



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ANDRÉ ROCHA BARBOSA

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR E OCORRÊNCIA DE  
*Streptococcus iniae* EM TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis  
niloticus*) DE CRIAÇÃO INTENSIVA**

---

Londrina  
2015

ANDRÉ ROCHA BARBOSA

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR E OCORRÊNCIA DE  
*Streptococcus iniae* EM TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis  
niloticus*) DE CRIAÇÃO INTENSIVA**

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

Orientador: Dr. Laurival Antônio Vilas Bôas

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lucienne Garcia Pretto-Giordano

Londrina  
2015

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

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

B238d Barbosa, André Rocha.

Diagnóstico molecular e ocorrência de *Streptococcus iniae* em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) de criação intensiva / André Rocha Barbosa. – Londrina, 2015. 39 f. : il.

Orientador: Laurival Antônio Vilas-Boas.

Coorientador: Lucienne Garcia Pretto-Giordano.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Tilápia (Peixe) – Teses. 2. Peixe – Doenças – Teses. 3. Estreptococo – Diagnóstico molecular – Teses. 4. Reação em cadeia de polimerase – Teses. I. Vilas-Boas, Laurival Antônio. II. Pretto-Giordano, Lucienne Garcia. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. IV. Título.

CDU 597.583.4

ANDRÉ ROCHA BARBOSA

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR E OCORRÊNCIA DE *Streptococcus iniae* EM TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*) DE CRIAÇÃO INTENSIVA**

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Prof. Dr. Carlos Roberto Maximiano da Silva  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Celso Duarte Carvalho Filho  
Universidade Federal da Bahia – UFBA

Londrina, 25 de Março de 2015

## **Dedico**

A *Deus* por permitir e inspirar todo o curso de  
minha vida acadêmica.

Aos meus pais, *Benedito Aparecido Barbosa* e  
*Uani Rocha Barbosa*, pelo exemplo e suporte em  
todos os momentos.

Aos meus irmãos *Felipe* e *Paula*, pela alegria de  
sermos família.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por me permitir viver à luz do conhecimento, por me inspirar e me conduzir em todos os momentos de minha vida.

Aos meus pais Benedito Barbosa e Uani Barbosa que não mediram esforços para que eu conseguisse chegar até aqui. Vocês são o exemplo de tudo o que eu quero ser um dia.

Aos meus irmãos Felipe e Paula, por me ensinar todos os dias ser uma pessoa mais humana.

À minha incrível namorada Deborah Rocha da Graça, por seu companheirismo, compreensão, amizade e incentivo em toda essa árdua etapa. Obrigado por cuidar de mim.

Aos meus orientadores Prof. Dr. Laurival Antônio Vilas Boas e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lucienne Garcia Pretto-Giordano pela oportunidade, confiança, compreensão, paciência, ensinamentos e principalmente pela amizade construída. Vocês são demais!

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Maximiano da Silva e Prof Dr. Celso Duarte Carvalho Filho por terem aceitado participar da banca examinadora e contribuir com o presente trabalho.

Aos meus colegas de trabalho Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gislayne Vilas-Boas, Josiane Scarpassa, Ana Paula Ricietto, Fernanda Fazon, Gabriel Marcos, Priscila Cardoso, André Nadal, Fernanda Henrique, Carla Suzuki, por todo apoio, incentivo, ensinamentos, pela ótima companhia e amizade.

À coordenadora do programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da UEL, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Ana Lúcia Dias, por toda colaboração, apoio e voto de confiança.

Aos meus queridos amigos biólogos Danilo Bruxelas, Alan Lorenzetti e Eddie Imada, por toda a amizade e incontáveis momentos reflexivos que me fazem hoje ser uma pessoa melhor. Vocês são os melhores cientistas que conheço.

Ao grande amigo e psicólogo Dainon Machado, pela amizade e confiança, e por todas as vezes que acreditou em mim mais do que eu mesmo.

Aos meus incríveis amigos de toda a vida Thiago Bittencourt, Guilherme Tramontina, Rogerio Cardoso, Rafael Passeti, Jean Dadaltt, por terem feito parte do

que eu já fui, do que eu sou, e do que eu serei. Obrigado pela alegria de todos os momentos.

À Luciana Zanella por cuidar de mim com tamanha competência, dedicação e carinho. Perco-me entre as palavras que explicitariam a real gratidão e admiração que tenho por você. Muito obrigado!!!

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

A CAPES e CNPQ, pela bolsa concedida e todo o suporte à pesquisa realizada.

BARBOSA, André Rocha. **Diagnóstico molecular e ocorrência de *Streptococcus iniae* em tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) de criação intensiva.** 2015. 39 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

## RESUMO

O consumo de proteína animal aumentou expressivamente nos últimos 50 anos. O aumento populacional e a melhoria das condições de vida em países emergentes estão entre os fatores responsáveis pela crescente demanda de proteína animal. O Brasil é um país que possui condições de suprir essa demanda, sobretudo por meio da aquicultura. No entanto, o crescimento da produção de peixes no Brasil sem uma política de desenvolvimento aumentou a ocorrência de doenças bacterianas, principalmente as causadas por estreptococos. *Streptococcus iniae* e *Streptococcus agalactiae* são as principais espécies responsáveis por mortalidade e morbidade de peixes na criação intensiva de todo o mundo, entretanto *S. iniae* foi identificado apenas uma vez no Brasil. O presente estudo investigou a ocorrência de *S. iniae* em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) coletadas durante um ano, em propriedades de criação intensiva. Foram coletados 10 peixes por propriedade a cada estação do ano, e amostras de encéfalo, rim e fígado foram utilizadas para a pesquisa por PCR. Dentre os 185 peixes analisados, 13 (7,06%) foram positivos para a PCR *S. iniae*-específica. Entre os peixes positivos, 76,92% (10/13) não apresentaram sinais clínicos de estreptococose e 69,23% (9/13) apresentaram infecção por *S. agalactiae* e *S. iniae*. Esses resultados evidenciaram a necessidade da utilização de técnicas sensíveis no monitoramento de doenças bacterianas em peixes. A ocorrência de *S. iniae* ao longo de todo o ano sugere que essa bactéria possa estar estabelecida nas propriedades pesquisadas. Esse é o primeiro estudo de ocorrência de *S. iniae* em peixes de criação do Brasil e primeiro relato de coinfeção de *S. iniae* e *S. agalactiae* em peixes.

**Palavras-chave:** PCR. Coinfeção. Estreptococose. Assintomáticos.

BARBOSA, André Rocha. **Molecular diagnosis and occurrence of *Streptococcus iniae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from intensive production.** 2015. 39 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

### ABSTRACT

The consumption of animal protein has increased significantly in the last 50 years. Population growth and improved living conditions in emerging countries are among the factors responsible for the growing demand for animal protein. Brazil is a country that can supply this demand, especially through aquaculture. However, the growth of fish production in Brazil without a development policy has increased the occurrence of bacterial diseases, mainly those caused by streptococci. *Streptococcus iniae* and *Streptococcus agalactiae* are the main species responsible for fish mortality and morbidity in intensive breeding throughout the world, although *S. iniae* was only identified once in Brazil. The present study investigated the occurrence of *S. iniae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) collected during one year in intensive farms. Ten fish per property were collected at each season of the year, and brain, kidney and liver samples were used for PCR analysis. Among the 185 fish analyzed, 13 (7.06%) were positive for *S. iniae*-specific PCR. Among the positive fish, 76.92% (10/13) did not present clinical signs of streptococcosis and 69.23% (9/13) had *S. agalactiae* and *S. iniae* infection. These results evidenced the need for the use of sensitive techniques in the monitoring of bacterial diseases in fish. The occurrence of *S. iniae* throughout the year suggests that this bacterium may be established in the researched properties. This is the first study of the occurrence of *S. iniae* in farmed fish in Brazil and the first report of co-infection of *S. iniae* and *S. agalactiae* in fish.

