



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

RAFFAELLA MENEGHETI MAINARDI

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UMA VACINA
BIVALENTE CONTRA DOIS SOROTIPOS DE *Streptococcus
agalactiae* EM TILÁPIAS DO NILO (*Oreochromis niloticus*)**

Londrina
2019

RAFFAELLA MENEGHETI MAINARDI

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UMA VACINA
BIVALENTE CONTRA DOIS SOROTIPOS DE *Streptococcus
agalactiae* EM TILÁPIAS DO NILO (*Oreochromis niloticus*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Ulisses de Pádua Pereira.

Londrina
2019

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

Mainardi, Raffaella Menegheti.

Desenvolvimento e validação de uma vacina bivalente contra dois sorotipos de *Streptococcus agalactiae* em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). / Raffaella Menegheti Mainardi. - Londrina, 2019.
53 f. : il.

Orientador: Ulisses de Pádua Pereira.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2019.
Inclui bibliografia.

1. Bacterioses - Tese. 2. Tilapia culture - Tese. 3. Streptococcosis - Tese. 4. Immunoprophylaxis - Tese. I. Pereira, Ulisses de Pádua. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

RAFFAELLA MENEGHETI MAINARDI

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UMA VACINA BIVALENTE
CONTRA DOIS SOROTIPOS DE *Streptococcus agalactiae* EM TILÁPIAS
DO NILO (*Oreochromis niloticus*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Ulisses de Pádua Pereira
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira Júnior
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. Luís Carlos Guimarães
Universidade Federal do Pará - UFPA

Londrina, 14 de fevereiro de 2019.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu grandioso Deus, Pai e fé.

Aos meus guias espirituais, luz e sabedoria.

A minha família, base, amor e afeto.

Aos meus amigos, motivação e persistência.

Ao meu orientador, dedicação e inspiração.

Aos colegas de trabalho, paciência e ensinamentos.

Ao Laboratório de Bacteriologia em Peixes da Universidade Estadual de Londrina, família.

Á todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

“Comovo-me em excesso, por natureza e por ofício.
Acho medonho alguém viver sem paixões”.

Graciliano Ramos

MAINARDI, Raffaella Menegheti. **Desenvolvimento e validação de uma vacina bivalente contra dois sorotipos de *Streptococcus agalactiae* em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2019. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

O Brasil apresenta potencial para o desenvolvimento da aquicultura, e tem sido impulsionado pela expansão dos cultivos de tilápia do Nilo em tanques-rede nos diversos reservatórios existentes no país. A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é a espécie mais cultivada nos reservatórios aquícolas brasileiros, devido a sua rusticidade, rápido crescimento, tolerância à baixa qualidade da água e considerável resistência às doenças. Entretanto, a bactéria *Streptococcus agalactiae* é responsável por elevadas taxas de mortalidade, prejudicando o crescimento e o desenvolvimento das tilapiculturas no país. Apesar de já existir uma vacina comercial disponível, sua proteção é conferida apenas contra o sorotipo Ib, não impedindo que as tilápias adquiram a doença quando expostas á outros sorotipos deste patógeno. Em 2017, o sorotipo III ocasionou mortalidade e grandes prejuízos em pisciculturas na região do nordeste brasileiro em decorrência da sua virulência, multirresistência e ausência de proteção vacinal. O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma vacina bivalente, utilizando duas cepas isoladas de *S. agalactiae*, sorotipos Ib e III (S13 e S73). Foram utilizadas 480 tilápias do Nilo de 30 gramas, distribuídas em 12 caixas de 150L, com 40 peixes por tratamento. O delineamento experimental constituiu-se em três grupos controles (negativo e positivos para cada sorotipo) e nove vacinados (grupos vacinados com vacina monovalente e desafiados com cepa homóloga e heteróloga e grupo de animais vacinados com a vacina bivalente e desafiados separadamente com as cepas de cada sorotipo e desafiados com as duas cepas concomitantemente). No dia 0, os peixes foram imunizados com 0,1 mL i.p das bacterinas (10^8 UFC/mL) e após 21 dias, foram desafiados (0.1 mL i.p) com dosagem de 7.6×10^9 UFC/peixe do patógeno). A eficácia das vacinas monovalentes foi observada nos grupos que foram desafiados com cepas homólogas aos das vacinas, demonstrando a ausência de proteção cruzada entre os sorotipos. Os grupos que receberam as vacinas bivalentes demonstraram maior proteção quando foram desafiados com as duas cepas (RPS = 96.16%). Não houve diferença significativa entre a vacina comercial quando os animais foram desafiados com o sorotipo Ib e a vacina produzida neste trabalho. O presente estudo demonstrou que a vacina de *S. agalactiae* bivalente, produzida com as cepas S13 e S73, apresentou elevada proteção e sua utilização no campo será uma ferramenta de grande importância na redução dos prejuízos causados pela estreptococose.

Palavras chaves: bacterioses; tilapicultura; estreptococose; imunoprofilaxia.

MAINARDI, Raffaella Menegheti. **Development and validation of a bivalent vaccine against two serotypes of *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)**. 2019. 53 p. Dissertation (Master's Degree in Animal Science) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

Brazil has demonstrated a great potential in aquaculture which is promoted due to the expansion of tilapia production all over the country. Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is the main species farmed in Brazil, mainly due to the rusticity, rapid growth, tolerance to water quality and considerable resistance to diseases. However, bacteria of the species *Streptococcus agalactiae* is a major threat to production inducing high levels of mortality in tilapia farms. Despite the availability of a commercial vaccine, protection levels only showed good results against *S. agalactiae* serotype Ib, which lead the occurrence of outbreaks in tilapia farms when affected by other serotypes that are circulating in the country. In 2017, a *S. agalactiae* serotype III caused high loss and mortality in tilapia farms in the Northeast region of Brazil due to its high virulence, multi resistance and lack of vaccine protection. The main goal of this study is to develop a bivalent vaccine using the serotypes Ib and III of *S. agalactiae* (strains S13 and S73). A total of 480 tilapias were allocated in 12 water tanks/groups with 40 fish in each. The arrangement of the experiment consisted of three control groups (negative and positive for each serotype) and nine vaccinated groups (groups vaccinated with monovalent vaccine and challenged with homologous and heterologous strain and group of animals vaccinated with the bivalent vaccine and challenged with the strains of each serotype separately and challenged with the two strains concomitantly). The vaccinated groups received a dose of the bacterin in day 0 with 0.1 mL i.p (10^8 UFC/mL), and after 21 days fish were administered with 0.1 mL i.p (7.6×10^9 UFC/fish of pathogen). The efficacy of monovalent vaccines was observed in the groups infected with homologous strains demonstrating the lack of cross-protection between the serotypes. Groups vaccinated with the bivalent inoculum demonstrated a better protection when challenged with the two different strains (RPS= 96.16%). No statistical significance of protection were observed between commercial vaccine and vaccine produced in this work when challenged with serotype Ib strain. These results demonstrate that the bivalent vaccine induces protection in fish challenged with streptococcosis caused by the serotype Ib and III and its use in the field would be of great importance to reduce losses caused by this disease.

Keywords: bacterioses; tilapia culture; streptococcosis; immunoprophylaxis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mortalidade cumulativa aos 23 dias após o desafio	44
Figura 2 – Taxa de mortalidade dos peixes de acordo com cada semana pós desafio experimental.	45
Figura 3 – Taxa de reisolamento bacteriano de peixes sobreviventes considerados portadores assintomáticos para <i>Streptococcus agalactiae</i>	46

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Grupos usados para avaliar a eficácia de uma vacina de *Streptococcus agalactiae* para dois sorotipos (Ib e III), em tilápias do Nilo (*O. niloticus*).....41
- Tabela 2** – Eficácia de uma vacina de *Streptococcus agalactiae* para dois sorotipos (Ib e III) em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em condições experimentais.....43

LISTA DE ABREVIATURAS

FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LABBEP	Laboratório de Bacteriologia em Peixes
MLST	<i>Multilocus sequence typing</i>
MSD	<i>Merck Sharp and Dohme</i>
NCBI	Centro Nacional de Informação Biotecnológica
PEIXE BR	Associação Brasileira da Piscicultura

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1	<i>STREPTOCOCCUS AGALACTIAE</i>	13
2.2	BACTERIOSES E TILÁPIA.....	14
2.3	EPIDEMIOLOGIA DA ESTREPTOCOLOSE	15
2.4	HISTÓRICO DAS LINHAGENS S13, S73	17
2.5	RELAÇÃO PATÓGENO HOSPEDEIRO	18
2.6	VACINAS BACTERIANAS.....	20
2.6.1	Histórico	20
2.6.2	Vacinas para Peixes	21
2.6.3	Vacina contra <i>Streptococcus agalactiae</i>	22
2.6.4	Vacinas Biotecnológicas	22
2.6.5	Adjuvantes.....	23
	REFERÊNCIAS	26
3	HIPÓTESE	35
4	OBJETIVOS	36
4.1	OBJETIVO GERAL	36
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
5	ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	37
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	53

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da piscicultura no Brasil tem sido impulsionado pela expansão dos cultivos de tilápia do Nilo em tanques-rede nos diversos reservatórios existentes (FAO, 2018). Nesse âmbito, a tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* é a principal espécie cultivada no país, com uma produção de 239,09 mil toneladas, representando quase metade (47,1%) do total da piscicultura no Brasil (IBGE, 2017). É uma espécie que se caracteriza pela sua rusticidade, rápido crescimento, tolerância à baixa qualidade da água e considerável resistência às doenças (LITTLE et al., 2008).

Fatores predisponentes que levam à uma condição de estresse nos peixes, como por exemplo, temperaturas abaixo de 28°C, elevada densidade animal pela utilização de sistemas intensivos e falhas em medidas sanitárias preventivas (quarentena, aquisição de alevinos de produtores livres de doenças, vacinação, dentre outras) estão relacionadas ao surgimento de doenças virais, parasitárias e, de forma destacada, as bacterianas (FIGUEIREDO et al., 2006; MIAN et al., 2009; CHIDEROLI et al., 2017).

Dentre as bacterioses encontradas em tilápias, destacam-se as principais espécies ou gêneros de patógenos bacterianos relacionados às enfermidades em peixes no Brasil: *Streptococcus agalactiae*, *S. iniae*, *S. dysgalactiae*, *Flavobacterium columnare* e *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* (LEAL; TAVARES; FIGUEIREDO et al., 2014; MIAN et al., 2009; NETTO; LEAL; FIGUEIREDO, 2011). A bactéria *S. agalactiae* surgiu como um dos principais agentes etiológicos que causa septicemia e meningoencefalite em plantéis do mundo inteiro (EVANS et al., 2002). Dados da literatura reportam a ocorrência de surtos causados pela bactéria em tilapiculturas em mais de 10 estados Brasileiros (FIGUEIREDO et al., 2006; MIAN et al., 2009; PEREIRA et al., 2010; SALVADOR et al., 2003; MAINARDI et al., 2016). Casos de infecção por essa bactéria ocasionam altas taxas de mortalidade, que podem atingir até 90% do plantel (ELDAR et al., 1995; EVANS et al., 2002; MIAN et al., 2009).

A maioria das linhagens de *S. agalactiae* GBS (*Streptococcus* grupo B de Lancefield – GBS) podem ser classificados em 10 sorotipos de acordo com as características fenotípicas de cápsula (Ia, Ib, II, III a IX) (SLOTVED et al., 2007). Embora, o sorotipo Ib seja o mais comumente associado a surtos de estreptococose em tilápias no Brasil, o sorotipo Ia e alguns isolados não-sorotipáveis podem ser encontrados no país (GODOY et al., 2013). No ano de 2017, foi descrito um surto com elevada mortalidade na região nordeste do Brasil

causado pelo sorotipo III, em tilápias previamente vacinadas, alertando os produtores ao novo sorotipo circulante nos plantéis (CHIDEROLI et al., 2017).

O *S. agalactiae* é um dos patógenos que mais causa prejuízos na tilapicultura nacional nas pisciculturas do país e apresenta resistência á alguns antimicrobianos (FIGUEIREDO et al., 2006). Desta forma, o uso de vacinas na aquicultura é uma alternativa eficaz ás boas práticas de manejo a fim de diminuir os efeitos negativos do uso de fármacos e conseqüentemente, a presença de resíduos de medicamentos em produtos animais (um risco à saúde humana), melhorando assim a saúde (animal e humana), o bem-estar dos animais, a cadeia alimentar humana e o crescimento da produção de maneira econômica (MEEUSEN et al., 2007; RINGØ; ERIK; INGVILL, 2014).

Visto que ainda não há uma vacina que proteja contra um novo sorotipo circulante no país, (o sorotipo III), objetivou-se neste trabalho desenvolver e avaliar a eficácia *in vivo* de uma bacterina produzida com dois sorotipos associados para *S. agalactiae*, Ib e III.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE*

A bactéria *Streptococcus agalactiae* também denominada *Streptococcus* grupo B de Lancefield – GBS apresenta morfologia cocos Gram positivo, dispostos em cadeias ou aos pares e é comensal da flora bacteriana em seres humanos (EL BEITUNE; DUARTE; MAFFEI, 2005). São fermentadoras de hidratos de carbono, catalase negativa, imóveis, apresentam um padrão de β -hemólise e por definição, todos os GBS possuem um antígeno (polissacarídeo capsular) do grupo B associado à parede celular como já descrito por Lancefield em 1933. A imunidade protetora à infecção pelo GBS pode ser desencadeada pela cápsula polissacarídica e também por diferentes proteínas de superfície (LANCEFIELD et al., 1975).

As cepas tipo Ia, Ib e II expressam as proteínas α e β , sendo a α mais frequente e as cepas do tipo III expressam a proteína Rib. Embora as proteínas α e Rib apresentem ampla identidade, elas não reagem de forma cruzada imunologicamente (STÅLHAMMAR-CARLEMALM; STENBERG; LINDAHL, 1993). Em 2002, 68 anos depois que Lancefield publicou seu trabalho (LANCEFIELD, 1933), os genomas do sorotipo III - GBS (GLASER et al., 2002) e do sorotipo V- GBS (TETTELIN et al., 2002) foram sequenciados favorecendo uma maior caracterização de fatores de virulência previamente conhecidos do GBS ampliando os conhecimentos da patogênese desta bactéria (BURNHAM; TYRRELL, 2003).

A maioria dos GBS podem ser classificados em 10 sorotipos de acordo com as características fenotípicas de cápsula (Ia, Ib, II, III a IX) e até 9% de isolados invasivos não são sorotipáveis (SLOTVED et al., 2007). Os sorotipos Ia e III são os sorotipos mais frequentes de *S. agalactiae* patogênicos transmitidos por humanos, vacas e tilápias (LI et al., 2013; DOGAN et al., 2005). E os sorotipos Ia e Ib são os mais encontrados em frutos do mar (VAN DER MEE-MARQUET et al., 2009). Entretanto, surtos em todo o mundo demonstraram que os sorotipos Ia, Ib e III são os mais comuns isolados de tilápias infectadas (CHIDEROLI et al., 2017; EVANS; KLESIUS; SHOEMAKER, 2004; SUANYUK et al., 2008).

