i>hylB</i>	Hyaluronate lyase	1	100%	98.60%	0%
2603V/R	Human	<i>rib</i>	Surface protein rib	13	16%	74.71%	3%
A909	Human	<i>bca</i>	C alpha protein	13	95%	99.90%	0%
A909	Human	<i>bac</i>	C-B protein	7	51%	98.81%	0%
2603V/R	Human	<i>cspA</i>	Serine protease	3	100%	99.13%	0%
SA102	Fish	<i>pbp1A/ponA</i>	Penicillin-binding protein 1A	5	100%	99.15%	0%
NEM316	Human	<i>bibA</i>	Immunogenic bacterial adhesion	17	100%	96.38%	0%
SA102	Fish	<i>gap</i>	GAPDH	2	99%	99.29%	0%
2603V/R	Human	<i>cylA</i>	B-hemolysin	2	100%	100%	0%

1536 **Fonte:** Siqueira, K. (2022)

1537

1538

1539

1540 **Tabela 12.** Similaridade e cobertura dos genes alvo de virulência da cepa de *S.*
1541 *agalactiae* sorotipo III Recife

Cepa	Hospedeiro	Gene	Fator de virulência	Node	Coverage	Id	Gaps
SA20-06	Fish	<i>fbsA</i>	Fibrinogen-binding protein A	3	100%	92.89%	1%
SGEHI2015-113	Fish	<i>fbsB</i>	Fibrinogen-binding protein B	2	100%	100%	0%
2603V/R	Human	<i>pavA</i>	Fibrinogen-binding protein	1	100%	99.46%	0%
A909	Human	<i>scpB</i>	C5a peptidase	***	***	***	***
2603V/R	Human	<i>lmb</i>	Laminin-binding protein	***	***	***	***
2603V/R	Human	<i>cylE</i>	B-hemolysin	2	100%	99.95%	0%
2603V/R	Human	<i>cfb</i>	cAMP factor	12	100%	99.48%	0%
SA220	Fish	<i>sbp1</i>	Pili-2b protein sbp1	***	***	***	***
SA220	Fish	<i>hylB</i>	Hyaluronate lyase	1	100%	98.60%	0%
2603V/R	Human	<i>rib</i>	Surface protein rib	14	15%	74.81%	3%
A909	Human	<i>bca</i>	C alpha protein	14	95%	99.90%	0%
A909	Human	<i>bac</i>	C-B protein	7	51%	98.91%	0%
2603V/R	Human	<i>cspA</i>	Serine protease	12	100%	99.13%	0%
SA102	Fish	<i>pbp1A/ponA</i>	Penicillin-binding protein 1A	5	100%	99.15%	0%
NEM316	Human	<i>bibA</i>	Immunogenic bacterial adhesion	18	100%	96.38%	0%
SA102	Fish	<i>gap</i>	GAPDH	2	99%	99.29%	0%
2603V/R	Human	<i>cylA</i>	B-hemolysin	2	100%	100%	0%

1542 **Fonte:** Siqueira, K. (2022)

1543

1544 **Tabela 13.** Similaridade e cobertura dos genes alvo de virulência da cepa de *S.*
 1545 *agalactiae* sorotipo Ib E8

Cepa	Hospedeiro	Gene	Fator de virulência	Node	Coverage	Id	Gaps
SA20-06	Fish	<i>fbsA</i>	Fibrinogen-binding protein A	6	100%	100%	0%
SGEHI2015-113	Fish	<i>fbsB</i>	Fibrinogen-binding protein B	7	100%	100%	0%
2603V/R	Human	<i>pavA</i>	Fibrinogen-binding protein	4	100%	98.97%	0%
A909	Human	<i>scpB</i>	C5a peptidase	***	***	***	***
2603V/R	Human	<i>lmb</i>	Laminin-binding protein	***	***	***	***
2603V/R	Human	<i>cylE</i>	B-hemolysin	3	100%	99.80%	0%
2603V/R	Human	<i>cfb</i>	cAMP factor	1	100%	98.70%	0%
SA220	Fish	<i>sbp1</i>	Pili-2b protein sbp1	15	100%	99.93%	0%
SA220	Fish	<i>hylB</i>	Hyaluronate lyase	4	100%	100%	0%
2603V/R	Human	<i>rib</i>	Surface protein rib	2	19%	74.81%	3%
A909	Human	<i>bca</i>	C alpha protein	2	100%	100%	0%
A909	Human	<i>bac</i>	C-B protein	13	100%	100%	0%
2603V/R	Human	<i>cspA</i>	Serine protease	1	92%	98.77%	0%
SA102	Fish	<i>pbp1A/ponA</i>	Penicillin-binding protein 1A	10	100%	99.96%	0%
NEM316	Human	<i>bibA</i>	Immunogenic bacterial adhesion	1	100%	94.46%	2%
SA102	Fish	<i>gap</i>	GAPDH	19	100%	99.93%	0%
2603V/R	Human	<i>cylA</i>	B-hemolysin	3	100%	99.57%	0%

1546 **Fonte:** Siqueira, K. (2022)

1547

1548

1549

1550

1551

1552

1553

1554

1555

1556

1557

1558

1559

1560

1561

1562

1563

1564

1565 6 DISCUSSÃO

1566

1567 Apesar do alto número de surtos de estreptococose ocorridos em
1568 tilapiculturas no Brasil relatados até agora terem sido causados pelo *S. agalactiae*
1569 sorotipo Ib, o nosso trabalho baseou-se no estudo e comparação das cepas de
1570 *S. agalactiae* sorotipo III Recife e Maranhão entre si, que são cepas emergentes no
1571 Nordeste do Brasil, além da comparação com a cepa Ib, já previamente conhecida em
1572 surtos de estreptococose.

1573 Para a realização do presente estudo fez-se necessário a reativação
1574 da patogenicidade das cepas bacterianas isoladas desses surtos e que estavam
1575 armazenadas em freezer no Laboratório de Microbiologia do Hospital Veterinário da
1576 UEL. Essa reativação teve como objetivo restabelecer os padrões de patogenicidade
1577 das cepas que, devido as baixas temperaturas, encapsulam, adquirindo um estágio
1578 de dormência, diminuindo sua capacidade de produzir doença. Em nosso estudo,
1579 apenas as cepas bacterianas usadas na primeira inoculação estavam congeladas. A
1580 reativação das cepas bacterianas foi feita através do seu cultivo em caldo triptona soja
1581 e inoculação nos juvenis de tilápia-do-Nilo.

1582 Após a inoculação nos peixes e observação durante dez dias, a cepa
1583 de *S. agalactiae* sorotipo III Recife causou a morte de 30% dos peixes, a cepa de *S.*
1584 *agalactiae* sorotipo III Maranhão causou 50% de morte e a cepa E8 (*S. agalactiae*
1585 sorotipo Ib) causou 30% de morte. Observamos que após a primeira inoculação das
1586 cepas bacterianas recuperadas nos peixes, os principais sinais clínicos de
1587 estreptococose verificados na primeira semana foram pigmentação corporal, anorexia,
1588 exoftalmia unilateral e bilateral, ascite e natação errática como já descrito por Lin *et*
1589 *al.* (2011). Em nosso estudo, além dos sinais descritos, identificamos também letargia
1590 e opacidade córnea. A pigmentação e o escurecimento corporal demonstram o
1591 estresse sofrido pelo animal. Na segunda semana, além dos sinais já descritos, os
1592 peixes apresentaram exoftalmia predominantemente unilateral e início de natação
1593 errática, evidenciando a presença bacteriana no encéfalo, provocando
1594 meningoencefalite e assim alterando a área responsável pelo equilíbrio corporal, como
1595 descrito por Kubitzka (2000).

1596 No experimento de coabitação, os peixes inoculados e com sinais
1597 clínicos de estreptococose foram passados para os aquários com peixes saudáveis.
1598 Figueiredo *et al.* (2007a) apontam que a transmissão bacteriana pode ocorrer através

1599 do contato de peixes saudios com os peixes infectados ou pelo contato indireto, através
1600 da presença as bactérias na água onde os peixes apresentam uma evolução gradativa
1601 da doença. Em nosso estudo, a transmissão da doença ocorreu de forma lenta. Os
1602 peixes saudáveis coabitados com peixes inoculados com a cepa Recife apresentaram,
1603 em quatorze dias de observação, sinais de estreptococose. Na primeira semana o
1604 apetite dos peixes coabitados manteve-se inalterado, assim como mantiveram-se
1605 preservados os níveis de atividade. Os peixes apresentaram sinais iniciais de
1606 estreptococose como exoftalmia e leve distensão abdominal. Na segunda semana de
1607 observação esses sinais mantiveram-se presentes e incluiu-se a presença de
1608 manchas corporais. Apenas um (1) peixe apresentou natação errática e um (1) peixe
1609 não apresentou nenhum sinal de doença. Ao final do experimento restaram quatro
1610 peixes com sinais leves de estreptococose; portanto a mortalidade, em nosso estudo,
1611 foi de 20%.

