



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

GABRIEL MARCOS DOMINGUES DE SOUZA

**“DETECÇÃO MOLECULAR DE *STREPTOCOCCUS*
AGALACTIAE EM TILÁPIA DO NILO (*OREOCHROMIS*
NILOTICUS)”**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL



Programa de
Pós-graduação em
Genética e Biologia Molecular

GABRIEL MARCOS DOMINGUES DE SOUZA

**“DETECÇÃO MOLECULAR DE *STREPTOCOCCUS*
AGALACTIAE EM TILÁPIA DO NILO (*OREOCHROMIS*
NILOTICUS)”**

GABRIEL MARCOS DOMINGUES DE SOUZA

**“DETECÇÃO MOLECULAR DE *STREPTOCOCCUS*
AGALACTIAE EM TILÁPIA DO NILO (*OREOCHROMIS*
NILOTICUS)”**

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

Orientador: Prof. Dr. Laurival Antônio Vilas Boas

Londrina
2013

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S729d Souza, Gabriel Marcos Domingues de.
Detecção molecular de *Streptococcus agalactiae* em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) / Gabriel Marcos Domingues de Souza. – Londrina, 2013.
56 f. : il.

Orientador: Laurival Antônio Vilas-Boas.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2013.

Inclui bibliografia.

1. Peixe – Doenças – Aspectos moleculares – Teses. 2. Tilápia (Peixe) – Teses. 3. DNA – Teses. 4. Reação em cadeia de polimerase – Teses. 5. Aquicultura – Teses. I. Vilas-Boas, Laurival Antônio. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Título.

CDU 597.583.4

GABRIEL MARCOS DOMINGUES DE SOUZA

**“DETECÇÃO MOLECULAR DE *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* EM
TILÁPIA DO NILO (*OREOCHROMIS NILOTICUS*)”**

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

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Celso Duarte Carvalho Filho
Universidade Federal da Bahia - UEL

Prof^a. Dr^a. Lucienne Garcia Pretto-Giordano
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 27 de fevereiro de 2013.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por estar presente sempre, me ajudando e realizando os sonhos Dele em minha vida, por ser a minha essência, a minha prioridade; pelas graças derramadas em minha vida, por ter me guiado desde a aprovação até a conclusão dessa etapa, me fortalecendo nas tribulações e me ensinando a ser perseverante, a Ele toda glória e todo louvor;

A Maria, mãe do meu Jesus e minha mãe, por estar sempre ao meu lado intercedendo junto ao Pai em todos os momentos, por mim;

A minha esposa Rafaelle, por ter sido a primeira a acreditar em mim, partilhado todos os momentos, todas as vitórias, todas as graças alcançadas;

Ao meu pai Sebastião, exemplo de homem e honestidade, por toda a educação, apoio e compreensão;

A minha mãe Edna, mulher de muita fé em DEUS, cuidadosa e amorosa, por ser o meu porto seguro, minha calma e meu alento toda a vida;

A minha irmã Laís, por todo o amor, carinho, companheirismo e apoio;

Ao meu irmão Caio, por ser uma das maiores motivações que tenho em tentar ser melhor sempre, por ser meu pupilo, meu amigo;

Aos meus avós Maria Luíza, Ermínio, Lourdes e Sebastião (em memória), pelo apoio, motivação e confiança na minha capacidade;

Aos meus tios Marco Antônio, Aparecida e Eliana pelo companheirismo e ajuda durante toda minha formação;

Ao meu orientador, Dr. Laurival Antônio Vilas Boas, um exemplo a ser seguido, pelo seu profissionalismo, seriedade, honestidade e principalmente por não deixar nada ultrapassar sua humanidade e simplicidade;

A Professora Dra. Gislayne Trindade Vilas Boas, por toda a dedicação, disponibilidade e exemplo de profissionalismo, pelo carinho e sensibilidade em ensinar não somente ciência, mas também para a vida;

A Ana Paula, Fernanda, Josiane, André, Nadal, João Godoi e toda a equipe do laboratório de Bioinseticida e Taxonomia de Bactérias, muito obrigado, pela amizade, companheirismo, cumplicidade, paciência e respeito, por me ensinarem a conviver e trabalhar em grupo;

Ao Bruno Hidalgo, meu amigo e companheiro de bancada, pela ajuda em todos os momentos, desde a coleta de material até a obtenção dos resultados, sem tua ajuda, não seria possível a execução desse trabalho;

A Professora Dra. Lucienne Garcia Pretto-Giordano, pelo apoio, iniciativa e disponibilidade em ajudar na idealização, implantação e desenvolvimento desse projeto;

A Professora Dra. Daniele Sartori, por toda a ajuda nas dúvidas e questionamentos referentes a este trabalho e pelas dicas e correções na qualificação;

Ao Professor Dr. Celso Duarte Carvalho Filho, pela paciência em me ensinar os primeiros passos no trabalho de bancada e por aceitar fazer parte da banca examinadora desse trabalho;

A CAPES e CNPq, pelo apoio financeiro;

A coordenação e aos professores do programa de mestrado em Genética e Biologia Molecular pelos ensinamentos e disciplinas ministradas durante o curso;

A secretária Sueli, por toda ajuda durante o período do mestrado;

A família que DEUS me permitiu escolher, Maurilio, Bárbara, André, Ygor, Marcela, Haroldo, Rafa, Mateus, Roberta, Diego, Astromar, Priscila, Pedro, Manoel Baptista e tantos outros, pela importância na minha formação pessoal e espiritual, indiretamente vocês foram muito importantes no desenvolvimento desse trabalho;

Aos queridos parceiros, Miguel, Roger, Paulo Vinicius e André Van, vocês são exemplos de amizade e companheirismo, foram presentes do céu que recebi durante a minha formação acadêmica, que nossa amizade seja eterna;

E a todos que participaram direta e indiretamente desse trabalho o meu muito obrigado!

*Dedico este trabalho a Deus e a Nossa Senhora
por mais uma etapa cumprida;
A minha esposa Rafaelle;
meus pais Sebastião e Edna
que fizeram tudo para que
eu pudesse chegar até aqui;
e aos meus irmãos Laís e Caio
por todo amor, respeito e
admiração que tem por mim.*

SOUZA, Gabriel Marcos Domingues de. **Detecção molecular de *Streptococcus agalactiae* em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2013. 56 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2013.

RESUMO

Doenças causadas por *Streptococcus ssp.* é um dos problemas sanitários mais importantes encontrados na aquicultura mundial. No Brasil e em outros países no mundo, *S. agalactiae* encontra-se como grande responsável por infecções que acometem tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e outros peixes de criação, causando grandes prejuízos à piscicultura. O diagnóstico utilizado atualmente para detecção e identificação dessa espécie se baseia nos sinais clínicos, no isolamento microbiológico, do agente etiológico, e testes bioquímicos. A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem a capacidade de identificar especificamente, com segurança e rapidez, *S. agalactiae* em amostras coletadas de peixes e vem sendo proposto para diagnóstico de diferentes doenças. Esse trabalho realizou a padronização da técnica para rápido diagnóstico da presença deste microrganismo em órgãos e tecidos de tilápia do Nilo. O DNA foi obtido de diversas fontes: banco de cepas com amostras de *S. agalactiae* isoladas de peixes de criação, órgãos como rim e encéfalo, oriundos de peixes infectados experimentalmente. Também foram utilizadas amostras de DNA contendo grupos de bactérias relacionadas para validar a especificidade da reação. As amostras foram avaliadas por PCR de um fragmento conservado do DNA ribossomal 16S de *S. agalactiae*. Os resultados dessa reação foram analisados através de eletroforese em gel de agarose observando a presença ou ausência do fragmento amplificado. Observou-se a amplificação do fragmento na linhagem usada como referência e identificada como *S. agalactiae* e ausência de amplificação nos demais grupos, demonstrando a especificidade de reação. As mesmas condições foram aplicadas às amostras de DNA do banco de cepas e dos órgãos contaminados por essa bactéria. A amplificação foi positiva para todos os isolados testados e órgãos oriundos dos peixes inoculados experimentalmente. Estes resultados poderão ser usados como subsídio para implementação do diagnóstico e monitoramento da doença em tilápia do Nilo.

Palavras-chaves: Piscicultura. DNA 16S. PCR.

SOUZA, Gabriel Marcos Domingues de. **Molecular detection of *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)**. 56 p. 2013. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2013.

ABSTRACT

Diseases caused by *Streptococcus ssp.* is one of the most important health problems encountered in aquaculture worldwide. In Brazil and other countries of the world, *S. agalactiae* is as largely responsible for infections that affect the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and other farmed fish, causing extensive damage to fish farming. Diagnosis currently used for detection and identification of this species is based on clinical, microbiological isolation of the etiologic agent, and biochemical tests. The technique of Polymerase Chain Reaction (PCR) has the ability to specifically identify, safely and quickly, *S. agalactiae* in samples of fish and has been proposed for diagnosis of different diseases. This work constitutes the standardized technique for rapid diagnosis of the presence of this bacteria in organs and tissues of Nile tilapia. DNA was obtained from several sources: collection samples with strains of *S. agalactiae* isolated from farmed fish, organs such as kidney and brain from experimentally infected fish. Samples were also used for DNA containing groups of related bacteria to validate the specificity of the reaction. The samples were evaluated by PCR from a fragment of the conserved 16S ribosomal DNA of *S. agalactiae*. The results were analyzed by agarose gel electrophoresis observing the presence or absence of the amplified fragment. We observed an amplification of the fragment used as reference strain identified as *S. agalactiae* and absence of amplification in the other groups, demonstrating the specificity of reaction. The same conditions were applied to samples of DNA collection strains and organs contaminated with this bacteria. The amplification was positive for all isolates tested and organs from fish inoculated. These results can be used as an aid to diagnosis implementation and monitoring of the disease in Nile tilapia.

Keywords: Pisciculture. 16S DNA. PCR.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	Aqüicultura.....	14
2.2	Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>	15
2.3	Sanidade em pisciculturas no Brasil.....	16
2.4	Gênero <i>Streptococcus</i>	18
2.4.1	Estreptococos do grupo B (EGB.....	20
2.4.2	Doenças causadas por Estreptococos em peixes	22
2.5	Diagnóstico Molecular	26
2.5.1	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR	26
2.5.2	Técnicas moleculares para diagnóstico e detecção de infecções bacterianas em peixes.....	28
3	OBJETIVOS	30
3.1	Objetivo geral	30
3.2	Objetivos específicos	30
4	ARTIGO: Detecção molecular de <i>Streptococcus agalactiae</i> em tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	31
	RESUMO.....	31
	ABSTRACT	32
4.1	Introdução.....	33
4.2	Material e métodos	35
4.2.1	Material Biológico	35

4.2.2	Infecção experimental de <i>Streptococcus agalactiae</i> em tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>	36
4.2.3	Extração de DNA e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	38
4.3	Resultados e discussão.....	39
4.4	Conclusão.....	46
4.5	Anexos.....	47
	REFERÊNCIAS Bibliográficas	50

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a aquicultura tem se desenvolvido de forma significativa no Brasil, pois além de possuir um grande potencial hídrico e condições favoráveis para a prática da aquicultura, o governo do país tem investido em políticas públicas de incentivo a essa atividade, desenvolvida pelo Ministério da Pesca e Aquicultura (ONO & KUBITZA, 1999; BRASIL, 2010).

Quando comparamos a produção do ano de 2004, onde foram produzidas 177.518 toneladas de peixes de água doce, com a de 2010 que produziu cerca de 394.340 toneladas, observa-se um aumento na produção desse ramo de atividade no país (FAO, 2009; BRASIL, 2010).

Uma das espécies de peixes mais cultivadas, no Brasil, é a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Em 2004 foram produzidas 69.078 toneladas e em 2010 a produção dessa espécie representou aproximadamente 40% (cerca de 150.000t) de toda a produção obtida pela aquicultura do país (FAO, 2009; BRASIL, 2010).