**Keywords:** PCR. Coinfection. Streptococose. Asymptomatic

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>REVISÃO</b> .....	9
1.1.	PRODUÇÃO DE PESCADO .....	9
1.2.	TILÁPIA DO NILO ( <i>Oreochromis niloticus</i> ).....	10
1.3.	STREPTOCOCCUS INIAE.....	12
1.4.	DIAGNÓSTICO .....	14
<b>2.</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	16
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	21
3.1.	OBJETIVOS GERAIS .....	21
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	21
<b>4.</b>	<b>ARTIGO - Diagnóstico molecular e ocorrência de <i>Streptococcus iniae</i> em tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) de criação intensiva</b>	
	<b>Diagnóstico molecular e ocorrência de <i>Streptococcus iniae</i> em tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) de criação intensiva</b> .....	22
<b>5.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	25
<b>6.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	26
6.1.	CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS .....	26
6.2.	EXTRAÇÃO DE DNA DOS ÓRGÃOS .....	26
6.3.	INICIADORES PARA IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE <i>S. INIAE</i> .....	27
<b>6.3.1</b>	<b>Seleção dos iniciadores</b> .....	27
<b>6.3.2</b>	<b>Especificidade dos iniciadores</b> .....	28
<b>6.3.3</b>	<b>Limite de detecção dos iniciadores F_ <i>iniae</i> e R_ <i>iniae</i></b> .....	28
6.4.	DETECÇÃO DE <i>S. INIAE</i> POR PCR .....	28
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	30
7.1.	ESPECIFICIDADE DOS INICIADORES .....	30
7.2.	PCR NOS TECIDOS.....	31
<b>8.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	34
<b>9.</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	37

## 1. REVISÃO

### 1.1. PRODUÇÃO DE PESCADO

A demanda por proteína animal vem aumentando de forma expressiva no Brasil e no mundo, substituindo em partes a proteína vegetal na alimentação. Nos últimos quarenta anos, o consumo mundial per capita de carnes mais que dobrou, passando de 23kg por pessoa/ano em 1961 para 46,6kg em 2009 (FAO, 2009). Em países como China, Índia e Brasil, com populações elevadas, o aumento no poder aquisitivo das camadas mais pobres da população, permitiu uma melhora nas dietas alimentares, acompanhada de maior inserção das proteínas de origem animal (SIDÔNIO et al., 2012).

Existe uma forte correlação entre aumento da renda e maior consumo de carnes, até que, ao alcance de um ponto crítico, essa correlação não é mais observada. Mercados mais maduros e desenvolvidos, como os da América do Norte e Europa, estão próximos desse ponto e não devem apresentar grande crescimento. Assim, o maior aumento na demanda vem ocorrendo em mercados emergentes (PIGATO; SANTINI, 2010; SIDÔNIO et al., 2012). A *Food and Agriculture Organization* (FAO) estima que a população mundial passe de 7 bilhões para 8,3 bilhões em 2030, com maior densidade populacional nos países asiáticos, africanos e sul-americanos. Será necessário um aumento na produção mundial de 100 milhões de toneladas/ano para alimentar todo esse contingente. Apesar de não estar entre os maiores produtores mundiais, o Brasil é um dos poucos países que tem condições de atender a essa crescente demanda, sobretudo por meio da aquicultura. Com 12% da água doce disponível no planeta e um litoral de mais de oito mil quilômetros, o território brasileiro disponibiliza ótimas condições para se tornar um dos maiores produtores do mundo até 2030 (FITZSIMMONS, 2000; BRASIL, 2014).

A produção mundial de pescado tem apresentado crescimento substancial ao longo das últimas décadas. A média de crescimento de 3,2% ao ano vem superando o crescimento da população mundial, que é de 1,7% ao ano. No Brasil, a criação de pescado em cativeiro atingiu 628,7 mil toneladas em 2011, o que representou um crescimento do 31,1% em relação ao ano anterior (BRASIL, 2014). O consumo mundial per capita de pescado cresceu de 9,9kg nos anos 60 para 18,8kg em 2011,

ano esse em que a produção mundial de pescado foi de 154 milhões de toneladas (FAO, 2012). No Brasil, a média de consumo per capita ainda é bastante inferior à mundial, mas apresentou crescimento de 57% em 8 anos. Segundo dados do Ministério da Pesca e Aquicultura, essa média era de 6,5 kg/hab/ano em 2003, e chegou a 11,4 kg/hab/ano em 2011, valor muito próximo ao recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) que é de 12 kg/hab/ano.

## 1.2. TILÁPIA DO NILO (*OREOCHROMIS NILOTICUS*)

Dentre as variedades de espécies de peixes cultivadas em piscicultura no Brasil, a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) se destaca, respondendo por 38% do total da produção de peixes em cativeiro (SEBRAE, 2007). De 2003 a 2009 o seu crescimento na produção foi de 105%, chegando a 132.957 toneladas (BRASIL, 2014). A tilápia do Nilo pertence a família Cichlidae, que é formada por peixes de água doce e apresenta o nome tilápia a aproximadamente 70 espécies diferentes (FITZSIMMONS, 2000; HILSDORF, 2002). Estas espécies são naturais da África (APPLEYARD, et al., 2001), Israel e Jordânia (LOVSHIN, 1997) e muito utilizadas para a piscicultura de subsistência nos países em desenvolvimento. Dentre as espécies de tilápias cultivadas, a tilápia do Nilo é a principal (*O. niloticus*) (CREPALDI, 2006). Devido ao seu potencial para a aquicultura, nos últimos 50 anos houve uma grande distribuição e expansão do cultivo de tilápia pelo mundo (LOVSHIN, 1997). Atualmente encontra-se amplamente disseminada nas regiões tropicais e subtropicais, como o Sudeste Asiático (Indonésia, Filipinas e Formosa) e no Continente Americano (USA, México, Panamá e toda a América do Sul) (CARVALHO, 2006). No Brasil foi introduzida, em 1971, por intermédio do Departamento Nacional de Obras Contra a Seca (DNOCS) nos açudes do Nordeste, difundindo-se para todo o país (CASTAGNOLLI, 1996).

Trata-se de uma espécie tropical cuja temperatura ideal para seu desenvolvimento varia entre 25 °C e 30°C, tendo seu crescimento afetado abaixo de 15 °C e não resistindo a temperaturas por volta de 9 °C (CASTAGNOLLI, 1992; GONZÁLEZ; QUEVEDO, 2001; ONO; KUBITZA, 2003; CYRINO; CONTE, 2006).

A tilápia é um dos peixes com maior potencial para a aquicultura por apresentar características como precocidade, rápido crescimento, aceitação de grande variedade de alimentos, mesma resposta à ingestão de proteínas de origem

vegetal e animal, capacidade fisiológica de adaptar-se em diferentes ambientes e sistemas de produção, boa resistência a doenças, suporta altas densidades de estocagem e baixos teores de oxigênio dissolvido, apresenta ainda carne saborosa com baixo teor de gordura e de calorias, alto rendimento de filé (35% a 40%) e ausência de espinhos em forma de “Y” (mioceptos) (CASTAGNOLLI, 1992; ONO; KUBITZA, 2003; ZIMMERMANN; FITZSIMMONS, 2004; CYRINO; CONTE, 2006). Estudos realizados com tilápia do Nilo, que visaram determinar a digestibilidade de nutrientes e a energia digestível de vários ingredientes de origem vegetal e animal, mostraram que entre as espécies de água doce e de hábito alimentar onívoro, a tilápia tem se destacado pela elevada capacidade de digestão e utilização da energia, superando a carpa comum (*Cyprinus carpio*) e o bagre (*Clarias gariepinus*).

Dentre os principais problemas presentes na criação intensiva de tilápias, a questão sanitária se destaca. A septicemia causada por doenças bacterianas é responsável por altas taxas de mortalidade, levando a severas perdas econômicas para a aquicultura e indústrias de pescados (SURESH, 1998; EVANS et al., 2006). Estando em contato direto com o ambiente em que vivem, os peixes são afetados por todas as alterações que nele ocorrem. À contaminação ambiental somam-se os microrganismos, cujo aumento no ambiente geralmente está associado à baixa qualidade da água, principalmente em sistemas de confinamento. Nesses sistemas, a alta densidade de estocagem, e conseqüentemente, o arraçoamento intensivo associados à diminuição da concentração de oxigênio dissolvido, aumento de amônia, nitrito e gás carbônico, levam a uma situação de estresse para os peixes, tornando-os susceptíveis às doenças, principalmente de origem bacteriana, como as estreptococoses (SURESH, 1998; AGNEW; BARNES, 2007). Com o objetivo de minimizar os problemas causados pela estreptococose, muitas vezes o produtores utilizam de forma indiscriminada, antibacterianos e produtos químicos prejudiciais ao meio ambiente e à saúde pública (SALVADOR, 2008).

As bactérias do gênero *Streptococcus* são descritas como patogênicas para diferentes hospedeiros, dentre eles seres humanos, bovinos, peixes de água doce e marinhos. As infecções causadas por esses microrganismos são impactantes para diversos segmentos da produção animal, incluindo a aquicultura. A espécie *Streptococcus iniae* tem sido descrita como um dos principais agentes etiológicos causadores de doenças em peixes (EVANS et al., 2002).

### 1.3. *STREPTOCOCCUS INIAE*

*Streptococcus iniae* emergiu como um importante patógeno de peixes e de caráter zoonótico ao longo das últimas décadas (FACKLAN et al., 2005; LAU et al., 2006). O primeiro relato de isolamento ocorreu na década de 1970, a partir de abscessos subcutâneos de golfinho (PIER; MADIN, 1976). Na década de 1980 ocorreram os primeiros relatos de isolamento em peixes (KITAO et al., 1981; NAKATSUGAWA, 1983; FOO et al., 1985). Desde então, surtos de doenças em piscicultura, causadas por esse microrganismo foram observados na América do Norte (Canadá, EUA e Caribe), Oriente Médio (Bahrein e Israel) e Ásia Pacífica (Austrália, China, Japão, Singapura e Taiwan). No Brasil existe apenas um único relato de isolamento e identificação desse microrganismo (AGNEW; BARNES, 2007; FIGUEIREDO et al., 2012).