1612 Os peixes saudios coabitados com peixes inoculados com a cepa
1613 Maranhão também apresentaram, em quatorze dias de observação, sinais de
1614 estreptococose. Na primeira semana, assim como os peixes coabitados com a cepa
1615 Recife, os peixes coabitados com a cepa Maranhão mantiveram o apetite inalterado.
1616 Os sinais mais evidentes foram leve escurecimento corporal e início de exoftalmia.
1617 Não apresentaram distensão abdominal. A partir da segunda semana o apetite
1618 diminuiu e os demais sinais clínicos de doença permaneceram inalterados. Não houve
1619 o desenvolvimento de natação errática. Ao final do experimento restaram três peixes
1620 com sinais leves de estreptococose, portanto a mortalidade da cepa Maranhão em
1621 coabitação, no nosso estudo, foi de 40%.

1622 Os peixes coabitados com peixes inoculados com a cepa E8 (*S.*
1623 *agalactiae* sorotipo lb) também apresentaram, em quatorze dias de observação, sinais
1624 de estreptococose como manchas corporais, leve exoftalmia e leve distensão
1625 abdominal. Esses sinais iniciaram-se na primeira semana de observação e
1626 permaneceram até o fim do experimento. Os peixes mantiveram-se ativos e com
1627 apetite normal durante todos os dias de observação. Assim como na cepa Maranhão,
1628 a cepa lb não provocou natação errática nos peixes em coabitação. Ao final do
1629 experimento sobreviveram quatro peixes com sinais leves de estreptococose, portanto
1630 a mortalidade da cepa lb em coabitação, no nosso estudo, foi de 20%.

1631 No estudo realizado com a inoculação das cepas recuperadas
1632 verificamos que as cepas bacterianas também provocaram a morte dos peixes

1633 durante a primeira semana de observação, assim como o estudo da inoculação para
1634 recuperação das bactérias, mas em menor porcentagem. A cepa bacteriana Recife
1635 causou a morte de 30% dos peixes, a cepa bacteriana Maranhão causou 30% de
1636 morte e a cepa E8 (*S. agalactiae* sorotipo Ib) causou 10 % de morte. A nova cepa
1637 isolada durante o nosso estudo, denominada Ib novo (*S. agalactiae* sorotipo Ib)
1638 causou 30% de morte na primeira semana de observação. No acompanhamento diário
1639 dos peixes após a segunda inoculação pudemos observar que os sinais de
1640 estreptococose foram mais brandos. Os peixes se mantiveram mais ativos e não
1641 houve uma diminuição do apetite em comparação com a primeira inoculação. As
1642 manchas corporais estiveram presentes na maioria dos peixes inoculados,
1643 evidenciando o estresse causado pela presença da bactéria no organismo. Sinais
1644 como exoftalmia, distensão abdominal e opacidade córnea se manifestaram em
1645 poucos peixes e em média quatro dias após a inoculação. Observamos que os sinais
1646 de doença se concentraram em poucos peixes em cada aquário, mas a maioria não
1647 apresentou sinal de doença, apenas as manchas corporais.

1648 A partir da obtenção das bactérias recuperadas da cepa Ib, a
1649 inoculação realizada com as diluições específicas de 10^8 UFC/mL, 10^7 UFC/mL, 10^6
1650 UFC/mL e 10^5 UFC/mL mostrou que os peixes apresentaram sinais mais evidentes de
1651 doença no quarto dia após a inoculação; sendo que no aquário onde a concentração
1652 bacteriana por UFC/mL era maior, os sinais apresentaram-se mais evidentes na
1653 maioria dos peixes do aquário enquanto nos demais aquários os sinais de doença
1654 apareceram sempre após esse sinal já ter previamente aparecido no aquário com
1655 diluição UFC/mL menor anterior. Segundo Lin *et al.* (2011) em casos superagudos de
1656 estreptococose os sinais clínicos podem não se manifestar, sendo verificada apenas
1657 a ocorrência das mortalidades.

1658 Na segunda realização do estudo com a cepa Ib foi feita novamente
1659 a inoculação dos peixes com concentrações bacterianas de $1,2 \times 10^8$ UFC/mL, $1,2 \times 10^7$
1660 UFC/mL, $1,2 \times 10^6$ UFC/mL e $1,2 \times 10^5$ UFC/mL. A partir dessas concentrações foi
1661 possível observar que os peixes apresentaram os mesmos sinais do experimento
1662 anterior realizado, e os sinais de estreptococose surgiram de forma linear, onde os
1663 peixes dos aquários com a maior concentração bacteriana apresentaram sinais
1664 clínicos de doença mais exacerbados e estes sinais foram diminuindo gradativamente
1665 conforme a concentração bacteriana também diminuía. A maior concentração
1666 bacteriana inoculada nos peixes ocasionou 80% de morte, a segunda concentração

1667 causou 70% de morte, a terceira concentração causou 83,4% de morte e a quarta
1668 concentração causou 63,4% de morte em sete dias de observação. Neste estudo, o
1669 cálculo da dose letal 50 (DL50) apresentou-se em $1,1 \times 10^6$ UFC/mL com $R=0,32$. Esse
1670 desvio possivelmente resulta de o maior número de mortes ter ocorrido no aquário
1671 com a segunda menor diluição durante a primeira semana de observação, onde se
1672 esperaria que a mortalidade ocorresse de maneira decrescente de acordo com a
1673 diminuição da concentração bacteriana inoculada.

1674 No experimento com a cepa Maranhão foram utilizadas as seguintes
1675 concentrações bacterianas: $1,4 \times 10^7$ UFC/mL, $1,4 \times 10^6$ UFC/mL, $1,4 \times 10^5$ UFC/mL e
1676 $1,4 \times 10^4$ UFC/mL. Em quatorze dias de observação, a maior concentração bacteriana
1677 ocasionou 6,7% de morte, a segunda concentração causou 30% de morte, a terceira
1678 concentração causou 20% de morte e a quarta concentração causou 56,7% de morte.
1679 Logo após a inoculação os peixes apresentaram uma diminuição da atividade
1680 natatória, permanecendo assim por quatro dias. A presença de manchas corporais
1681 demonstrou o estresse sofrido pelos peixes no procedimento de inoculação. Notou-se
1682 que, diferentemente da cepa Ib, a cepa Maranhão não manifestou sinais clínicos de
1683 estreptococose nos primeiros dias de observação, sendo que os sinais se mostraram
1684 mais evidentes a partir do quinto dia da inoculação. Singularmente, nos aquários de
1685 menor concentração bacteriana inoculada ($1,4 \times 10^5$ UFC/mL e $1,4 \times 10^4$ UFC/mL) os
1686 peixes exibiram mais sinais clínicos de estreptococose, como exoftalmia uni e bilateral
1687 com opacidade córnea uni ou bilateral inclusive. Outro sinal importante de
1688 estreptococose foi a manifestação de natação errática nos peixes desses aquários de
1689 menor concentração, além de ter corrido o maior número de mortes. A natação errática
1690 ocorre quando a bactéria causadora da estreptococose encontra-se alojada no tecido
1691 encefálico do peixe, provocando a meningoencefalite (KUBITZA, 2000). Essa
1692 condição altera a capacidade de estabilização corporal do peixe, fazendo com que
1693 sua natação ocorra de maneira circular, sem rumo definido ou em alta velocidade e
1694 descontroladamente. Na cepa Ib notamos que esse sinal demorou para ocorrer e
1695 apareceu após sinais iniciais como exoftalmia e opacidade córnea já estarem
1696 estabelecidos. Interessantemente na cepa Maranhão a natação errática surgiu como
1697 primeiro e único sinal de doença em dois peixes logo após a inoculação e manifestou-
1698 se juntamente com demais sinais de estreptococose em quatro peixes dos aquários
1699 de menor concentração. Durante todo o acompanhamento do experimento da cepa
1700 Maranhão os peixes mantiveram a alimentação normal, com pequena diminuição do

1701 apetite nos peixes com sinais evidentes de doença. Portanto, pode-se sugerir uma
1702 intervenção medicamentosa via oral (via alimentar) para os casos de estreptococose
1703 causada pela cepa Maranhão. Neste estudo, o cálculo da dose letal 50 (DL50)
1704 apresentou-se em $1,5 \times 10^5$ UFC/mL com $R=0,5184$. Acreditamos que esse desvio
1705 tenha sido possivelmente causado pelo resultado atípico que obtivemos, onde a
1706 mortalidade foi inversamente proporcional a concentração bacteriana inoculada, onde
1707 o aquário com a menor concentração bacteriana apresentou o maior número de
1708 peixes mortos.