O crescimento da produção aquícola tem acentuado problemas sanitários ligados ao sistema intensivo de cultivo (BONDAD-REANTASO et al., 2005). As características da produção de peixes nesse sistema, onde são utilizados tanques-rede, com alta densidade de estocagem, diminuição da qualidade da água, distúrbios nutricionais, acúmulo de matéria orgânica no ambiente, proliferação de micro-organismos patogênicos, entre outros (KUBTIZA, 2000).

Tais condições de estresse ambiental alteram a homeostase dos peixes e os tornam suscetíveis ao ataque de organismos patogênicos que podem

desencadear surtos de contaminação graves e mesmo dizimar criações inteiras em poucos dias (ONAKA, 2009; PAVANELLI et al., 2008).

Doenças de origem bacteriana são as responsáveis por causarem os maiores problemas relacionadas a doenças na piscicultura. As estreptococoses são a principais doenças, sendo responsáveis por grandes prejuízos no cultivo de peixes em diversos países com grande produção aquícola, inclusive no Brasil (SALVADOR et al., 2005; PARK et al., 2009).

Salvador et al. (2005) isolaram de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) cultivadas em tanque-rede e viveiros de terra, no estado Paraná, *Streptococcus spp.* não-hemolítico do grupo B de Lancefield e observaram em propriedades de cultivo de tilápia em tanques-rede, uma alta morbidade e mortalidade por *S. agalactiae*. Os peixes acometidos por essa bactéria apresentaram sinais clínicos como: escurecimento da pele, letargia, natação errática e circular, diminuição de apetite, exoftalmia uni ou bilateral e distensão da cavidade visceral.

Uma das principais estratégias de controle das doenças bacterianas é o uso, muitas vezes indiscriminado, de antibióticos e produtos químicos, para controle dos agentes patogênicos, podendo causar contaminação e degradação do ambiente, e também provocar a seleção de cepas bacterianas resistentes, podendo implicar em risco à saúde pública (SERRANO, 2005; SWAIN et al., 2002).

A avaliação e diagnóstico laboratorial se torna uma ferramenta de extrema importância para indicar o tratamento adequado, em surtos de infecção por bacterioses, pois a utilização indiscriminada de algum produto pode causar impactos negativos, tanto no peixe como no meio ambiente, além da possibilidade de selecionar parasitas e bactérias resistentes (VARGAS, 2004).

O diagnóstico pode ser realizado pela associação dos sinais clínicos com os achados laboratoriais, identificação microbiológica e bioquímica, porém, dependem, sobretudo, da viabilidade das bactérias nos tecidos, limitando a análise, além de demandarem tempo (KUBITZA, 2000; FIGUEIREDO et al., 2007a; FIGUEIREDO et al., 2009). O objetivo dessa pesquisa foi propor uma metodologia de diagnóstico molecular de *S. agalactiae* que acometem tilápia do Nilo, visando contribuir para o manejo das doenças e controle sanitário da cadeia produtiva de tilápia.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 AQUICULTURA

A produção da aquicultura de origem continental do Brasil tem aumentado de forma significativa. Em 2004, o Brasil produziu 177.518 toneladas de peixes de água doce das quais 69.078 t de tilápia. Em 2010 a produção nacional alcançou a marca de 394.340 toneladas de pescado sendo 155.450,8 t de tilápia, representando aproximadamente 40% da produção nacional de peixes (FAO, 2009; BRASIL, 2010).

A Região Sul do Brasil é destaque na produção de pescado no país, sendo responsável pela maior produção com 133.425,1 toneladas, correspondendo por 33,8% da produção nacional. O Estado do Rio Grande do Sul é considerado o maior polo produtor de pescado do Brasil, com 55.066,4 toneladas. O estado do Paraná produziu 35.811,1 toneladas de pescado no ano de 2010 (BRASIL, 2010).

O aumento dessa atividade está associado ao desenvolvimento do setor, através de incentivos de políticas públicas que facilitaram o acesso dos piscicultores a programas do governo, como o Plano Mais Pesca e Aquicultura desenvolvida pelo Ministério da Pesca e Aquicultura (BRASIL, 2010).

Devido ao seu grande potencial hídrico o Brasil apresenta condições extremamente favoráveis para a prática da aquicultura, com mais de cinco milhões de hectares de água doce em reservatórios naturais e artificiais, que podem ser aproveitados para a produção de organismos aquáticos (ONO & KUBITZA, 1999).

Na área de cultivo para engorda de organismos aquáticos, o Brasil, emprega o uso de açudes, viveiros escavados e tanques-rede (BRASIL, 2010), sendo que atualmente o sistema de criação em tanques-rede tem se desenvolvido com maior intensidade (BRASIL, 2010). Esta forma de cultivo é bastante difundida em todo o mundo, pois possibilita a utilização de ambientes aquáticos já existentes exigindo poucos investimentos quando comparada à piscicultura tradicional, praticada em viveiros escavados (ONO & KUBITZA, 1999).

2.2 TILÁPIA DO NILO (*OREOCHROMIS NILOTICUS*)

As tilápias são originárias da África do Sul e do Oriente Médio e atualmente estão presentes em cerca de 100 países (CASTAGNOLLI & CYRINO, 1986; FITZSIMMOS, 2000).

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) pertence à ordem *Perciformes*, família *Cichlidae*. Tem origem na África, onde é encontrada nos rios litorâneos de Israel, rios Nilo e Jebel Marra e nas bacias dos rios Níger, Benue, Volta, Gâmbia, Senegal e Chade (FROESE & PAULY, 2011). Com a finalidade de melhorar a produtividade e auxiliar no desenvolvimento da aquicultura, este peixe foi introduzido em mais de 100 países das regiões tropicais e subtropicais (COWARD & BROMAGE, 2000; LÈVEQUE, 2002).

O Brasil utiliza várias espécies exóticas como fonte econômica, mas a tilápia do Nilo apresenta inúmeras vantagens com relação às demais e também às espécies nativas (LIZAMA et al., 2007). Essa vantagem pode ser entendida pelo fato de existirem muitas informações detalhadas sobre as características biológicas e

zootécnicas que são utilizadas em condições de cultivo de tilápia (BOSCARDIN, 2008).

Algumas características como ciclos curtos de produção, rápido crescimento, tolerância a ambientes com alta densidade, consumo de alimento natural e também de rações, ótima qualidade de carne, facilidade de manipulação e filetagem, boa aceitação comercial, resistência ao manejo e às doenças (LEONHARDT, 1997).

2.3 SANIDADE EM PISCICULTURAS NO BRASIL

Com o aumento das atividades relacionadas à aquicultura, os estudos de patógenos que acometem organismos aquáticos tem se desenvolvido consideravelmente, principalmente àqueles ligados a organismos com potencial para cultivo e comercialização (THATCHER & BRITES-NETO, 1994). O desenvolvimento dessa atividade no mundo, associado à globalização do comércio, introdução de novas espécies e sistemas intensivos de cultivo, tem acentuado problemas sanitários, além do surgimento de doenças de origem bacteriana (BONDAD-REANTASO et al., 2005).

Doenças bacterianas em peixes estão associadas a fatores que aumentam sua susceptibilidade a infecções como nível de oxigênio dissolvido, concentração de amônia e nitrito, alcalinidade total, pH, transparência da água, dureza total e temperatura (MCGEACHIN et al., 1987).

Na criação intensiva, as bactérias são importantes patógenos devido à facilidade de sua disseminação e por serem oportunistas (KUBITZA, 2000; PAVANELLI et al., 2008). Existem muitas bactérias patogênicas, porém algumas delas têm ocorrência frequente e apresentam maior impacto na aquicultura como *Streptococcus spp.*, *Aeromonas spp.*, *Pseudomonas spp.* e *Flavobacterium columnare* (KUBITZA & KUBITZA, 2004).

Plumb (1997) e Shoemaker et al. (2000) relataram que o cultivo intensivo obriga os criadores a utilizar grandes volumes de ração e a alta densidade de peixes, acúmulo de matéria orgânica, redução da quantidade de oxigênio dissolvido e da qualidade da água, promovem o estresse nos peixes, o que leva a uma diminuição da imunidade do animal, favorecendo a disseminação de doenças, principalmente de origem bacteriana. As taxas de mortalidade em surtos causados por esses organismos podem ser bastante elevados, e de difícil tratamento, por essa razão, em muitos países, doenças causadas por bactérias são de declaração obrigatória (PAVANELLI et al., 2008).

O sucesso da piscicultura depende do cuidado com os parasitas e patógenos que causam perdas no cultivo. Agentes patogênicos podem se disseminar para o ambiente, representando riscos à saúde pública (BRACCINI et al., 2008). Portanto se torna de extrema importância, o diagnóstico laboratorial para indicação do tratamento adequado, haja vista que a utilização indiscriminada de algum produto pode causar impactos negativos, tanto no peixe como no meio ambiente, além da possibilidade de selecionar parasitas e bactérias resistentes (VARGAS, 2004).

2.4 GÊNERO *STREPTOCOCCUS*

O gênero *Streptococcus* pertence ao filo Firmicute, classe *Bacilli*, ordem *Lactobacillales*, e família *Streptococcaceae*. Esse gênero atualmente contém 90 espécies e 17 subespécies, sendo distribuídas em linhagens de origem animal e humana (GARRITY, 2008). A família *Streptococcaceae* também compreende os gêneros *Lactococcus* e *Lactovul* (MATTHIES et. al., 2004).

A classificação taxonômica de estreptococos, que tem por base características morfológicas e fisiológicas exploradas através de diferentes testes, tem se modificado nos últimos anos pelos avanços de técnicas de análise molecular como o sequenciamento de regiões do genoma como do DNA ribossômico 16S (FACKLAM, 2002).

O grupo estreptococos engloba os cocos Gram-positivos, ovoides de 0,5 a 2,0 µm de diâmetro e ocorrem aos pares ou em cadeias quando crescem em meio líquido. Não são móveis, não formam esporos e são catalase-negativos, isto é não reagem com peróxido de hidrogênio a 3% (TRABULSI & ALTERTHUM, 2005).

De modo geral, esses microrganismos são nutricionalmente exigentes e requerem meios enriquecidos, geralmente pela adição de sangue, para o crescimento a temperaturas de 25 a 45°C, com temperatura ótima de 37°C. Possuem metabolismo fermentativo e produz ácido lático a partir de carboidratos, são anaeróbios facultativos, e alguns podem crescer melhor em atmosfera rica em CO₂ (5%) ou em anaerobiose (TRABULSI & ALTERTHUM, 2005).

Do ponto de vista ecológico, esses microrganismos são bastante heterogêneos, pois são encontrados nos mais diferentes ambientes. Muitos são

integrantes da flora normal do corpo humano, particularmente ao nível das vias aéreas superiores e do trato intestinal. Alguns são patógenos clássicos e vários são tipicamente oportunistas. Alguns destes oportunistas raramente são associados à infecção, enquanto outros vêm crescendo intensamente em importância, graças à capacidade de causar infecções hospitalares e de adquirir resistência aos antibióticos. Embora esses microrganismos façam parte da microbiota normal, muitos deles são responsáveis por uma variedade de manifestações clínicas, e são considerados importantes agentes infecciosos tanto para o homem como para os animais. (TRABULSI & ALTERTHUM, 2005)

Vários sistemas de classificação foram desenvolvidos para os estreptococos, levando à utilização de diversas designações que frequentemente, se tornam um obstáculo ao entendimento, já que sua adoção não é universal. Entre esses sistemas se destacam aqueles baseados em características hemolíticas, fisiológicas e antigênicas (TRABULSI & ALTERTHUM, 2005).

A identificação dos estreptococos é, entretanto, até hoje, relativamente complexa e fundamentada num sistema dicotômico, com base na observação inicial das propriedades hemolíticas das amostras. Dessa forma, os estreptococos são classificados como beta-hemolíticos ou não beta-hemolíticos. Estes últimos podem ser subdivididos em alfa-hemolíticos e gama ou não hemolíticos (TRABULSI & ALTERTHUM, 2005).