Atualmente essa bactéria é um dos patógenos de maior relevância para a produção mundial de peixes, tendo um impacto na indústria de pescado de cerca de 100 milhões de dólares por ano (SHOEMAKER et al., 2001). Mais de 30 espécies de peixes já foram documentadas com infecção por *S. iniae*, incluindo espécies de água doce, marinhas e estuarinas, e tanto populações em condições de criação quanto populações selvagens (EL AAMRI et al., 2014; AGNEW; BARNES, 2007). Não se sabe se *S. iniae* sempre esteve presente em peixes selvagens, ou se a amplificação de patógenos em situação de cultivo levou a doença para as comunidades selvagens vizinhas (AGNEW; BARNES, 2007). Também não se sabe se essa bactéria foi originada a partir de uma única fonte e distribuída através das correntes oceânicas e movimentos de cardumes (ELDAR et al., 1994).

*S. iniae* é caracterizado morfológicamente como cocos encapsulado de até 1,5µm de diâmetro, Gram-positivo. Cresce em meio líquido formando grandes cadeias de células, e em meio sólido de ágar sangue formam colônias brancas de até 1 milímetro, beta-hemolíticas, com um anel externo difuso de alfa-hemólise. O tipo de hemólise e sua extensão no meio podem variar de acordo com o sangue usado no ágar, sendo o sangue de carneiro o que apresenta maiores reações em relação ao sangue humano ou bovino (ELDAR et al., 1995a; PIER et al., 1978). Podem ser aeróbias e/ou anaeróbias facultativas, e não são associadas a nenhum grupo do sistema sorológico de classificação de Lancefield (AGNEW; BARNES, 2007; BROMAGE ET AL., 1999; BROMAGE; OWENS, 2002;). *S. iniae* não está

listado nas bases de dados dos sistemas de identificação rápida mais comumente usados (RAPID Strep strip, the Vitek system, API 20 STREP system, ATB Expression system), isso se torna um problema para a sua identificação (FACKLAM et al., 2005; LAU et al., 2006).

Infecções por *S. iniae* se caracterizam por quadros de meningoencefalite e septicemia, que induzem altas taxas de morbidade e mortalidade, chegando a 100% de óbito em animais adultos (BROMAGE; OWENS, 2002). A progressão da doença nos peixes é bastante variável e dependente de alguns fatores como, virulência da estirpe, espécie hospedeira afetada, via de infecção, idade dos peixes e de outros fatores ambientais e de qualidade da água (AGNEW; BARNES, 2007). No entanto, a maioria das infecções e surtos partilham um número de características e são geralmente semelhantes ao de outras infecções estreptocócicas. Os sinais clínicos podem ser exoftalmia (que pode ser bilateral), opacidade da córnea, melanose, letargia, perda de orientação, natação errática, rigidez dorsal, deformidade vertebral, taquipnéia, anorexia, emagrecimento, ou morte súbita com poucos sinais clínicos (BROMAGE; OWENS, 2002; ELDAR et al., 1994; FIGUEIREDO et al., 2012; AGNEW; BARNES, 2007).

Os peixes têm demonstrado serem susceptíveis à infecção por *S. iniae* através de uma variedade de vias. Via oral, exposição ao banho com ou sem a presença de escoriações, e vias de injeção intraperitoneal, foram eficazes experimentalmente (BROMAGE; OWENS, 2002; SHOEMAKER et al., 2000). Também tem sido sugerido que a infecção pode ocorrer por via olfativa, através do contato direto em condições de aglomeração, ou por meio de canibalismo de peixes infectados moribundos ou mortos (BROMAGE; OWENS, 2002; SHOEMAKER et al., 2000). A dose letal média ( $DL^{50}$ ) varia de acordo com a espécie hospedeira, via de infecção e isolado, mas está entre  $3 \times 10^4$  e  $10^8$  UFC/peixe para tilápia, truta e perca-gigante (ELDAR et al., 1995a; BERCOVIER et al., 1996; BROMAGE et al., 1999; ELDAR; GHITTINO, 1999).

Muitos fatores têm sido identificados como promotores do aumento da morbidade e mortalidade de peixes por *S. iniae*. Altos níveis de virulência e o número elevado de bactérias são frequentemente associados com um aumento da temperatura da água, geralmente acima de 17 °C (BERCOVIER et al., 1996; INGLIS

et al., 1993). A deterioração da qualidade da água, especialmente com altos níveis de amônia, nitrato e nitrito, e níveis de oxigênio dissolvido menores que 4 mg/ml também promovem rápida propagação e mortalidade. Densidade elevada de peixes e outros estresses também são fatores contribuintes (ELDAR et al., 1995b; SHOEMAKER et al., 2000, 2001).

A patogênese da doença causada por *S. iniae* ainda não é completamente conhecida, mas Zlotkin et al. (2003) sugere que é resultado de um processo com múltiplos passos. É provável que a infecção comece em tecidos externos ou gastrointestinais, seguido de proliferação local e subsequente invasão da corrente sanguínea. Falhas no processo inicial de fagocitose e morte da bactéria permitem o estabelecimento da doença.

Nem todos os peixes infectados por *S. iniae* apresentam sinais de doença. O isolamento dessa bactéria a partir de cérebros de peixes saudáveis evidenciou que o patógeno pode ser carregado assintomaticamente (BROMAGE et al., 1999). Outros estudos também relataram o isolamento frequente do patógeno em peixes assintomáticos que sobreviveram a um surto. Esses peixes portadores podem servir como reservatório do patógeno para futuras infecções BROMAGE; OWENS, 2002; ELDAR et al., 1995b; ZLOTKIN et al., 1998).

#### 1.4. DIAGNÓSTICO

A identificação e caracterização de patógenos de peixes são muito importantes para a aplicação de medidas sanitárias preventivas e escolha de tratamentos mais eficazes (NETTO, 2009). *S. iniae* não pertence a nenhum grupo de Lancifield e não está contemplado nos bancos de dados dos sistemas identificação comerciais como API 20 STREP system®, RAPID Strep strip®, Vitek system®. Além disso, os resultados de testes bioquímicos de isolados de peixes, muitas vezes são discordantes dos padrões da cepa de referência, o que resulta em identificações errôneas ou inconsistentes (LAU et al., 2003; FACKLAN et al., 2005).

As técnicas de biologia molecular propiciaram uma melhora significativa na eficiência e qualidade do diagnóstico de enfermidades de peixes e outros animais. As técnicas de maior significância incluem métodos baseados na amplificação específica por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que permite a localização

de DNA do organismo pesquisado em quantidades muito pequenas e em misturas complexas (CUNNINGHAM, 2002). A prática dessas técnicas tem se mostrado de grande efetividade, especialmente no diagnóstico de doenças cuja descoberta precoce é fundamental no sucesso da profilaxia e tratamento (CAMARGO; SILVA, 2009).

Considerada uma técnica de biologia molecular revolucionária, a PCR permitiu o rápido desenvolvimento do estudo de sequências de ácidos nucléicos (MOLINA et al, 2004). Desenvolvida por Kary Banks Mullis em 1983, essa técnica de biologia molecular consiste na síntese enzimática de cópias de ácidos nucléicos (COSTA, 2010). Por meio de etapas de variação de temperatura, a técnica produz a duplicação *in vitro* de cadeias de DNA. A reação de amplificação envolve o emprego dos quatro nucleotídeos do DNA, os iniciadores selecionados e uma DNA polimerase termoestável. Assim, é possível a obtenção de muitas cópias de uma sequência específica de ácidos nucléicos, a partir de uma fita molde (COSTA, 2010).

As principais áreas de aplicação das técnicas moleculares de diagnóstico são doenças infecciosas, câncer, doenças genéticas, transplantes, patologia clínica e estudos epidemiológicos. Estes estudos podem ser realizados no sangue periférico, fluidos corporais, materiais obtidos através de punção, tecidos frescos e tecidos embebidos em parafina. Na área de doenças infecciosas, a detecção rápida de microrganismos de crescimento lento, ou daqueles não cultiváveis, se torna possível através dessas técnicas de biologia molecular (LINSCOTT, 2002; PASSOS-BUENO, 2004).

## 2. REFERÊNCIAS

AGNEW, W.; BARNES, A.C., 2007. *Streptococcus iniae*: An aquatic pathogen of global veterinary significance and challenging candidate for reliable vaccination. *Veterinary Microbiologic*. 122, 1–15.

APPLEYARD, S.A.; RENWICK, J.M.; MATHER, P.B., 2001. Individual heterozygosity levels and relative growth performance in *Oreochromis niloticus* (L.) cultured under figian conditions. *Aquaculture Research*, v.32, p.287-296.

BERCOVIER, H., GHITTINO, C., ELDAR, A., 1996. Immunization with bacterial antigens: infections with streptococci and related organisms. In: *Second International Symposium on Progress in Fish Vaccinology*, Soria Moria Hotel, Oslo, Norway, June 5–7, pp. 153–160.