1709 No experimento com a cepa Recife foram utilizadas as seguintes
1710 concentrações bacterianas: 10^7 UFC/mL, 10^6 UFC/mL, 10^5 UFC/mL e 10^4 UFC/mL.
1711 Em quatorze dias de observação, a maior concentração bacteriana ocasionou 90% de
1712 morte, a segunda concentração causou 76,7% de morte, a terceira e a quarta
1713 concentrações causaram 53,4% de morte. No primeiro dia de observação após a
1714 inoculação, dois peixes do aquário com maior concentração bacteriana apresentaram
1715 natação errática avançada e morreram ao final do dia. Nos aquários de maior
1716 concentração bacteriana os peixes apresentaram sinais evidentes de estreptococose
1717 como exoftalmia, opacidade córnea e natação errática. Nos aquários menos
1718 concentrados os sinais de doença começaram a aparecer entre o terceiro e quarto dia
1719 de observação, incluindo a natação errática. E relação a cepa Maranhão, a cepa
1720 Recife causou mais sinais de natação errática, mesmo nos peixes inoculados com
1721 menor concentração bacteriana; inclusive demonstra-se como sinal inicial de
1722 estreptococose. Nas demais cepas estudadas previamente a natação errática
1723 aparecia como uma evolução tardia da estreptococose. Na cepa Maranhão a natação
1724 errática apareceu em média após seis dias de observação pós inoculação e na cepa
1725 Recife apareceu até o terceiro dia após a inoculação nos aquários com maior
1726 concentração bacteriana e em até quatro dias nos aquários com menor concentração
1727 bacteriana. O apetite dos peixes ficou diminuído até o sexto dia pós inoculação e na
1728 segunda semana voltou ao normal. Um sinal diferente foi observado em um aquário
1729 com menor concentração bacteriana: a nadadeira caudal dos peixes apresentou
1730 coloração avermelhada, mas esse sinal não evoluiu e não causou prejuízos aos
1731 animais. Ao final dos quatorze dias de observação, os peixes com meningoencefalite
1732 leve conseguiam se alimentar normalmente, portanto a intervenção medicamentosa
1733 para a estreptococose, neste caso, pode ser considerada. Neste estudo, o cálculo da
1734 dose letal 50 (DL50) apresentou-se em $DL50=1,1 \times 10^6$ UFC/mL com $R= 0,6792$.

1735 Consideramos esse pequeno desvio como sendo resultado da análise da mortalidade
1736 ocorrida na primeira semana do experimento, onde o aquário com a menor
1737 concentração apresentou uma mortalidade maior do que os aquários com a segunda
1738 e terceira maior concentração bacteriana inoculada. Entretanto, de um modo geral, a
1739 mortalidade ocasionada pela cepa Recife foi maior no aquário com a maior
1740 concentração bacteriana e foi diminuindo gradativamente em relação aos aquários
1741 com menor concentração bacteriana inoculada ao analisar o período completo de
1742 quatorze dias de observação.

1743 A caracterização do perfil genômico das cepas de *S. agalactiae*
1744 sorotipo III Recife e Maranhão revelou padrões muito semelhantes. As distinções
1745 encontradas entre elas estão descritas a seguir. No subsistema de aminoácidos e
1746 derivados encontramos uma diferença na ramificação da fenilalanina e tirosina do
1747 corismato. Este subsistema cobre os genes e proteínas que conduzem o corismato à
1748 biossíntese de L-fenilalanina e L-tirosina. No subsistema de carboidratos encontramos
1749 diferença na captação e utilização de glicerol e glicerol-3-fosfato. O glicerol-3-fosfato
1750 é um importante intermediário tanto na glicólise quanto na biossíntese de fosfolípidios.
1751 A absorção de glicerol nas bactérias é mediada pelo facilitador de difusão do glicerol,
1752 uma proteína de membrana integral que catalisa o equilíbrio rápido dos gradientes de
1753 concentração de glicerol através da membrana citoplasmática. Consideramos
1754 importante salientar que no estudo do genoma das duas cepas de *S. agalactiae*
1755 (Recife e Maranhão), não foram encontradas sequências plasmidiais. Ao analisar as
1756 sequências dos genes de virulência já descritos na literatura, fizemos a busca dessas
1757 sequências nos genomas das duas cepas de *S. agalactiae* sorotipo III (Recife e
1758 Maranhão) e na cepa E8 de *S. agalactiae* sorotipo Ib e encontramos uma quase total
1759 similaridade com os genes alvos, com cobertura de 100% para a maioria dos genes
1760 de virulência já descritos.

1761 Encontramos na cepa Ib uma cobertura de 100% para o gene *bac*
1762 responsável pela expressão da proteína C-beta e apenas 51% de cobertura total para
1763 as cepas de *S. agalactiae* sorotipo III Recife e Maranhão. Apesar dos antígenos da
1764 proteína C-beta serem componentes imunodominantes da superfície do *S. agalactiae*,
1765 são principalmente expressas pelos sorotipos Ia, Ib e II, como demonstrado por
1766 Schalen (1993). O gene *rib* responsável pela expressão da proteína de superfície
1767 celular está presente em estreptococos do grupo B (GBS) e desempenham papéis
1768 importantes durante vários estágios da infecção por GBS (adesão às células epiteliais,

1769 interações com a matriz extracelular humana e escape da imunidade do hospedeiro
1770 concedendo a imunidade protetora) (LINDAHL *et al.*, 2005) e apesar de ser expresso
1771 pela maioria das cepas do tipo III (STALHAMMAR-CARLEMALM *et al.*, 1993), em
1772 nosso estudo ela apresentou uma cobertura de apenas 16% para a cepa Maranhão,
1773 15% para a cepa Recife e 19% para a cepa Ib e demonstrou 74% de similaridade com
1774 o gene alvo para as três cepas descritas.

1775 A comparação das cepas Recife e Maranhão de *S. agalactiae* sorotipo
1776 III entre si demonstrou uma similaridade de quase 100% na cobertura dos genes de
1777 virulência estudados. Encontramos uma pequena variação na cobertura do gene *fbSA*
1778 onde a cepa Recife apresentou uma cobertura de 100% e similaridade de 92,89% com
1779 os genes alvo e a cepa Maranhão apresentou uma cobertura de 100% e similaridade
1780 de 94,24% com os genes alvo. De acordo com Collins *et al.*, (2012) o gene *fbSA*
1781 (Fibrinogen-binding protein A) é responsável pela expressão de um dos principais
1782 fatores de virulência - das proteínas de ligação ao fibrinogênio, que atuam durante a
1783 infecção bacteriana, ligando o patógeno ao fibrinogênio, com conseqüente agregação
1784 plaquetária e posteriormente induzindo graves complicações ao hospedeiro. Essa
1785 característica poderia explicar as pequenas diferenças observadas na evolução da
1786 doença nos peixes, onde na cepa Recife observamos uma predileção no
1787 acometimento do sistema nervoso, em que os peixes apresentaram desvio de coluna
1788 e natação errática como sinais iniciais da estreptococose, enquanto esse sinal
1789 apareceu de modo tardio na cepa Maranhão. Consideramos essencial a comparação
1790 dos genomas entre as duas cepas estudadas (cepa de *S. agalactiae* sorotipo III Recife
1791 e Maranhão) pois através dos estudos de patogenicidade verificamos que a evolução
1792 da estreptococose ocorreu de maneira diferente entre as cepas. Apesar do *S.*
1793 *agalactiae* apresentar uma predileção por alojar-se no encéfalo dos animais
1794 acometidos, pudemos perceber que a cepa Maranhão os sinais neurológicos
1795 estiveram pouco presentes. Já a cepa Recife os sinais neurológicos foram os
1796 primeiros sinais de estreptococose que surgiram nos animais acometidos, sendo
1797 muitas vezes, inclusive, o único sinal evidente de estreptococose e causando logo em
1798 seguida a morte do animal.

1799 Como já mencionado anteriormente, a maioria dos surtos de
1800 estreptococose no Brasil registrados foram causados pela cepa Ib de *S. agalactiae*
1801 embora nos últimos anos tenha-se registrado uma ascendência de casos de
1802 estreptococose causados pela cepa III de *S. agalactiae*, principalmente em regiões de

1803 temperaturas mais elevadas no Brasil, como o Nordeste. Ressaltamos a possibilidade
1804 desse genótipo estar presente inclusive nas demais regiões brasileiras, portanto a
1805 identificação dessa nova cepa de mostra essencial para que futuramente possam ser
1806 desenvolvidos meios para um melhor controle sanitário da estreptococose causada
1807 pelo *S. agalactiae* sorotipo III.
1808

1809 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

1810 A partir dos resultados obtidos podemos concluir que o *Streptococcus*
1811 *agalactiae* sorotipo III causou estreptococose a partir das cepas reativadas, onde os
1812 sinais de doença foram mais evidentes nos experimentos de inoculação e em menores
1813 diluições. Maiores concentrações bacterianas foram responsáveis por alta mortalidade
1814 e sinais de doença exacerbados e choque séptico seguido de morte. O experimento
1815 de coabitação mostrou que a estreptococose atingiu peixes saudáveis que estiveram
1816 em contato com peixes doentes, através da água contaminada ou ingestão de tecidos
1817 contaminados dos peixes mortos. Por ser uma cepa nova, emergente da região
1818 Nordeste do Brasil, sugerimos um maior aprofundamento dos estudos de
1819 patogenicidade para o controle efetivo da doença de modo a evitar sua disseminação
1820 para demais regiões.