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. Rebecca Lancefield (1933) tomando por base este

polissacarídeo e trabalhando com testes de precipitação e antissoros, conseguiu distribuir as espécies de estreptococos 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 (LANCEFIELD, 1933).

2.4.1 Estreptococos do grupo B (EGB)

Essa espécie foi descrita pela primeira vez em 1887 por Nocard e Mollereau como *Streptococcus de la mammitis*, ou seja, um patógeno da mastite bovina (NOCARD; MOLLEREAU, 1887, *apud* BISHARAT et al., 2004). *S. agalactiae* é a única espécie pertencente ao grupo B de Lancefield, é um agente patogênico importante em humanos, bovinos e peixes. Em peixes causa meningoencefalite, mastite clínica e subclínica em bovinos e em humanos provocam infecções superficiais da pele, faringite, sepse, pneumonia, meningite, endocardite, febre reumática, glomerulonefrite e meningite neonatal (BERRIDGE et al., 2001 DUARTE et al., 2004, LINDAHL et al., 2005, MIAN et al., 2009, POPPERT et al., 2009, PEREIRA et al., 2010).

Sua identificação é feita através da caracterização morfológica de suas colônias, cinzas, circulares e levemente brilhantes em meio de cultivo contendo sangue. Suas cepas apresentam beta-hemólise discreta ao redor das colônias, mas podem também existir cepas com ausência de hemólise, gama-hemólise, o que pode ocasionar confusão com espécies de *Enterococcus* (SPELLERBERG; BRANDT, 2007).

Existem várias provas bioquímicas para a identificação fenotípica de EGB. A escolha de testes como prova da catalase, prova de crescimento em azul de metileno, NaCl a 6,5%, bile 40% e esculina e classificação em grupos com testes sorológicos disponíveis comercialmente, permitem caracterizar isolados de *S. agalactiae* de peixes (SALVADOR et al., 2003; 2005).

Atualmente tem-se descritos nove sorotipos diferentes para *S. agalactiae*, Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII e VIII, baseados nas variações da estrutura e composição dos polissacarídeos capsulares e nas respostas imunogênicas (LANCEFELD; HARE, 1935; JENNINGS et al., 1983; WESSELS et al., 1987; VON HUNOLSTEIN et al., 1993; KOGAN et al., 1995, 1996). Esses polissacarídeos extracelulares são importantes para a proteção contra condições do meio e do hospedeiro que podem ser prejudiciais à sobrevivência do microrganismo. Além disso, esses polissacarídeos podem ser considerados potentes fatores de virulência quando possuem a capacidade de mimetizar estruturas do hospedeiro e de intervir com vias de ativação do sistema complemento (EDWARDS et al., 1982; HAYRINEN et al., 1989).

Além da estrutura básica da membrana constituída por peptidoglicana, carboidratos, ácido teicóico, lipoteicóico e proteínas, estreptococos possuem um complexo polissacarídico grupo específico (KONEMAN et al., 2005). Segundo a classificação de Lancefield, EGB é constituída pelo antígeno de grupo B.

Contudo a variação estrutural de *S. agalactiae* não se resume apenas ao antígeno grupo-específico B, mas existe outro complexo polissacarídico, localizado na região externa a parede celular que representa a cápsula. Essa

estrutura apresenta composição variável a qual determina os nove tipos sorológicos de EGB já descritos (KONEMAN et al., 2005).

EGB foi primeiramente associada a doenças de origem animal, especificamente de bovinos (ELLIOTT et al., 1990). Desde sua descrição, esse microrganismo vem se revelando como agente etiológico de doenças e colonização no homem e em outros animais como ovelhas, cabras, suínos, caninos, felinos, roedores, rãs e até em peixes (ELLIOTT et al., 1990; LAMMLER et al., 1998).

2.4.2 Doenças causadas por Estreptococos em peixes

Os estreptococos estão entre os principais grupos de bactérias que acometem a criação de peixes no Brasil e no mundo, doenças associadas a esse grupo tem causado altos prejuízos para os produtores (SALVADOR et al., 2005; PARK et al., 2009).

O primeiro relato de estreptococose em peixes foi de Hoshina et al. (1958), no Japão, em truta arco-íris cultivada. *Streptococcus difficile* foi descrito pela primeira vez por Eldar et al. (1994), em Israel, como um cocos não hemolítico que causava septicemia e meningoencefalite em tilápia (*Oreochromis spp.*) e em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). Estudos recentes demonstraram que o *S. difficile* é do grupo B de Lancefield, tipo IB, com perfil eletroforético de proteína celular indistinguível do *S. agalactiae* (VANDAMME et al., 1997). Kawamura et al. (2005), após analisar cinco sequências de genes, observaram que *S. agalactiae* e *S. difficile* apresentaram semelhança de 100% para 16S rRNA, 99,6% para *gyrB*, 98,6% para *sodA*, 99,5% para *gyrA* e 99,8% para *parC* sugerindo uma reclassificação do *S.*

difficile para unificar a nomenclatura, considerando *S. difficile* e *S. agalactiae* sinônimos.

Em tilápia do Nilo doenças associadas a estreptococos são as mais comuns e as mais sérias a serem tratadas em sistemas de cultivo de vários países, inclusive no Brasil. As principais espécies desse gênero responsáveis por causar infecção em tilápias são *Streptococcus iniae*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* e *S. ictaluri*. No Brasil foram isolados *S. agalactiae* e *S. iniae* (FIGUEIREDO et al., 2007a; FIGUEIREDO et al., 2009; SALVADOR et al., 2005).

O processo de transmissão da doença associada a estreptococos ocorre provavelmente por contato direto entre peixes infectados com peixes sadios, e por contato indireto, pela bactéria presente na água, permitindo que a doença se manifeste gradativamente em diferentes tanques-rede de uma mesma propriedade. A doença apresenta mortalidade elevada, principalmente em peixes cultivados em tanques-rede, onde há ocorrência de manejo inadequado da qualidade da água e da nutrição dos peixes (KUBITZA, 2000; FIGUEIREDO et al., 2007a).

O acometimento por estreptococose é comumente observado em peixes de 50g até 1 kg, mas é na fase de engorda, sendo peixes de 400 a 600g, que ocorre a maioria dos casos de infecção. Ao que parece, alevinos e juvenis não costumam manifestar a doença, porém existe a possibilidade destes serem portadores assintomáticos e reservatórios por onde a bactéria é introduzida no sistema de produção (FIGUEIREDO et al., 2007a; FIGUEIREDO et al., 2009).

A doença causada por estreptococos é septicêmica, com proliferação bacteriana em diversos órgãos do animal acometido. Acredita-se que o encéfalo seja seu órgão de predileção, causando encefalite e como consequência é

observado nos peixes acometidos, natação errática, com rodopios e perda de equilíbrio. Outros sinais que podem ser observados são: anorexia; coloração escura do corpo; distensão abdominal; corpo levemente curvado; exoftalmia, opacidade de córnea, ou córnea hemorrágica; hemorragia difusa na pele, ao redor da boca, nas nadadeiras e opérculo; como também apresentar lesões cutâneas e musculares semelhantes a abscessos (KUBITZA, 2000; FIGUEIREDO et al., 2007a; FIGUEIREDO et al., 2009). Internamente podem ser observados: acúmulo de líquido sanguinolento na cavidade celomática; fluído intestinal sanguinolento; fígado pálido; e esplenomegalia (KUBITZA, 2000).

Bunch e Bejerano (1997) relataram que infecções causadas por *S. iniae* estão associadas às tilápias cultivadas em regiões com baixas temperaturas (15 a 16°C) enquanto *S. agalactiae* é a espécie comumente encontrada em regiões de clima quente, variando entre 26 e 28°C, estando associada a diferentes espécies de peixes de água doce, marinha e estuarina (EVANS et al., 2002).

Eldar et al. (1995), em Israel, observaram em peixes infectados por *S. difficile*, natação errática, diminuição no apetite, letargia, exoftalmia com hemorragia intraocular, opacidade de córnea e ascite. A natação em círculos, movimentos descoordenados e a rigidez dorsal indicam o comprometimento do sistema nervoso central (ELDAR et al., 1995).

No Brasil, Salvador et al. (2005) isolaram de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) cultivadas em tanque-rede e viveiros de terra, no estado Paraná, *Streptococcus spp.* não hemolítico do grupo B de Lancefield e Figueiredo et al. (2006), nos estados de Minas Gerais e Espírito Santo isolaram *S. agalactiae* de tilápias cultivadas em tanques-rede.

Salvador et al. (2005) observaram em propriedades de cultivo de tilápia em tanques-rede, uma alta morbidade e mortalidade por *S. agalactiae*, sendo os principais sinais clínicos, escurecimento da pele, letargia, natação errática e circular, diminuição de apetite, exoftalmia uni ou bilateral e distensão da cavidade visceral. As principais alterações macroscópicas encontradas por Salvador et al. (2003) foram lesões na pele, nadadeiras e brânquias, opacidade da córnea, líquido na cavidade visceral, hepato e esplenomegalia.

Pretto-Giordano et al (2010), no Brasil, a partir de uma cepa de *S. agalactiae* isolada de tilápias naturalmente infectadas, inoculou por via i.p (intraperitoneal), $1,0 \times 10^6$ UFC/peixe e $1,5 \times 10^8$ UFC/peixe e a mortalidade observada foi de 67,5 e 90,0%, respectivamente. No primeiro dia após a inoculação, ocorreu elevada taxa de mortalidade caracterizada por morte súbita, e os demais peixes estavam letárgicos no fundo do tanque, com alteração de coloração da pele e anorexia. A partir do segundo dia, ocorreu agravamento dos sinais clínicos como natação errática, exoftalmia uni e bilateral, opacidade de córnea e distensão da cavidade visceral.

A intensidade das lesões e sinais clínicos em tilápia depende de fatores relacionados à cepa de *S. agalactiae*, dose infectante, qualidade da água, temperatura, biomassa e manejo (CHANG; PLUMB, 1996).

O diagnóstico pode ser realizado pela associação dos sinais clínicos com os achados laboratoriais, porém, dependem, sobretudo, da viabilidade das bactérias nos tecidos, limitando a análise, além de demandarem tempo. Peixes doentes devem ser coletados e encaminhados vivos para os laboratórios de diagnóstico. No laboratório, o diagnóstico pode ser realizado por técnicas diretas,

através da análise de lâminas de tecido infectado sendo visualizados microscopicamente cocos Gram positivos; ou cultivos em meios seletivos ou por técnicas de biologia molecular, como PCR (FIGUEIREDO et al., 2007a; FIGUEIREDO et al., 2009).

A profilaxia e controle devem ser realizados através da manutenção adequada das condições ambientais e da boa nutrição nos peixes; realização de tratamentos táticos com antibióticos; descarte de animais mortos ou sintomáticos e realização com frequência de testes laboratoriais para certificar que a produção está isenta do agente bacteriano (KUBITZA, 2000; FIGUEIREDO et al., 2007).

2.5 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

2.5.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Essa reação é uma técnica para síntese “in vitro” de sequências específicas de DNA. As siglas PCR significam “Polimerase Chain Reaction”: reação em cadeia da polimerase. Desenvolvida originalmente por Kary Mullis na década de 80, pela qual foi agraciado com o Prêmio Nobel de Química em 1993, tem sido amplamente utilizada no campo da biologia molecular como PCR simples em suas diferentes variedades (multiplex PCR, PCR, RT-PCR, PCR-RFLP, PCR tempo real, etc.) (HOORFAR et al., 2004; HOFFMANN et al., 2009).

A técnica de PCR permite amplificar de maneira seletiva fragmentos de DNA, situados entre duas regiões cujas sequências são conhecidas. Estas duas regiões se utilizam de iniciadores na reação de síntese do DNA, que é catalisada pela enzima DNA polimerase (GIBELLO et al., 2001).

A vantagem da PCR sobre outros métodos de diagnóstico genético reside na sua simplicidade, rapidez, especificidade e sensibilidade (JOHNSON, 2000; GIBELLO et al., 2001).