2.2 BACTERIOSES E TILÁPIA

A Tilápia (*Oreochromis* spp.) é a espécie mais difundida e cultivada na aquicultura mundial com potencial aumento na produção, atingindo 400.280 toneladas em 2018, com crescimento de 11,9% em relação ao ano anterior (PEIXE BR, 2019). O termo tilápia refere-se a uma série de espécies da Família *Cichlidae*; no entanto, a espécie mais comum é a Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (FAO, 2018). Entretanto, apesar de sua resistência em condições de estresse pode ser suscetível á infecções causadas por bactérias oportunistas como as pertencentes aos gêneros *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Flexibacter*, *Edwardsiella* e *Aeromonas* (PLUMB, 1999), o que pode levar á perdas consideráveis nas tilapiculturas. Desta forma, devido ao cultivo intensivo em sistemas tanque rede (alta densidade e criação intensiva), a ocorrência de surtos de doenças infecciosas foi caracterizada como um dos principais impedimentos para o completo desenvolvimento de cultura de tilápia no Brasil (MIAN et al., 2009).

Os fatores de virulência da bactéria estão relacionados com a invasão, replicação e evasão do sistema imune dos hospedeiros, além de provocarem lesões durante a patogênese da doença (VILCHES et al., 2004). Leucócitos (monócitos, neutrófilos, basófilos) desempenham um papel importante na defesa imunológica inespecífica do sistema inato do peixe (MISRA et al., 2006) e a redução de monócitos é comum em processos inflamatórios (SILVA et al., 2012). Além de produzirem citocinas, os monócitos, são células primárias na apresentação de antígenos em teleósteos, como a tilápia do Nilo, e têm funções de célula de defesa no sangue periférico (DALMO; BOGWALD, 2008).

Embora, as patogêneses das infecções da maioria dos patógenos em tilápias ainda não estejam totalmente descritas, compreende-se que uma vez que a bactéria penetre nas barreiras celulares para alcançar a corrente sanguínea ou os tecidos, uma resposta imunológica é desencadeada pelo o organismo do hospedeiro e as células fagocíticas, incluindo os neutrófilos e macrófagos, partem para combater esta resposta. (DORAN; NIZET, 2004). Adicionalmente, a bactéria pode permanecer viável no hospedeiro como um organismo comensal por longos períodos e estabelecer uma infecção em indivíduos suscetíveis, sugerindo que a bactéria possa ser capaz de “enganar” o sistema imunológico do hospedeiro (CUMLEY et al., 2012).

A bactéria *S. agalactiae* pode sobreviver dentro das células do hospedeiro, por exemplo, em macrófagos e, quando isso ocorre resulta em uma proteção do microrganismo de moléculas antimicrobianas ativas no sangue, possibilitando que ele avance

para o cérebro dos peixes e estabeleça uma infecção crônica como a meningoencefalite (ELDAR et al., 1995; IREGUI et al., 2016). Em contrapartida, a resposta imune humoral demora aproximadamente uma semana para iniciar sua ação, neste período o patógeno pode alcançar o SNC (Sistema Nervoso Central) do hospedeiro, dificultando a ação de anticorpos. Além disso, a resposta humoral primária e secundária dos peixes tem a imunoglobulina IgM como fundamental anticorpo, não produzindo anticorpos da classe IgG (WATTS; MUNDAY; BURKE, 2001).

Outros fatores ligados ao manejo inadequado deprimem a resposta imunológica das tilápias, e ajudam a intensificar o contato entre os animais o que contribui para a maior ocorrência de enfermidades e morte em sistemas intensivos de tilapiculturas. Fatores como a inadequada nutrição (rações com baixas taxas de proteína), pouca renovação de água (como consequência elevados níveis de amônia), alta densidade animal, ocasionam exaustão nos plantéis (PASNIK et al., 2005).

Notadamente, parâmetros hematológicos são importantes indicadores de saúde dos peixes (DE PEDRO et al., 2005; MARTINS et al., 2008), e mudanças na proporção de células sanguíneas podem ser indicativo de uma doença ou exposição a produtos químicos (DE PEDRO et al., 2005).

2.3 EPIDEMIOLOGIA DA ESTREPTOCOLOSE

A estreptococose é uma doença emergente que afeta mais de 45 espécies de peixes tanto de água doce como de água salgada em aquiculturas na África, Austrália e Europa. Além disso, 12 países do continente americano já tiveram a doença notificada em tilapiculturas existentes (CONROY, 2009). A distribuição dos sorotipos podem variar de acordo com região geográfica, o perfil da população estudada e a fonte da bactéria isolada (DOGAN et al., 2005). Os sorotipos Ia, II, III e V são os mais comumente isolados nos Estados Unidos e em alguns países europeus (DOGAN et al., 2005; GHERARDI et al., 2007). Já os sorotipos VI a IX raramente são descritos no mundo (EKELUND et al., 2003; SLOTVED et al., 2007). Nesse âmbito, o *S. agalactiae* - GBS vem causando surtos com alta morbidade e mortalidade em peixes selvagens, (EVANS; KLESIUS; SHOEMAKER, 2004; JAFAR et al., 2008) na garoupa gigante de Queensland e em algumas espécies de peixes selvagens na Austrália (BOWATER et al., 2012).

Estudos realizados em tilápias vermelhas (*Oreochromis* sp.) e tilápias do Nilo (*O. niloticus*) cultivadas na Tailândia, foram relatados a ocorrência de genótipos raros de

S. agalactiae relacionando-os com isolados de humanos, peixes e outros GBS zoonóticos. Entretanto, ao final do estudo concluíram que as tilápias infectadas pertenciam aos sorotipos Ia e III. E os diferentes sorotipos identificados indicaram que os surtos de GBS em todo o país não tinham relação, sugerindo que os isolados poderiam ter se originado de diferentes fontes. Além disso, descreveram que os efeitos dos fatores ambientais e a imunização contra a estreptococose, causada por diferentes sorotipos, estariam relacionados à virulência da bactéria (SUANYUK et al., 2008).

Pereira et al. (2010), em um trabalho inédito com caracterização de cepas de *S. agalactiae* isoladas de peixes, bovinos leiteiros e humanos, demonstraram que as cepas analisadas dos três hospedeiros naturais não apresentavam parentesco genético, embora algumas cepas de bovinos e humanos tenham sido capazes de infectar os peixes e causar sinais de meningoencefalite. Assim, sugeriram que a ligação genética não é um pré-requisito para que *S. agalactiae* atravesse a barreira interespecie de diferentes hospedeiros. Chen et al. (2015), em um estudo semelhante ao de Pereira et al. (2010), investigou a patogenicidade de isolados de GBS (sorotipos Ia, III e V) de humano, vaca e tilápia e a relação evolutiva entre estas cepas vindo de diferentes fontes. Ao final, confirmaram que as cepas de GBS com os sorotipos Ia, III e V de humanos e vacas poderiam infectar tilápias e induzir sinais clínicos sob condições experimentais.

Em 2016 no Peru, foi relatado o primeiro isolamento de *S. agalactiae* diagnosticado por PCR em tempo real em criadouros de tilápias apresentando características das principais alterações histopatológicas causadas por essa bactéria nos tecidos (ORTEGA ASENCIOS et al., 2016). No mesmo ano, Areechon et al. (2016) demonstraram que os isolados de tilápias, em pisciculturas na Tailândia, infectadas com sorotipo III apresentava uma maior virulência quando comparado ao sorotipo Ia. Adicionalmente, estudos referentes ao sorotipo III de *S. agalactiae* isolados de peixes sugerem um elevado potencial zoonótico para seres humanos (inclusive adultos saudáveis que consumiram peixe cru) (IP et al., 2016; MARGARET et al., 2006; TAN et al., 2016).

No Brasil, a bactéria *S. agalactiae* foi isolada de tilápias pela primeira vez no Norte do Estado do Paraná (SALVADOR et al., 2003). Em 2006, a bactéria foi relatada pela primeira vez em casos de surtos de meningoencefalite em tilápias do Nilo em dois estados brasileiros, Minas Gerais e Espírito Santo (FIGUEIREDO et al., 2006). Em contrapartida, a ocorrência de sorotipos Ia, Ib, II, III, IV e V foi descrito em poucos estudos realizados com isolados de humanos originados das regiões Sul e Sudeste (BENCHETRIT et al., 1982, PINTO et al., 2013).

2.4 HISTÓRICO DAS LINHAGENS S13, S73

A linhagem S13 foi isolada, pelo Laboratório de Bacteriologia em Peixes (LABBEP) da Universidade Estadual de Londrina, de um esfregaço ocular em abril de 2015 a partir de um surto que ocorreu em uma fazenda de tilápia no norte do estado do Paraná. Em estudos realizados pela equipe LABBEP, o genoma completo dessa cepa foi sequenciado e depositado no NCBI GenBank, classificando-a como sequência tipo 552 (ST-552) pela análise Multilocus (MLST) (FACIMOTO et al., 2017). Desta forma, o genoma completo da linhagem S13 contribuiu para a dinâmica epidemiológica e a patogenicidade desse agente.

Por outro lado, a linhagem S73 foi isolada e descrita pela primeira vez no país (CHIDEROLI et al., 2017), pelo LABBEP, de amostras do rim, cérebro e baço, entre agosto e dezembro de 2016 a partir de surtos que ocorreram em seis fazendas de tilápia do Nilo no nordeste do Brasil. Neste mesmo estudo, Chideroli et al. (2017) demonstraram através de testes de susceptibilidade a agentes antimicrobianos que a cepa era multirresistente e altamente virulenta em ensaios *in vivo* em juvenis de tilápia. Além disso, o surgimento dessa nova cepa circulante sugeriu que poderia ter ocorrido falhas nas barreiras sanitárias dos plantéis, já que os peixes eram vacinados ou, uma infecção devido a contaminação ambiental com o patógeno deste sorotipo oriundo de outros hospedeiros.

2.5 RELAÇÃO PATÓGENO HOSPEDEIRO

A cápsula polissacarídica é um importante fator de virulência na patogênese da estreptococose, pois, permite que a bactéria fuja dos mecanismos inatos de defesa do hospedeiro. Além disso, a perda da expressão da cápsula resulta na perda da sua virulência. Este fato foi comprovado em um trabalho realizado em 1987 por Rubens e colaboradores através de um modelo experimental com ratos neonatais, onde foi demonstrado que uma única mutação específica na expressão da cápsula resultava em um GBS mutante avirulento. Assim, evidenciaram o papel da cápsula tipo III como principal fator de virulência para o sorotipo III GBS (RUBENS et al., 1987).

Segundo Nizet (2002) outro fator de virulência da bactéria *S. agalactiae* GBS são as β -hemolisinas ou seja, citotoxinas que apresentam um importante papel na lesão tecidual e disseminação sistêmica da doença e está associado á graves infecções humanas. Leucócitos humanos, células epiteliais e endoteliais respondem de forma variável á essas β -

hemolisinas, com liberação de pró-inflamatórios e / ou fatores de defesa quimiotática, como IL-8 e peptídeos antimicrobianos. E, a capacidade de detectar e responder á liberação das toxinas é possivelmente adaptativa e serve para orientar a resposta imune inata do hospedeiro a conter o organismo na superfície epitelial da mucosa.

Em 2015, Evans e seus colaboradores realizaram um estudo transversal com tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) para verificar se havia diferenças patogênicas entre cepas de *S. agalactiae* isolados de várias regiões geográficas (USA, Brasil, Honduras, Israel e Kuwait) em diferentes concentrações. Ao final do estudo, concluíram que os isolados das Américas (EUA, Brasil e Honduras) foram mais virulentos do que os isolados do Oriente Médio e Ásia (Israel e Kuwait). Além disso, destacaram possíveis indicadores de aumento da virulência, ou seja, a origem geográfica, a origem das espécies de peixes, a atividade hemolítica, a tipagem genética e a atividade CAMP (EVANS; PASNIK; KLESIUS, 2015).

A bactéria *S. agalactiae* possui a capacidade de desenvolver biofilme no meio ambiente, ou seja, agregados de bactérias ligadas. Este fator está associado á sua persistência no ambiente, ocorrência de recidivas pós tratamento e posterior desenvolvimento de meningoencefalite crônica em peixes (ISIAKU et al., 2017). E no estudo de Chideroli et al. (2017) foi demonstrado que o sorotipo III (linhagem S73) apresenta um maior potencial para a produção de biofilme quando comparado ao sorotipo Ib (linhagem S13).

Além disso, outro fator que tem influência na persistência da bactéria no ambiente é a água. Em um estudo realizado na Tailândia, mostrou que as tilápias do Nilo criadas em altas temperaturas era suscetível à estreptococose associada à transmissão do sorotipo Ia de *S. agalactiae* pela água. Deste modo, para países tropicais como a Tailândia, a suscetibilidade à infecção devido à altas temperaturas pode ser expressivamente importante, especialmente em períodos de verão. Portanto, o estudo da relação entre peixes, *S. agalactiae* e condições ambientais, deve ser levado em conta (RODKHUM; KAYANSAMRUJ; PIRARAT, 2011).

Diferentes isolados de *Streptococcus* variam em sua virulência de acordo com o hospedeiro tilápia do Nilo, mas essas variações são influenciadas não só pela temperatura, mas também pela salinidade da água na qual eles são mantidos. Além disso, a lesão no epitélio, a estirpe e a dose infectante são importantes fatores que contribuem para a suscetibilidade da doença (CHANG; PLUMB, 1996).

Sob condições naturais a transmissão da estreptococose ocorre pela via horizontal, ou seja, contato direto entre os peixes sadios com os doentes e alimentos

contaminados ou, contato indireto pela contaminação da água nos sistemas de criação (AGNEW; BARNES, 2007; BOWATER et al., 2012).

Além disso, estudos realizados com larvas e juvenis de tilápias sugeriram pouca ou nenhuma transmissão vertical da doença (HERNÁNDEZ; FIGUEROA; IREGUI, 2009; JIMÉNEZ et al., 2011). No entanto, trabalhos recentes avaliaram uma possível transmissão vertical da estreptococose e o padrão de tropismo tecidual desta bactéria através dos testículos e ovários dos reprodutores em tilápias vermelhas (*Oreochromis spp.*). E, embora todos os reprodutores fossem assintomáticos, as bactérias estavam presentes em quase todos os órgãos. Logo, confirmaram que tanto *S. agalactiae* como o *S. iniae* podem ser transmitidos verticalmente (PRADEEP et al., 2016).

Os sinais clínicos característicos da estreptococose consistem em ascite, letargia, anorexia, exoftalmia, opacidade de córnea uni e bi lateral, natação errática, enegrecimento de pele e relativa mortalidade. Além disso, na autópsia, os achados patológicos revelam ascite, meningite, hepato e esplenomegalia (FIGUEIREDO et al., 2006; SALVADOR et al., 2003).