1821 A caracterização genética das duas cepas de *S. agalactiae* sorotipo
1822 III estudadas (Recife e Maranhão) demonstrou que são cepas genomicamente
1823 semelhantes como número de contigs, comprimento total do genoma e conteúdo GC.
1824 As cepas diferem apenas em dois subsistemas: dos aminoácidos e do metabolismo
1825 de carboidratos. Na busca da caracterização da virulência das cepas de *S. agalactiae*,
1826 encontramos dezessete genes de virulência mais frequentemente descritos na
1827 literatura. Esses genes são encontrados tanto em *S. agalactiae* patógeno humano
1828 como patógeno de peixes. Ao realizar o alinhamento e comparação entre as
1829 sequências dos genes, encontramos semelhança relevante entre os genes de
1830 virulência alvo e os genes de virulência das cepas de *S. agalactiae* sorotipo III cepas
1831 Recife e Maranhão entre si e em comparação com o *S. agalactiae* sorotipo Ib
1832 estudados. Em relação aos sorotipos Ib e III as linhagens diferiram em apenas dois
1833 genes de virulência: gene *rib* e *bac*.

1834 Portanto, mediante ao nosso trabalho, podemos afirmar que a cepa
1835 do *S. agalactiae* sorotipo III é uma cepa emergente com características relevantes
1836 encontrada em tilapiculturas no Brasil. O aprofundamento do seu estudo se faz
1837 necessário para que, no futuro, possam ser desenvolvidas vacinas efetivas que atuem
1838 na redução das perdas comerciais e principalmente colaborem para a prevenção da
1839 sua disseminação para os seres humanos.

1840

1841

REFERÊNCIAS

- 1842 ABUTBUL, S. *et al.* Use of *Rosmarinus officinalis* as a treatment against *Streptococcus iniae* in tilapia
1843 (*Oreochromis* sp.) *Aquaculture*, v.238, p. 97-105, 2004.
1844
- 1845 ADAMS, A., SUBASIGNE, R. Use of Fish Vaccines in Aquaculture (Including Methods of
1846 Administration) (first ed.), Veterinary Vaccines for Livestock. *The Food and Agriculture Organization of*
1847 *the United Nations*, 2019.
1848
- 1849 AGNEW, W.; BARNES, A. C. *Streptococcus iniae*: An aquatic pathogen of global veterinary significance
1850 and challenging candidate for reliable vaccination. *Vet. Microbiol.*, v. 122, n. 1-2, p. 1–15, 2007.
1851
- 1852 ANVISA. *Agência Nacional de Vigilância Sanitária*. Disponível em: <
1853 https://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo4/intr_stre.htm
1854 >. Acesso em: 12 Maio 2021.
1855
- 1856 ARAKERE, G. *et al.* Inhibition Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Serotyping of Group B
1857 Streptococcal Isolates. *Journal Of Clinical Microbiology*, [s.i], v. 37, n. 8, p.2564-2567, 1999.
1858
- 1859 ARMISTEAD, B. *et al.* The double life of group B Streptococcus: asymptomatic colonizer and potent
1860 pathogen. *J. Mol. Biol.*, 431 (16) p. 2914-2931, 2019.
1861
- 1862 BALARIN, J.D.; R.D. HALLER. The intensive culture of tilapia in tanks, raceways and
1863 cages. In: MUIR, J.F.; R.J. ROBERTS (Ed) *Recent advances in aquaculture*,
1864 London: Croom Helm. p. 267-355, 1982
1865
- 1866 BALCÁZAR, J.L. *et al.* *The role of probiotics in aquaculture*. *Veterinary Microbiology*, v.114, p.173-
1867 186, 2006.
1868
- 1869 BARCELLOS, I. J. G. *et al.* Nursering rearing of jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy & gaimard) in cages:
1870 cage type, stocking density and stress response to confinement. *Aquaculture*, v. 232, issues 1-4, p.
1871 383-394, 2004.
1872
- 1873 BARNETT, T. C. *et al.* Streptococcal toxins: role in pathogenesis and 420 disease. *Cellular*
1874 *microbiology*, n.17, p.1721-1741, 2015.
1875
- 1876 BARONY, G. M., *et al.* Large-scale genomic analyses reveal the population structure and evolutionary
1877 trends of *Streptococcus agalactiae* strains in Brazilian fish farms. *Scientific Reports*, v.7, p.1-1, 2017.
1878
- 1879 BERGMANN, S. *et al.* Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus pneumoniae* is a
1880 surface-displayed plasminogen-binding protein. *Infect Immun.* v. 72, n. 4, p.2416–2419, 2004.
1881
- 1882 BEVERIDGE, M.C.M. Cage aquaculture. Oxford: *Fishing News Books*. 2ed, p.346,1996.
1883
- 1884 BHARADWAJ. ABRAHAM, T.J. JOARDAR, N.S. 22 Immune effector activities in challenged rohu,
1885 *Labeo rohita* after vaccinating with *Aeromonas bacterin*. *Aquaculture* p.392–395, 16–22, 2013.
1886
- 1887 BIANCHI-JASSIR, F. *et al.* Preterm birth associated with group B *streptococcus* maternal colonization
1888 worldwide: systematic review and meta-analyses *Clin. Infect. Dis.*, 65, p. S133-S142, 2017.
1889
- 1890 BOSCARDIN, N. R. Produção Aquícola. In: OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R.; SOTO, D. (Org.).
1891 *Aquicultura no Brasil*, o desafio é crescer. Brasília: 2008. p. 27-72.
1892
- 1893 BOZANO, G.L.N. Viabilidade técnica da criação de peixes em tanques-redes. In: *SIMPÓSIO*
1894 *BRASILEIRO DE AQUICULTURA*, 12., 2002, Goiânia. Anais. Goiânia: Abraç, p.107-111, 2002.
1895
- 1896 BRASIL. Instrução Normativa nº 7. *Diário Oficial*, República Federativa do Brasil, Brasília, p.11.827-
1897 11.833, 9 jun 1997. Seção 1, 1997.
1898

- 1899 BUNCH, E. C.; BEJERANO, I. The effect of environmental factors on the susceptibility of hybrid tilapia
1900 *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus* to streptococcosis. *Israeli Journal Aquaculture*,
1901 Bamidgeh, v.49, n.2, p.67-76, 1997.
1902
- 1903 BURCHACKA, E., WITKOWSKA, D. The role of serine proteases in the pathogenesis of bacterial
1904 infections. *Postepy Hig Med Dosw* n. 30, v. 70(0), p.678-694, 2016.
1905
- 1906 CABELLO, F.C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human
1907 and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology* v.8, p.1137-1144, 2006.
1908
- 1909 CAMOLEZE, E. Tilápia: O segundo peixe mais consumido do mundo. *Sociedade Nacional de*
1910 *Agricultura*, 2019. Disponível em: <[https://animalbusiness.com.br/producao-animal/criacao-](https://animalbusiness.com.br/producao-animal/criacao-animal/tilapia-o-segundo-peixe-mais-consumido-do-mundo/)
1911 [animal/tilapia-o-segundo-peixe-mais-consumido-do-mundo/](https://animalbusiness.com.br/producao-animal/criacao-animal/tilapia-o-segundo-peixe-mais-consumido-do-mundo/) > Acesso em 09 abr 2021.
1912
- 1913 CARVALHO, E.D. Avaliação dos impactos da piscicultura em tanques-rede nas represas dos grandes
1914 tributários do alto Paraná (Tietê e Paranapanema): o pescado, a ictiofauna agregada e as condições
1915 limnológicas. *Relatório Científico* (FAPESP). Botucatu, SP. p.46, 2006.
1916
- 1917 CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. *J Infect Dis*.
1918 n.184, p. 337-344, 2001.
1919
- 1920 CHANG, P. H.; PLUMB, J. A. Effects of salinity on *Streptococcus* infection of Nile tilapia, *Oreochromis*
1921 *niloticus*. *Journal of Applied Aquaculture*, Binghamton, v.6, p. 39-45, 1996.
1922
- 1923 CHEN, C.Y. *et al.* Comparative histopathology of *Streptococcus iniae* and *Streptococcus agalactiae*-
1924 infected tilapia. *Bulletin of The European Association of Fish Pathologists*, v. 27, n. 1, p. 2-9, 2007.
1925
- 1926 CHEN, M. *et al.* PCR detection and PFGE genotype analyses of streptococcal clinical isolates from
1927 tilapia in China. *Vet Microbiol*, 2012.
1928
- 1929 CHEN, M. *et al.* Screening vaccine candidate strains against *Streptococcus agalactiae* of tilapia based
1930 on PFGE genotype Vaccine, 30 (42), p. 6088-6092, 2012.
1931
- 1932 CHENG, Q., *et al.* The group B streptococcal C5a peptidase is both a specific protease and an
1933 invasin. *Infect. Immun.* v.70, p.2408-2413, 2002.
1934
- 1935 CHUZEVILLE, S. *et al.* Characterization of a New CAMP Factor Carried by an Integrative and
1936 Conjugative Element in *Streptococcus agalactiae* and Spreading in *Streptococci*. *PLoS ONE* 7(11):
1937 e48918, 2012.
1938
- 1939 CLARK, J. S.; PALLER, B.; SMITH, P. D. Prevention of streptococcosis in tilapia by vaccination: the
1940 Philippine experience. In: *International Symposium on Tilapia Aquaculture*, 2000, Rio de Janeiro, v.2,
1941 p.545-551, 2000.
1942
- 1943 COLLINS, J. *et al.* Fibrinogen-binding and platelet-aggregation activities of a *Lactobacillus*
1944 *salivarius* septicaemia isolate are mediated by a novel fibrinogen-binding protein. *Molecular*
1945 *Microbiology*. v. 85, Issue 5 p. 862-877, 2012.
1946
- 1947 COLQUHOUN, D. J. Y.; DUODU S. Francisella infections in farmed and wild aquatic organisms. *Vet*
1948 *Res* 42(45): p.1-15. 2011.
1949
- 1950 CONTE, F. S. Stress and the welfare of cultured fish. *Applied Animal Behavior Science*, v. 86, p. 205-
1951 223, 2004.
1952
- 1953 COWARD, K.; BROMAGE N. R. Reproductive physiology of female tilapia broodstock. *Reviews in*
1954 *Fish Biology and Fisheries*, v.10, n. 1, p. 1-25, 2000.
1955
- 1956 DARWISH, A. M. Laboratory efficacy of florfenicol against *Streptococcus iniae* infection in sunshine
1957 bass. *J Aquat Anim Health*, v.19, p. 1-7, 2007.
1958