Diferentes tipos de PCR têm sido extensivamente utilizados para a pesquisa e diagnóstico de infecções causadas por microrganismos (bactérias, fungos, protozoários), bem como para o estudo de doenças genéticas, análise forense, as relações filogenéticas entre espécies, estirpes resistentes à detecção de antibióticos, etc. E também a partir de diferentes amostras, tais como sangue, sêmen, culturas de bactérias, culturas de células, tecidos frescos, congelados ou embebido em parafina em medicina humana e veterinária (YANG & ROTHMAN, 2004).

Nas últimas duas décadas a PCR têm sido modificada para expandir a sua utilidade e versatilidade. Por exemplo, PCR múltipla permite a detecção simultânea de diferentes sequências de DNA por incorporação de diferentes conjuntos de iniciadores. A Nested PCR aumenta a sensibilidade e a especificidade do método em duas amplificações sucessivas, PCR-RFLP (polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição) que permite a amplificação dos genes de interesse e subsequente digestão com enzimas de restrição para gerar fragmentos de DNA de diferentes pesos moleculares, esta técnica é útil para a genotipagem de microrganismos e RT-PCR, que permite a conversão de RNA em uma cópia complementar do cDNA pela enzima transcriptase reversa, útil em identificação de vírus de RNA tais como HIV e hepatite C (HOORFAR et al., 2004; HOFFMANN et al., 2009).

O diagnóstico de infecções com base no PCR foram efetivamente desenvolvidos para uma grande variedade de microrganismos, devido à alta sensibilidade e especificidade e o baixo consumo de tempo. Em todo o mundo tem sido aplicada a identificação de gênero e espécies de microrganismos que não crescem *in vitro* ou requerem um longo tempo para crescer (YANG & ROTHMAN, 2004). No entanto, um número limitado de tentativas tem sido aprovado pela FDA (Food and Drug Administration) e aceitos na prática clínica (YANG & ROTHMAN, 2004).

Em medicina veterinária, é utilizado para o diagnóstico de doenças virais, bacterianas e parasitárias, principalmente em aves, bovinos e suínos (PULIDO et al., 2006; HOFFMANN et al., 2009).

Em medicina humana é um método de rotina para o diagnóstico e classificação de enfermidades hematolinfóides, bacterianas, fúngicas, parasitárias, virais e de enfermidades neoplásicas (WEISS, 1995; ESPY et al., 2006; HUTCHINS & GRABSCH, 2009; MENGOLI et al., 2009; OLSON et al., 2010).

2.5.2 Técnicas moleculares para diagnóstico e detecção de infecções bacterianas em peixes

As técnicas moleculares são cada vez mais utilizadas como meio de diagnóstico em aquicultura. A identificação, classificação e caracterização genética de muitos patógenos de peixes, incluindo agentes bacterianos, parasitas, fungos e vírus têm sido executadas por técnicas como a PCR, RFLPs, hibridização e sequenciamento (CUNNINGHAM, 2002; EAST, 2008). Muitas dessas técnicas foram

incorporadas a legislação de sanidade de peixes como uma ferramenta para controlar a disseminação de enfermidades. As técnicas baseadas em análise molecular possibilitam a detecção do patógeno diretamente, complementando ou até podendo substituir o cultivo microbiológico e os testes bioquímicos (CUNNINGHAM, 2002).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Implementação e otimização do diagnóstico molecular de *Streptococcus agalactiae*, por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), a partir de isolados, órgãos e tecidos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Amplificar e identificar molecularmente e especificamente, por PCR, amostras de DNA de *S. agalactiae* validando a reação com os iniciadores específicos, nas amostras de DNA obtidas de um banco de linhagens *S. agalactiae* isoladas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*);
- Diagnosticar a presença de *S. agalactiae* em órgãos e tecidos de tilápia do Nilo, infectadas experimentalmente, através da PCR;

4 ARTIGO: Detecção molecular de *Streptococcus agalactiae* em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

RESUMO

Doenças causadas por *Streptococcus ssp.* é um dos problemas sanitários mais importantes encontrados na aquicultura mundial. No Brasil e em outros países no mundo, *S. agalactiae* encontra-se como grande responsável por infecções que acometem tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e outros peixes de criação, causando grandes prejuízos à piscicultura. O diagnóstico utilizado atualmente para detecção e identificação dessa espécie se baseia nos sinais clínicos, no isolamento microbiológico, do agente etiológico, e testes bioquímicos. A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem a capacidade de identificar especificamente, com segurança e rapidez, *S. agalactiae* em amostras coletadas de peixes e vem sendo proposto para diagnóstico de diferentes doenças. Esse trabalho realizou a padronização da técnica para rápido diagnóstico da presença deste microrganismo em órgãos e tecidos de tilápia do Nilo. O DNA foi obtido de diversas fontes: banco de cepas com amostras de *S. agalactiae* isoladas de peixes de criação, órgãos como rim e encéfalo, oriundos de peixes infectados experimentalmente. Também foram utilizadas amostras de DNA contendo grupos de bactérias relacionadas para validar a especificidade da reação. As amostras foram avaliadas por PCR de um fragmento conservado do DNA ribossomal 16S de *S. agalactiae*. Os resultados dessa reação foram analisados através de eletroforese em gel de agarose observando a presença ou ausência do fragmento amplificado. Observou-se a amplificação do fragmento na linhagem usada como referência e identificada como *S. agalactiae* e ausência de amplificação nos demais grupos, demonstrando a especificidade de reação. As mesmas condições foram aplicadas às amostras de DNA do banco de cepas e dos órgãos contaminados por essa bactéria. A amplificação foi positiva para todos os isolados testados e órgãos oriundos dos peixes inoculados experimentalmente. Estes resultados poderão ser usados como subsídio para implementação do diagnóstico e monitoramento da doença em tilápia do Nilo.

Palavras-chaves: Piscicultura. DNA 16S. PCR.

ABSTRACT

Diseases caused by *Streptococcus ssp.* is one of the most important health problems encountered in aquaculture worldwide. In Brazil and other countries of the world, *S. agalactiae* is as largely responsible for infections that affect the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and other farmed fish, causing extensive damage to fish farming. Diagnosis currently used for detection and identification of this species is based on clinical, microbiological isolation of the etiologic agent, and biochemical tests. The technique of Polymerase Chain Reaction (PCR) has the ability to specifically identify, safely and quickly, *S. agalactiae* in samples of fish and has been proposed for diagnosis of different diseases. This work constitutes the standardized technique for rapid diagnosis of the presence of this bacteria in organs and tissues of Nile tilapia. DNA was obtained from several sources: collection samples with strains of *S. agalactiae* isolated from farmed fish, organs such as kidney and brain from experimentally infected fish. Samples were also used for DNA containing groups of related bacteria to validate the specificity of the reaction. The samples were evaluated by PCR from a fragment of the conserved 16S ribosomal DNA of *S. agalactiae*. The results were analyzed by agarose gel electrophoresis observing the presence or absence of the amplified fragment. We observed an amplification of the fragment used as reference strain identified as *S. agalactiae* and absence of amplification in the other groups, demonstrating the specificity of reaction. The same conditions were applied to samples of DNA collection strains and organs contaminated with this bacteria. The amplification was positive for all isolates tested and organs from fish inoculated. These results can be used as an aid to diagnosis implementation and monitoring of the disease in Nile tilapia.

Keywords: Pisciculture, 16S DNA, PCR

4.1. Introdução

O Brasil possui um grande potencial hídrico e condições favoráveis para a prática da aquicultura (ONO & KUBITZA, 1999). Nos últimos anos essa atividade tem crescido de forma significativa. Quando comparamos a produção do ano de 2004, onde foram produzidas 177.518 toneladas de peixes de água doce, com a de 2010 que produziu cerca de 394.340 toneladas, observa-se um aumento na produção desse ramo de atividade no país (FAO, 2009; BRASIL, 2010).

No Brasil uma das espécies de peixes mais cultivadas é a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Em 2004 foram produzidas 69.078 toneladas e em 2010 a produção dessa espécie representou aproximadamente 40%, cerca de 150.000 toneladas, de toda a produção obtida pela aquicultura do país (FAO, 2009; BRASIL, 2010).

Contudo o crescimento da produção aquícola tem acentuado problemas sanitários ligados ao sistema intensivo de cultivo (BONDAD-REANTASO et al., 2005). As características da produção de peixes nesse sistema, onde são utilizados tanques-rede, com alta densidade de estocagem, pode acarretar em problemas de manejo, causando diminuição da qualidade da água, distúrbios nutricionais, acúmulo de matéria orgânica no ambiente, proliferação de microrganismos patogênicos, entre outros (KUBTIZA, 2000). Tais condições de estresse ambiental alteram a homeostase dos peixes e os tornam suscetíveis ao ataque de organismos patogênicos que podem desencadear surtos de contaminação graves e mesmo dizimar criações inteiras em poucos dias (ONAKA, 2009; PAVANELLI et al., 2008).

Infecções de origem bacteriana são os responsáveis por causarem os maiores problemas relacionados a doenças na piscicultura e a estreptococose é a principal doença responsável por elevados prejuízos econômicos em diversos países com grande produção aquícola, inclusive o Brasil (SALVADOR et al., 2005; PARK et al., 2009).

Salvador et al. (2005) isolaram de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) cultivadas em tanque-rede e viveiros de terra, no estado Paraná, *Streptococcus spp.* não hemolítico do grupo B de Lancefield e observaram em propriedades de cultivo de tilápia em tanques-rede, uma alta morbidade e mortalidade por *S. agalactiae*. Os peixes acometidos por essa bactéria apresentaram sinais clínicos como: escurecimento da pele, letargia, natação errática e circular, diminuição de apetite, exoftalmia uni ou bilateral e distensão da cavidade visceral.

Para que a aquicultura se consolide como uma atividade de sucesso, cuidados com as condições sanitárias de cultivo são necessários. Uma das principais estratégias de controle das doenças bacterianas é o uso, muitas vezes indiscriminado, de antibióticos e produtos químicos, para controle dos agentes patogênicos, podendo causar contaminação e degradação do ambiente além de provocar a seleção de cepas bacterianas resistentes, podendo implicar em risco à saúde pública (SERRANO, 2005; SWAIN et al., 2002).

A avaliação e diagnóstico laboratorial se tornam ferramentas de extrema importância para indicação de tratamento adequado, em surtos de infecção por bacterioses, pois a utilização indiscriminada de algum produto pode causar impactos negativos, tanto no peixe como no meio ambiente (VARGAS, 2004).

O diagnóstico pode ser realizado pela associação dos sinais clínicos com os achados laboratoriais, identificação microbiológica e bioquímica, porém, dependem, sobretudo, da viabilidade das bactérias nos tecidos, limitando a análise, além de demandarem tempo (FIGUEIREDO et al., 2007, 2009). O objetivo desse trabalho foi propor a implementação de uma metodologia de diagnóstico molecular de *S. agalactiae*, visando contribuir para o manejo e controle sanitário da cadeia produtiva de tilápia.

4.2. Material e métodos

4.2.1. Material biológico

Foram analisadas 92 amostras do banco de cepas de *Streptococcus agalactiae* isoladas e identificadas de órgãos e tecidos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), disponível no Laboratório de Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas – Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Estadual de Londrina (Tabela 1).

Para obtenção de DNA do banco, as cepas foram semeadas em placas contendo no meio de cultura Ágar com 5% de sangue de carneiro desfibrinado e incubadas a 30°C por 48h.

4.2.2. Infecção experimental de *S. agalactiae* em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Foram utilizadas 20 tilápia do Nilo (*O. niloticus*) de peso médio de 50g, cedidas gentilmente pela Estação de Piscicultura do Departamento de Biologia Animal e Vegetal, da Universidade Estadual de Londrina.