Os sinais da doença não são patognomônicos, porém, a natação errática pode ser um indicador alarmante e de triagem para o diagnóstico da doença. No entanto, a primeira etapa é o isolamento da bactéria dos órgãos cérebro, rim cranial e baço. E, com a ocorrência de cocos Gram-positivos realiza-se a prova da catalase, teste CAMP e posteriores testes sorológicos e moleculares confirmatórios (EVANS et al., 2002). Ressalta-se que o teste de CAMP para o sorotipo Ib de *S. agalactiae* isolado de hospedeiro heterotérmico é CAMP negativo (EVANS; PASNIK; KLESIUS, 2015).

A tipagem gênica capsular pela aglutinação do látex é também um método de diagnóstico com base em anticorpos policlonais específicos para as 10 cápsulas reconhecidas Ia, Ib e II, III a IX (AFSHAR et al., 2011). Além disso, a análise histológica e o uso de outras técnicas como a de impregnação de prata é possível identificar cocos abundantes no parênquima cerebral. Logo, o diagnóstico é realizado com características fenotípicas e genéticas da bactéria (SALVADOR et al., 2005).

O uso de antimicrobianos é uma prática rotineira usada para o controle da estreptococose nas tilapiculturas do Brasil, principalmente em casos de surtos. E nesse contexto, a oxitetraciclina é a droga de eleição (RIGOS et al., 2004). No entanto, esse manejo leva á seleção de bactérias resistentes e causa desequilíbrios na microbiota ou no habitat do peixe (YOUSEFIAN; AMIRI, 2009).

Embora cepas de *S. agalactiae* isoladas de peixes tenham sido encontradas na China e sejam resistentes à penicilina, ceftriaxona e clindamicina (CHU et al., 2016), há poucas informações sobre mudanças no perfil de resistência a antimicrobianos de cepas de peixe no Brasil (CHIDEROLI et al., 2017). No estudo de Chideroli, os isolados pertencentes ao sorotipo III foram resistentes à ampicilina, norfloxacin, todos os aminoglicosídeos testados e fluoroquinolonas, sulfametoxazol com trimetoprim e tetraciclina. Ressalta-se que linhagens do sorotipo Ib isoladas de peixes geralmente possuem baixa frequência de resistência à antibacterianos, sendo a mais comum a resistência a estreptomicina encontrada no isolados do banco de cepas do LABBEP (dados ainda não publicados).

Recentemente, novas perspectivas surgiram com o intuito de diminuir o uso de antimicrobianos e melhorar a imunidade dos peixes. Nesse âmbito, houve o surgimento dos probióticos e prebióticos para uso em animais de criação e na aquicultura. Estes tem a função de alterar as bactérias intestinais para obter efeitos favoráveis no ganho de peso, melhorar a resistência aos patógenos e estimular a imunidade do hospedeiro (KOH et al., 2016). Notadamente, a vacinação é a medida profilática mais importante para o controle da estreptococose em peixes (LIU, G. et al., 2016).

2.6 VACINAS BACTERIANAS

2.6.1 Histórico

No início do século XX, ocorreu a primeira campanha para vacinação com bactérias atenuadas em seres humanos. Albert Calmette e Camille Guérin fizeram sucessivas passagens de uma cepa bacteriana em um meio de cultura contendo bile bovina e, após 13 anos, desenvolveram uma cepa atenuada não virulenta do patógeno BCG (Bacille Calmette-Guérin) para cobaias e bovinos. E, embora a vacina BCG tenha sido usada pela primeira vez em seres humanos e animais; estudos demonstraram uma eficácia limitada no bovino sendo, portanto, usado apenas para humanos (VAN HOUTEN et al., 2010; SINGHAL; BISHT; JOSHI, 2010; SUAZO; ESCALERA; TORRES, 2003).

A maior compreensão da resposta imune não só aos agentes patogênicos inativos ou atenuados, mas também às toxinas e polissacarídeos capsulares favoreceu a descoberta de novas vacinas bacterianas. Na década de 1920, as vacinas contra o toxóide do tétano e a difteria resultaram em efeitos protetores contra essas doenças. Mais tarde, descobriu-se que a vacina inativada contra a tosse convulsa resultou em melhores resultados

quando empregado em conjunto com os toxóides da difteria e do tétano, levando a vacina DPT, a primeira a imunizar contra mais de um patógeno (ANDRÉ, 2003).

Quanto ao polissacarídeo capsular, as vacinas foram desenvolvidas contra pneumococos, meningococos e *Haemophilus influenzae b*. A descoberta de que a combinação polissacarídeo-proteína induzia uma melhor resposta imune proporcionou o uso de novos antígenos potenciais (SANTOSHAM et al., 1991).

2.6.2 Vacinas para Peixes

Com o surgimento de resistência de certos patógenos aos antimicrobianos e a preocupação de que os fármacos antibacterianos usados na aquicultura poderiam prejudicar a saúde animal humana e ambiental, levou ao desenvolvimento de pesquisas com vacinação em peixes a partir dos anos de 1960 (MUISWINKEL, 2008). Já, em 1976 a primeira vacina foi licenciada nos EUA contra *Yersinea ruckeri*, por via de administração oral, e em 1981 uma vacina intraperitoneal com adjuvante oleoso contra *A.salmonicida* (PLANT; LAPATRA, 2011).

O uso de vacinas como método imunoprolático na aquicultura tem aumentado consideravelmente. Entretanto, a vacinação em peixes é ainda uma área relativamente recente, tanto cientificamente como na capacidade de transferência de tecnologia para as indústrias (GUDDING; LILLEHAUG; EVENSEN, 1999). Desta forma, vacinas dos principais patógenos encontrados na piscicultura ainda estão em processo de desenvolvimento (KLESIUS; EVANS; SHOEMAKER, 2004; AGNEW; BARNES, 2007; TONHEIM; BØGWALD; DALMO, 2008).

Atualmente, existem vacinas para mais de 17 espécies de peixes que protegem contra 22 diferentes doenças bacterianas e 6 doenças virais. As vacinas estão disponíveis em mais de 40 países e são mais usadas em espécies de elevado valor comercial (BRUDESETH et al., 2013). Os peixes podem ser imunizados de três formas, pelas vias intraperitoneal, oral e por banho de imersão (LONGHI; PRETTO-GIORDANO; MÜLLER, 2012). A via de administração oral é realizada pela ração e é uma forma rápida e pouco custosa para o produtor. Já a via intraperitoneal exige maior manejo e pode levar os peixes a um nível de stress. No entanto sua eficácia é maior pela sua durabilidade e ultimamente ser um método mais utilizado em tilapiculturas (CORBEIL; KURATH; LAPATRA, 2000).

Outro método de administração da vacina que pode ser empregado para peixes é a imersão (SOMMERSET et al., 2005), podendo ser por banho, mergulho, ou

pulverização. Esses são métodos baratos e exigem pouco manejo (PLANT; LAPATRA, 2011). Entretanto, o grau e o período da proteção imune podem ser variáveis (KIBENGE et al., 2012). Além disso, estudos demonstraram que a temperatura e o tamanho do peixe são fatores importantes e que influenciam na eficácia da imunização e devem ser levados em conta durante a elaboração de protocolos de vacinação em tilápias cultivadas (SOTO et al., 2014).

2.6.3 Vacina contra *Streptococcus Agalactiae*

Uma gama de vacinas contra patógenos bacterianos extracelulares em peixes foram produzidas através da inativação de bactérias inteiras e posterior combinação com adjuvante, administradas por via intraperitoneal e obtendo resultados satisfatórios durante a imunização (SOMMERSET et al., 2005).

No Brasil a vacina comercializada contra *S. agalactiae* em peixes (AQUAVAC® STREP SA, MSD Saúde Animal) é inativada e administrada de forma intraperitonealmente (LONGHI; PRETTO-GIORDANO; MÜLLER, 2012), no entanto só protege contra o sorotipo Ib. E nesse mesmo contexto, uma variedade de vacinas contra a estreptococose em peixes já foram desenvolvidas, utilizando a inativação com o calor ou formol como técnicas padrão já descritas em inúmeros trabalhos (EVANS; KLESIUS; SHOEMAKER, 2004; PRETTO-GIORDANO et al., 2010; SALVADOR et al., 2012).

Entretanto, não há ainda uma vacina que confira proteção contra os 10 sorotipos do *S. agalactiae* GBS, ocorrendo surtos com alta mortalidade, devido à prevalência de diferentes sorotipos e perfis genéticos na mesma região, sugerindo a necessidade de desenvolver uma vacina polivalente. Além disso, observa-se ausência de padronização do protocolo que pode resultar em viés nos resultados do estudo e uma conclusão duvidosa (EVANS; KLESIUS; SHOEMAKER, 2004; PASNIK et al., 2005; LIU; ZHANG; LU, 2013; WU et al., 2013).

2.6.4 Vacinas Biotecnológicas

A maior parte das vacinas disponíveis para bactérias foram desenvolvidas a partir de microorganismos, atenuados ou inativados a partir de proteínas e / ou carboidratos derivados de agentes patogênicos. Nas últimas décadas, com o aparecimento da biologia molecular e estudos genéticos desenvolveram novas ferramentas para pesquisa e

desenvolvimento de novas vacinas. Essas ferramentas podem permitir o aumento da eficácia das respostas imunes humorais e celulares, que são fundamentais fatores para o sucesso das vacinas atualmente disponíveis (PLOTKIN, 2008).

Em geral, características distintivas de algumas bactérias podem dificultar o desenvolvimento de vacinas como, por exemplo, a capacidade das bactérias de trocar elementos genéticos móveis (MGES). MGES são segmentos de DNA que se movimentam entre e dentro das células bacterianas e permite que as bactérias se adaptem rapidamente a novos ambientes, adquirindo genes de resistência aos antimicrobianos além, de novos fatores de virulência (MALACHOWA; DeLEO, 2010). Desta forma, uma alternativa para o desenvolvimento de vacinas eficazes contra espécies bacterianas que apresentam ampla variabilidade genética é a utilização de genes com alvos conservados para o desenvolvimento de vacinas de DNA ou proteínas recombinantes (SETTE; RAPPUOLI, 2010).

Recentemente, a vacinologia reversa vem ganhando espaço na produção de vacinas recombinantes, sua análise basicamente identifica genes candidatos para vacinas através de *pipelines* da imunoinformática, utilizando dados dos genomas de patógenos bacterianos, *in silico*. Assim, essas vacinas utilizam genes conservados dentro da espécie ou gênero, como forma de desenvolver vacinas universais contra esses agentes patogênicos (SETTE; RAPPUOLI, 2010).

Comparado a outros tipos de proteínas, proteínas de superfície bacteriana, especialmente as de âncora da superfície da parede celular, estão totalmente expostas ao sistema imunológico do hospedeiro e são capazes de induzir um alto nível de respostas imunes. Portanto, as proteínas de superfície bacteriana podem servir como alvo útil para o desenvolvimento de vacinas recombinantes (NAVARRE; SHNEEWIND, 1999; CORDWELL, 2006; BAUMS; VALENTIN-WEINGAND, 2009).

Estudos já realizados mostram que as vacinas biotecnológicas de candidatos vacinais proteicos selecionados por bioinformática (vacinologia reversa) são promissoras quando empregadas na predição de alvos vacinais contra *S. agalactiae* (MAIONE et al., 2005; PEREIRA et al., 2013). Contudo, existem poucos estudos utilizando estas ferramentas para o desenvolvimento de vacinas contra doenças em peixes. E até o presente momento só há uma vacina de DNA recombinante comercialmente licenciada para peixes, uma vacina contra o vírus da necrose hematopoiética infecciosa (IHNV) (LORENZEN; LAPATRA, 2005; KURATH; PURCELL; GARVER, 2007; KURATH, 2008).

2.6.5 Adjuvantes

Os adjuvantes, embora pouco relatados como uso na aquicultura, apresentam diversos mecanismos de ação e devem ser selecionados baseados na rota de administração e na imunidade requerida pelo tipo de vacina particular (imunidade humoral, celular ou mucosa) (ELLIS, 1988). São misturados às bacterinas através da emulsificação, de forma a induzir uma alta eficácia e uma proteção duradoura devido à liberação lenta do antígeno (BRUDESTH et al., 2013).

Há vários tipos disponíveis como a substância completa e incompleta (emulsão de óleo mineral) de Freund, óleos leves semelhantes ao óleo mineral, lipopolissacarídeos bacterianos e até mesmo adjuvantes moleculares, ou seja, exotoxinas, quimiosinas e citocinas que atuam como adjuvantes em peixes. O adjuvante dos β -glucanos tem apresentado resultados satisfatórios quando usado nas vacinas de peixes orais (PETIT; WIEGERTJES, 2016; SKOV et al., 2012) pois, incluem fácil incorporação na alimentação dos peixes (DADAR et al., 2017). Recentemente, a IL-8 do “peixe gato” foi clonada e usada como um adjuvante juntamente com a vacina de subunidade do *S. iniae*, desta forma mostraram que a IL-8 é um bom imunopotenciador, porém, mais estudos são necessários para que isso possa ser usado em outras vacinas (WANG et al., 2016).

REFERÊNCIAS

- AFSHAR, B.; BROUGHTON, K.; CRETU, R.; DECHEVA, A.; HUFNAGEL, M.; KRIZ, P.; LAMBERTSEN, L.; LOVGREN, M.; MELIN, P.; OREFICI, G.; POYART, C.; RADTKE, A.; RODRIGUEZ-GRANGER, J.; SKOV SØRENSEN, U. B.; TELFORD, J.; VALINSKY, L.; ZACH, L. International external quality assurance for laboratory identification and typing of *Streptococcus agalactiae* (group B streptococci). **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 49, n. 4, p. 1475-1482, 2011.
- AGNEW, W.; BARNES, A. C. *Streptococcus iniae*: an aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 122, n. 1-2, p. 1-15, 2007.
- ANDRÉ, F. E. Vaccinology: past achievements, present roadblocks and future promises. **Vaccine**, Amsterdam, v. 21, p. 593-595, 2003.
- AREECHON, N.; KANNIKA, K.; HIRONO, I.; KONDO, H.; UNAJAK, S. Draft genome sequences of *Streptococcus agalactiae* serotype Ia and III isolates from tilapia farms in Thailand. **Genome Announcements**, Washington, v. 4, p. 5132-5133, 2016.
- BAUMS, C. G.; VALENTIN-WEIGAND, P. Surface-associated and secreted factors of *Streptococcus suis* in epidemiology, pathogenesis and vaccine development. **Animal Health Research Reviews**, Wallingford, v. 10, n. 1, p. 65-83, 2009.
- BENCHETRIT, L. C.; FRACALANZZA, S. E.; PEREGRINO, H.; CAMELO, A. A.; SANCHES, L. A. Carriage of *Streptococcus agalactiae* in women and neonates and distribution of serological types: a study in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 15, p. 787-90, 1982.
- BOWATER, R. O.; FORBES-FAULKNER, J.; ANDERSON, I. G.; CONDON, K.; ROBINSON, B.; KONG, F.; GILBERT, G. L.; REYNOLDS, A.; HYLAND, S.; MCPHERSON, G.; BRIEN, J. O.; BLYDE, D. Natural outbreak of *Streptococcus agalactiae* (GBS) infection in wild giant Queensland grouper, *Epinephelus lanceolatus* (Bloch), and other wild fish in northern Queensland, Australia. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 35, n. 3, p. 173-186, 2012.
- BRUDESETH, B. E.; WIULSROD, R.; FREDRIKSEN, B. N.; LINDMO, K.; LOKLING, K.; BORDEVIK, M.; STEINE, N.; KLEVAN, A.; GRAVNINGEN, K. Status and future perspectives of vaccines for industrialised fin-fish farming. **Fish and Shellfish Immunology**, London, v. 35, n. 6, p.1759-1768, 2013.
- BURNHAM, C. A.; SHOKOPLES, S. E.; TYRRELL, G. J. Virulence factors of group B streptococci. **Reviews in Medical Microbiology**, [S. l.], v. 14, n. 4, p. 109-118, 2003.
- CHANG, P. H.; PLUMB, J. A. Effects of Salinity on *Streptococcus* Infection of Nile Tilapia *Oreochromis niloticus*. **Journal of Applied Aquaculture**, Binghamton, v. 6, n. 1, p. 39-45, 1996.
- CHEN, M.; WANG, R.; LUO, F. G.; HUANG, Y.; LIANG, W. W.; HUANG, T.; LEI, A. Y.; GAN, X.; LI, L. P. *Streptococcus agalactiae* isolates of serotypes Ia, III and V from human

and cow are able to infect tilapia. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 180, n. 1–2, p. 129–135, 2015.