BRASIL, MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. O potencial brasileiro para a aquicultura. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/index.php/aquiculturampa/informacoes/potencial-brasileiro>>. Acesso em: 15 jul. 2014.

BROMAGE, E.; THOMAS, A.; OWENS, L. 1999. *Streptococcus iniae*, a bacterial infection in barramundi *Lates calcarifer*. *Disease of Aquatic Organism* v. 36: 177-181.

BROMAGE, E.S.; OWENS, L., 2002. Infection of barramundi *Lates calcarifer* with *Streptococcus iniae*: effects of different routes of exposure. *Disease Aquatic Organism* 52, 199–205.

CAMARGO, F.C.; SILVA, Q.R.P. 2009. Aplicação das Técnicas de PCR e suas Técnicas Derivadas em Diagnóstico Molecular. Disponível em: <<http://www.cpgls.ucg.br/6mostra/artigos/SAUDE/CLEYTON%20FLORENCIO%20DE%20CAMARGO%20E%20PAULO%20ROBERTO%20QUEIROZ.pdf>>. Acesso em: 17 ago. 2014.

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

CASTAGNOLLI, N. 1992. Criação de peixes de água doce. Jaboticabal: FUNEP. 189p.

CASTAGNOLLI, N. 1996. Aquicultura para o ano 2000. Brasília, CNPq, 95p.

CREPALDI, A. 2006. Situação da aquicultura e da pesca no Brasil e no mundo. *Revista Brasileira Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.30, p. 81-85.

COSTA, R.J. 2010. Técnica de Biologia Molecular: PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).

CUNNINGHAM, A. C. 2002. Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania. *Experimental and Molecular Pathology*. v. 72, n. 2, p. 132-141.

CYRINO, J.E.; CONTE, L. 2006. Tilapicultura em Gaiolas: produção e economia. In: José Eurico Possebon Cyrino e Elisabeth Criscuolo Urbinati (Eds.). AquaCiência 2004: Tópicos Especiais em Biologia Aquática e Aqüicultura. Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, cap.12, p.151-171.

EL AAMRI, F.; REMUZGO-MARTÍNEZ, S.; ACOSTA, F.; REAL, F.; RAMOS-VIVAS, J.; ICARDO, J. M.; PADILLA, D. 2014. Interactions of *Streptococcus iniae* with phagocytic cell line, *Microbes and Infection*. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2014.06.006>>. Acesso em: 15 jul. 2014

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

ELDAR, A., BEJERANO, Y., LIVOFF, A., HOROVITCZ, A., BERCOVIER, H., 1995a. Experimental streptococcal meningo-encephalitis in cultured fish. *Veterinary Microbiology* 43, 33–40.

ELDAR, A., FRELIER, P.F., ASSENTA, L., VARNER, P.W., LAWHON, S., BERCOVIER, H., 1995b. *Streptococcus shiloi*, the name for an agent causing septicaemic infection in fish, is a junior synonym of *Streptococcus iniae*. *International Journal Systematic Bacteriology* 45, 840–842.

ELDAR, A., GHITTINO, C., 1999. *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: similar, but different diseases. *Disease of Aquatic Organism* 36, 227–231.

EVANS, J.J.; KLESIOUS, P.H.; GILBERT, P.M., 2002. Characterization of b-hemolytic group B *Streptococcus agalactiae* in culture sea bream (*Sparus auratus*) (L.), and wild mullet (*Liza klunzingeri*), in Kuwait. *Journal of Fish Disease*., v. 25, n. 3, p. 505-513.

EVANS, J.J.; KLESIOUS, P.H.; SHOEMAKER, C.A., 2006. An overview of *Streptococcus* in warmwater fish. *Aquaculture*. H. Int, v. 7, p. 10–4.

FACKLAM, R., ELLIOTT, J., SHEWMAKER, L., REINGOLD, A., 2005. Identification and characterization of sporadic isolates of *Streptococcus iniae* isolated from humans. *Journal Clinical Microbiology*. 43, 933–937.

FAO. 2009. The State of Food and Aquaculture. Rome. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/012/i0680e/i0680e.pdf>>. Acesso em: 23 jul. 2014.

FAO. 2012. The State of World Fisheries and Agriculture. Rome. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/016/i2727e/i2727e01.pdf>>. Acesso em: 20 jul. 2014.

FIGUEIREDO, H. C. P.; NOBREGA NETTO, L.; LEAL, C. A. G.; PEREIRA, U. P.; MIAN, G. F., 2012. *Streptococcus iniae* outbreaks in Brazilian Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) farms. Br. Journal of Microbiology, p. 576-580

FITZSIMMONS, K., 2000. Tilapia: the most important aquaculture species of the 21 century. In: Fitzsimmons K, Carvalho Filho J (Ed.). Proceedings from the fifth international symposium on tilapia aquaculture. Rio de Janeiro; Pan. da aqui., p. 3-8.

FOO, J., HO, B., LAM, T., 1985. Mass mortality in *Siganus canaliculatus* due to streptococcal infection. Aquaculture 49, 185–195.

GONZÁLEZ, C.E.; QUEVEDO, E.T. 2001, Cultivo de las tilápias roja (*Oreochromis spp.*) y plateada (*Oreochromis niloticus*), cap.XIII. p. 283-299. GOMEZ, H.R.; DAZA, P.V.; AVILA, M.C.C. Fundamentos de Acuicultura Continental. Bogotá: Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura, 423p.

HILSDORF, 2002 HILSDORF, AWS. Avaliação genética e zootécnica de duas variedades de tilápias nilóticas (*O. niloticus* var. Red sterling e *O. niloticus*, var. Chitralada) para o estabelecimento de um programa de produção massal de um híbrido de peixes e seus subprodutos. Disponível em: <http://Watson.fapesp.Br/PIPEM/pipe10/engpesc1.htm>, Acessado em jul 2014.

INGLIS, V., ROBERTS, R.J., BROMAGE, N.R., 1993. Bacterial Diseases of Fish. The University Press, Cambridge.

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

KUBITZA, F., 2003. Manejo nutricional e alimentar de tilápias. Revista Panamericana da Aquicultura, Jundiaí, SP, v. 10, n. 60, p. 31-36.

LAU, S.K.P., WOO, P.C.Y., LUK, W.-K., FUNG, A.M.Y., HUI, W.-T., FONG, A.H.C., CHOW, C.-W., WONG, S.S.Y., YUEN, K.-Y., 2006. Clinical isolates of *Streptococcus iniae* from Asia are more mucoid and B-hemolytic than those from North America. Molecular diagnostics for Infection Disease. 54, 177–181.

LAU, S.K.P., WOO, P.C.Y., TSE, H., LEUNG, K.-W., WONG, S.S.Y., YUEN, K.-Y., 2003. Invasive *Streptococcus iniae* infections outside North America. Journal Clinical Microbiology 41, 1004–1009.

LINSCOTT A.J. 2002. Molecular diagnostics for infections disease. Pathol Case Rev.7(2):64-9.

LOVSHIN, L.L., 1997. Tilapia farming; a growing worldwide aquaculture industry. In SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE PEIXES, 1997, Piracicaba. Anais. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários “Luis de Queiroz”, p.137 164.

- MOLINA, Adriana Lopes, TOBO, Patrícia Renovato. Uso das Técnicas de Biologia Molecular para Diagnóstico. Disponível em: <<http://www.einstein.br/biblioteca/artigos/Vol2Num2/Serie%20Biologia%20parte%202.pdf>>. Acesso em 19 ago. 2014.
- NAKATSUGAWA, T., 1983. A streptococcal disease of cultured flounder. *Fish Pathology*. 17, 281–285.
- NOBREGA NETTO, L. D., 2009 . *Streptococcus inea* e *Streptococcus dysgalactiae* associados à septicemia e meningoencefalite em tilápias do Nilo no Brasil. Universidade Federal de Lavras, 44p.: il. Disponível em: <[http://www.livrosgratis.com.br/arquivos\\_livros/cp112589.pdf](http://www.livrosgratis.com.br/arquivos_livros/cp112589.pdf)> Acesso em: 20 jul. 2014.
- ONO, E. A.; KUBITZA, F. 2003. Cultivo de peixes em tanques-rede. 3ªed. Jundiaí: Eduardo A. Ono. 112p.
- PASSOS-BUENO M.R.S.; MOREIRA, E.S. 2004. Ferramentas básicas da genética molecular humana. *Genômica*. São Paulo: Atheneu. p. 43-67.
- PIER, G.B., MADIN, S.H., 1976. *Streptococcus iniae* sp. nov., a betahemolytic *Streptococcus* isolated from an Amazon freshwater dolphin, *Inia geoffrensis*. *International Journal Systematic Bacteriology*. 26, 545–553
- PIER, G.B., MADIN, S.H., AL-NAKEEB, S., 1978. Isolation and characterization of a second isolate of *Streptococcus iniae*. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 28, 311–314.
- PIGATO, G.; SANTINI, G. A., 2010. Tendência mundial da proteína animal: produção e consumo. *Revista de agronegócios da FGV*. Disponível em : <[http://www.agroanalysis.com.br/materia\\_detalhe.php?idMateria=886](http://www.agroanalysis.com.br/materia_detalhe.php?idMateria=886)> Acesso em: 16 de jul 2014.
- SALVADOR, R., 2008. Imunização e inflamação por *Streptococcus agalactiae* em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com ração suplementada com parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertação (Doutorado em Aqüicultura) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal.
- SEBRAE – Serviço brasileiro de Apoio às micro e pequenas empresas. Criação de tilápias em tanques-redes. 2007. Disponível em: <[http://www.biblioteca.sebrae.com.br/bds/bds.nsf/7227d4d9d30ab6cc832573a9006df4bc/\\$file/nt0003737a.pdf](http://www.biblioteca.sebrae.com.br/bds/bds.nsf/7227d4d9d30ab6cc832573a9006df4bc/$file/nt0003737a.pdf)>. Acesso em: jul. 2014.
- SHOEMAKER et al., 2000 SHOEMAKER, C. A.; EVANS, J. J.; KLESIUS, P. H., 2000. Density and dose: factors affecting mortality of *Streptococcus iniae* infected tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, v. 188, n. 3-4, p. 229-235.
- SHOEMAKER, C.A., KLESIUS, P.H., EVANS, J.J., 2001. Prevalence of *Streptococcus iniae* in tilapia, hybrid striped bass, and channel catfish on commercial fish farms in the United States. *American Journal of Veterinary Research*, v. 62, n.2, p. 174 – 177.