Para realização do experimento os peixes foram separados em 2 grupos, com 10 animais cada, mantidos em caixas de fibra de vidro com capacidade para 500L, volume de água de 400L e taxa de renovação de 3L por minuto. As caixas foram abastecidas com água proveniente de poço semi-artesiano, com fluxo e aeração contínua. Os peixes foram alimentados com ração extrusada (FISHTM 30% de proteína bruta, Cooperativa Integrada), duas vezes ao dia. Nestas condições os peixes foram aclimatados por 10 dias, antes do início do experimento.

Foram utilizadas duas cepas do banco de cepas de *S. agalactiae* do Laboratório de Microbiologia Veterinária e Doenças Infeciosas – Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Estadual de Londrina, a cepas UEL - 12 e UEL - 71 para o preparo dos inóculos. Ambas foram isoladas de um surto com elevada morbidade e mortalidade de tilápias em estações de piscicultura de criação intensiva com tanques-rede na região Norte do Paraná.

Para o preparo dos inóculos, uma alíquota de cada cepa foi semeada em meio Tryptic Soy Broth – Difco Laboratories, Sparks, MD (TSB) e incubadas a 30°C por 48 horas. Culturas de ambas as cepas foram preparadas, padronizadas por espectrofotometria (Cintra 5) com comprimento de onda de 540nm e densidade óptica (OD) de 0,60 e contagem em placas (UFC/ml) com Tryptic Soy Agar – Difco Laboratories, Sparks, MD (TSA) para obter a contagem de células

dessas culturas. A partir dessas concentrações foram realizadas diluições decimais em TSB para obtenção das doses infectantes, confirmadas por contagem em placas de TSA.

Os peixes foram inoculados por via intraperitoneal (i.p.) com 0,1 ml de suspensão bacteriana na concentração de $1,5 \times 10^7$ UFC/ml para cada cepa. O grupo 1 utilizou como inóculo a *S. agalactiae* (UEL 12) e o grupo 2 a *S. agalactiae* (UEL 71).

Após a inoculação os peixes foram monitorados duas vezes ao dia por um período de 10 dias. Ao final do 10º dia os peixes foram levados ao Laboratório de Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas – DMVP - Universidade Estadual de Londrina para realização de necropsia e coleta de material para exames bacteriológicos e moleculares.

Foram coletadas assepticamente amostras de rim, encéfalo e sangue de cada peixe e semeados. Em placas de Ágar Columbia com 5% de sangue de carneiro desfibrinado, as amostras foram semeadas e incubadas a 30°C por 48h.

Rim, encéfalo e amostras de tecido de sangue foram coletados dos peixes infectados experimentalmente, armazenados em microtubos estéreis de 1,5 ml e estocados a -20°C para extração de DNA.

4.2.3. Extração de DNA e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para extração do DNA, colônias isoladas dos órgãos dos peixes inoculados experimentalmente e as colônias do banco de cepas foram transferidas para microtubos esterilizados de 1,5 ml onde foram adicionados 100 µL de tampão TE. Então submetido à fervura em banho-maria a 100°C por 10 minutos, seguido de centrifugação a 10.000 RPM, por 5 minutos. O DNA genômico contido no sobrenadante foi transferido para novo tubo e estocado a -20°C até a utilização (RICIETO et al., 2013).

As cepas do banco que não cresceram em placa foram submetidas à extração direta do seu DNA. Em 100 µL do estoque foi adicionado 100 µL de tampão TE e foi extraído o DNA pelo método de fervura.

Para extração do DNA das amostras biológicas dos peixes inoculados, foi utilizado o protocolo de extração de DNA com Lise enzimática por Proteinase K e fenol-clorofórmio – PK (adaptado de LEAL-KLEVEZAS et al., 1995), e estocado a -20°C até a realização do teste.

A amplificação por PCR ocorreu através da utilização dos iniciadores F1 e IMOD descritos por Martinez et al.(2001) que amplificam especificamente um fragmento de 220 pb, do gene 16S rRNA, de *S. agalactiae*.

A reação de PCR teve volume final de 20 µL contendo 2,0 µL de tampão (10x); 0,8 µL de MgCl₂ (50 mM); 0,4 µL da solução dos trifosfatos de desoxinucleotídeos (25 mM); 1,5 µL de cada iniciador (10 µM); 0,2 µL de Taq DNA polimerase (5u/ µL), 2,0 µL da amostra de DNA bacteriano e 11,6 µL de H₂O ultra pura. Cada reação foi submetida a 32 ciclos de amplificação no termociclador

(TECHNE – TC 512). O primeiro ciclo foi precedido de uma desnaturação inicial de 4 minutos, a 94°C. Cada ciclo de amplificação consistia em uma desnaturação a 94°C, durante 30s, pareamento dos iniciadores a 55°C, durante 30s, nos primeiros 10 ciclos e a 51°C, nos 22 ciclos restantes, e extensão a 72°C, por 30s. O último ciclo foi sucedido por uma extensão final por 4 minutos, a 72°C.

Para testar a especificidade da reação foi utilizada uma linhagem de referência *S. agalactiae* (ATCC 13813) como controle positivo em todas as reações de amplificação, uma cepa de *S. pyogenes* isolada de mastite ovina, uma cepa de *Mannheimia haemolytica* e uma cepa de *Bacillus thuringiensis*.

O produto de amplificação foi visualizado por eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com SyberSafe (Invitrogen) e registrado com câmera digital.

4.3. Resultados e discussão

Os resultados obtidos demonstrado na figura 1 indicam que os iniciadores F₁ e IMOD, demonstraram eficácia na identificação específica de *S. agalactiae* por PCR.

Martinez et al. (2001) também avaliaram a especificidade quando descreveram esses iniciadores para *S. agalactiae*. As amostras de DNA bacteriano foram submetidas à reação de amplificação por PCR com os iniciadores F₁ e IMOD. Obtiveram amplificação positiva apenas para a amostra com DNA de *S. agalactiae*, demonstrando a especificidade da técnica de PCR com a utilização desses iniciadores.



Figura 1. Gel de eletroforese apresentando os resultados da amplificação por PCR para avaliar a especificidade da reação com os iniciadores F₁ e IMOD. Onde (-) Branco e (+) *S. agalactiae* (ATCC 13813).

As amostras do banco de cepas de *Streptococcus agalactiae* foram, todas, submetidas à reação de amplificação por PCR específica. Foram avaliadas 92 amostras de DNA, e o resultado (tabela 2 e figura 2) mostrou que 89 amostras, previamente identificadas e descritas no banco como *S. agalactiae*, amplificaram o fragmento de tamanho esperado com cerca de 220 pb. Uma amostra de DNA, UEL-65, descritas no banco como *Streptococcus* do grupo C e outras 2 isoladas de mastite ovina, UEL-66 e UEL-67, não obtiveram amplificação do fragmento esperado. Esses resultados comprovam a eficácia da identificação molecular de *S. agalactiae*, através da PCR, pois quando comparados com a descrição de cada linhagem proveniente do banco, estes tem 100% de correlação. Portanto esses resultados validam a metodologia de diagnóstico molecular de *S. agalactiae* isoladas de tilápia do Nilo.

Tabela 2. Resultados da amplificação específica por PCR das amostras de DNA do Banco de Cepas.

Amostra	Resultado PCR	Amostra	Resultado PCR
01	(+)	35	(+)
03	(+)	35*	(+)
03*	(+)	36	(+)
04	(+)	37	(+)
06	(+)	38	(+)
06*	(+)	38*	(+)
07	(+)	39	(+)
07*	(+)	40	(+)
08	(+)	41	(+)
08*	(+)	42	(+)
09	(+)	43	(+)
09*	(+)	44	(+)
10*	(+)	44*	(+)
11	(+)	45	(+)
11*	(+)	46	(+)
12*	(+)	47	(+)
13*	(+)	47*	(+)
14	(+)	48	(+)
14*	(+)	50	(+)
15	(+)	51	(+)
15*	(+)	51*	(+)
16	(+)	52	(+)
16*	(+)	52*	(+)
17	(+)	54	(+)
18	(+)	54*	(+)
18*	(+)	55	(+)
19	(+)	56	(+)
19*	(+)	56*	(+)
20*	(+)	57	(+)
21*	(+)	57*	(+)
22	(+)	58	(+)
22*	(+)	58*	(+)
23	(+)	59	(+)
23*	(+)	59*	(+)
24	(+)	60	(+)
25	(+)	61	(+)
26	(+)	62	(+)
26*	(+)	63	(+)
28*	(+)	64	(+)
29	(+)	65	(-)
30	(+)	66	(-)
32*	(+)	67	(-)
33	(+)	68	(+)
33*	(+)	71	(+)
34	(+)	72	(+)
34*	(+)	73	(+)

Legenda: (*) Amostras de DNA extraído diretamente do estoque da cepa em meio BHI líquido.

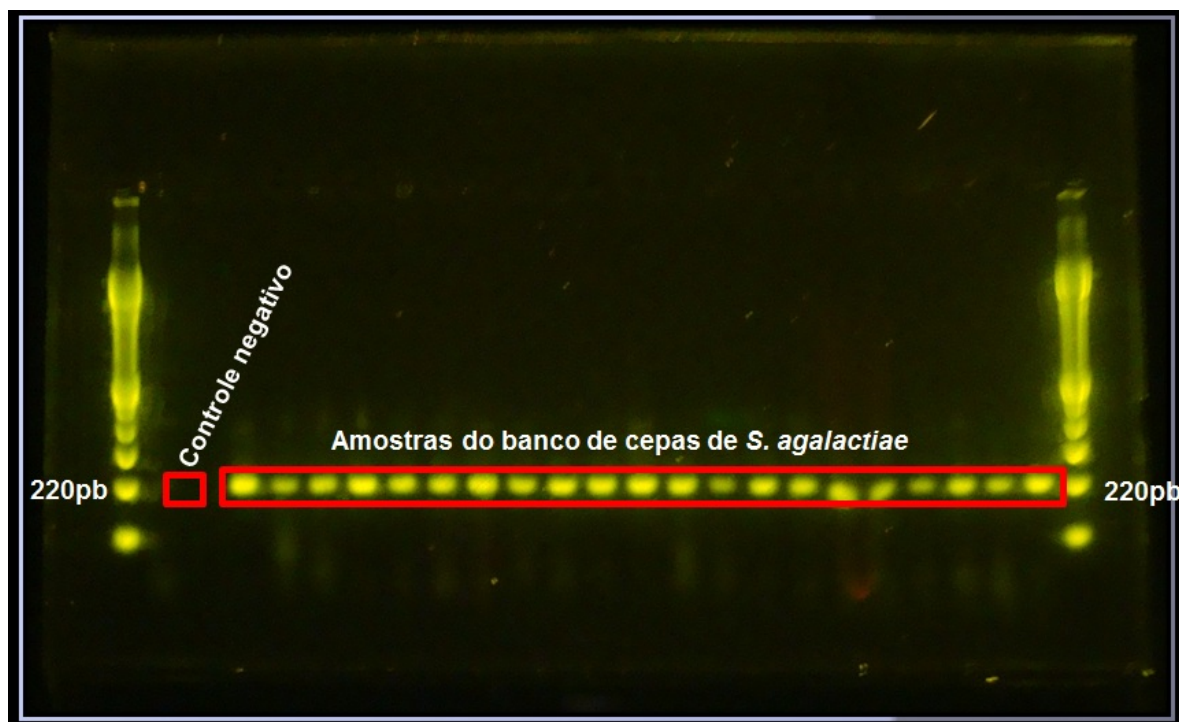


Figura 2. Gel de eletroforese representativo dos resultados da amplificação específica por PCR de amostras do Banco de Cepas.

Jafar et al. (2009) fizeram a identificação espécie-específica de *S. agalactiae*, por PCR, utilizando o mesmo conjunto de iniciadores, F₁ e IMOD. Os resultados obtidos também foram comparados com os resultados de isolamento e testes bioquímicos que foram similares, comprovando a robustez e confiabilidade da reação de PCR com esses iniciadores.