CHIDEROLI, R. T.; AMOROSO, N.; MAINARDI, R. M.; SUPHORONSKI, S. A.; PADUA, S. B.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A.; MOSELA, M.; MORALES, A. T. P.; OLIVEIRA, A. G.; ZANOLO, R.; DI SANTIS, G. W.; PEREIRA, U. P. Emergence of a new multidrug-resistant and highly virulent serotype of *Streptococcus agalactiae* in fish farms from Brazil. **Aquaculture**, Binghamton, v. 479, p. 45–51, 2017.

CHU, C.; HUANG, P. Y.; CHEN, H. M.; WANG, Y. H.; TSAI, I.; LU, C. C.; CHEN, C. C. Genetic and pathogenic difference between *Streptococcus agalactiae* serotype Ia fish and human isolates. **BMC Microbiology**, London, v. 16, n. 1, p. 1–9, 2016.

CONROY, G. Estreptococosis en tilapia: prevalencia de las especies de *Streptococcus* en América Latina y sus manifestaciones patológicas. In: MEMORIAS de *Streptococcus* en peces de aguas cálidas. México: Intervet, 2009. p. 15–20.

CORBEIL, S.; KURATH, G.; LAPATRA, S. E. Fish DNA vaccine against infectious hematopoietic necrosis virus: efficacy of various routes of immunisation. **Fish Shellfish Immunology**, London, v. 10, p. 711–723, 2000.

CORDWELL, S. J. Technologies for bacterial surface proteomics. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 9, p. 320–329, 2006.

CUMLEY, N. J.; SMITH, L. M.; ANTHONY, M.; MAY, R. C. The CovS/CovR acid response regulator is required for intracellular survival of group B *Streptococcus* in macrophages. **Infection and Immunity**, Washington, v. 80, n. 5, p. 1650–1661, 2012.

DADAR, M.; DHAMA, K.; VAKHARIA, V. N.; HOSEINIFAR, S. H. Advances in Aquaculture Vaccines Against Fish Pathogens: Global Status and Current Trends. **Reviews in Fisheries Science and Aquaculture**, [S. l.], v. 25, n. 3, p. 184–217, 2017.

DALMO, R. A.; BOGWALD, J. β -glucans as conductors of immune symphonies. **Fish Shellfish Immunology**, London, v. 25, n. 4, p. 384–396, 2008.

DE PEDRO, N.; GUIJARRO, A. I.; LÓPEZ-PATIÑO, M. A.; MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, R.; DELGADO, M. J. Daily and seasonal variations in hematological and biochemical parameters in the tench, *Tinca tinca* Linnaeus, 1758. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 36, n. 12, p. 1185–1196, 2005.

DOGAN, B.; SCHUKKEN, Y. H.; SANTISTEBAN, C.; BOOR, K. J. Distribution of serotypes and antimicrobial resistance genes among *Streptococcus agalactiae* isolates from bovine and human hosts. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 12, p. 5899–5906, 2005.

DORAN, K. S.; NIZET, V. Molecular pathogenesis of neonatal group B streptococcal infection: No longer in its infancy. **Molecular Microbiology**, Copenhagen, v. 54, n. 1, p. 23–31, 2004.

EKELUND, K.; SLOTVET, H. C.; NIELSEN, H. U.; KALTOFT, M. S.; KONRADSEN, H. B. Emergence of invasive serotype VIII group B Streptococcal infections in Denmark. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 9, p. 4442–4444, 2003.

EL BEITUNE, P.; DUARTE, G.; MAFFEI, C. M. L. Colonization by *Streptococcus agalactiae* during pregnancy: maternal and perinatal prognosis. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 9, n. 4, p. 276–82, 2005.

ELDAR, A.; BEJERANO, Y.; LIVOFF, A.; HOROVITCZ, A.; BERCOVIER, H. Experimental streptococcal meningo-encephalitis in cultured fish. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 43, n. 1, p. 33-40, 1995.

ELLIS, A.E. General principles of fish vaccination. In: ELLIS, A. E. (Ed.). **Fish vaccination**. London: Academic Press Limited, 1988. p. 1-19.

EVANS, J. J.; KLESIUS, P. H.; GILBERT, P. M.; SHOEMAKER, C. A.; SARAWI, M. A.; LANDSBERG, J.; DUREMDEZ, R.; MARZOUK, A.; ZENKI, S. Characterization of β -haemolytic Group B *Streptococcus agalactiae* in cultured seabream, *Sparus auratus* L., and wild mullet, *Liza klunzingeri* (Day), in Kuwait. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 25, n. 12, p. 505–513, 2002.

EVANS, J. J.; KLESIUS, P. H.; SHOEMAKER, C. A. Efficacy of *Streptococcus agalactiae* (group B) vaccine in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by intraperitoneal and bath immersion administration. **Vaccine**, Amsterdam, v. 22, n. 27–28, p. 3769–3773, 2004.

EVANS, J. J.; PASNIK, D. J.; KLESIUS, P. H. Differential pathogenicity of five *Streptococcus agalactiae* isolates of diverse geographic origin in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). **Aquaculture Research**, Oxford, v. 46, n. 10, p. 2374–2381, 2015.

FACIMOTO, C.; CHIDEROLI, R.T.; GONÇALVES, D.D.; CARMO, A. O.; KALAPHOTAKIS, E.; PEREIRA, U. P. Whole-Genome Sequence of Isolated from a Fish Eye from a Nile Tilapia Farm in Southern Brazil. **Genome Announcements**, Whashington, v. 5, n. 35, p. 9–10, Aug. 2017.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The state of world fisheries and aquaculture**, Roma, 2018. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/sofia/en>. Acesso em: 20 nov. 2018.

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

GHERARDI, G.; IMPERI, M.; BALDASSARRI, L.; PARARACCHIA, M.; ALFARONE, G.; RECCHIA, S.; OREFICI, G.; DICUONZO, G.; CRETÌ, R. Molecular epidemiology and distribution of serotypes, surface proteins, and antibiotic resistance among group B streptococci in Italy. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 45, n. 9, p. 2909-2916, 2007.

GLASER, P.; RUSNIOK, C.; BUCHRIESER, C.; CHEVALIER, F.; FRANGEUL, L.; MSADEK, T.; ZOUINE, M.; COUVÉ, E.; LALIOUI, L.; POYART, C.; TRIEU-CUOT, P.; KUNST, F. Genome sequence of *Streptococcus agalactiae*, a pathogen causing invasive neonatal disease. **Molecular Microbiology**, Copenhagen, v. 45, n. 6, p. 1499–1513, 2002.

GODOY, D. T.; CARVALHO-CASTRO, G. A.; LEAL, C. A.; PEREIRA, U. P.; LEITE, R. C.; FIGUEIREDO, H. C. Genetic diversity and new genotyping scheme for fish pathogenic

Streptococcus agalactiae. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 57, n. 6, p. 476-83, Dec. 2013.

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

HERNÁNDEZ, E.; FIGUEROA, J.; IREGUI, C. Streptococcosis on a red tilapia, *Oreochromis* sp., farm: A case study. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 32, n. 3, p. 247–252, 2009.

IBGE. **Produção da pecuária municipal**. 2017. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/pesquisas/pesquisa_resultados.php?id_pesquisa=21. Acesso em: 10 nov. 2017.

IP, M.; ANG, I.; FUNG, K.; LIYANAPATHIRANA, V.; LUO, M. J.; LAI, R. Hypervirulent Clone of Group B *Streptococcus* Serotype III Sequence Type 283, Hong Kong, 1993-2012. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 22, n. 10, p. 1800-3, 2016.

IREGUI, C. A.; COMAS, J.; VÁSQUEZ, G. M.; VERJÁN, N. Experimental early pathogenesis of *Streptococcus agalactiae* infection in red tilapia *Oreochromis* spp. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 39, n. 2, p. 205–215, 2016.

ISIAKU, A. I.; SABRI, M. Y.; INA-SALWANY, M. Y.; HASSAN, M. D.; TANKO, P. N.; BELLO, M. B. Biofilm is associated with chronic streptococcal meningoencephalitis in fish. **Microbial Pathogenesis**, London, v. 102, p. 59–68, 2017.

JAFAR, Q. A.; SAMEER, A. Z.; SALWA, A. M.; SAMEE, A. A.; AHMED, A. M.; AL-SHARIFI, F. Molecular investigation of *Streptococcus agalactiae* isolates from environmental samples and fish specimens during a massive fish kill in Kuwait Bay. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Faisalabad, v. 11, n. 21, p. 2500-4, Nov. 2008.

JIMÉNEZ, A.; TIBATÁ, V.; JUNCA, H.; ARIZA, F.; VERJAN, N.; IREGUI, C. Evaluating a nested-PCR assay for detecting *Streptococcus agalactiae* in red tilapia (*Oreochromis* sp.) tissue, **Aquaculture**, Binghamton, v. 321, p. 203–206, 2011.

KIBENGE, F. S. B.; GODOY, M. G.; FAST, M.; WORKENHE, S.; KIBENGE, M. T. Countermeasures against viral diseases of farmed fish. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 95, p. 257-281, 2012.

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

KOH, C. B.; ROMANO, N.; ZAHRAH, A. S.; NG, W. K. Effects of a dietary organic acids blend and oxytetracycline on the growth, nutrient utilization and total cultivable gut microbiota of the red hybrid tilapia, *Oreochromis* sp., and resistance to *Streptococcus agalactiae*. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 47, n. 2, p. 357–369, 2016.

KURATH, G. Biotechnology and DNA vaccines for aquatic animals. **Revue Scientifique et Technique**, Paris, v. 27, n. 1, p. 175-196, 2008.

- KURATH, G.; PURCELL, M. K.; GARVER, K. A. Fish rhabdovirus models for understanding host response to DNA vaccines. **CAB Reviews**, Washington, v. 2, n. 48, p. 1-12, 2007.
- LANCEFIELD, B. R. C.; MCCARTY, M.; EVERLY, W. N.; MULTIPLE MOUSE-PROTECTIVE ANTIBODIES DIRECTED. Special reference to antibodies effective against protein antigens the experiments presented in the present paper were designed to determine whether the protein antigens of Types Ib and Ic are significant in. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 142, n. 5, 1975.
- LANCEFIELD, R. C. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 57, p. 571-595, 1933.
- LEAL, A. G.; TAVARES, G. C.; FIGUEIREDO, H. C. P. Outbreaks and genetic diversity of *Francisella noatunensis* subsp *orientalis* isolated from farm-raised Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 13, n. 3, p. 5704-5712, 2014.
- LI, L.; WANG, R.; LIANG, W.; GAN, X.; HUANG, T.; HUANG, Y.; LI, J.; SHI, Y.; CHEN, M.; LUO, H. Rare serotype occurrence and PFGE genotypic diversity of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia in China. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 167, n. 3-4, p. 719-724, 2013.
- LITTLE, D. C.; MURRAY, F. J.; LESCHEN, W.; BOYD, K.; WATTERSON, A.; YOUNG, A. Options for producing a warm water fish in the UK: limits to 'Green Growth'? **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 19, p. 255-264, 2008.
- LIU, G.; ZHANG, W.; LU, C. Comparative genomics analysis of *Streptococcus agalactiae* reveals that isolates from cultured tilapia in China are closely related to the human str. **BMC Genomics**, London, v. 14, p. 775, 2013.
- LIU, G.; ZHU, J.; CHEN, K.; GAO, T.; YAO, H.; LIU, Y.; ZHANG, W.; LU, C. Development of *Streptococcus agalactiae* vaccines for tilapia. **Diseases of Aquatic Organisms**, Oldendorf, v. 122, n. 2, p. 163-170, 2016.
- LONGHI, E.; PRETTO-GIORDANO, L. G.; MÜLLER, E. E. Avaliação da eficácia de vacina autóctone de *Streptococcus agalactiae* inativado aplicada por banho de imersão em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, p. 3191-3200, 2012.
- LORENZEN, N.; LaPATRA, S. E. DNA vaccines for aquacultured fish. **Review Science Technology**, Paris, v. 24, p. 201-213, 2005.
- MAINARDI, R. M.; LIMA JUNIOR, E. A.; RIBEIRO JÚNIOR, J. C.; BELOTI, V.; CARMO, A. O.; KALAPOTHAKIS, E.; GONÇALVES, D. D.; PADUA, S. B.; PEREIRA, U. P. Complete genome sequence of *Streptococcus agalactiae* strain S25 isolated from peritoneal liquid of Nile tilapia. **Genome Announcements**, Washington, v. 4, n. 4, 2016.
- MAIONE, D.; MARGARIT, I.; RINAUDO, C. D.; MASIGNANI, V.; MORA, M.; SCARSELLI, M.; TETTELIN, H. Identification of a Universal Group B *Streptococcus* Vaccine by Multiple Genome Screen. **Science**, New York, v. 309, n. 5731, p. 148-150, 2005.

MALACHOWA, N.; DeLEO, F. R. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 67, n. 18, p. 3057–3071, 2010.

MARGARET, I.; CHEUK, E. S. C.; TSUI, M. H. Y.; KONG, F.; LEUNG, T. N.; GILBERT, G. L. Identification of a *Streptococcus agalactiae* Serotype III Subtype 4 Clone in Association with Adult Invasive Disease in Hong Kong. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 44, n. 11, p. 4252–4254, 2006.