- 1959 DERMER, P. *et al.* A history of neonatal group B *Streptococcus* with its related morbidity and mortality rates in the United States. *Journal of Pediatric Nursing*. v.19, p. 357–363, 2004.
- 1960
- 1961
- 1962 DEFOIRDT, T. *et al.* The bacterial storage compound poly- β -hydroxybutyrate protects *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio campbellii*. *Environmental Microbiology*, v. 9, p. 445-452, 2007.
- 1963
- 1964
- 1965 DUREMDEZ, R. *et al.* Isolation of *Streptococcus agalactiae* from cultured silver pomfret, *Pampus argenteus* (Euphrasen), in Kuwait. *J Fish Dis*, v. 27, p. 307– 310, 2004.
- 1966
- 1967
- 1968 DUTRA, V. G. *et al.* *Streptococcus agalactiae* in Brazil: serotype distribution, virulence determinants and antimicrobial susceptibility. *Bmc Infectious Diseases*, [s.l.], *Springer Nature*, v. 14, n. 1, p. 323, 2014.
- 1969
- 1970
- 1971
- 1972 EISSA, N.M.E. *et al.* Characterization of *Pseudomonas* species isolated from tilapia “*Oreochromis niloticus*” in Qaroun and Wadi-El-Rayan Lakes, *Egypt Glob. Vet.*, v. 5, p.116-121, 2010.
- 1973
- 1974
- 1975 EL AAMRI, F.; CABALLERO, M. J.; REAL, F. *et al.* *Streptococcus iniae* in gilthead seabream (*Sparus aurata*, L.) and red porgy (*Pagrus pagrus*, L.): ultrastructural analysis. *Vet. Pathol.*, p. 1-4, 2014.
- 1976
- 1977
- 1978 EI-BARBARY, M.I. Some clinical, microbiological and molecular characteristics of *Aeromonas hydrophila* isolated from various naturally infected fishes. *Aquac. Int.*, v 18, p. 943-954, 2010.
- 1979
- 1980
- 1981 EL-METWALLY, S. *et al.* Next-Generation Sequence Assembly: Four Stages of Data Processing and Computational Challenges. *PLOS Computational Biology*, v. 9, p. 84, 2013.
- 1982
- 1983
- 1984 EMBRAPA. Piscicultura em tanques-rede / Embrapa Amazônia Oriental. – Brasília, DF : *Embrapa Informação Tecnológica*, p.120: il. – (Coleção Criar, 6). 1ª edição, 2009.
- 1985
- 1986
- 1987 EVANS, J. J. *et al.* Characterization of β -hemolytic group B *Streptococcus agalactiae* in cultured seabream, *Sparus auratus* L., and wild mullet, *Liza klunzingeri*, in Kuwait. *Journal of Fish Diseases*, v. 25, p. 505-513, 2002.
- 1988
- 1989
- 1990
- 1991 FAO, 2009 - *FAO revela aposta na aquicultura para os países em desenvolvimento*. Disponível em: <<https://www.fao.org.br/FAOraappd.asp>>. Acesso em jan. 2013.
- 1992
- 1993
- 1994 FAO, 2020 – *Cultured Aquatic Species Information Programme: Oreochromis niloticus*. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis_niloticus/en> Acesso em nov, 2020.
- 1995
- 1996
- 1997 FARLEY, M.M. Group B streptococcal disease in nonpregnant adults. *Clin. Infect. Dis.* v. 33, p. 556-561, 2001.
- 1998
- 1999
- 2000 FIGUEIREDO, H. C. P. *et al.* Estreptococose em tilápia do Nilo - parte 2. *Panorama da Aquicultura*, v. 104, p. 42-45, 2007.
- 2001
- 2002
- 2003 FIGUEIREDO, H. C. P. *et al.* *Streptococcus iniae*: um grande vilão da aquicultura mundial identificado no Brasil. *Panorama da Aquicultura*, v. 19, n. 112, p. 26-29, 2009.
- 2004
- 2005
- 2006 FIGUEIREDO, H. C. P. *et al.* *Streptococcus iniae* outbreaks in brazilian Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) farms. *Braz. J. Microbiol.*, v. 43, n. 2, p. 576-580, 2012.
- 2007
- 2008
- 2009 FITZSIMMONS, K. Future trends of tilapia Aquaculture in the Américas. In: COSTA PIERCE, B.A.; RAKOCY, J.E. (Eds.). *Tilapia Aquaculture in Americas*. The World Aquaculture Society. Vol. 2. Baton Rouge, Louisiana, United States. p. 252-264, 2000.
- 2010
- 2011
- 2012
- 2013 FRANÇA, L. T.; CARRILHO, E.; KIST, T. B. A review of DNA sequencing techniques. *Quarterly reviews of biophysics*, n. 35, p. 169-200, 2002.
- 2014
- 2015
- 2016 FRANCESCHINI, L. *Infecções parasitárias e microbianas na produção do pacu Piaractus mesopotamicus e do híbrido patinga procedentes da região Noroeste do Estado de São Paulo*, 2012, 91f. Tese (Mestrado), Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2012.
- 2017
- 2018

- 2019 FLEISCHMANN, R. D. *et al.* Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus*
2020 *influenzae*. *Rd. Science*, v. 269, p. 496-512, 1995.
- 2021
- 2022 GAUNT, P. S.; ENDRIS, R.; MCGINNIS, A. *et al.* Determination of florfenicol dose rate in feed for
2023 control of mortality in Nile tilapia infected with *Streptococcus iniae*. *J. Aquat. Anim. Health*, v. 22, n. 3,
2024 p. 158-166, 2010.
- 2025
- 2026 GLASER, P. *et al.* Genome sequence of *Streptococcus agalactiae*, a pathogen causing invasive
2027 neonatal disease. *Molecular microbiology*, v. 45, p. 1499-1513, 2002.
- 2028
- 2029 GLAZUNOVA, O. O. *et al.* Partial sequence comparison of the rpoB, sodA, groEL and gyrB genes
2030 within the genus *Streptococcus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.
2031 59, n. 9, p. 2317-2322, 2009.
- 2032
- 2033 GRANLUND, M., OBERG, L., SCUM, M., NORGREN, M. Identification of a novel insertion element,
2034 IS1548, in group B streptococci, predominantly in strains causing endocarditis. *J Infect Dis*, n.177,
2035 p. 967-976, 1998.
- 2036
- 2037 GODY, D. T. *Relações coloniais, genes de virulência e patogenicidade de Streptococcus agalactiae*
2038 *isolado de peixes*. 2011, 49f, Tese (Doutorado), Universidade federal de Lavras, Lavras, 2011.
- 2039
- 2040 GODOY, D. T. *et al.* Genetic diversity and new genotyping scheme for fish pathogenic *Streptococcus*
2041 *agalactiae*. *Letters in Applied Microbiology*, v. 57, p. 476-483, 2013.
- 2042
- 2043 HÅKANSSON, S. *et al.* Novel coagglutination method for serotyping group B streptococci. *Journal Of*
2044 *Clinical Microbiology*, v. 30, n. 12, p.3268-3269, 1992.
- 2045
- 2046 HALL, J. *et al.* Maternal disease with group B streptococcus and serotype distribution worldwide:
2047 systematic review and meta-analyses. *Clin. Infect. Dis.*, 65, p. S112-S124, 2017.
- 2048
- 2049 HANSEN, S. M. *et al.* Dynamics of *Streptococcus agalactiae* colonization in women during and after
2050 pregnancy and in their infants. *J. Clin. Microbiol.*, v. 42, p. 83-89, 2004.
- 2051
- 2052 HERNÁNDEZ, E. *et al.* Streptococcosis on a red tilapia, *Oreochromis sp.*, farm: a case study. *Journal*
2053 *of Fish Diseases*, v. 32, n. 3, p. 247-252, 2009.
- 2054
- 2055 HEUER, O. E. *et al.* Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture.
2056 *Clinical Infectious Diseases*, v. 49, n. 8, p. 1248-1253, 2009.
- 2057
- 2058 HOSHINA, T. *et al.* Streptococcus pathogenic to fish. *Journal of Tokyo University of Fisheries*, v. 44, p.
2059 57-68, 1958.
- 2060
- 2061 HYNES, W.L. & WALTON, S.L. Hyaluronidases of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Lett*,
2062 n.183, p. 201-207, 2000.
- 2063
- 2064 IREGUI, C. A. *et al.* Experimental early pathogenesis of *Streptococcus agalactiae* infection in red
2065 tilapia *Oreochromis spp.* *Journal of Fish Diseases*, v. 39, n. 2, p. 205-215, 2016.
- 2066
- 2067 JARVA, H. *et al.* Complement resistance of streptococci. *Mol Immunol*, n. 40, p. 95-107, 2003.
- 2068
- 2069 JOHNSON, D; FERRIERI, P. Group B streptococcal Ibc protein antigen: distribution of two
2070 determinants in wild-type strains of common serotypes. *Journal Of Clinical Microbiology*, v. 4, n. 19,
2071 p.506-510,1984.
- 2072
- 2073 JOHRI, A. K., *et al.* Group B *Streptococcus*: global incidence and vaccine development. *Nat. Rev.*
2074 *Microbiology*, v. 4, p. 932-942, 2006.
- 2075
- 2076 KEEFE, G. P. *Streptococcus agalactiae* mastitis: a review. *Can. Vet. J.*, v. 38, p. 429-437, 1997.
- 2077
- 2078