Para confirmar a confiabilidade da metodologia de diagnóstico molecular por PCR, de *S. agalactiae* que acomete tilápia do Nilo, as amostras coletadas dos peixes infectados experimentalmente foram submetidas à reação de PCR específica. Das 100 amostras de DNA extraídas, 59 diretamente dos órgãos dos peixes inoculados e 41 das colônias isoladas e identificadas, 100% apresentaram o fragmento esperado de 220 pb (tabela 3 figuras 3 e 4). Isso

comprovou a credibilidade da reação, pois as amostras de DNA obtidas do isolamento microbiológico e da extração de DNA direta dos órgãos e tecidos foram comparadas e ambas tiveram resultados iguais no diagnóstico molecular por PCR.

Tabela 3. Resultados da amplificação específica por PCR das amostras de DNA de *S. agalactiae* oriundas de peixes infectados experimentalmente.

Peixe	Cepa	Encéfalo	Rim	Sangue	Isolado Encéfalo	Isolado Rim	Isolado Sangue
1	12	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
2	12	(+)	(+)	(+)	*	(+)	(+)
3	12	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
4	12	(+)	(+)	*	(+)	*	(+)
5	12	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
6	12	(+)	(+)	(+)	(+)	*	(+)
7	12	(+)	(+)	(+)	*	*	*
8	12	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	*
9	12	(+)	(+)	(+)	*	*	*
10	12	(+)	(+)	(+)	*	*	*
1	71	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
2	71	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
3	71	(+)	(+)	(+)	(+)	*	(+)
4	71	(+)	(+)	(+)	(+)	*	(+)
5	71	(+)	(+)	(+)	*	(+)	(+)
6	71	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
7	71	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
8	71	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
9	71	(+)	(+)	(+)	(+)	*	*
10	71	(+)	(+)	(+)	(+)	*	(+)

Legenda: * - Amostra inexistente.

Leaño (2010) relata a confiabilidade e especificidade da amplificação espécie-específica por PCR em tecidos de tilápia para detecção e identificação de *S. agalactiae*. As amostras foram coletadas também de peixes infectados experimentalmente e passaram pelos mesmos processos de avaliação. O DNA foi obtido das bactérias isoladas dos tecidos e diretamente dos tecidos. Os resultados obtidos foram semelhantes aos do experimento desse trabalho, corroborando para a

consolidação dessa metodologia de diagnóstico molecular de *S. agalactiae* em peixes.

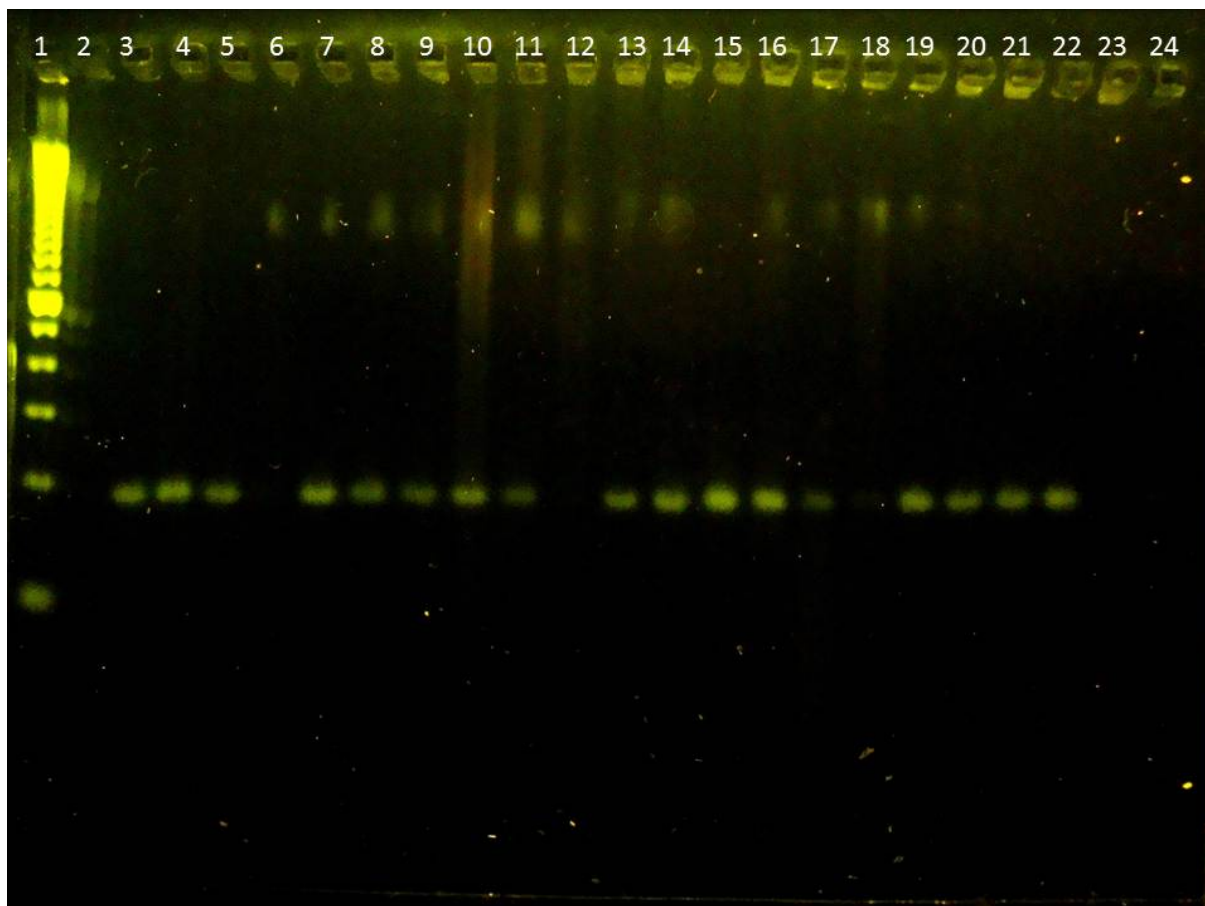


Figura 3. Gel de eletroforese representativo dos resultados da detecção de *S. agalactiae* em peixes infectados experimentalmente. Cepa 71. **Linha 1:** Marcador. **Linha 2:** branco. **Linha 3:** *S. agalactiae* (ATCC 13813). **Linha 4-6:** encéfalo, rim, sangue do peixe 1. **Linha 7-9** isolados encéfalo, rim e sangue do peixe 1. **Linha 10-12:** encéfalo, rim, sangue do peixe 2. **Linha 13-15:** isolados encéfalo, rim e sangue do peixe 2. **Linha 16-18** encéfalo, rim, sangue do peixe 6. **Linha 19-21:** isolados encéfalo, rim e sangue do peixe 6. **Linha 22:** controle positivo e **Linha 23 e 24:** controle negativo.

Monfared et al. (2011) também trabalharam com detecção e diagnóstico molecular de *S. agalactiae* em peixes. Os autores utilizaram trutas infectadas experimentalmente, e após extração de DNA do rim dos peixes utilizaram iniciadores específicos, que amplificam uma região de 254pb do gene *ScpB* de *S.*

agalactiae. Os autores obtiveram resultados positivos e similares aos resultados conseguidos neste trabalho.

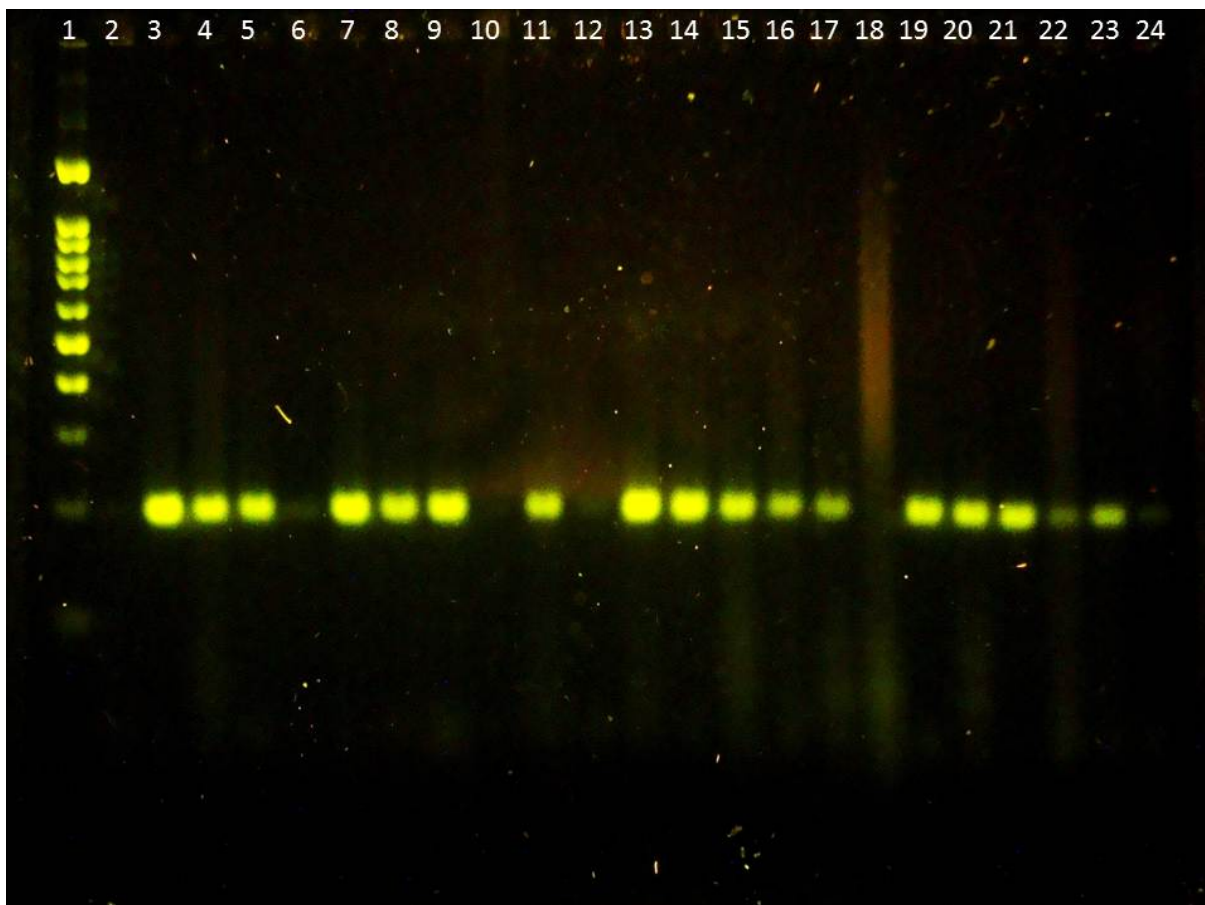


Figura 4. Gel de eletroforese representativo dos resultados da detecção de *S. agalactiae* em peixes infectados experimentalmente. Cepa 12. **Linha 1:** Marcador. **Linha 2:** branco. **Linha 3:** *S. agalactiae* (ATCC 13813). **Linha 4-6:** encéfalo, rim, sangue do peixe 1. **Linha 7-9** isolados encéfalo, rim e sangue do peixe 1. **Linha 10-12:** encéfalo, rim, sangue do peixe 3. **Linha 13-15:** isolados encéfalo, rim e sangue do peixe 3. **Linha 16-18** encéfalo, rim, sangue do peixe 5. **Linha 19-21:** isolados encéfalo, rim e sangue do peixe 5. **Linha 22-24:** encéfalo, rim, sangue do peixe 9.

Zhou et al. (2011) utilizaram do diagnóstico molecular por PCR para detectar e identificar especificamente *Streptococcus iniae*. Trabalhando com tilápias do Nilo infectadas experimentalmente, extraíram DNA de rim, encéfalo, fígado, baço e músculo dos peixes. Utilizando iniciadores que amplifica uma região de 377pb do espaço intergênico (ITS) 16S-23S do DNA ribossomal de *S. iniae*. No trabalho foram

feitas avaliações de especificidade da reação com os iniciadores, sensibilidade e confiabilidade do diagnóstico molecular por PCR. Os resultados obtidos foram positivos e confiáveis, comprovando que essa estratégia de diagnóstico para bacterioses em peixes é segura e eficaz.