MARTINS, M. L.; MOURIÑO, J. L.; AMARAL, G. V.; VIEIRA, F. N.; DOTTA, G.; JATOBÁ, A. M. B.; PEDROTTI, F. S.; JERÔNIMO, G. T.; BUGLIONE-NETO, C. C.; PEREIRA, J. G. Haematological changes in Nile tilapia experimentally infected with *Enterococcus* sp. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 68, n. 3, p. 631-637, 2008.

MEEUSEN, E. N. T.; WALKER, J.; PETERS, A.; PASTORET, P.; JUNGENSEN, G. Current status of veterinary vaccines. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 20, n. 3, p. 489-510, 2007.

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

MISRA, S.; SAHU, N. P.; PAL, A. K.; XAVIER, B.; KUMAR, S.; MUKHERJEE, S. C. Pre- and post-challenge immunohaematological changes in *Labeo rohita* juveniles fed gelatinised or non-gelatinised carbohydrate with n-3 PUFA. **Fish & Shellfish Immunology**, New York, v. 21, p. 346-356, 2006.

MUISWINKEL, W. B. V. A history of fish immunology and vaccination I. The early days. **Fish and Shellfish Immunology**, London, v. 25, n. 4, p. 397-408, 2008.

NAVARRÉ, W. W.; SCHNEEWIND, O. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 63, p. 174–229, 1999.

NETTO, L. N.; LEAL, C. A. G.; FIGUEIREDO, H. C. P. *Streptococcus dysgalactiae* as an agent of septicemia in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 34, p. 251-254, 2011.

NIZET, V. Streptococcal β -hemolysins: Genetics and role in disease pathogenesis. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 10, n. 12, p. 575–580, 2002.

ORTEGA ASECIOS, Y.; SÁNCHEZ, F. B.; MENDIZÁBAL, H. B.; PUSARI, K. H.; ALFONSO, H. O.; SAYÁN, A. M.; FIGUEIREDO, M. A. P.; MANRIQUE, W. G.; BELO, M. A. A.; CHAUPE, N. S. First report of *Streptococcus agalactiae* isolated from *Oreochromis niloticus* in Piura, Peru: Molecular identification and histopathological lesions. **Aquaculture Reports**, Orono, v. 4, p. 74–79, 2016.

PASNIK, D. J.; EVANS, J. J.; PANANGALA, V. S.; KLESZIUS, P. H.; SHELBY, R. A.; SHOEMAKER, C. A. Antigenicity of *Streptococcus agalactiae* extracellular products and vaccine efficacy. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 28, n. 4, p. 205-212, 2005.

PEREIRA, U. P.; SOARES, S. C.; BLOM, J.; LEAL, C. A. G.; RAMOS, R. T. J.; GUIMARÃES, L. C.; OLIVEIRA, L. C.; ALMEIDA, S. S.; HASSAN, S. S.; SANTOS, A.

R.; MIYOSHI, A.; SILVA, A.; TAUCH, A.; BARH, D.; AZEVEDO, V.; FIGUEIREDO, C. P. Complete genome sequence of *Streptococcus agalactiae* strain SA20-06, a fish pathogen associated to meningoencephalitis outbreaks. **Standards in Genomic Sciences**, London, v. 25, n. 8, p. 188-197, 2013.

PETIT, J.; WIEGERTJES, G. F. Long-lived effects of administering b-glucans: indications for trained immunity in fish. **Developmental and Comparative Immunology**, Elmsford, v. 64, p. 93-102, 2016.

PEIXE BR. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA PISCICULTURA. **Anuário Peixe BR da Piscicultura**. p. 146, 2019.

PINTO, T. C. A.; COSTA, N. S.; VIANNA SOUZA, A. R.; SILVA, L. G.; CORRÊA, A. B.; FERNANDES, F. G.; OLIVEIRA, I. C.; MATTOS, M. C.; ROSADO, A. S.; BENCHETRIT, L. C. Distribution of serotypes and evaluation of antimicrobial susceptibility among human and bovine *Streptococcus agalactiae* strains isolated in Brazil between 1980 and 2006. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 17, n. 2, p. 131–136, 2013.

PLANT, K. P.; LAPATRA, S. E. Advances in fish vaccine delivery. **Developmental and Comparative Immunology**, Elmsford, v. 35, n. 12, p. 1256-1262, 2011.

PLOTKIN, S. A. Vaccines: correlates of vaccine-induced immunity. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 47, n. 3, p. 401–409, 2008.

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

PRADEEP, P. J.; SUEBSING, R.; SIRTHAMMAJAK, S.; KAMPEERA, J.; KITRAKORN, S.; SAKSMERPROME, V.; TURNER, W.; PALANG, I.; VANICHVIRIYAKIT, R.; SENAPIN, S.; JEFFS, A.; KIATPATHOMCHAI, W.; WITHYACHUMANARNKUL, B. Evidence of vertical transmission and tissue tropism of Streptococcosis from naturally infected red tilapia (*Oreochromis spp.*). **Aquaculture Reports**, Orono, v. 3, p. 58–66, 2016.

PRETTO-GIORDANO, L. G.; MÜLLER, E. E.; KLESIUS, P.; SILVA, V. G. Efficacy of an experimentally inactivated *Streptococcus agalactiae* vaccine in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in Brazil. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 41, p. 1539-1544, 2010.

RIGOS, G.; NENGAS, I.; ALEXIS, M.; ATHANASSOPOULOU, F. Bioavailability of oxytetracycline in sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 27, n. 2, p. 119-122, Feb. 2004.

RINGØ, E.; OLSEN, R. E.; JENSEN, I.; ROMERO, J.; LAUZON, H. L. Application of vaccines and dietary supplements in aquaculture: possibilities and challenges. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, London, v. 24, n. 4, p. 1005-1032, Dec. 2014.

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

RUBENS, C. E.; WESSELS, M. R.; HEGGEN, L. M.; KASPER, D. L. Transposon mutagenesis of type III group B *Streptococcus*: correlation of capsule expression with

virulence. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.**, Washington, v. 84, n. 20, p. 7208-7212, 1987.

SALVADOR, R.; MÜLLER, E. E.; LEONHARDT, J. H.; PRETTO-GIORGANO, L. G.; DIAS, J. A.; FREITAS, J. C.; MORENO, A. M. Isolamento de *Streptococcus* spp de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*) e qualidade da água de tanques rede na Região Norte do Estado do Paraná, Brasil Isolation of *Streptococcus* spp from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and quality of water. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, p. 35–42, 2003.

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

SALVADOR, R.; TOAZZA, C. S.; MORAES, J. R. E; MORAES, F. R. Inflammatory responses of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* to *Streptococcus agalactiae*: effects of vaccination and yeast diet supplement. **Diseases of Aquatic Organisms**, Oldendorf, v. 98, p. 235–241, 2012.

SANTOSHAM, M.; WOLFF, M.; REID, R.; HOHENBOKEN, M.; BATEMAN, M. The efficacy in Navajo infants of a conjugate vaccine consisting of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide and *Neisseria meningitidis* outer-membrane protein complex. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 324, n. 25, p. 1767-1772, 1991.

SETTE, A.; RAPPUOLI, R. Reverse vaccinology: developing vaccines in the era of genomics. **Immunity**, Cambridge, v. 33, n. 4, p. 530-541, 2010.

SILVA, B. C.; MOURINO, J. L. P.; VIEIRA, F. N.; JATOBA, A.; SEIFFERT, W. Q.; MARTINS, M. L. *Haemorrhagic septicaemia* in the hybrid surubim (*Pseudoplatystoma corruscans* x *Pseudoplatystoma fasciatum*) caused by *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 43, p. 908–916, 2012.

SINGHAL, N.; BISHT, T.; JOSHI, B. Immunoprophylaxis of Tuberculosis: An Update of Emerging Trends. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, Warszawa, v. 58, n. 2, p. 97-106, 2010.

SKOV, J.; KANIA, P. W.; HOLTEN-ANDERSEN, L.; FOUZ, B.; BUCHMANN, K. Immunomodulatory effects of dietary β -1,3- glucan from *Euglena gracilis* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immersion vaccinated against *Yersinia ruckeri*. **Fish Shellfish Immunology**, London, v. 33, p. 111-120, 2012.

SLOTVED, H.-C.; KONG, F.; LAMBERTSEN, L.; SAUER, S.; GILBERT, G. L. Serotype IX, a Proposed New *Streptococcus agalactiae* Serotype. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 45, n. 9, p. 2929–2936, 2007. Disponível em: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.00117-07>. Acesso em: 26 set. 2018.

SOMMERSET, I.; KROSSØY, B.; BIERING, E.; FROST, P. Vaccines for fish in aquaculture. **Expert review of vaccines**, London, v. 4, n. 1, p. 89-101, 2005.

SOTO, E.; BROWN, N.; GARDENFORS, Z. O.; YOUNT, S.; REVAN, F.; FRANCIS, S.; KEARNEY, M. T.; CAMUS, A. Effect of size and temperature at vaccination on

- immunization and protection conferred by a live attenuated *Francisella noatunensis* immersion vaccine in red hybrid tilapia. **Fish & Shellfish Immunology**, London, v. 41, n. 2, p. 593-599, 2014.
- STÅLHAMMAR-CARLEMALM, M.; STENBERG, L.; LINDAHL, G. Protein rib: a novel group B streptococcal cell surface protein that confers protective immunity and is expressed by most strains causing invasive infections. **The Journal of experimental medicine**, New York, v. 177, n. 6, p. 1593–603, 1993.
- SUANYUK, N.; KONG, F.; KO, D.; GILBERT, G. L.; SUPAMATTAYA, K. Occurrence of rare genotypes of *Streptococcus agalactiae* in cultured red tilapia *Oreochromis* sp. and Nile tilapia *O. niloticus* in Thailand-Relationship to human isolates? **Aquaculture**, Binghamton, v. 284, p. 35–40, 2008.
- SUAZO, F. M.; ESCALERA, A. M. A.; TORRES, R. M. G. A review of *M. bovis* BCG protection against TB in cattle and other animals species. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 58, p. 1-13, 2003.
- TAN, S.; LIN, Y.; FOO, K.; KOH, H. F.; TOW, C.; ZHANG, Y.; ANG, L. W.; CUI, L.; BADARUDDIN, H.; OOIL, P. L.; LIN, R. T.; CUTTER, J. Group B *Streptococcus* Serotype III Sequence Type 283 Bacteremia Associated with Consumption of Raw Fish, Singapore. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 22, n. 11, p. 1970–1973, 2016.
- TETTELIN, H.; MASIGNANI, V.; CIESLEWICZ, M. J.; EISEN, J. A.; PETERSON, S.; WESSELS, M. R. Complete genome sequence and comparative genomic analysis of an emerging human pathogen, serotype V *Streptococcus agalactiae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A**, Washington, v. 99, p. 12391-12396, 2002.
- TONHEIM, T. C.; BØGWALD, J.; DALMO, R. A. What happens to the DNA vaccine in fish? A review of current knowledge. **Fish & shellfish immunology**, London, v. 25, n. 1-2, p. 1-18, Mar. 2008.
- VAN HOUTEN, N. E.; HENRY, K. A.; SMITH, G. P.; SCOTT, J. K. Engineering filamentous phage carriers to improve focusing of antibody responses against peptides. **Vaccine**, Amsterdam, v. 28, n. 10, p. 2174-2185, 2010.
- VAN DER MEE-MARQUET, N.; DOMELIER, A. S.; SALLOUM, M.; VIOLETTE, J.; ARNAULT, L.; GAILLARD, N.; BIND, J. L. Molecular Characterization of Temporally and Geographically Matched *Streptococcus agalactiae* Strains. **Foodborne Pathogens and Disease**, Larchmont, v. 6, n. 10, p. 1177–1183, 2009.
- VILCHES, S.; URGELL, C.; MERINO, S.; CHACON, M. R.; SOLER, L.; CASTRO-ESCARPULLI, G.; FIGUERAS, M. J.; TOMÁS, J. M. Complete type III secretion system of a mesophilic *Aeromonas hydrophila* strain. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 6914–6919, 2004.
- WANG, E.; WANG, J.; LONG, B.; WANG, K.; HE, Y.; YANG, Q.; CHEN, D.; GENG, Y.; HUANG, X.; OUYANG, P.; LAI, W. Molecular cloning, expression and the adjuvant effects of interleukin-8 of channel catfish (*Ictalurus Punctatus*) against *Streptococcus iniae*. **Science Reports**, London, v. 6, p. 29310, 2016.

WATTS, M.; MUNDAY, B. L.; BURKE, C. M. Immune responses of teleost fish. **Australian Veterinary Journal**, Oxford, v. 79, p. 570-574, 2001.

WU, Y. R.; GONG, Q. F.; FANG, H.; LIANG, W. W.; CHEN, M.; ELE, R. J. Effect of *Sophoraflavescens* on non-specific immune response of tilapia (GIFT *Oreochromis niloticus*) and disease resistance against *Streptococcus agalactiae*. **Fish Shellfish Immunology**, London, v. 34, p. 220-227, 2013.

YOUSEFIAN, M.; AMIRI, M. S. A review of the use of prebiotic in aquaculture for fish and shrimp. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 8, n. 25, p. 7313–7318, 2009.

3 HIPÓTESE

A vacina bivalente, confere elevada proteção contra dois sorotipos de *Streptococcus agalactiae*, sorotipos Ib e III, em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma vacina bacterina utilizando duas cepas isoladas de *Streptococcus agalactiae*, sorotipos Ib e III (S13 e S73).

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar de forma comparativa a eficácia da vacina bivalente com as monovalentes;
- Avaliar a proteção vacinal *in vivo* frente ao desafio experimental com as cepas S13 e S73, de animais vacinados pela vacina bivalente;
- Avaliar a porcentagem relativa de sobrevivência dos peixes imunizados com a vacina bivalente para de *S. agalactiae*;

5 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

Development and validation of a bivalent vaccine against two serotypes of *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) (formatado de acordo com as normas do periódico Fish and Shellfish Immunology– Qualis Capes A1)

ABSTRACT

Streptococcus agalactiae is a gram-positive bacterium responsible for an emerging disease that affects more than 45 species of freshwater and saltwater fish worldwide. Serotypes Ia, Ib and III are most commonly isolated from infected tilapia (*Oreochromis niloticus*). In this study, the isolates S13 (serotype Ib) and S73 (serotype III) were evaluated for use in a bivalent vaccine administered intraperitoneally in juvenile tilapia. Vaccine efficiency was determined by measuring the mortality rate after vaccinated animals were challenged with the same isolates. The treatments consisted of three control groups (negative and positive) and nine vaccinated groups, composed of two groups vaccinated with the commercial vaccine, two groups with bacterin S13, two groups with bacterin S73 and three groups with the bivalent vaccine. The protective efficacy of bivalent vaccines was demonstrated by the relative percentage survival (RPS) - 96.16%. These results suggest that the bivalent vaccine tested provides protection against *S. agalactiae* infection in cultured tilapia, even when compared to commercially available vaccine.

Keywords: Aquaculture. Fish pathogen. RPS. Vaccination strategies.