- 2079 KEENLEYSIDE, M. H. A. Cichlid fishes: Behavior, ecology and evolution. *London*
2080 *Chapman & Hall*. p. 378, 1991.
2081
- 2082 KONG, F. Serotype identification of group B *Streptococci* by PCR and sequencing. *J. Clin Microbiol.*,
2083 n. 40, p. 216-226, 2002.
2084
- 2085 KONTO-GHIORGHI, Y. *et al.* Dual role for pilus in adherence to epithelial cells and biofilm formation in
2086 *Streptococcus agalactiae*. *PLOS Pathogens*, San Francisco. v.5, n. 5. p. 1-13, 2009.
2087
- 2088 KUBITZA, F. A evolução da tilapicultura no Brasil: produção e mercados. *Panorama da Aquicultura*,
2089 v.13, n.76, p. 25-35, 2003.
2090
- 2091 KUBITZA, F. Antecipando-se às doenças na tilapicultura. *Panorama da Aquicultura*, maio/junho, p.
2092 15-23, 2005.
2093
- 2094 KUBITZA, F. Manejo na produção de peixes. Parte 1: A conservação e o uso da água. *Panorama da*
2095 *Aquicultura*, julho/agosto, p. 14-21, 2008a.
2096
- 2097 KUBITZA, F. Manejo na produção de peixes. Parte 2: O uso eficiente da aeração: fundamentos e
2098 aplicação. *Panorama da Aquicultura*, setembro/outubro, p.26-33, 2008b.
2099
- 2100 KUBITZA, F. Manejo na produção de peixes. Parte 3: O preparo dos tanques, estocagem dos peixes
2101 e a manutenção da qualidade da água. *Panorama da Aquicultura*, setembro/outubro, p.26-33, 2008c.
2102
- 2103 KUBITZA, F. Principais parasitoses e doenças em tilápias. *Panorama da Aquicultura*, julho/agosto, p.
2104 39-53, 2000.
2105
- 2106 KUBITZA, F. Produção de tilápias em tanques de terra – estratégias avançadas no manejo.
2107 *Panorama da Aquicultura*, setembro, outubro, p. 14-21, 2009.
2108
- 2109 KUBITZA, F. Qualidade da água na produção de peixes – Parte II. *Panorama da Aquicultura*, v.8,
2110 n.46, p. 35-41, 1998.
2111
- 2112 KUBITZA, F. Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial. Jundiaí: *Fernando Kubitza*, p.
2113 289, 2000.
2114
- 2115 LANCEFIELD, R. C. Loss of the properties of hemolysin and pigment formation without change in
2116 immunological specificity in a strain of *Streptococcus haemolyticus*. *Journal Of Experimental Medicine*,
2117 [s.l.], Rockefeller University Press, v. 59, n. 4, p.459-469, 1934.
2118
- 2119 LARSEN, J; MATTHEW, J. *Farmed Fish Production Overtakes Beef*. Disponível
2120 em:<http://www.earth-policy.org/plan_b_updates/2013/update114>. Acesso em: nov. de 2020.
2121
- 2122 LECLERCQ, S. *et al.* Interplay between Penicillin-binding proteins and SEDS proteins promotes
2123 bacterial cell wall synthesis. *Sci Rep* v.7, p.43306, 2017.
2124
- 2125 LEIRA, M. H. *et al.* As principais doenças na criação de tilápias no Brasil: revisão de literatura.
2126 *Nutritime Revista Eletrônica*, v. 14, n. 2, 2017.
2127
- 2128 LEIRA, M. H. *et al.* *Estreptococose nas pisciculturas de Lavras, Sul do Estado de Minas Gerais*, v. 13,
2129 p. 4672-4676, 2016.
2130
- 2131 LÈVEQUE, C. Out of Africa: the success story of tilapias. *Environmental Biology of*
2132 *Fishes*, v. 64, n. 4, p. 461-464, 2002.
2133
- 2134 LI, Y. *et al.* Chip-based digital PCR for direct quantification dynamic bacterial load in target organs of
2135 tilapia infected with *Streptococcus agalactiae*, a pathogen causing meningoencephalitis in teleosts.
2136 *Aquaculture Reports*, v.18, 2020.
2137
2138

- 2139 LIM, C., WEBSTER, C. D. Tilapia: biology, culture and nutrition. *Haworth Press*: New York, p. 678,
2140 2006.
- 2141
- 2142 LINDAHL, G. *et al.* Surface proteins of *Streptococcus agalactiae* and related proteins in other bacterial
2143 pathogens. *Clin Microbiol Rev* n.18, p.102–127, 2005.
- 2144
- 2145 LINEHAN, D. *et al.* Relationship between haemolytic and sphingomyelinase activities in a partially
2146 purified β -like toxin from *Staphylococcus schleiferi* FEMS Immunol. Med. Microbiol. v.36(1/2), p.95-
2147 102, 2003.
- 2148
- 2149 LIU, G. *et al.* Development of *Streptococcus agalactiae* vaccines for tilapia. *Diseases of Aquatic*
2150 *Organisms*, v. 122, p. 163-170, 2016.
- 2151
- 2152 LOMAN, N. J. *et al.* Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms.
2153 *Nature Biotechnology*, v. 30, n. 5, p. 434-439, 2012.
- 2154
- 2155 LONGHI, E.; PRETTO-GIORDANO, L. G.; MÜLLER, E. E. Effectiveness of homologous inactivated
2156 *Streptococcus agalactiae* vaccine by immersion bath in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Semina:*
2157 *Ciências Agrárias*, v. 33, n. 6Supl2, p. 3191-3200, 2013.
- 2158
- 2159 MADOFF, L.C. *et al.* A monoclonal antibody identifies a protective C-protein alpha-antigen epitope in
2160 group B streptococci. *Infect Immun.* Jan;59(1), p. 204-210, 1991.
- 2161
- 2162 MADRID, L. *et al.* Infant group B streptococcal disease incidence and serotypes worldwide: systematic
2163 review and meta-analyses. *Clin. Infect. Dis.*, 65, p. S160-S172, 2017.
- 2164
- 2165 MAHESWARAM, S. K., LINDORFER, R. K. "Staphylococcal beta-hemolysin. II. Phospholipase C
2166 activity of purified beta-hemolysin". *J. Bacteriol.* n. 94 (5), p. 1313–1319, 1967.
- 2167
- 2168 MAIONE, D. *et al.* Identification of a universal Group B *streptococcus* vaccine by multiple genome
2169 screen. *Science*, v. 309, p. 148-150, 2005.
- 2170
- 2171 MARCUSSO, P. F. *et al.* Isolamento de *Streptococcus agalactiae* em diferentes órgãos de tilápias do
2172 Nilo (*Oreochromis niloticus*) criadas em tanques-rede. *Bioscience Journal*, v.31, p. 549-554, 2015.
- 2173
- 2174 MARDIS, E. R. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends in Genetics*,
2175 v. 24, n. 3, p. 133-141, 2008.
- 2176
- 2177 MARTINEZ, G., HAREL, J., GOTTSCHALK, M. Specific detection by PCR of *Streptococcus* 1087
2178 *agalactiae* in milk. *Canadian Journal Veterinary Research.* v. 65, p. 68, 2001.
- 2179
- 2180 MATA, A. I. *et al.* Multiplex PCR assay for detection of bacterial pathogens associated with warm
2181 water Streptococcosis in fish. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70, p. 3183-3187, 2004.
- 2182
- 2183 MAUEL, M. J. *et al.* A piscirickettsiosis-like syndrome in cultured Nile tilapia in Latin America with
2184 *Francisella spp.* as the pathogenic agent. *J Aquat Anim Health.* v. 19, p. 27-34, 2007.
- 2185
- 2186 MELDRUM, D. R. Sequencing Genomes and Beyond. *Science*, n. 292, p. 515-517, 2001.
- 2187
- 2188 MIAN, G. F. *et al.* Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia.
2189 *Veterinary Microbiology*, v. 136, p. 180-183, 2009.
- 2190
- 2191 MILLARD, C. M. *et al.* Evolution of the capsular operon of *Streptococcus iniae* in response to
2192 vaccination. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 78, n. 23, p. 8219-8226, 2012.
- 2193
- 2194 MILLER F.P. *et al.* Median Lethal Dose. *Alphascript Publishing*, 2010.
- 2195
- 2196 MOHAMED M.H.Y; AHMED N. Pathological evaluation of probiotic, *Bacillus subtilis*, against
2197 *Flavobacterium columnare* in tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) fish in Sharkia governorate. *J Am*
2198 *Sc.* v. 7, n. 2. P. 244-256, 2011.