Todos os resultados obtidos no trabalho juntamente com os dados relacionados da literatura contribuem para que o diagnóstico molecular por PCR específica de *S. agalactiae* se torne uma ferramenta de importante relevância para o estudo e controle dessa bactéria nos sistemas de cultivo intensivo de tilápia do Nilo.

4.4 Conclusão

O diagnóstico molecular por PCR foi capaz de discriminar amostras de *S. agalactiae* de outros organismos. Quando submetidas à identificação molecular, as amostras do banco de cepas tiveram o fragmento esperado amplificado para todas as amostras descritas como *S. agalactiae*, validando assim a metodologia de diagnóstico molecular por PCR. Todas as amostras de DNA dos órgãos dos peixes infectados experimentalmente foram diagnosticadas molecularmente e confirmadas pelo isolamento, testes bioquímicos e também pela PCR das culturas desses órgãos.

O diagnóstico molecular se mostrou uma ferramenta segura e de grande importância para realizar o monitoramento e estudos sobre *S. agalactiae* que acomete tilápia do Nilo nas estações de cultivo intensivo, podendo ser utilizada no monitoramento de surtos e auxiliar no manejo das atividades ligadas à piscicultura.

4.5 Anexos

Tabela 1. Banco de cepas de *Streptococcus agalactiae* isoladas de órgãos e tecidos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), disponível no Laboratório de Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas – Departamento de Medicina Veterinária Preventiva - Universidade Estadual de Londrina.

Amostra	Origem	Amostra	Origem
UEL-01	Encéfalo – norte Paraná	UEL-37	Pele - norte Paraná
UEL-03	Olho - norte Paraná	UEL-38	Rim – norte Paraná
UEL-04	Fígado - norte Paraná	UEL-39	Rim - norte Paraná
UEL-06	Encéfalo - norte Paraná	UEL-40	Encéfalo - norte Paraná
UEL-07	Encéfalo - norte Paraná	UEL-41	Líq. Visceral - norte Paraná
UEL-08	Encéfalo - norte Paraná	UEL-42	Sangue - norte Paraná
UEL-09	Rim - norte Paraná	UEL-43	Sangue - norte Paraná
UEL-10	Olho - norte Paraná	UEL-44	Sangue - norte Paraná
UEL-11	Encéfalo - norte Paraná	UEL-45	Encéfalo - oeste SP
UEL-12	Encéfalo – norte Paraná	UEL-46	Encéfalo - norte Paraná
UEL-13	Encéfalo – norte Paraná	UEL-47	Rim - norte Paraná
UEL-14	Encéfalo – norte Paraná	UEL-48	Coração - norte Paraná
UEL-15	Encéfalo – norte Paraná	UEL-50	Fígado - norte Paraná
UEL-16	Rim – norte Paraná	UEL-51	Fígado - norte Paraná
UEL-17	Encéfalo - norte Paraná	UEL-52	Encéfalo - norte Paraná
UEL-18	Rim - norte Paraná	UEL-54	Encéfalo - norte Paraná
UEL-19	Rim – norte Paraná	UEL-55	Olho - norte Paraná
UEL-20	Encéfalo – norte Paraná	UEL-56	Olho - norte Paraná
UEL-21	Encéfalo – norte Paraná	UEL-57	Fígado - norte Paraná
UEL-22	Encéfalo – norte Paraná	UEL-58	Rim - norte Paraná
UEL-23	Líquido visceral - norte Paraná	UEL-59	Encéfalo - norte Paraná
UEL-24	Fígado - norte Paraná	UEL-60	Olho - norte Paraná
UEL-25	Líquido visceral - norte Paraná	UEL-61	Rim - norte Paraná
UEL-26	Encéfalo – norte Paraná	UEL-62	Encéfalo - norte Paraná
UEL-28	Encéfalo – norte Paraná	UEL-63	Fígado - norte Paraná

UEL-29	Rim – norte Paraná	UEL-64	Encéfalo - norte Paraná
UEL-30	Fígado - norte Paraná	UEL-65	Grupo C - equino
UEL-32	Encéfalo – norte Paraná	UEL-66	Mastite ovina
UEL-33	Lesão de filé – oeste SP	UEL-67	Mastite ovina
UEL-34	Lesão de filé – oeste SP	UEL-68	Encéfalo - norte do Paraná
UEL-35	Pele - norte Paraná	UEL-71	Encéfalo - norte do Paraná
UEL-36	Pele - norte Paraná	UEL-72	Olho - oeste SP
		UEL-73	Rim - oeste SP

4.5.1 Protocolo de Extração de LEAL-KLEVEZAS et al., 1995 (adaptado por SOUZA, G. M. D.; SCARPASSA, J. A.)

(*) Ligar o banho-maria a 65°C e a centrífuga refrigerada a 4°C.

(*) Identificar tubos (tipo falcon) de 50 ml e microtubos de 2mL para cada amostra.

1. Transferir a amostra para um tubo (tipo falcon) de 50 ml;
2. Adicionar 1 ml de tampão TE ;
3. Macerar o material da amostra utilizando bastão de vidro;
4. Transferir o material para um microtubo de 2 ml
(*) adicionar mais 0,5 µL de TE no tubo (tipo falcon) homogeneizar e transferir para o microtubo de 2 ml.
5. Homogeneizar no vortex cada amostra por 10 segundos;
6. Centrifugar por 5 minutos a 13000 rpm;
7. Descartar o sobrenadante por inversão;
(*) repetir o processo (adicionar 1,5 ml de tampão TE, vortex e centrifugar por 5 minutos), se necessário, para tornar a amostra mais límpida.
8. Adicionar 15 µL de Proteinase K em cada amostra;
(*) Proteinase K do kit de extração da QUIAGEN
9. Adicionar 300 µL de **tampão de LISE** em cada amostra;
10. Homogeneizar no vortex por 10s cada amostra;
11. Deixar no banho-maria a 65°C de 2 a 3 horas;

12. Retirar o material do banho e adicionar 500 μL de Fenol;
13. Homogeneizar no vortex por 10s cada amostra;
14. Centrifugar por 5 minutos a 13000 rpm;
(*) identificar novos tubos de 1,5 ml para cada amostra.
15. Transferir 300 μL do sobrenadante para um novo tubo de 1,5 ml;
16. Adicionar 150 μL de Fenol + 150 μL de Clorofórmio em cada amostra;
17. Homogeneizar no vortex por 10s cada amostra;
18. Centrifugar por 5 minutos a 13000 rpm;
19. Transferir pelo menos 200 μL do sobrenadante para um novo tubo de 1,5 ml;
20. Adicionar 20 μL (ou 1/10 da quantidade do sobrenadante coletado) de Acetato de Sódio 3M em cada amostra;
21. Adicionar 200 μL de Etanol absoluto (álcool 100%) em cada amostra
(*) utilizar o álcool gelado, ajuda a otimizar a precipitação.
22. Homogeneizar por inversão;
23. Levar ao freezer e incubar à -20°C por pelo menos 4h ou overnight;
24. Centrifugar por 30 minutos a 13000 rpm;
(*) observar a formação do pellet.
25. Descartar o sobrenadante;
26. Adicionar 200 μL de álcool 70%;
27. Centrifugar por 30 minutos a 13000 rpm;
28. Descartar o sobrenadante;
29. Deixar secar a temperatura ambiente;
30. Adicionar 200 μL de TE em cada amostra;
31. Homogeneizar por inversão;
32. Armazenar no freezer à -20°C .

(*) Solução tampão de LISE

Para **500 μL** de solução final

- **10 μL de Pk 20 units/mg**
(*) não colocar na solução, pipetar separadamente 0,5 μL em cada amostra.
- 50 μL de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10 %;
- 05 μL Tris-HCl 1M;
- 25 μL EDTA 0,5 M;
- 10 μL NaCl 5M;
- 400 μL de água ultrapura.

Para **50 ml** de solução final

- 5 ml de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10 %;
- 0,5 ml Tris-HCl 1M;
- 2,5 ml EDTA 0,5 M;
- 1 ml NaCl 5M;
- 40 ml de água ultrapura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERCOVIER, H.; GHITTINO, C.; ELDAR A. Immunization with bacterial antigens: infections with *Streptococcus* and related organisms. **Fish Vaccinology**, v.90, p.153-160, 1997.
- BERRIDGE, B., BERCOVIER H.,FRELIER P. *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus difficile* 16S-23S intergenic rDNA: genetic homogeneity and species-specific PCR. **Vet. Microbiol**, v.78, p.1165-173, 2001
- BISHARAT, N. et al. Hyperinvasive neonatal group B *Streptococcus* has arisen from a bovine ancestor. **J. Clin Micorbiol**, v.42, n.5, p.2161-2167, 2004.
- BONDAD-REANTASO, M.G. et al. Disease and health management in Asian aquaculture. **Veterinary Parasitology**,v.132, p.249-272, 2005.
- BOSCARDIN, N. R. Produção Aquícola. In: OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R. & SOTO, D. (Org.). **Aquicultura no Brasil: o desafio é crescer**. Brasília, p. 27-72, 2008.
- BRACCINI, G. L. et al. Ectoparasitos de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) cultivados em tanques-rede nos rios do Corvo e Guairacá, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.17, p. 24-29, 2008.
- BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura**: Brasil 2008-2009. 2010. 99 p. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/mpa/seap/Jonathan/mpa3/docs/anu%E1rio%20da%20pesca%20completo2.pdf>> Acesso em: 20 dez. 2011.
- BUCHANAN, R.E.; GIBBONS, N.E. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**, 8ªed. The Willians and Wilkins Company, Baltimore, Maryland, 1974.
- BUNCH, E.C.; BEJERANO, I. The effect of environmental factors on the susceptibility of hybrid tilapia *Oreochromis niloticus* versus *Oreochromis aureus* to streptococcosis. **Israeli J. Aquacult.**, v.49, p.67-76, 1997.
- CARVALHO, L. N.; DEL-CLARO, K.; TAKEMOTO, R. M. Host-parasite interaction between branchiurans (Crustacea: Argulidae) and piranhas (Osteichthyes: Serrasalminae) in the Pantanal wetland of Brazil. **Environmental Biology of Fishes**, v. 67, p. 289-296, 2003.
- CASTAGNOLLI, N.; CYRINO, J.E.P. **Piscicultura nos trópicos**. São Paulo: Manole, 1986. 152p.
- CHANG, P.H.; PLUMB, J.A. Effects of salinity on *Streptococcus* infection of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Journal of Applied Aquaculture**, v.6, p.39-45, 1996.
- COWARD, K; BROMAGE N. R. Reproductive physiology of female tilapia broodstock. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.10, p. 1-25, 2000.
- CUNNINGHAM, C.O. Molecular diagnosis of fish and shellfish diseases: present status and potential use in disease control. **Aquaculture**, v.206, p.19-55, 2002.

DUARTE, R.S. et al. Phenotypic and molecular characteristics of *Streptococcus agalactiae* isolates recovered from milk of dairy cows in Brazil. **J. Clin. Microbiol**, v.42, p.4214-4222, 2004.

EAST, I.J. Addressing the problems of using the polymerase chain reaction technique as a stand-alone test for detecting pathogens in aquatic animals. **Rev. Sei. Teeh. Off. Int. Epiz**, v.27, p.829-837, 2008.

EDWARDS, M.S. et al. Capsular sialic acid prevents activation of alternative complement pathway by type III, group B Streptococci. **J. Immunol**, v.128, n.3, Mar, p.1278-1283, 1982.

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

ELDAR, A. et al. Experimental streptococcal meningo-encephalitis in cultured fish. **Veterinary Microbiology**, v. 43, p.33-40, 1995.

ELIOT, J.A.; FACKLAM, R.R.; RICHTER, C.B. Whole-cell protein patterns of nonhemolytic group B, type Ib, streptococci isolated from humans, mice, cattle, frogs and fish. **J. Clin Microbiol**, v.28, n.3, Mar, p.628-630, 1990.