1. Introdução

Streptococcus agalactiae é uma bactéria gram-positiva de alta morbidade que causa septicemia em peixes, humanos, cães, vacas, cavalos e porquinhos-da-índia, levando à alta prevalência de meningoencefalite, miocardite e coroidite [1,2]. A estreptococose é uma das doenças que mais causa prejuízos em aquiculturas do mundo todo, afetando mais de 45 espécies de peixes tanto de água doce como de água salgada [3]. Sua classificação ocorre de acordo com as características fenotípicas de cápsula (Ia, Ib, II, III a IX) [4], sendo os sorotipos Ia, Ib e III os mais comumente isolados de tilápias infectadas em surtos descritos mundialmente [5].

A tilápia (*Oreochromis* spp.) é a espécie mais difundida e cultivada no mundo, com potencial aumento na produção, atingindo 1.6 milhões de toneladas em 2016. O termo tilápia refere-se a uma série de espécies da família *Cichlidae*, no entanto, a espécie mais comum é a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) [6]. É uma espécie rústica e de rápido crescimento, apresenta tolerância à baixa qualidade de água e considerável resistência às doenças [7], contudo entre as espécies de água doce

41 cultivadas, o maior impacto econômico causado pela bactéria *S. agalactiae* ocorre em
42 criações de tilápias do Nilo [8], principalmente no verão [2,9].

43 A imunoprofilaxia, além de ser uma medida sanitária eficaz na prevenção,
44 controle e erradicação de doenças, reduz o uso de antimicrobianos na aquicultura,
45 prática favorável para o desenvolvimento e crescimento de um meio ambiente aquático
46 sustentável [10]. Os patógenos inativados por formalina são rotineiramente utilizados
47 em vacinas para peixes, pois é um método de inativação que não afeta a indução da
48 imunidade protetora das vacinas. No entanto, a sua efetividade e biossegurança
49 dependerá das condições de cultivo, forma de produção e vias de inoculação nos
50 animais [11].

51 No Brasil a estreptococose ocorre principalmente pelo sorotipo Ib, no entanto
52 isolados pertencentes ao sorotipo Ia já foram descritos em surtos da doença [12], e o
53 sorotipo III foi recentemente isolado de tilápias previamente vacinadas, na região do
54 Nordeste brasileiro [5]. Embora haja uma vacina comercial disponível no país sua
55 proteção é conferida apenas contra o sorotipo Ib, não protegendo as tilápias dos demais
56 sorotipos.

57 No presente estudo desenvolvemos uma vacina bivalente, usando os sorotipos Ib
58 e III de *S. agalactiae*. Além disso, demonstramos que a imunização intraperitoneal pode
59 induzir imunidade protetora eficiente em tilápias desafiadas com os mesmos sorotipos
60 utilizados na vacina.

61

62 **2. Material e Métodos**

63 **2.1. Animais, Condição Ética e Experimental**

64 O experimento foi realizado no Laboratório de Bacteriologia e Peixe (LABBEP),
65 da Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Paraná (Latitude 23° 17' 34" S,
66 Longitude 51° 10' 24" O). No LABBEP, os alevinos da espécie Tilápia do Nilo (*O.*
67 *niloticus*), com peso médio de 6 gramas, foram submetidos a quarentena em caixas de
68 fibra de polietileno (Fortlev, BR) com capacidade para 2000 L de água e taxa de
69 renovação de 8L por minuto, por um período de 30 dias e, posteriormente, transportados
70 para caixas de fibra de polietileno de 150L (Fortlev, BR) e mantidos sob aclimação
71 durante 10 dias.

72 Foram utilizadas 480 tilápias com peso médio de 30 gramas, provenientes da
73 mesma desova. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia (período da manhã –
74 09h00min e período da tarde – 16h00min) com ração extrusada Nutripiscis TR 32® com

75 32% de proteína bruta (Presence, BR), de acordo com as exigências nutricionais para o
76 desenvolvimento e crescimento das tilápias [13].

77 As caixas continham água declorificada vindas de um reservatório com fluxo
78 contínuo e aeração realizada por um compressor de ar Air Pump SC - 3500 (Boyu,
79 China), distribuídas por mangueiras de silicone (5 mm) e pedra porosa. A limpeza e a
80 renovação da água foram realizadas de acordo com a qualidade da água com taxa de
81 renovação volumétrica de 10%. Diariamente eram medidos os níveis de oxigênio e
82 temperatura da água sendo mensurados também valores de pH, amônia e cloro pelos
83 testes bioquímicos LabconTest (Alcon, BR) pH Tropical, Amônia Tóxica e Cloro Test,
84 respectivamente. Durante o experimento, a temperatura foi mantida em $25 \pm 0.8^{\circ}\text{C}$, pH
85 em 6.6 ± 0.8 e amônia em 0.04 mg/L, valores dentro da referência e, os animais foram
86 mantidos num fotoperíodo de 12 horas de luz.

87 O projeto foi realizado mediante a aprovação do Comitê de Ética e
88 Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina (CEUA) protocolo
89 n.19685.2017.53.

90

91 **3. Desenvolvimento da Vacina Bacteriana**

92 3.1. Cultivo

93 Os isolados (SisGen N° A76D95A), *S. agalactiae* S13 (sorotipo Ib,
94 NZ_CP018623.1) e S73 (sorotipo III, NZ_CP030845.1), previamente isolados de
95 tilápias do Nilo (*O. niloticus*) e armazenados no banco de bactérias do LABBEP, foram
96 cultivados em ágar Nutriente (Kasvi, Itália) acrescentado de 5% de sangue ovino
97 desfibrinado e incubados a $28^{\circ}\text{C}/48\text{h}$. Os isolados foram adicionados aos pré-inóculos,
98 3.0 mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion – Kasvi, Itália), e incubados a $28^{\circ}\text{C}/10\text{h}$ e
99 8h a 120 RPM (Incubadora Refrigerada com Agitação - Tecnal TE 422). Em seguida, os
100 pré-inóculos foram adicionados aos inóculos (50 mL de caldo BHI) e novamente
101 submetidos à incubação com agitação, durante 20 e 15 horas para os isolados S13 e S73,
102 respectivamente. Uma alíquota (1,0 mL) foi utilizada para determinar a concentração
103 bacteriana por espectrofotometria (Modelo Cintra 5), comprimento de onda de 600nm,
104 densidade óptica (OD) de 0,459 para o isolado S13 e 0,808 para o isolado S73, e
105 contagem em placas (UFC mL⁻¹) de ágar Nutriente acrescido de 5% de sangue ovino
106 desfibrinado. Os inóculos apresentaram uma concentração estimada de 10^9 UFC/mL
107 para a preparação da vacina.

108

109 3.2. Inativação

110 Os inóculos foram centrifugados (Thermo Scientific™ Heraeus Megafuge 8R
111 Centrifuge, USA) a 4000 x g/15 min, a 4°C, lavados (três vezes) com 10 mL de solução
112 Tampão fosfato-salino - PBS (Phosphate Buffered Saline) (1X, pH 7.4) e foram
113 inativados por adição de formalina 1% (Biotec, BR), a 4°C, por 48 h. As culturas
114 inativadas foram lavadas e centrifugadas novamente para total retirada da formalina e ao
115 final cada *pellet* foi diluído em PBS estéril no volume de 10 mL, correspondendo a uma
116 concentração final de 10^8 UFC mL⁻¹. Uma alíquota de cada cultura foi semeada em ágar
117 Nutriente acrescentado de 5% de sangue ovino desfibrinado para confirmar a inativação
118 das células e os *pellets* foram mantidos em refrigeração até o momento do uso.

119

120 3.3. Emulsificação

121 Os *pellets* foram emulsionados, com o auxílio de um aparato de emulsão, em
122 PBS (pH 7.4) adicionado de adjuvante oleoso Montanide™ ISA 763 A VG (Seppic,
123 França) na proporção 1:1 para gerar uma emulsão estável. A qualidade da emulsão foi
124 testada gotejando uma gota das mesmas em uma placa de Petri (90 x 15 mm, Kasvi,
125 Itália) com água destilada estéril gelada (6°C). Caso a gota não se dissociasse e
126 mantivesse estável por 15 segundos a emulsão era considerada de boa qualidade.

127

128 4. Vacinação

129 Com os animais anestesiados por curta duração de tempo utilizando-se
130 benzocaína (Ethyl 4-aminobenzoato, 98% - Acros Organics, USA), 50 mg/l por 60
131 segundos, foi realizada a inoculação das bacterinas com injeção de 0,1 mL dos
132 tratamentos na cavidade peritoneal e PBS no grupo controle, para assegurar o mesmo
133 estresse em todos os peixes. Ao final, os animais receberam dose referente a 10^8
134 UFC/mL da vacina bacterina, ministrada de acordo com seu grupo experimental.

135 Foram utilizados cinco tratamentos para cada desafio com os isolados S13 e S73.
136 Os tratamentos foram constituídos de três grupos controle (negativo e positivo) e nove
137 grupos vacinados, compostos por dois grupos vacinados com a vacina comercial, dois
138 grupos com a bacterina S13, dois grupos com a bacterina S73 e três grupos com a
139 vacina bivalente (Tabela 1).

140

141

142 **Tabela 1** - Grupos experimentais utilizados para avaliar a eficácia de vacina bivalente
 143 (sorotipos Ib e III) de *Streptococcus agalactiae*, em tilápias do Nilo (*O. niloticus*).

Grupos (Sigla)	Descrição dos tratamentos
CN (G1)	Peixes imunizados com PBS* + Adjuvante e não desafiados
CP S13 (G2)	Peixes imunizados com PBS + Adjuvante e desafiados com linhagem S13
CP S73 (G3)	Peixes imunizados com PBS + Adjuvante e desafiados com linhagem S73
VAC CM Dsf S13 (G4)	Peixes imunizados com vacina comercial e desafiados com linhagem S13
VAC CM Dsf S73 (G5)	Peixes imunizados com vacina comercial e desafiados com linhagem S73
VAC S13 Dsf S13 (G6)	Peixes imunizados com vacina linhagem S13 e desafiados com linhagem S13
VAC S13 Dsf S73 (G7)	Peixes imunizados com vacina linhagem S13 e desafiados com linhagem S73
VAC S73 Dsf S13 (G8)	Peixes imunizados com vacina linhagem S73 e desafiados com linhagem S13
VAC S73 Dsf S73 (G9)	Peixes imunizados com vacina linhagem S73 e desafiados com linhagem S73
VAC Bi Dsf S13 (G10)	Peixes imunizados com vacina linhagens S13 e S73 e desafiados com linhagem S13
VAC Bi Dsf S73 (G11)	Peixes imunizados com vacina linhagens S13 e S73 e desafiados com linhagem S73
VAC Bi Dsf S13 S73 (G12)	Peixes imunizados com vacina linhagens S13 e S73 e desafiados com linhagens S13 e S73

144 * PBS Tampão fosfato-salino

145

146

147 **5. Desafio Pós-Vacinal**

148 Após 21 dias da última dose da vacina, o desafio bacteriano foi realizado e os
 149 animais foram expostos aos isolados S13 e S73, de acordo com seu grupo experimental,
 150 na dosagem de $7,6 \times 10^9$ UFC/peixe por via intraperitoneal.

151

152 **6. Avaliação dos Efeitos Pós-Imunização**

153 Após o desafio, os peixes foram observados três vezes ao dia, durante 23 dias,
 154 quanto à mortalidade e a ocorrência de sinais clínicos como anorexia, natação errática,
 155 letargia, exoftalmia, opacidade de córnea uni ou bilateral e os óbitos.

156

157 **7. Reisolamento e Diagnóstico Microbiológico**

158 Os animais que vieram a óbito foram submetidos ao diagnóstico microbiológico
159 para reisolamento bacteriano em meio de cultura ágar Nutriente com 5% de sangue
160 ovino desfibrinado. Para isso, fragmentos do cérebro foram semeados, de acordo as
161 características morfológicas das colônias, coloração de gram, hemólise em ágar sangue,
162 provas da catalase, teste CAMP, somente para o isolado S73 [14] e prova de
163 soroadglutinação utilizando o Latex Assay kit® (Immulex™ *Streptococcus* Group B
164 Type Ib, Statens Serum Institut, Denmark) somente para o isolado S13, associados com
165 a patogenia observada, os microrganismos foram identificados

166 Ao final do experimento todos os animais sobreviventes foram eutanasiados por
167 imersão em benzocaína (200 mg/L por 60s) e submetidos ao diagnóstico microbiológico
168 para confirmação do *status* de livres de *S. agalactiae*.

169

170 **8. Análise Estatística**

171 Para verificar a significância estatística entre a mortalidade dos grupos
172 vacinados e do grupo controle, utilizou-se o teste exato de Fisher, com nível de
173 significância de 5%. Para isso, utilizou-se o programa estatístico OpenEpi versão 3.01.
174 A eficácia da vacina foi calculada como porcentagem de sobrevivência relativa (RPS),
175 $RPS = [1 - (\% \text{ mortalidade dos animais vacinados} / \% \text{ mortalidade dos animais}$
176 $\text{controle})] \times 100$ [15].

177

178 **9. Resultados**

179 9.1. Eficácia da Vacina

180 A eficácia das vacinas monovalentes foi observada nos grupos desafiados com
181 os isolados homólogos aos das vacinas, apresentando RPS maiores que 50%. Os grupos
182 que receberam as vacinas bivalentes demonstraram maior proteção quando desafiados
183 com os dois isolados (RPS = 96.16%) (Tabela 2). Não houve diferença significativa
184 entre a eficiência protetiva da vacina com o isolado S13 produzida pelo LABBEP e a
185 vacina comercial ($p > 0,05$).

186

187

188

189 **Tabela 2** - Eficácia de vacina bivalente (sorotipos Ib e III) contra *Streptococcus*
 190 *agalactiae* em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) mantidas em condições
 191 experimentais.

Tratamentos	Óbitos/Total (%)	p valor	RPS ^a
VAC CM Dsf S13	2/38 (5.26)	0,000*	82.4561
Controle S13	13/40 (30)		
VAC CM Dsf S73	15/40 (37.5)	0,312	10.9375
Controle S73	16/38 (42.10)		
VAC S13 Dsf S13	4/33 (12.12)	0,001*	59.596
Controle S13	13/40 (30)		
VAC S13 Dsf S73	17/38 (44.73)	0,397	-6.25
Controle S73	16/38 (42.10)		
VAC S73 Dsf S13	8/35 (22.85)	0,162	23.8095
Controle S13	13/40 (30)		
VAC S73 Dsf S73	3/38 (7.89)	0,000*	81.25
Controle S73	16/38 (42.10)		
VAC Bi Dsf S13	4/35 (11.42)	0,001*	61.9048
Controle S13	13/40 (30)		
VAC Bi Dfs S73	3/36 (8.33)	0,000*	80.2083
Controle S73	16/38 (42.10)		
VAC Bi Dsf Bi	1/36 (2.77)	0,000*	96.1581

192 *As diferenças foram consideradas significativas em $P < 0,05$ no Teste Exato de Fisher.