- 2199 MONNET, C. *et al.* The *Arthrobacter arilaitensis* Re117 genome sequence reveals its genetic
2200 adaptation to the surface of cheese. *PLoS ONE*, v. 5, n. 11, p. e15489, 2010.
2201
- 2202 MUNANG'ANDU, H. M. *et al.* A review of the immunological mechanisms following mucosal
2203 vaccination of finfish. *Front. Immunol.*, v.6, p. 427, 2015.
2204
- 2205 MURRAY, P. *et al.* *Microbiologia Médica*. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 300, 2009.
2206
- 2207 NAWAWI, R. A., BAIANO, J.; BARNES, A. C. Genetic variability amongst *Streptococcus iniae* isolates
2208 from Australia. *J. Fish. Dis.*, v. 31, n. 4, p. 305-309, 2008.
2209
- 2210 NETTLES, R.E., SEXTON, D.J. Successful treatment of *Edwardsiella tarda* prosthetic valve
2211 endocarditis in a patient with AIDS. *Clin. Infect. Dis.*, v.25, p.918-919, 1997.
2212
- 2213 NIZETi, V. & RUBENS, C. Factores de Virulência de *Streptococcus* Grupo B com importancia en las
2214 infecciones neonatales. *Asociación Argentina de Microbiología*; Boletín n° 146. Enero. [internet]
2215 Argentina; 2001. Acesso em 26 Maio 2021. Disponível em:
2216 <http://medicine.ucsd.edu/nizetlab/streptococcipage/spanish.html>
2217
- 2218 NOGA, E.J. *Fish disease*. Missouri: Mosby, p.367,1995.
2219
- 2220 NOGA, E.J.; LEVY, M.G. *Phylum Dinoflagellata*. In: WOO, P.T.K. Fish Diseases and Disorders:
2221 Protozoan and Metazoan Infections. vol. 1, 2 ed. CAB International, Wallingford. p.16-45, 2006.
2222
- 2223 OBA, E. T. *et al.* Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para manejo. In: TAVARES-
2224 DIAS M (Org.). *Manejo e sanidade de peixes em cultivo*. Macapá: Embrapa, p. 226-247, 2009.
2225
- 2226 OLIVARES-FUSTER, O. *et al.* Molecular typing of *Streptococcus agalactiae* isolates from fish. *J Fish*
2227 *Dis*, v. 31, n.4, p. 277-283, 2008.
2228
- 2229 OLIVEIRA, E. *et al.* *Produção de tilápia*: Mercado, espécie, biologia e recria. Circular Técnica, 45.
2230 MAPA – Embrapa Meio Ambiente, 2007.
2231
- 2232 OLSON, M.V. The maps. Clone by clone by clone. *Nature*, v. 409, n. 6822, p. 816-818, 2001.
2233
- 2234 ONAKA, E. M. Acompanhamento do estado parasitológico de peixes mantidos em tanques-rede e em
2235 ambiente natural nos reservatórios de Nova Avanhandava e Ilha Solteira (SP). In: Castellani, D. (Ed.) /
2236 *Workshop de Piscicultura do Noroeste Paulista*, Votuporanga, SP, Brasil, 2009.
- 2237 ONO, E. A; KUBITZA, F. *Cultivo de peixes em tanques-rede*. 2. ed. Jundiaí: F. Kubitza, 1999. 68 p.
2238
- 2239 PADUA, S. B. Piscinodiniase. *Aquaculture Brasil*. Disponível em: <
2240 <https://www.aquaculturebrasil.com/coluna/74/piscinodiniase-> > Acesso em: 24 fev. 2021.
2241
- 2242 PADUA, S. B.; MENEZES FILHO, R. N.; CRUZ, C. Alevinos saudáveis: o ponto de partida para uma
2243 produção estável. *Panorama da Aquicultura*, v. 22, n. 134, p. 30-37, 2012.
2244
- 2245 PANCHOLI, V., FISCHETTI, V.A. A major surface protein on group A streptococci is a
2246 glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase with multiple binding activity. *J Exp Med*. v. 176, n. 2, p.
2247 415–426, 1992.
2248
- 2249 PARK, C. H. *et al.* Detection of Group B Streptococcal Colonization in Pregnant Women Using Direct
2250 Latex Agglutination Testing of Selective Broth. *Journal Of Clinical Microbiology*, [s.l.], v. 39, n. 1,
2251 p.408-409, 2001.
2252
- 2253 PARK, S. *et al.* Functional cross-reactivity within *Streptococcus pneumoniae* serogroup 6 elicited by
2254 pneumococcal conjugate and polysaccharide vaccines. *49th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents*
2255 *Chemother.* San Francisco, CA, abstr. G1-1006, 2009.
2256
2257

- 2258 PASTOR, E.Z. Principales enfermedades infecciosas de los peces. Barcelona: Aedos, p.175, 1981.
2259
- 2260 PAVANELLI, G.C. *et al.* Doenças de peixes: profilaxia, diagnósticos e tratamentos. Maringá: *Nupleia*,
2261 p.264, 1998.
2262
- 2263 PAVANELLI, G. C. *et al.* Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento. 3 ed, p. 31, Maringá:
2264 Eduem, 2008.
2265
- 2266 PHILIPPART, J.C.; J.C. RUWET. 1982. Ecology and distribution of tilapias. In: PULLIN, R.S.V.; R.H.
2267 LOWE McCONNEL (Ed.). *Biology and culture of tilapias*. Manila: ICLARM. Baton Rouge, Louisiana,
2268 United States. p. 15-59, 1982.
2269
- 2270 PIER, G. B.; MADIN, S. H. *Streptococcus iniae* sp. nov., beta hemolytic *Streptococcus* isolated from
2271 an amazon freshwater dolphin, *Iniae geoffrensis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v. 26, n. 4, p.545–553, 1976.
2272
- 2273 PILARSKI, F. *et al.* Isolation and characterization of *Flavobacterium columnare* (Bernardet et al. 2002)
2274 from four tropical fish species in Brazil. *Braz. J. Biol.*, São Carlos, v. 68, n. 2, p. 409-414, 2008.
2275
- 2276 PILARSKI, F.; SAKABE, R. *Principais Enfermidades Diagnosticadas no Estado de São Paulo:*
2277 *Profilaxia ou Tratamento?* 2009.
2278
- 2279 PRETTO-GIORDANO, L. G., *et al.* Evaluation on the Pathogenesis of *Streptococcus agalactiae* in
2280 Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 53, p. 87-92,
2281 2010.
2282
- 2283 PROENÇA, C.E.M.; BITTENCOURT, P.R.L. *Manual de piscicultura tropical*. Brasília: IBAMA, p.195,
2284 1994.
2285
- 2286 RICHARDS, V. P. *et al.* Comparative genomics and the role of lateral gene transfer in the evolution of
2287 bovine adapted *Streptococcus agalactiae*. *Infection, Genetics and Evolution*, Amsterdam, v. 11, n. 6,
2288 p. 1263-1275, 2011.
2289
- 2290 RIGOS, G.; STEVENSON, R. The effect of antibiotic treatment on the establishment of persistent
2291 infection with *Yersinia ruckeri* serovar II in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum).
2292 *Aquaculture International*, v. 9, p. 247-253, 2001.
2293
- 2294 ROBERTS, M. S. A report of an epizootic in hatchery-reared rainbow trout, *Salmo gairdneri*
2295 Richardson, at an English trout farm, caused by *Yersinia ruckeri*. *Journal of Fish Diseases*, v. 6, p.
2296 551-552, 1983.
2297
- 2298 ROMANO, L. A.; MEJÍA, J. Infección por *Streptococcus iniae*: Una enfermedad emergente que afecta
2299 a peces de cultivo y a humanos. *Aquatic*, v. 18, p. 25-32, 2003.
2300
- 2301 ROUBACH, R. *et al.* Aquicultura brasileira. *Panorama da Aquicultura*, v. 13, n.76, p. 47-57, 2003.
2302
- 2303 RUSSEL, N. J. *et al.* Maternal colonization with group B streptococcus and serotype distribution
2304 worldwide: systematic review and meta-analyses. *Clin. Infect. Dis.*, v. 65, p. S100-S111, 2017.
2305
- 2306 SALVADOR, R. *Imunização e inflamação por Streptococcus agalactiae em tilápia do Nilo*
2307 *(Oreochromis niloticus) alimentadas com ração suplementada com parede celular de Saccharomyces*
2308 *cerevisiae*. 136f. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Universidade Estadual Paulista, Centro de
2309 Aquicultura, Jaboticabal, 2008.
2310
- 2311 SALVADOR, R. *et al.* Isolation and characterization of *Streptococcus* spp. group B in Nile tilapia
2312 (*Oreochromis niloticus*) reared in hapas nets and Earth nurseries in the northern region of Parana
2313 State, Brazil. *Ciência Rural*, v.35, p.1374-1378, 2005.
2314
- 2315 SANTI, I. *et al.* CsrRS regulates group B *Streptococcus* virulence gene expression in response to
2316 environmental pH: a new perspective on vaccine development. *J Bacteriol* v.191, n. 17, p.5387–5397,
2317 2009.