ESPY M.J. et al. Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. **Clin. Microbiol**. v. 19, p. 165-256, 2006.

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

FAO (Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação). **El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura 2008**. Roma, 218 p., 2009.

FACKLAM, R. What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. **Clin Microbiol Rev**, v.15, n.4, Oct, p.613-630, 2002.

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

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

FIGUEIREDO, H. C. P.; NETTO, L. N.; LEAL, C. A. *Streptococcus iniae*: um grande vilão da aquicultura mundial identificado no Brasil. **Panorama da Aquicultura**, v. 19, n. 112, p. 26-29, Mar./ abr. 2009.

FITZSIMMOS, J.A.; FITZSIMMOS, M.J. **Administração de serviços**: operações, estratégias e tecnologia de informação. 2ª ed. Porto Alegre: Bookman, 2000.

FROESE, R.; PAULY, D. (Ed). FishBase. World Wide Web electronic publication. Version (12/2011). Disponível em: <www.fishbase.org> Acesso em: 15 de dez. 2011.

GARRITY, G.M. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2^a ed. 3v. The Williams and Wilkins Company, Baltimore, New York, 2008. Disponível em: <<http://www.bergeys.org/pubinfo.html>>. Acesso em: 05 ago. 2012.

GIBELLO, A. et al. Utilización de la PCR para el diagnóstico en ictiopatología. **Revista AquaTIC**, n. 15, Nov, 2001.

HAYRINEN, J.; PELKONEN, S.; FINNE, J. Structural similarity of the type-specific group B streptococcal polysaccharides and the carbohydrate units of tissue glycoproteins: evaluation of possible cross-reactivity. **Vaccine**, v.7, n.3, Jun, p.217-224, 1989.

HOFFMANN B. et al. A review of RT-PCR technologies used in veterinary virology and disease control: Sensitive and specific diagnosis of five livestock diseases notifiable to the World Organisation for Animal Health. **Vet. Microbiol**, v.139, p.1-23, 2009.

HOORFAR, J. et al. Practical Considerations in Design of Internal Amplification Controls for Diagnostic PCR Assays. **J. Clinical Microbiol**, v.42, p.1863-1868, 2004.

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

HUTCHINS, G.G.A.; GRABSCH H.I. Molecular Pathology the future? Review. **The royal colleges of surgeons of Edinburgh and Ireland**, Surgeon 7, v.6, p.366-77, 2009.

INGLIS, V., ROBERTS, R.J.; BROMAGE, N.R. Streptococcal Infections. **Bacterial Diseases of Fish**, New York: Halsted, 1993. p. 196-97.

JAFAR, Q.A. et al. Molecular investigation of *Streptococcus agalactiae* isolates from environmental samples and fish specimens during a massive fish kill in Kuwait Bay. **African Journal of Microbiology Research**, v.3, p.022-026, 2009.

JENNINGS, H.J.; LUGOWISK, C.; KASPER, D.L. Conformation aspects critical to immunospecificity of the type III group B streptococcal polysaccharide. **Biochemistry**, v.22, n.5, Mar 1, p.1258-1264, 1983.

JOHNSON, J.R. Development of polymerase chain reaction-based assays for bacterial gene detection. **J. of Microbiol. Methods**, v.41, p.201-209, 2000.

KAWAMURA, Y. et al. High genetic similarity of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus difficilis*: *S. difficilis* Eldar et al.. 1995 is a later synonym of *S. agalactiae* Lehmann and Neumann 1896 (Approved Lists 1980). **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, v.55, p.961-965, 2005.

KOGAN, G. et al. Structural elucidation of the novel type VII group B *Streptococcus* capsular polysaccharide by high resolution NMR spectroscopy. **Carbohydr Res**, v.227, n.1, Nov 7, p.1-9, 1995.

KOGAN, G. et al. Structural and immunochemical characterization of the type VIII group B *Streptococcus* capsular polysaccharide. **J. Biol Chem**, v.271, n.15, Apr 12, p.8786-8790, 1996.

KONEMAN, E.W. et al. **Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**. 6ªed. Lippincott: Williams and Wilkins, p.182, 2005.

KUBITZA, F. Principais parasitoses e doenças em tilápias. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 60, p. 39-53, julho/agosto, 2000.

KUBITZA, F.; KUBITZA, L. M. M. Principais parasitoses e doenças dos peixes cultivados. 4ª. ed. Jundiaí: F. Kubitza, p.118, 2004.

LAMMLER, C.; ABDULMANJOOD, A.; WEISS, R. Properties of serological group B streptococci of dog, cat, and monkey origin. **Zentralbl Veterinarmed B**, v.45, n.9, Nov, p.561-566, 1998.

LANCEFIELD, R.C. A serological differentiation of human and other groups of streptococci. **J. Exp. Med.**, v.59, p.441-458, 1933.

LANCEFIELD, R.C.; HARE, R. The serological differentiation of pathogenic and non-pathogenic streptococci from parturient women. **J. Exp. Med.**, v.61, p.335, 1935.

LEAÑO, A. P. J. Detecção de *Streptococcus agalactiae* por PCR em Tecidos de Tilápias rojas (*Oreochromis* spp.) menores de 20g. 2010. 101f. **Dissertação (Mestrado)** – Pós-graduação em Microbiologia, maestria interfacultades de microbiologia, grupo de investigación en patologia veterinária, Universidad Nacional de Colombia, Bogota.

LEONHARDT, J. H. Efeito da reversão sexual em tilápia do nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757). 1997. 141 f. **Tese (Doutorado em Aquicultura)** - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista – Campus de Jaboticabal, Jaboticabal, 1997.

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

LINDAHL, G.; STALHAMMAR, M.; ARESCHOUG, T. Surface Proteins of *Streptococcus agalactiae* and related proteins in other bacterial pathogens. **Clin. Microbiol**, v.18, p.102-127, 2005.

LIZAMA, M. A. P. et al. Relação parasito-hospedeiro em peixes de pisciculturas da região de Assis, Estado de São Paulo, Brasil. 1. *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757). **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 29, n. 2, p. 223-231, 2007.

LONGHI, E. Avaliação da eficácia de uma vacina autóctone de *Streptococcus agalactiae* inativado aplicada por banho de imersão em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). 2010. 50f. **Dissertação (Mestrado)** – Pós-graduação em Ciência Animal, Centro de Ciências agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR.

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

MARTINEZ, G.; HAREL. J.; GOTTSCHALK, M. Specific detection by PCR of *Streptococcus agalactiae* in milk. **Can. J. Vet.**, v.65, p.68-72, 2001.

MATTHIES, C. et al. Lactovum miscens gen. Nov., na aerotolerant, psychrotolerant, mixed-fermentative anaerobe from acidic forest soil. **Res Microbiol.** v. 155, n.10, Dec, p.847-854, 2004.

MENGOLI, C. et al. Use of PCR for diagnosis of invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis. **Lancet Infect Dis.**, v.9, p.89–96, 2009.

MIAN, G.F. et al. Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia. **Vet. Microbiol.**, v.136, p.180–183, 2009.

MONFARED, S.R. et al. PCR Assay for Experimental Detection of *Streptococcus agalactiae* based on ScpB Gene in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Journal of Fisheries International** **6**, v.4, p.75-79, 2011.

OLSON, A.B. et al. Development of real-time PCR assays for detection of the *Streptococcus milleri* Group from Cystic fibrosis clinical specimens using targets for *cpn60* and 16s rRNA genes. **J. Clin. Microbiol. JCM Accepts**, published online ahead of print on 17 February 2010.

ONAKA, E. M. Acompanhamento do estado parasitológico de peixes mantidos em tanques-rede e em ambiente natural nos reservatórios de Nova Avanhandava e Ilha Solteira (SP). In: Castellani, D. (Ed.) **I Workshop de Piscicultura do Noroeste Paulista** - 13 de março, Votuporanga, SP, Brasil, 2009.

ONO, E. A.; KUBITZA, F. Cultivo de peixes em tanques-rede. Jundiaí: Kubitza, p.68, 1999.

PARK, S.; FERNSTEN, P.D.; NAHM, M.H. Functional cross-reactivity within *Streptococcus pneumoniae* serogroup 6 elicited by pneumococcal conjugate and polysaccharide vaccines. **49th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother.**, San Francisco, CA, abstr. G1-1006, 2009.

PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C. & TAKEMOTO, R. M. Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento. 3ª ed. Maringá: Eduem, 2008. 311 p.

PEREIRA, U.P. et al. Genotyping of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from fish, human and cattle and their virulence potential in Nile tilapia. **Vet. Microbiol.**, v.140, p.186–192, 2010

PLUMB, J. A. Infections diseases of tilapia. In: COSTA-PIERCE, B. A.; RAKOCY, J. E. **Tilapia Aquaculture in the Americas**. Baton Rouge: World Aquaculture Society, v. 1, p. 212-218, 1997.

POPPERT, S. et al. Rapid identification of beta-hemolytic streptococci by fluorescence in situ hybridization (FISH). **Internat. J. of Medical Micro**, v.299, p.421–426, 2009

PRETTO-GIORDANO, L. G. et al. Evaluation on the Pathogenesis of *Streptococcus agalactiae* in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.53, p.87-92, 2010.

PULIDO A. et al. Estandarización y aplicación de la técnica PCR anidado para la detección de *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Rev. Med. Vet. Zoot.**, v.53, p.22-32, 2006.

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

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

SERRANO, P. H. Responsible use of antibiotics in aquiculture. In: Food and Agriculture Organization (FAO) **Fisher Technical Paper**, 469, Roma, p. 97, 2005.

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

SHOEMAKER, C. A., PHILLIP, K. & JOYCE, E. Diseases of tilapia with emphasis on economically important pathogens. 2000, Rio de Janeiro. In: **5th International Symposium on Tilapia Aquaculture**. Anais, Rio de Janeiro, p.565-572, 2000.

SWAIN, P. et al. Bath immunization of spawns, fries and fingerlings of Indian major carps using a particulate antigen and determination of age, dose and duration of antigen exposure. **Fish Shellfish Immunology**, v. 13, p. 133-140, 2002.

THATCHER, V. E.; BRITES NETO, J. Diagnóstico, prevenção e tratamento das enfermidades de peixes neotropicais de água doce. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v.16, n.3, p.111-128, 1994.

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

VANDAMME, P. et al. *Streptococcus difficile* is a nonhemolytic Group B, Type Ib *Streptococcus*. **International Journal Systematic of Bacteriology**, v.47, p.81-85, 1997.

VARGAS, L. Efeito da vitamina C, da vitamina E, do cloreto de sódio e da formalina na ocorrência de ectoparasitos em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). In: RANZANI-PAIVA, M. J. T.; TAKEMOTO, R. M. & LIMA, M. L. A. P. **Sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo: Liv. Varela, p.371-382, 2004.

VON HUNOLSTEIN, C. et al. Immunochemistry of capsular type polysaccharide and virulence properties of type IV *Streptococcus agalactiae*. **Infect Immun**, v.61, n.4, Apr, p.1272-1280, 1993.

WEISS, J.B. 1995. DNA Probes and PCR for Diagnosis of Parasitic Infections. **Clinical Microbiol**, v.8: p.113–130, 1995.

WESSELS, M.R. et al. Structure and immunochemistry of oligosaccharide repeating unit of the capsular polysaccharide of type III group B *Streptococcus*. A revised

structure of the type III group B streptococcal polysaccharide antigen. **J. Biol Chem**, v.262, n.17, Jun 15, p.8262-8267, 1987.

YANG, S.; ROTHMAN, R.E. Review: PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. **Lancet Infect Dis**, v.4, p.337–48, 2004.

ZHOU, S. M. et al. Rapid identification of *Streptococcus iniae* by specific PCR assay utilizing genetic markers in ITS rDNA. **Journal of Fish Diseases**, v. 34, p. 265-271, 2011.