193 ^a Porcentagem relativa de sobrevivência.

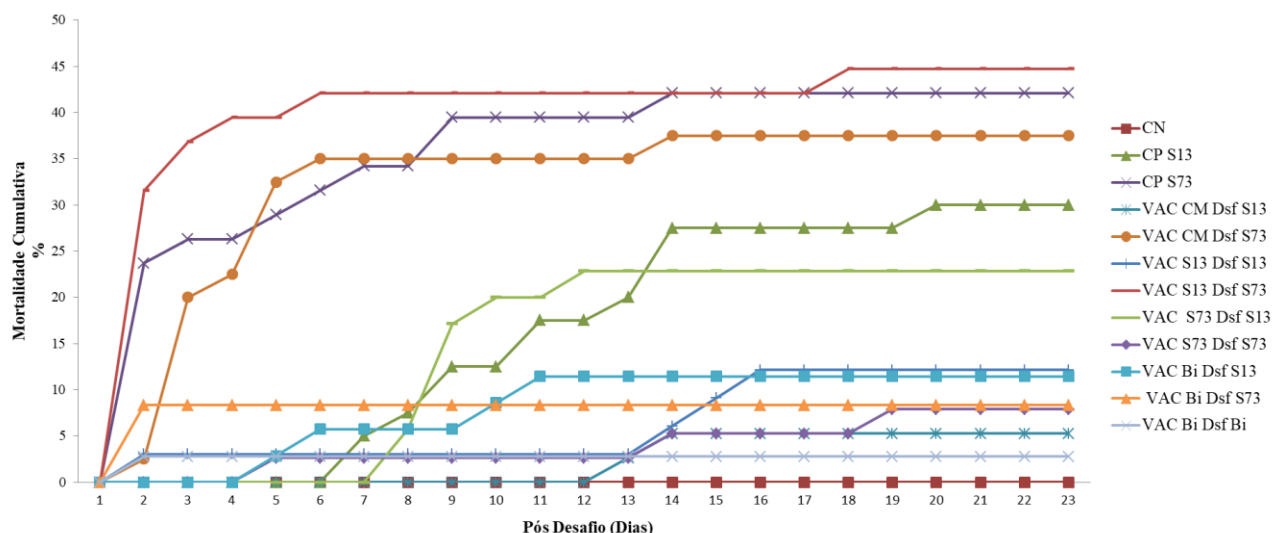
194

195

196 9.2. Mortalidade Cumulativa

197 A média da mortalidade percentual dos grupos imunizados com as vacinas
 198 monovalentes foi de 21.72%, demonstrando menores taxas para os grupos desafiados
 199 com os isolados homólogos aos das vacinas, e a média da mortalidade percentual dos
 200 grupos imunizados com a vacina bivalente foi de 7.5%. O grupo VAC S13 Dsf S73
 201 apresentou maior taxa de mortalidade (44.73%) entre todos os grupos vacinados e o
 202 grupo VAC Bi Dsf Bi a menor taxa (2.77%). A mortalidade dos controles positivos foi
 203 maior no grupo CPS73 (42.10%) comparado ao grupo CPS13 (32.5%). Os grupos
 204 vacinados foram significativamente protegidos, em comparação aos não vacinados
 205 (Figura 1).

206



207
 208 **Figura 1 - Mortalidade cumulativa de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) aos**
 209 **23 dias pós desafio experimental.** As tilápias foram vacinadas com VAC CM, VAC
 210 S13, VAC S73, VAC Bi (S13 e S73) e PBS (grupo controle) no dia 0. Esses grupos
 211 foram desafiados contra *S. agalactiae* aos 21 dias após a imunização e a mortalidade foi
 212 observada durante 23 dias após o desafio.

213

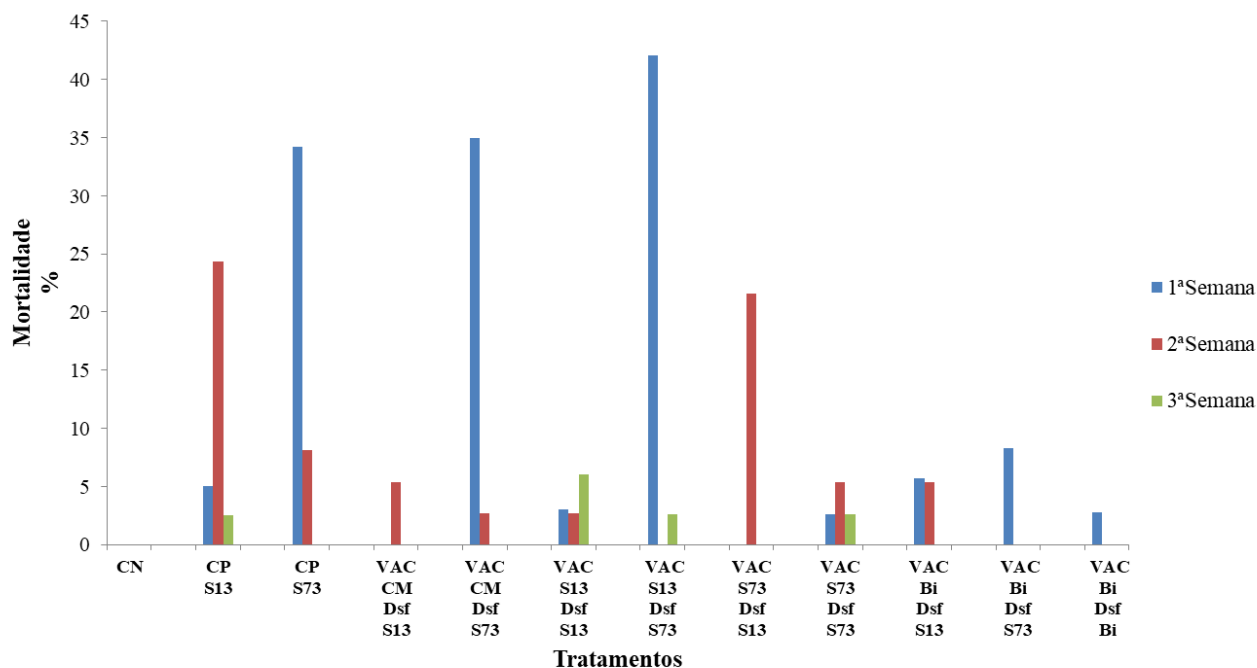
214 9.3. Efeitos Pós-Vacinal

215 A mortalidade nos peixes teve início a partir da primeira semana pós desafio,
 216 para o grupo controle positivo e para os grupos vacinados desafiados com o isolado
 217 S73, com um pico no segundo dia para os grupos CPS73, VAC CM Dsf S73 e VAC
 218 S73 Dsf S73. Os peixes não apresentaram sinais clínicos, caracterizando-se como uma
 219 doença de evolução aguda.

220 A partir da segunda semana os grupos desafiados com o isolado S13, grupo
 221 controle positivo e grupos vacinados, começaram a morrer, com um pico no 14º dia para
 222 o grupo CPS13 e no 9º dia para o grupo VAC S13. Inicialmente os peixes apresentaram
 223 letargia e anorexia evoluindo para exoftalmia uni e bilateral, opacidade de córnea e
 224 natação errática, caracterizando-se como uma doença de evolução crônica. A partir da
 225 terceira semana, observou-se uma recuperação gradativa para todos os grupos e taxas
 226 menores de mortalidade quando comparadas à primeira e segunda semanas (Figura 2).

227 A necropsia, todos os animais que vieram a óbito após o desafio apresentaram
 228 lesões macroscópicas características de estreptococcia (septicemia e meningoencefalite).
 229 Dos sobreviventes eutanasiados, apenas os grupos controles, CN e CPS73, e o grupo
 230 vacinado, VAC CM Dsf S13, não apresentaram lesões.

231



232 **Figura 2** - Percentagem de mortalidade de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*)
 233 vacinadas contra *Streptococcus agalactiae* de acordo com as 3 semanas pós desafio
 234 experimental.
 235
 236

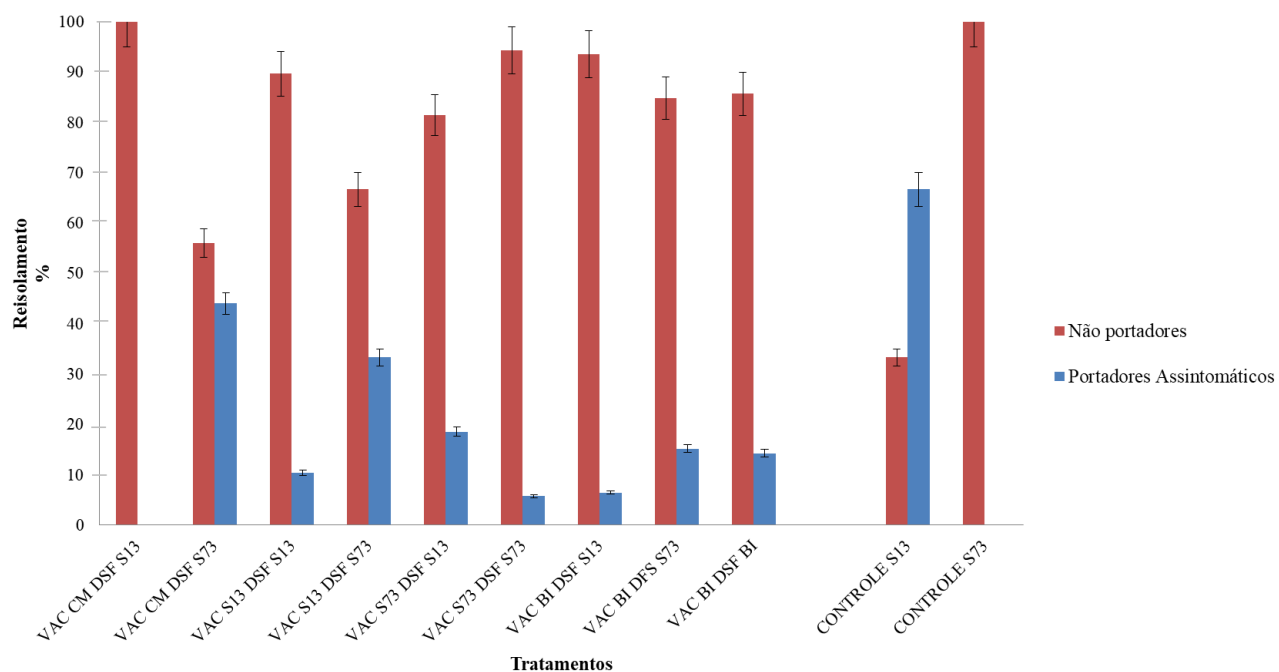
237

238 9.4. Reisolamento e Diagnóstico Microbiológico

239 Todos os animais que vieram a óbito pós-desafio apresentaram 100% de
 240 isolamento bacteriano, demonstrando no exame bacteriológico as mesmas
 241 características morfológicas e bioquímicas do isolado utilizado no desafio. Dos
 242 sobreviventes eutanasiados submetidos ao diagnóstico bacteriológico, os grupos
 243 controles, CN e CPS73, assim como o grupo vacinado, VAC CM Dsf S13, não
 244 apresentaram isolamento bacteriano, ao contrário dos demais grupos, que se
 245 comportaram como portadores da doença. Os grupos que receberam as vacinas
 246 monovalentes e foram desafiados com isolados homólogos aos da vacina apresentaram
 247 menores taxas de reisolamento quando comparados aos grupos que foram desafiados
 248 com isolados heterólogos, sendo o grupo VAC CM Dsf S73 o que apresentou maior
 249 taxa de isolamento (44%).

250 Os grupos que foram imunizados com a vacina bivalente apresentaram maior
 251 taxa de reisolamento quando desafiados com o isolado S73 (15.15%) em comparação
 252 aos desafiados com o isolado S13 (6.45%), e o grupo controle CPS13 apresentou maior
 253 taxa de reisolamento quando comparado a todos os grupos (66.67%) (Figura 3).

254



255 **Figura 3** - Percentagem de reisolamento bacteriano de tilápias do Nilo (*Oreochromis*
 256 *niloticus*) sobreviventes pós desafio experimental consideradas portadores
 257 assintomáticos para *Streptococcus agalactiae*.
 258
 259

260 10 Discussão

261 Os resultados deste estudo mostraram que a vacina bivalente inativada produzida
 262 com dois sorotipos da bactéria *S. agalactiae*, sorotipo Ib e III, e administrada por via
 263 intraperitoneal, forneceu uma melhor proteção (RPS de 96.16%) quando comparada às
 264 outras bacterinas monovalentes (RPS acima de 50% para as vacinas). Em estudo
 265 semelhante, Evans et al. [16] demonstraram que a vacina inativada para *S. agalactiae*
 266 (Ib), administrada de forma intraperitoneal, forneceu uma excelente proteção às tilápias
 267 (RPS de 80 % em tilápias de 30g e RPS de 25% em tilápias de 5g) quando comparada
 268 ao banho de imersão (RPS de 35% em tilápias de 30g e 34% em tilápias de 30g).
 269 Entretanto, desafiaram os peixes com doses menores (1.5×10^4 UFC/peixe) quando
 270 comparado à dose infectante utilizada no presente trabalho (7.6×10^9 UFC/peixe).

271 Neste estudo, a RPS foi acima de 80% para a vacina inativada bivalente,
 272 demonstrando uma alta proteção frente ao desafio experimental, acima dos valores
 273 frequentemente encontrados em outros estudos. A presente pesquisa também revelou
 274 que os grupos desafiados com os sorotipos homólogos aos da vacina obtiveram uma
 275 proteção significativa (RPS acima de 50%) quando comparados aos grupos controle
 276 positivo de cada patógeno. Contudo, o mesmo não pode ser verificado quando o desafio
 277 foi realizado com sorotipos heterólogos aos da vacina. Estudos já realizados em outras

278 espécies também demonstraram que não há proteção cruzada entre os diferentes
279 sorotipos de *S. agalactiae* [17,18,19].

280 Chideroli et al. [5], em 2017, em um surto de mortalidade na região nordeste do
281 Brasil, isolaram o sorotipo III GBS (*Streptococcus* grupo B de Lancefield) de tilápias
282 com sinais de estreptococose previamente imunizadas com a vacina comercial contendo
283 a bactéria considerada altamente virulenta e resistente a antibacterianos. Desta forma, os
284 autores sugeriram que a vacina comercial não protege contra o novo sorotipo, o que
285 reforça a importância dos resultados positivos (RPS 96.16%) com a vacina bivalente
286 observados no presente estudo.

287 Em estudo também realizado com tilápias do Nilo (*O. niloticus*), os autores
288 demonstraram que uma vacina bacterina polivalente, produzida com isolados de três
289 bactérias (*Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus durans*),
290 administrada por diferentes vias (intraperitoneal, oral e imersão), aumentava
291 significativamente a resposta imunológica dos peixes pós desafio, em comparação aos
292 não vacinados, sendo a via intraperitoneal a que apresentou melhor e mais rápida
293 resposta imune [20]. A eficácia das vacinas produzidas com mais de um isolado ocorre
294 devido ao aumento de epítopos, receptores específicos, proliferação de células e
295 proteínas específicas, gerados quando os animais são expostos a mais de um antígeno. O
296 reconhecimento leva à produção de células T de memória, que persistirá após a infecção
297 [21].