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

SURESH, A. V., 1998. Tilapia Update 1998. Aquaculture., v.30, n.4, p.8-68.

ZIMMERMANN, S.; FITZSIMMONS, K. 2004. Tilapicultura intensiva. In: José Eurico Possebon Cyrino, Elisabeth Criscuolo Urbinati, Débora Machado Fracalosi, Newton Castagnolli (Editores), Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva, São Paulo: TecArt, Cap.9, p. 239-266.

ZLOTKIN, A., CHILMONCZYK, S., EYNGOR, M., HURVITZ, A., GHITTINO, C., ELDAR, A., 2003. Trojan horse effect: phagocyte-mediated *Streptococcus iniae* infection of fish. *Infection and Immunity*. 71, 2318–2325.

ZLOTKIN, A.; ELDAR, A., GHITTINO, C. BERCOVIER H., 1998. Identification of *Lactococcus garvieae* by PCR. *J. of C. Micro.*, v. 36 n. 4, p. 983-985.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVOS GERAIS

Verificar a ocorrência de *S. iniae* em amostras de tecido de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) coletadas durante as estações do ano.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar e testar iniciadores específicos para o diagnóstico de estreptococose por *S. iniae*.
- Verificar a presença de *S. iniae* por PCR, em peixes com e sem sinais clínicos de doença bacteriana.
- Investigar a coinfeção de *S. iniae* e *S. agalactiae* em tilápias, por PCR espécie-específica.

#### 4. ARTIGO

**Diagnóstico molecular e ocorrência de *Streptococcus iniae* em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) de criação intensiva**

## **Diagnóstico molecular e ocorrência de *Streptococcus iniae* em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) de criação intensiva**

### **Resumo**

O crescimento desordenado da produção de peixes no Brasil aumentou a ocorrência de doenças bacterianas, principalmente as causadas por estreptococos. *Streptococcus iniae* e *Streptococcus agalactiae* são as principais espécies responsáveis por mortalidade e morbidade de peixes na criação intensiva de todo o mundo. Apesar da importância de *S. iniae*, esse patógeno foi identificado apenas uma vez no Brasil. O presente estudo investigou a ocorrência de *S. iniae* em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e coinfeção por *S. iniae* e *S. agalactiae*, em cinco pisciculturas no norte do estado do Paraná. Foram utilizadas amostras de encéfalo, rim e fígado para a pesquisa por PCR. Dentre os 185 peixes analisados, 13 (7,06%) foram positivos para a PCR *S. iniae*-específica. Entre os peixes positivos, 76,92% (10/13) não apresentaram sinais clínicos de estreptococose e 69,23% (9/13) apresentaram infecção simultânea por *S. agalactiae* e *S. iniae*. Esses resultados evidenciam a necessidade de estudos epidemiológicos em todo o Brasil para que se conheça a distribuição desse patógeno no país e a necessidade de implantação de técnicas sensíveis no monitoramento de doenças bacterianas em peixes. A ocorrência de *S. iniae* ao longo de todo o ano sugere que essa bactéria possa estar estabelecida nas propriedades pesquisadas. Esse é o primeiro estudo de ocorrência de *S. iniae* em peixes de criação do Brasil e primeiro relato de coinfeção de *S. iniae* e *S. agalactiae* em peixes.

**Palavras-chave:** PCR. Coinfeção. Estreptococose. Assintomáticos.

**Molecular diagnosis and occurrence of *Streptococcus iniae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from intensive fish farming**

**Abstract**

The disorderly growth of fish production in Brazil increased the occurrence of bacterial diseases, especially those caused by *Streptococcus*. *Streptococcus iniae* and *Streptococcus agalactiae* are the main species responsible for morbidity and mortality on commercial fish farms around the world. Despite the importance of *S. iniae*, this pathogen was identified only once in Brazil. The present study investigated the occurrence of *S. iniae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) of five intensive rearing fish farms in the north of Paraná state. Samples of brain, kidney and liver were used for PCR survey. Among the 185 fish analyzed, 13 (7.06%) were positive for *S. iniae*-specific PCR. Among the positive fish, 76.92% (10/13) showed no clinical signs of streptococcosis and 69.23% (9/13) had simultaneous infection with *S. agalactiae* and *S. iniae*. These results show the need for the use of sensitive techniques in the monitoring of bacterial diseases in fish. The occurrence of *S. iniae* throughout the year suggests that these bacteria may be established in the studied properties. This is the first study of the occurrence of *S. iniae* in fish farming in Brazil and first report of co-infection of *S. iniae* and *S. agalactiae* in fish.

**Key words:** PCR, coinfection, streptococcosis, asymptomatic.

## 5. INTRODUÇÃO

*Streptococcus iniae* é um importante patógeno frequentemente associado a grandes perdas na produção de peixes (SHOEMAKER et al., 2001; AGNEW; BARNES, 2007). Nas últimas décadas *S. iniae* também foi relatado como causador de infecções invasivas em humanos que manipularam peixes infectados (FACKLAN et al., 2005; LAU et al., 2006; BAIANO; BARNES, 2009). O primeiro isolamento de *S. iniae* foi na década de 1970 a partir de lesões subcutâneas de golfinhos (*Inia geoffrensis*) (PIER; MADIN, 1976). Em peixes, os primeiros relatos ocorreram na década de 1980, em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (KITAO et al., 1981; NAKATSUGAWA, 1983). *S. iniae* foi identificado em pisciculturas na América do Norte (Canadá, EUA e Caribe), Oriente Médio (Israel e Bahrein) e Ásia Pacífica (Austrália, China, Japão, Singapura e Taiwan) (AGNEW; BARNES, 2007). No Brasil, Figueiredo et al. (2012) relataram surtos de meningoencefalite e septicemia por *S. iniae* em tilápias de criação, no Paraná.

No geral, a produção de pescado no Brasil se caracteriza por altas densidades de estocagens de peixes (ZANIBONI FILHO et al., 2005). Esse sistema intensivo de criação associado a fatores ambientais, como água em temperaturas elevadas, são elementos predisponentes importantes para disseminação da estreptococose na criação (SHOEMAKER et al., 2001; AGNEW; BARNES, 2007). Atualmente a estreptococose causada por *S. agalactiae* é o principal problema reportado em sistemas de criação intensiva no Brasil, no entanto estudos de ocorrência de *S. iniae* no país são inexistentes. Por possuírem fatores predisponentes e sinais clínicos muito similares, os agentes etiológicos causadores da estreptococose podem ser facilmente confundidos em surtos da doença (AGNEW; BARNES, 2007).

O isolamento e identificação de *S. iniae* por métodos de cultura bacteriana e testes bioquímicos são considerados laboriosos e de difícil caracterização. Como forma alternativa de detecção e identificação, técnicas moleculares têm sido amplamente utilizadas quando os métodos de cultura se mostram insuficientes (SHOEMAKER et al., 2001; AGNEW; BARNES, 2007). A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem sido apontada como um método eficaz na detecção de

agentes etiológicos em peixes com e sem sinais clínicos (ZLOTKIN et al., 1998; SHOEMAKER et al., 2001; AGNEW; BARNES, 2007; SCARPASSA, 2014).

Em função da importância desse patógeno para a piscicultura, e o pouco conhecimento desta bactéria no Brasil, esse trabalho objetivou investigar a ocorrência de *S. iniae* em tilápia do Nilo (*O. niloticus*) de pisciculturas de criação intensiva da região norte do estado do Paraná.

## 6. MATERIAL E MÉTODOS

### 6.1. CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras de órgãos de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) utilizadas no estudo pertencem à coleção biológica do Laboratório de Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas da Universidade Estadual de Londrina.