- 2318 SCARPASSA, J. A. *Detecção molecular e isolamento de Streptococcus agalactiae em tilápia do Nilo*
2319 *(Oreochromis niloticus) com e sem sinais clínicos de doença bacteriana*. Dissertação (Mestrado em
2320 Genética e Biologia Molecular) Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2014.
2321
- 2322 SCHALEN, C. Prevalence of IgA receptors in clinical isolates of *Streptococcus pyogenes* and
2323 *Streptococcus agalactiae*: serologic distinction between the receptors by blocking antibodies. *FEMS*
2324 *Immunol Med Microbiol.* v.7, p.39–45, 1993.
2325
- 2326 SEALE, A.C. *et al.* Stillbirth with group B streptococcus disease worldwide: systematic review and
2327 meta-analyses. *Clin. Infect. Dis.*, 65, p. S125-S132, 2017
2328
- 2329 SEBASTIÃO F.A. *et al.* Hematology and protective performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)
2330 naturally infected with *Flavobacterium columnare*. *Braz J Microb* v. 42, p. 282-289, 2011.
2331
- 2332 SEIDLER, N.W. GAPDH, as a Virulence Factor. In: GAPDH: Biological Properties and Diversity.
2333 *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 985. Springer, Dordrecht, 2013.
2334
- 2335 SERRANO, P. H. Responsible use of antibiotics in aquaculture. In: Food and
2336 Agriculture Organization (FAO) *Fisher Technical Paper*, p. 97, 2005.
2337
- 2338 SCHMITTOU, H.R. High density fish culture in low volume cages. Singapore: *American Soybean*
2339 *Association*, p. 78, 1993.
2340
- 2341 SHENDURE, J.; JI, H. Next-generation DNA sequencing. *Nature biotechnology*, n. 26, p. 1135-1145,
2342 2008.
2343
- 2344 SHOEMAKER, C. A. *et al.* Protection against heterologous *Streptococcus iniae* isolates using a
2345 modified bacterin vaccine in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *J. Fish Dis.*, v. 33, n. 7, p. 537-544,
2346 2010.
2347
- 2348 SLOTVED, H.C. *et al.* Serotype IX, a proposed new *Streptococcus agalactiae* serotype. *J Clin*
2349 *Microbiol.* v. 45, n. 9, p. 2929-2936, 2007.
2350
- 2351 STALHAMMAR-CARLEMALM *et al.* Protein Rib: A novel group B streptococcal cell surface protein
2352 that confers protective immunity and is expressed by most strains causing invasive infections. *The*
2353 *Journal of experimental medicine.* v. 77, p. 1593-1603, 1993.
2354
- 2355 SKOV, J. *et al.* Effects of soluble immunostimulants on mucosal immune responses in rainbow trout
2356 immersion-vaccinated against *Yersinia ruckeri*. *Aquaculture*, v. 492, p. 237-246, 2018.
2357
- 2358 SMITH, P.; HINEY, M. P.; SAMUELSEN, O. B. Bacterial resistance to antimicrobial agent used in fish
2359 farming: a critical evaluation of method and meaning. *Ann. Rev. Fish Dis*, n.4, p. 273-313, 1994.
2360
- 2361 STEVENS, D. Streptococcal infections: clinical aspects, microbiology and molecular pathogenesis.
2362 Nova York: *Oxford University Press*; 2000.
2363
- 2364 Sociedade Brasileira de Piscicultura. *Anuário Peixe BR da Piscicultura*. 2019.
2365
- 2366 SOTO E. *et al.* Interaction of *Francisella asiatica* with Tilapia (*Oreochromis niloticus*) innate immunity.
2367 *Infection and Immunity.* v. 78(5), p.2070-2078, 2010.
2368
- 2369 SU, J. F *et al.* Dynamic bacterial colonization and microscopic lesions in multiple organs of tilapia
2370 infected with low and high pathogenic *Streptococcus agalactiae* strains. *Aquaculture*, n. 471, p. 190-
2371 203, 2017.
2372
- 2373 SWAIN, P. *et al.* Bath immunization of spawns, fries and fingerlings of Indian major carps using a
2374 particulate antigen and determination of age, dose and duration of antigen exposure. *Fish Shellfish*
2375 *Immunology*, v. 13, p. 133-140, 2002.
2376
2377

- 2378 SURESH, A.V. Tilapia update 1998. *World Aquaculture*, v.30, p. 8-68, 1998.
2379
- 2380 Tanques suspensos ou escavados: qual a melhor opção? *Sansuy*, 2020. Disponível em:
2381 <<https://blog.sansuy.com.br/tanques-suspensos-ou-escavados/>> Acesso em: 05 de fev. de 2021.
2382
- 2383 TELLES, J. A. Estudo farmacocinético da enrofloxacina em Tilápia-do-Nilo
2384 (*Oreochromis niloticus*) utilizando ração medicada preparada com recobrimento polimérico. 145 f.
2385 Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.
2386
- 2387 TENENBAUM, T.B. *et al.* *Streptococcus agalactiae* invasion of human brain microvascular endothelial
2388 cells is promoted by the laminin-binding protein Lmb. *Microbes Infect.* V.9, p.714-720, 2007.
2389
- 2390 TETTELIN, H. *et al.* Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*:
2391 implications for the microbial “pan-679 genome”. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.
2392 102, p. 13950-13955, 2005.
2393
- 2394 THATCHER, V. E.; BRITES NETO, J. Diagnóstico, prevenção e tratamento das enfermidades de
2395 peixes neotropicais de água doce. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, n.16, p. 111-128, 1994.
2396
- 2397 TRABULSI-ALTERTHUN, Luiz Rachid, Flavio. *Microbiologia*. 6ª edição. São Paulo: Editora Atheneu,
2398 2017.
2399
- 2400 VOJTECH L.N. *et al.* Host immune response and acute disease in a zebrafish model of Francisella
2401 pathogenesis. *Infect. Immun.* v.77, p.914-925. 2009.
2402
- 2403 WATANABE, W. *et al.* Tilapia production system in the americas: technological advances, trends, and
2404 challenges. *Reviews in Fisheries Science*, v. 10, n. 384, p. 465-598, 2003.
2405
- 2406 WILLUMSEN, B. Birds and wild fish as potential vectors of *Yersinia ruckeri*. *Journal of Fish Diseases*,
2407 v.12, p. 275–277, 1989.
2408
- 2409 YE, X. *et al.* Identification and molecular typing of *Streptococcus agalactiae* isolated from pond-
2410 cultured tilapia in China. *Fish Sci*, v.77, p. 623-632, 2011.
2411
- 2412 YILDIRIM, A. Ö. *et al.* Identification and characterization of *Streptococcus agalactiae* isolated from
2413 horses. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v. 85, n. 1, p. 31-35, 2002.
2414
- 2415 ZAMBONI FILHO, E. Cultivo de peixes em tanques-rede e impactos ambientais. In: *Cultivo de peixes*
2416 *em tanques-rede: desafios e oportunidades para um desenvolvimento sustentável*. Belo Horizonte:
2417 EPAMIG. p 104, 2005.
2418
- 2419 ZAMRI-SAAD, M. *et al.* Pathological changes in red tilapias (*Oreochromis* spp.) naturally infected by
2420 *Streptococcus agalactiae*. *Journal of Comparative Pathology*, n. 143, p. 227-229, 2010.
2421
- 2422 ZHANG, D. *et al.* Molecular characteristics and transmission of *Streptococcus agalactiae* in a major
2423 tilapia culturing area of China. *J. Fish. Sci.* n. 24, p. 606-614, 2017.
2424
- 2425 ZHOU, S. M. *et al.* Rapid identification of *Streptococcus iniae* by specific PCR assay utilizing genetic
2426 markers in ITS rDNA. *J. Fish Dis.*, v. 34, n. 4. p. 265-217, 2011.
2427