298 Inúmeros estudos estão sendo realizados a fim de desenvolver vacinas
299 produzidas com mais de um antígeno, que estimulem melhores respostas imunológicas
300 nos peixes contra infecções causadas pela bactéria *S. agalactiae*. Os resultados
301 mostraram que as combinações das proteínas recombinantes com as células inteiras
302 desencadearam uma maior e melhor resposta imune quando comparado às vacinas
303 individuais [22,23]. Entretanto, o número e as características de cada cepa e/ou
304 componente da célula bacteriana que será selecionada para a produção das vacinas com
305 mais de um antígeno devem ser cuidadosamente elegidos para evitar efeitos inibitórios
306 na resposta específica dos peixes [24].

307 O presente estudo evidenciou diferentes tempos de mortalidade pós imunização
308 entre os tratamentos, de acordo com o comportamento e as características de cada cepa
309 para *S. agalactiae*, demonstrando a evolução da doença e o aparecimento de sinais
310 clínicos. Assim, o grupo controle positivo para a cepa S13 e os tratamentos desafiados
311 com esta cepa, apresentaram uma doença de característica crônica com o aparecimento

312 de sinais clínicos e óbitos a partir da segunda semana, com picos no 15º dia. Já, para o
313 controle positivo para a cepa S73 e os grupos desafiados com a cepa, a doença
314 apresentou-se de forma aguda, com óbitos na primeira semana e picos de mortalidade já
315 no segundo dia. Os sinais de infecção por *S. agalactiae* na tilápia tipicamente incluíram
316 sinais clínicos agudos como septicemia, exoftalmia, opacidade da córnea, melanose,
317 anormalidades de natação, inchaço e hemorragia nos órgãos internos [25,26]. A morte
318 geralmente ocorre dentro de um curto período de aproximadamente 10 dias [27].

319 Corroborando com este estudo, Longhi et al. [28] ao testarem uma vacina
320 inativada para *S. agalactiae* (Ib), em doses diferentes, após o desafio evidenciaram
321 mortalidade dos peixes a partir do segundo dia, com pico entre o oitavo e décimo dia.
322 Além disso, a partir do 11º dia após o desafio recuperaram gradativamente o apetite,
323 assim como na presente pesquisa, em que se observou uma recuperação gradativa e
324 diminuição da mortalidade a partir da terceira semana do experimento.

325 Adicionalmente, enquanto o início da doença e a observação clínica nos
326 permitiram diferenciar os sorotipos com base nos sinais evidentes e sua evolução, os
327 achados patológicos na necropsia revelaram que as infecções pelo isolado S13 ou S73
328 apresentaram características comuns de meningoencefalite e septicemia nos grupos
329 controles positivos que vieram a óbito.

330 Deve-se ressaltar que alguns animais sobreviventes dos grupos que receberam a
331 vacina bivalente apresentaram-se assintomáticos e sem lesões macroscópicas presentes.
332 Suwannasang et al. [29], avaliando as manifestações patológicas da estreptococose de
333 acordo com os dias após a infecção com *S. agalactiae* para os sorotipos, Ia e III,
334 revelaram que o sorotipo III apresentou sinais característicos da doença em poucos
335 indivíduos de peixe quando comparado ao sorotipo Ia. Isso ocorreu devido a
336 mortalidade precoce causada pelo sorotipo III, já para o sorotipo Ia a mortalidade foi
337 mais tardia o quadro clínico foi mais evidente. De forma similar, os dados aqui
338 apresentados são semelhantes para o sorotipo III e, adicionalmente, o sorotipo Ib se
339 comportou com um padrão similar ao sorotipo Ia do estudo supracitado.

340 Neste trabalho, com exceção do grupo controle para o isolado S73 e do grupo
341 VAC CM desafiado com seu isolado homólogo, houve reisolamento bacteriano das
342 tilápias amostradas e sobreviventes a infecção. Este resultado revela melhor eficácia e
343 segurança da vacina comercial disponível no país. A presença de portadores
344 assintomáticos, como observado na presente pesquisa, é de fato algo que ocorre com
345 frequência na estreptococose. Isso acontece porque a bactéria consegue atravessar a

346 barreira hematoencefálica e sobreviver dentro dos fagócitos, se protegendo dos
347 mecanismos de defesa do hospedeiro [30].

348 Mian et al. [2] demonstraram que animais saudáveis quando tiveram contato
349 direto com peixes assintomáticos, portadores da bactéria, e que foram introduzidos ao
350 plantel, apresentaram sinais clínicos da estreptococose após 24 a 72 horas e, após 10
351 dias, apresentaram 100% de mortalidade dos peixes. Cumley et al. [31] evidenciaram
352 que não há diferenças significativas entre sorotipos na capacidade de sobrevivência
353 dentro dos fagócitos do hospedeiro. Os autores ainda sugeriram que as diferenças na
354 virulência e epidemiologia da estreptococose podem ocorrer por diferenças na
355 colonização ou no crescimento extracelular, já que expressam proteínas de superfície na
356 parede celular da bactéria que resultam em maior aderência ao epitélio do hospedeiro.
357 Logo, a presença de portadores assintomáticos para a estreptococose é um grande e
358 frequente problema à biossegurança nos plantéis, pois pode favorecer a permanência do
359 agente, levando a recidivas da doença e a difícil erradicação dessa importante doença na
360 produção de tilápia.

361

362 **11. Conclusão**

363 A vacina bivalente para *S. agalactiae*, produzida com os isolados S13 e S73,
364 apresentou elevada eficácia e sobrevivência significativa das tilápias imunizadas quando
365 comparada às outras bacterinas monovalentes. Entretanto, uma pequena proporção
366 (14.28%) dos animais sobreviventes imunizados com a vacina bivalente permaneceu
367 como portadores assintomáticos da bactéria.

368

369 **Agradecimentos**

370 Este trabalho foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento
371 Científico e Tecnológico (CNPq - número de concessão da bolsa 133800/2017-2).
372 Agradecemos o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
373 Superior (CAPES) através do programa de pós-graduação em Ciência Animal,
374 Universidade Estadual de Londrina - Paraná - Brasil.

375

376 **Referências**

377 [1] Evans J, Klesius P, Shoemaker C. An overview of *Streptococcus* in warmwater fish.
378 Aquacult Health Int. 2006; 7: 10-14.

- 379 [2] Mian GF, Godoy DT, Leal CAG, Yuhara TY, Costa GM, Figueiredo HCP. Aspects
380 of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia. Vet
381 Microbiol 2009; 136:180-3.
- 382 [3] Conroy G. Estreptococosis en tilapia: prevalencia de las especies de *Streptococcus*
383 en América Latina y sus manifestaciones patológicas. In: Conroy G. Memorias de
384 *Streptococcus* en peces de aguas cálidas. Veracruz: Intervet; 2009. p. 15-20.
- 385 [4] Slotved HC, Kong F, Lambertsen L, Sauer S, Gilbert GL. Serotype IX, a Proposed
386 New *Streptococcus agalactiae* Serotype. J Clin Microbiol. 2007 Sep;45(9):2929-36.
387 Disponível em: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.00117-07>. Acesso em: 26 set.
388 2018.
- 389 [5] Chideroli RT, Amoroso N, Mainardi RM, Suphoronski SA, Padua SB, Alfieri AF, et
390 al. Emergence of a new multidrug-resistant and highly virulent serotype of
391 *Streptococcus agalactiae* in fish farms from Brazil. Aquaculture 2017; 479:45–51.
- 392 [6] FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. The state of world
393 fisheries and aquaculture, Roma; 2018. Disponível em:
394 <http://www.fao.org/fishery/sofia/en>. Acesso em: 20 nov. 2018.
- 395 [7] Little DC, Murray FJ, Leschen W, Boyd K, Watterson A, Young A. Options for
396 producing a warm water fish in the UK: limits to 'Green Growth'? Trend Food Scienc
397 Technol. 2008; 19: 255-264.
- 398 [8] Evans JJ, Klesius PH, Gilbert PM, Shoemaker CA, Sarawi MA, Landsberg J, et al.
399 Characterization of β -haemolytic Group B *Streptococcus agalactiae* in cultured
400 seabream, *Sparus auratus* L., and wild mullet, *Liza klunzingeri* (Day), in Kuwait. J Fish
401 Diseases. 2002; 25(12):505–13
- 402 [9] Chu C, Huang PY, Chen HM, Wang YH, Tsai I, Lu CC. et al. Genetic and
403 pathogenic difference between *Streptococcus agalactiae* serotype Ia fish and human
404 isolates. BMC Microbiol. 2016; 16(1): 1–9.
- 405 [10] Evensen, Ø. Development in fish vaccinology with focus on delivery
406 methodologies, adjuvants and formulations Development in fish vaccinology with focus
407 on delivery methodologies, adjuvants and formulations; 2009.
- 408 [11] Toranzo A, Romalde J, Magarinos B, Barja, J. Present and future of aquaculture
409 vaccines against fish bacterial diseases. Option. 2009; 86: 155–176.
- 410 [12] Godoy DT, Carvalho-Castro GA, Leal CA, Pereira UP, Leite RC, Figueiredo HC.
411 Genetic diversity and new genotyping scheme for fish pathogenic *Streptococcus*
412 *agalactiae*. Letters in Appl Microbiol. 2013; 57(6): 476-83.
- 413 [13] Furuya WM, Pezzarto LE, Pezzato AC, Barros MM, Miranda EC. Coeficientes de
414 Digestibilidade e Valores de Aminoácidos Digestíveis de Alguns Ingredientes para
415 Tilápia (*Oreochromis niloticus*). Rev Bras Zootec. 2001; 30 (4): 1129-143.
- 416 [14] Pereira UP, Mian GF, Oliveira IC, Benchetrit LC, Costa GM, Figueiredo HC.
417 Genotyping of *Streptococcus agalactiae* strains isolates from fish, human and cattle and
418 their virulence potential in Nile tilapia. Vet Microbiol. 2010; 140(1): 186-92.

- 419 [15] Amend DF. Potency testing of fish vaccines. *Develop Biolog Standardizat.* 1981;
420 49:447-54.
- 421 [16] Evans JJ, Klesius PH, Shoemaker CA. Efficacy of *Streptococcus agalactiae* (group
422 B) vaccine in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by intraperitoneal and bath immersion
423 administration. *Vaccine* 2004; 22(27-28): 3769–773.
- 424 [17] Le Doare K, Heath PT. An overview of global GBS epidemiology. *Vaccine.* 2013;
425 31(4):D7–D12.
- 426 [18] Nuccitelli A, Rinaudo CD, Maione D. Group B *Streptococcus* vaccine: state of the
427 art. *Therap Adv Vaccines.* 2015; 3(3): 76–90.
- 428 [19] Suwannasang A, Suanyuk N, Issaro A, Wutiporn P. Growth, immune responses
429 and protection of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* immunized with formalin-killed
430 *Streptococcus agalactiae* serotype Ia and III vaccines. *Songklanakarin J SciencTechnol.*
431 2017; 39(4): 429-37.
- 432 [20] Silva BC, Martins ML, Jatobá A, Buglione Neto CC, Vieira FN, Pereira GV, et al.
433 Hematological and immunological responses of Nile tilapia after polyvalent vaccine
434 administration by different routes. *Pes Vet Bras.* 2009; 29(11): 874-80.
- 435 [21] Magnadottir B. Immunological control of fish diseases. *Marine Biotechnology.*
436 2010; 12:361-79.
- 437 [22] Wang YT, Huang HY, Tsai MA, Wang PC, Jiang BH, Chen SC. Phosphoglycerate
438 kinase enhanced immunity of the whole cell of *Streptococcus agalactiae* in tilapia,
439 *Oreochromis niloticus*. *Fish Shellfish Immunol.* 2014; 41(2): 250–9.
440 doi:10.1016/j.fsi.2014.09.008.
- 441 [23] Dobrut A, Brzozowska E, Górska S, Pyclik M, Gamian A, Bulanda M, et al.
442 Epitopes of Immunoreactive Proteins of *Streptococcus Agalactiae*: Enolase, Inosine 5'-
443 Monophosphate Dehydrogenase and Molecular Chaperone GroEL. *Front Cell Infect*
444 *Microbiol.* 2018; 8:1–12. doi:10.3389/fcimb.2018.00349.
- 445 [24] Nikoskelainen S, Verho S, Jarvinen S, Madetoja J, Wiklund T, Lilius EM. Multiple
446 whole bacterial antigens in polyvalent vaccine may result in inhibition of specific
447 responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology.*
448 2007; 22:206–217. doi:10.1016/j.fsi.2006.04.010.
- 449 [25] Chen M, Wang R, Li LP, Liang WW, Li J, Huang Y, Lei AY, et al. Screening
450 vaccine candidate strains against *Streptococcus agalactiae* of tilapia based on PFGE
451 genotype. *Vaccine.* 2012; 30(42): 6088–92.
- 452 [26] Ye X, Li J, Lu M, Deng G, Jiang X, Tian Y, et al. Identification and molecular
453 typing of *Streptococcus agalactiae* isolated from pond-cultured tilapia in China.
454 *Fisheries Scienc.* 2011; 77: 623–32.
- 455 [27] Li YW, Liu L, Huang PR, Fang W, Luo ZP, Peng HL, et al. Chronic
456 streptococcosis in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), caused by *Streptococcus*
457 *agalactiae*. *J Fish Diseases.* 2014; 37(8): 757-63.

- 458 [28] Longhi E, Pretto-Giordano LG, Müller EE. Avaliação da eficácia de vacina
459 autóctone de *Streptococcus agalactiae* inativado aplicada por banho de imersão em
460 tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Semina: Ciênc Agrár. 2012; 33: 3191-200.
- 461 [29] Suwannasang A, Dangwetngam M, Issaro A, Phromkunthong W, Suanyuk N.
462 Pathological manifestations and immune responses of serotypes Ia and III *Streptococcus*
463 *agalactiae* infections in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Songklanakarin J Scienc
464 Technol. 2014; 36(5): 499-506.
- 465 [30] Agnew W, Barnes AC. *Streptococcus iniae*: an aquatic pathogen of global
466 veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination. Vet
467 Microbiol. 2007; 122(1-2): 1-15.
- 468 [31] Cumley NJ, Smith LM, Anthony M, May RC. The CovS/CovR acid response
469 regulator is required for intracellular survival of group B *Streptococcus* in macrophages.
470 Infect Immunit. 2012; 80(5): 1650–61.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Novos estudos estão sendo realizados com o intuito de melhorar limitações da vacina bivalente para que com isso, um melhor controle da presença do patógeno possa ser alcançado nas tilapiculturas nacionais.