A coleção engloba órgãos de tilápias do Nilo (*O. niloticus*) coletadas no estudo de Scarpassa et al. (2014) em cinco propriedades de criação intensiva que utilizam sistemas de tanque rede, localizadas no norte estado do Paraná, Brasil. As amostras de órgãos foram obtidas de peixes coletados no período de janeiro a dezembro de 2013. Todos os peixes foram submetidos à avaliação macroscópica, necropsiados e amostras de rim encéfalo e fígado foram coletadas e armazenadas à -20 °C.

### 6.2. EXTRAÇÃO DE DNA DOS ÓRGÃOS

Para a extração de DNA foram utilizadas 485 amostras de 185 peixes, sendo 168 de rim, 151 de encéfalo e 166 de fígado. A extração foi realizada pelo método fenol-clorofórmio com lise enzimática por proteinase K, descrito por Sambrook et al. (1989), com modificações de Scarpassa (2014). Foram macerados individualmente 25mg de cada órgão coletado, e posteriormente ressuspensos e homogeneizados em 300 µL de solução de lise (0,6 µL NaCl 5M; 150 µL TrisHCl 1M pH 8; 30 µL SDS 10%; 12 µL EDTA 0,5M pH 8; 107,4 µL de água ultra pura) e 12 µL de Proteinase K 20 mg/ml. Essas amostras foram incubadas a 70°C em banho-maria por 1 hora e 30 minutos, com homogeneização a cada 15 minutos.

Após o processo de lise as amostras foram submetidas a três etapas de desproteinização do DNA. No primeiro passo foram adicionados 300 µL de fenol, e

então as amostras foram centrifugadas a 15.000 Xg por 10 minutos com a coleta da fase aquosa. No segundo passo, ocorreu a adição de 180 µL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico na proporção 25:24:1 respectivamente e foi repetido o mesmo processo de centrifugação e coleta da fase aquosa. O terceiro passo foi realizado com a adição 80 µL de clorofórmio/álcool isoamílico na proporção de 24:1 respectivamente, e repetido o mesmo processo de centrifugação e coleta. Após a terceira etapa de purificação, o DNA foi precipitado pela adição de álcool absoluto gelado na proporção de dois volumes e NaCl 1M na proporção de 0,1 volume. Em seguida as amostras foram guardadas por 24 horas a -20°C.

Após a precipitação, o DNA foi recuperado por centrifugação a 18.000 Xg por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados então 200 µL de etanol a 70% e realizada nova centrifugação a 14.000 Xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi novamente desprezado e o DNA foi ressuspendido em 30 µL de água ultra pura esterilizada. As soluções de DNA obtidas foram armazenadas a - 20° C até a realização da PCR.

### 6.3. INICIADORES PARA IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *S. INIAE*

#### 6.3.1 Seleção dos iniciadores

Os iniciadores F\_iniae (5'-ATGGGAGTGGAAAATCCATTAC-3') e R\_iniae (5'-CCACCTGTCTCCTCTGTCC-3') foram selecionados para a amplificação de um fragmento de 595 pb da região ribossomal 16S específica da espécie *S. iniae*. Para a seleção dos iniciadores foram utilizadas 202 sequências, de 38 espécies do gênero *Streptococcus*, que foram recuperadas do banco de dados NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). As sequências foram alinhadas pelo algoritmo ClustalW e foram analisadas regiões conservadas para *S. iniae* e polimórficas para as demais espécies do gênero. Os iniciadores selecionados tiveram suas características analisadas no web server OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies inc.).

### 6.3.2 Especificidade dos iniciadores

Para avaliar a especificidade dos iniciadores foi realizada uma reação de PCR com DNA de *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, *S. agalactiae* (ATCC 13813) e *S. iniae* (SIUEL-1).

A Cepa de *S. iniae* (SIUEL-1) utilizada no ensaio de especificidade pertence ao banco de cepas do Laboratório de Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas e foi obtida a partir de tilápias de criação com sinais clínicos de estreptococose. A cepa foi identificada molecularmente como *S. iniae* através do sequenciamento de um fragmento de 1200 pb da região ribossomal 16S, amplificado pelos iniciadores fd1 e rd1 descritos por Weisburg et al. (1991).

### 6.3.3 Limite de detecção dos iniciadores F\_ *iniae* e R\_ *iniae*

A cepa de *S. iniae*, SIUEL-1, foi semeada em 9mL de Brain Heart Infusion (BHI Himedia®) e incubada por 48 horas em aerofilia a 30 °C. Após crescimento, a cultura foi diluída seriadamente (base 10) em salina 0,85%, e semeada em duplicata em Tryptone Soy Agar (TSA Himedia®) em superfície para contagem. As placas foram incubadas a 30 °C por 48 horas em aerofilia. O número de colônias em cada placa foi contado para a obtenção da quantidade de UFC/mL em cada diluição.

Cada suspensão avaliada foi utilizada para a extração de DNA seguindo o protocolo descrito por Ricieto (2012), e posteriormente usada na verificação do limite mínimo de detecção dos iniciadores.

## 6.4. DETECÇÃO DE *S. INIAE* POR PCR

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 20 µL, contendo 2,0 µL de tampão (10x), 1,0 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0,4 µL de solução de dNTPs (25 mM), 1,5 µL de cada iniciador (10 µM), 0,2 µL de Taq DNA polimerase (5u/µL), 2,0 µL de amostra de DNA extraído dos órgãos e 11,4 µL de água ultra pura. Todas as reações foram submetidas a 30 ciclos de amplificação, que foram precedidos por um passo inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos. Cada ciclo consistiu em uma etapa de desnaturação a 94 °C por 50 segundos, seguido por pareamento dos iniciadores a 56,2 °C por 45 segundos e extensão dos fragmentos a 72 °C por 1 minuto. O último ciclo foi sucedido por um passo final de extensão a 72 °C por 5

minutos. Um controle negativo (água) e um controle positivo (SIUEL-1) foram incluídos em cada conjunto de reações. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese, em gel de agarose (1%) corado com Sybr Safe® (Invitrogen), corridos em tampão SB 1x e documentados em fotodocumentador.

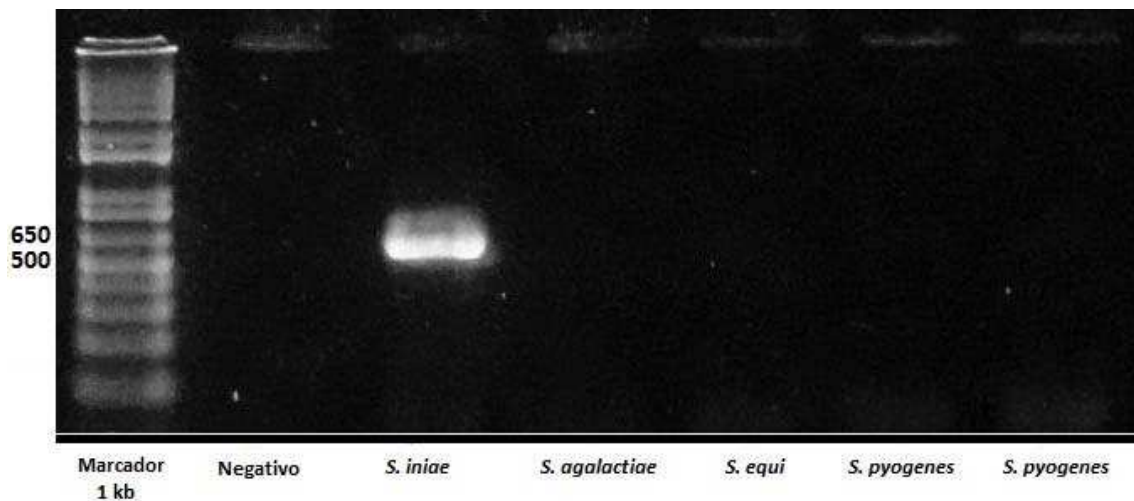
## 7. RESULTADOS

### 7.1. ESPECIFICIDADE DOS INICIADORES

A especificidade foi confirmada pela amplificação do fragmento de 595 pb apenas para *S. iniae*. Não foi observada amplificação para *S. pyogenes*, *S. equi* subsp. *zooepidemicus* e *S. agalactiae* (**Figura 1**).

O limite de detecção dos iniciadores F\_iniae e R\_iniae foi de  $1,91 \times 10^4$  UFC/ml.

Figura 1 – Reação de especificidade dos iniciadores F\_iniae e R\_iniae, propostos no estudo para detecção de *S. iniae*. Gel de agarose 1%, corado com Sybr Safe® (Invitrogen).

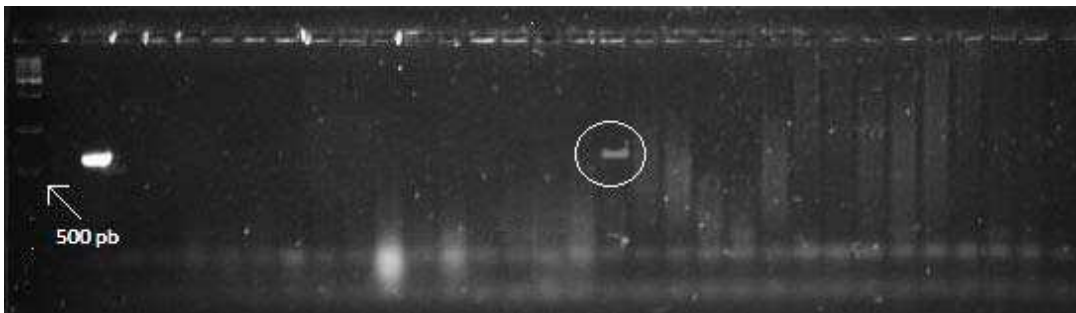


Fonte: BARBOSA (2015).

## 7.2. PCR NOS TECIDOS

*S. iniae* foi detectado em 7,02% (13/185) dos peixes (**Tabela 1**). Os peixes considerados positivos foram aqueles que apresentaram PCR positiva para *S. iniae* em algum dos órgãos avaliados (**Figura 2**). Dentre os 13 peixes positivos para *S. iniae*, 10 (76,92%) não apresentavam qualquer sinal clínico de doença bacteriana, e 3 (23,08%) exibiram natação errática, ascite e opacidade da córnea, segundo à descrição macroscópica realizada por Scarpassa et al. (2014).

Figura 2 – Amplicon esperado de 595 pares de bases evidenciando a presença de *S. iniae* na amostra analisada.



Fonte: BARBOSA (2015).

O verão apresentou 11,42% (4/35) dos peixes positivos para *S. iniae* sendo a estação com maior ocorrência dessa bactéria. No outono, *S. iniae* foi detectado em 10% (5/50) dos peixes, enquanto inverno e primavera apresentaram 4% (2/50) de positivos para *S. iniae*, cada um (**Tabela 1**).

Tabela 1 – Resultados das coletas efetuadas durante o ano de 2013. Ocorrência por estação do ano e total.

Estação do Ano	Temperatura Água (°C)	Nº de Peixes	Nº de Peixes Positivos	Ocorrência (%)	Nº de Amostras de Tecidos	Nº de Amostras de Tecidos Positivas	Ocorrência (%)
<b>Verão</b>							
Coleta 1		NC <sup>1</sup>	NC <sup>1</sup>		NC <sup>1</sup>	NC <sup>1</sup>	
Coleta 2	25°C	10	4		21	4	
Coleta 3	25°C	8	0		14	0	
Coleta 4	28°C	10	0		30	0	
Coleta 5	26°C	7	0		9	0	
<b>TOTAL</b>		<b>35</b>	<b>4</b>	<b>11,42</b>	<b>74</b>	<b>4</b>	<b>5,40</b>
<b>Outono</b>							
Coleta 1	23°C	10	2		27	2	
Coleta 2	24,5°C	10	3		29	3	
Coleta 3	24°C	10	0		27	0	
Coleta 4	24°C	10	0		30	0	
Coleta 5	25°C	10	0		28	0	
<b>TOTAL</b>		<b>50</b>	<b>5</b>	<b>10,00</b>	<b>141</b>	<b>5</b>	<b>3,54</b>
<b>Inverno</b>							
Coleta 1	20°C	10	0		30	0	
Coleta 2	20°C	10	1		29	1	
Coleta 3	21°C	10	0		15	0	
Coleta 4	20,5°C	10	0		28	0	
Coleta 5	20°C	10	1		30	1	
<b>TOTAL</b>		<b>50</b>	<b>2</b>	<b>4,00</b>	<b>132</b>	<b>2</b>	<b>1,51</b>
<b>Primavera</b>							
Coleta 1	25°C	10	0		30	0	
Coleta 2	26°C	10	0		30	0	
Coleta 3	26°C	10	0		27	0	
Coleta 4	26°C	10	2		30	2	
Coleta 5	26°C	10	0		21	0	
<b>TOTAL</b>		<b>50</b>	<b>2</b>	<b>4,00</b>	<b>138</b>	<b>2</b>	<b>1,41</b>
<b>TOTAL</b>		<b>185</b>	<b>13</b>	<b>7,02</b>	<b>485</b>	<b>13</b>	<b>2,68</b>

<sup>1</sup> Não consta: amostras não presentes no banco

Fonte: BARBOSA (2014).

Das 485 amostras, 13 (2,68%) foram positivas para *S. iniae* (Tabela 1). *S. iniae* foi detectado em 3,97% (6/151) das amostras de encéfalo, 3,57% (6/168) de rim e 0,6% (1/166) de fígado (Tabela 2).

Tabela 2 – Ocorrência de *S. iniae* em cada órgão analisado.

Órgão	N° de amostras de tecido	N° de positivos	Ocorrência (%)
Encéfalo	151	6	3,97
Rim	168	6	3,57
Fígado	166	1	0,60
<b>Total</b>	<b>485</b>	<b>13</b>	<b>2,68</b>

Fonte: BARBOSA (2014)

## 8. DISCUSSÃO

*S. iniae* ganhou atenção na última década em função dos prejuízos econômicos causados na indústria da aquicultura em todo o mundo. O prejuízo estimado por *S. iniae* em todo o mundo, em 2001, foi de 100 milhões de dólares (SHOEMAKER et al., 2001). Mesmo sendo frequentemente detectado na piscicultura em muitos países, esse patógeno havia sido identificado apenas uma vez no Brasil. Figueiredo et al. (2012) isolaram e identificaram molecularmente por PCR, sete isolados de *S. iniae*, durante um surto de estreptococose em tilápia do Nilo (*O. niloticus*) no estado do Paraná.

A técnica de PCR tem sido amplamente utilizada como ferramenta de diagnóstico molecular, por sua rapidez e alta sensibilidade para detecção (MATA et al., 2004; YANG; ROTHMAN, 2004; AGNEW; BARNES, 2007). Os iniciadores aqui descritos, F\_*iniae* e R\_*iniae*, foram selecionados de regiões não conservadas entre *S. iniae* e bactérias filogeneticamente próximas e apresentaram especificidade ao amplificarem apenas o DNA de *S. iniae*. Em especial, a não amplificação de *S. agalactiae* representa uma importante característica dos iniciadores, já que esse agente etiológico é descrito como um causador frequente de estreptococose em peixes de criação no Brasil (SALVADOR et al., 2005; FIGUEIREDO; LEAL, 2008; SCARPASSA, 2014).

Esse é o primeiro estudo de ocorrência de *S. iniae* na América do Sul. Dos 185 peixes analisados por PCR, 7,02% (13/185) foram positivos para *S. iniae*. Shoemaker et al. (2001), em pisciculturas dos Estados Unidos, relataram 7,96% (30/377) de isolamento de *S. iniae* em tilápia do Nilo (*O. niloticus*), 9,56% (26/272) em robalos (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*) e nenhum isolamento de *S. iniae* em bagre americano (*Ictalurus punctatus*). Nguyen et al. (2002) analisaram a presença de *S. iniae* em linguados (*Paralichthys olivaceus*) de criação no Japão, e obtiveram 6,52% (15/230) de isolamento. Esses trabalhos mostraram a presença de *S. iniae* em diferentes espécies de peixes de criação, no entanto foram realizados utilizando apenas a técnica de isolamento bacteriano. Shoemaker et al. (2001) sugeriram a utilização de PCR para identificação desse patógeno em peixes assintomáticos.

Entre as estações do ano, o verão foi a estação que apresentou maior ocorrência de *S. iniae*. A presença da bactéria foi detectada em 11,42% (4/35) dos peixes. Ao longo das quatro estações do ano foram observados resultados positivos para *S. iniae* em temperaturas da água variando entre 20 e 26 °C. Shoemaker et al. (2001) verificaram a presença de *S. iniae* em peixes de criação, em temperaturas de 25°C, nos EUA. Nguyen et al. (2002), no Japão, detectaram a presença de *S. iniae* na água, no sedimento e em peixes, principalmente em temperaturas próximas a 25°C. A temperatura da água de 17°C a 25°C tem sido frequentemente associada ao aumento de infecções por *S. iniae* no ambiente de criação de peixes (INGLIS et al., 1993; BERCOVIER et al., 1996; NGUYEN et al., 2002; AGNEW; BARNES, 2007). A presença constante dessa bactéria nas pisciculturas pesquisadas sugere que a mesma possa estar estabelecida no ambiente de criação dos peixes, sendo mantida em peixes assintomáticos e ampliando o número de hospedeiros em surtos.

Dentre os peixes positivos para *S.iniae*, 76,92% (10/13) não apresentavam sinal clínico quando coletados por Scarpassa (2014). Os sinais clínicos observados dos 23,08% (3/13) foram natação errática, ascite e opacidade da córnea. As infecções por *S. iniae* podem causar diferentes sinais clínicos (BROMAGE et al., 1999; AGNEW; BARNES, 2007). Figueiredo et al. (2012) relataram *S. iniae* como causa de meningoencefalite, natação errática e perda de equilíbrio em peixes afetados. Agnew e Barnes (2007) sugeriram que alterações oculares como opacidade da córnea são os sinais mais encontrados em peixes com estreptococose. No entanto nem todos os peixes infectados por *S. iniae* apresentam sinais clínicos de doença. Bromage et al. (1999) isolaram essa bactéria de encéfalos de peixes saudáveis, evidenciando que o patógeno pode estar presente em peixes assintomáticos. Em 76,92% dos peixes positivos relatados nesse estudo não houve a presença de qualquer sinal clínico. Estudos mostraram que o patógeno geralmente é isolado de peixes que sobreviveram a surtos. Esses peixes portadores podem servir como reservatórios da bactéria para futuras infecções na população (ELDAR et al., 1995; ZLOTKIN et al., 1998; BROMAGE; OWENS, 2002).

A ocorrência de *S. iniae* nas amostras de encéfalo, rim e fígado foi de 3,97% (6/151), 3,57% (6/168) e 0,6% (1/166), respectivamente. Figueiredo et al. (2007, 2009) citaram que o encéfalo é o órgão de predileção de *Streptococcus spp.* Yanong

e Floyd (2002) relataram que o diagnóstico de estreptococose é confirmado com a detecção do agente principalmente em encéfalo e rim.

Dentre os 13 peixes infectados por *S. iniae*, 9 (69,23%) apresentaram PCR positiva para *S. agalactiae* (SCARPASSA, 2014). Essas duas espécies têm sido apontadas como as maiores causadoras de prejuízo para a tilapicultura mundial e *S. agalactiae* é relatado atualmente como o principal patógeno de tilápias de criação no Brasil (EVANS et al., 2002; SALVADOR et al., 2005; AGNEW; BARNES, 2007; FIGUEIREDO, 2012; SCARPASSA, 2014).

Esse é o primeiro relato de coinfeção por *S. iniae* e *S. agalactiae* em tilápia do Nilo. Os sinais clínicos de ambas as infecções são semelhantes e, portanto, é necessário o diagnóstico para a identificação correta do agente etiológico. Possivelmente esses patógenos quando associados podem causar mortalidade e morbidade de peixes mais severa demonstrando a importância das estreptococoses e as potenciais perdas econômicas na criação intensiva.

Tanto em função da importância econômica, como do caráter zoonótico de *S. iniae*, a ocorrência dessa bactéria nas propriedades estudadas evidencia a necessidade de estudos epidemiológicos para verificar a distribuição desse patógeno em peixes de criação em todo o país. Podemos evidenciar ainda a necessidade de implantação de técnicas de diagnóstico mais sensíveis, como a utilização dos iniciadores aqui descritos para o monitoramento da estreptococose no Brasil, auxiliando nas estratégias de manejo contra a essa doença em peixes de criação

## 9. REFERÊNCIAS

AGNEW, W.; BARNES, A.C., 2007. *Streptococcus iniae*: An aquatic pathogen of global veterinary significance and challenging candidate for reliable vaccination. *Veterinary Microbiology*. 122, 1–15.

BERCOVIER, H., GHITTINO, C., ELDAR, A., 1996. Immunization with bacterial antigens: infections with streptococci and related organisms. In: *Second International Symposium on Progress in Fish Vaccinology*, Soria Moria Hotel, Oslo, Norway, June 5–7, pp. 153–160.

BROMAGE, E.; THOMAS, A.; OWENS, L. 1999. *Streptococcus iniae*, a bacterial infection in barramundi *Lates calcarifer*. *Diseases of Aquatic Organisms*, v. 36: 177-181.

BROMAGE, E.S.; OWENS, L., 2002. Infection of barramundi *Lates calcarifer* with *Streptococcus iniae*: effects of different routes of exposure. *Disease Aquatic Organism* 52, 199–205.

ELDAR, A., BEJERANO, Y., LIVOFF, A., HOROVITCZ, A., BERCOVIER, H., 1995. Experimental streptococcal meningo-encephalitis in cultured fish. *Vet. Microbiol.* 43, 33–40.

EVANS, J.J.; KLESIUS, P.H.; GILBERT, P.M., 2002. Characterization of b-hemolytic group B *Streptococcus agalactiae* in culture sea bream (*Sparus auratus*) (L.), and wild mullet (*Liza klunzingeri*), in Kuwait. *Journal of Fish Diseases*, v. 25, n. 3, p. 505-513.

FACKLAM, R., ELLIOTT, J., SHEWMAKER, L., REINGOLD, A., 2005. Identification and characterization of sporadic isolates of *Streptococcus iniae* isolated from humans. *Journal Clinical Microbiology* 43, 933–937.

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

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

FIGUEIREDO, H. C. P.; NOBREGA NETTO, L.; LEAL, C. A. G.; PEREIRA, U. P.; MIAN, G. F., 2012. *Streptococcus iniae* outbreaks in brazilian nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) farms. *Brazilian Journal of Microbiology*, p. 576-580

INGLIS, V., ROBERTS, R.J., BROMAGE, N.R., 1993. *Bacterial Diseases of Fish*. The University Press, Cambridge.

KITAO, T., AOKI, T., SAKOH, R., 1981. Epizootic caused by betahaemolytic *Streptococcus* species in cultured freshwater fish. *Fish Pathology*. 15, 301–307.

- LAU, S.K.P., WOO, P.C.Y., LUK, W.-K., FUNG, A.M.Y., HUI, W.-T., FONG, A.H.C., CHOW, C.-W., WONG, S.S.Y., YUEN, K.-Y., 2006. Clinical isolates of *Streptococcus iniae* from Asia are more mucoid and B-hemolytic than those from North America. *Diagnostic Microbiology Infection Disease*. 54, 177–181.
- MATA, A.I., BLANCO, M.M., DOMÍNGUEZ, L., FERNANDEZ-GARAYZÁBAL J.F., GIBELLO, A., 2004. Development of a PCR assay for *Streptococcus iniae* based on the lactase oxidase (lctO) gene with potential diagnostic value. *Veterinary Microbiology* v. 101, n 109-116.
- NGUYEN, T.H.; KANAI, K.; YOSHIKOSHI, K. 2002. Ecological investigation of *Streptococcus iniae* in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) using selective isolation procedures. *Aquaculture*.
- NAKATSUGAWA, T., 1983. A streptococcal disease of cultured flounder. *Fish Pathology*. 17, 281–285.
- PIER, G.B., MADIN, S.H., 1976. *Streptococcus iniae* sp. nov., a beta-hemolytic *Streptococcus* isolated from an Amazon freshwater dolphin, *Inia geoffrensis*. *International Journal Systematic Bacteriology*. 26, 545–553
- RICIETO, A.P.S., FAZION F.A.P., CARVALHO, C.D., VILAS-BOAS, L.A., VILAS-BÔAS, G.T. 2012. Effect of vegetation on the presence and genetic diversity of *Bacillus thuringiensis* in soil. *Canadian Journal of Microbiology* v. 59, n 28-33.
- SALVADOR, R. MÜLLER, E.E.; FREITAS, J.C.; LEONHARDT, J.H.; PRETTO-GIORDANO, L.G.; DIAS, J.A. Isolation and characterization of *Streptococcus* spp. group B in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in hapas nets and earth nurseries in the northern region of Parana State, Brazil. *Ciência Rural*, v. 35, n. 6, p. 1374-1378, 2005.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, v. 1, 2028 p.
- SCARPASSA, J.A. 2014. Detecção molecular e isolamento de *streptococcus agalactiae* em tilápia do nilo (*oreochromis niloticus*) com e sem sinais clínicos de doença bacteriana. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina.
- SHOEMAKER, C.A., KLESIOUS, P.H., EVANS, J.J., 2001. Prevalence of *Streptococcus iniae* in tilapia, hybrid striped bass, and channel catfish on commercial fish farms in the United States. *American Journal of Veterinary Research*, v. 62, n.2, p. 174 – 177.
- STOSKOPF, M.K., 1993. *Fish medicine*. 9th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co.
- ZANIBONI FILHO, E.; NUÑER A.P.O.; GUERESCHI, R.M.; HERMES-SILVA, S. 2005. Cultivo de peixes em tanques-rede e impactos ambientais. In: *Seminário Cultivo de Peixes em Tanques-rede: Desafios e oportunidades para um desenvolvimento sustentável*, 2005, Belo Horizonte, MG. p 57-80.

ZLOTKIN, A.; ELDAR, A., GHITTINO, C. BERCOVIER H., 1998. Identification of *Lactococcus garvieae* by PCR. Journal of Clinical Microbiology, v. 36 n. 4, p. 983-985.

WEISBURG, W.G.; BARNES, S.M.; PELLETIER, D.A.; LANE, D.J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Journal of Bacteriology, 173: 697-703.

YANG, S., ROTHMAN, R.E., 2004. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. Infectious diseases.

YANONG, R.P.E.; FRANCIS-FLOYD, R. 2002. Streptococcal infections of fish. Report from University of Florida. Series from the Department of Fisheries and Aquatic Sciences, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural.