



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LUCIENNE GARCIA PRETTO GIORDANO

Streptococcus agalactiae:

AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE “IN VIVO” E EFICÁCIA DA
VACINA EXPERIMENTAL EM TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis
niloticus*)

LUCIENNE GARCIA PRETTO GIORDANO

Streptococcus agalactiae:

AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE “IN VIVO” E EFICÁCIA DA
VACINA EXPERIMENTAL EM TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis
niloticus*)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Área de Concentração: Sanidade Animal, da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial à obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Ernst Ekehardt Muller

Londrina
2007

LUCIENNE GARCIA PRETTO GIORDANO

Streptococcus agalactiae:

AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE “IN VIVO” E EFICÁCIA DA
VACINA EXPERIMENTAL EM TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis
niloticus*)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Área de Concentração: Sanidade Animal, da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial à obtenção do título de Doutor.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ernst Ekehardt Muller
UEL – Londrina – PR

Prof. Dr. Henrique César Pereira Figueiredo
Universidade Federal de Lavras

Prof. Dr. Julio Hermann Leonhardt
UEL – Londrina – PR

Prof^a. Dr^a Alice Fernandes Alfieri
UEL – Londrina – PR

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

Londrina, 04 de junho de 2007.

DEDICATÓRIA

Ao meu marido Wilson e aos meus filhos Thiago e Vivian por entenderem a minha ausência e sempre demonstrarem o quanto me amam dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ernst E. Müller, pela orientação, confiança, ensinamentos e amizade;

A CAPES pelo apoio financeiro para realização do estágio de doutorado nos EUA;

Ao USDA, Auburn-Alabama, EUA, por me receberem durante estágio e aprendizado;

Ao Prof. Dr. Amauri A. Alfieri, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da UEL, pela ajuda durante o curso, auxílio na pesquisa e amizade;

Aos professores doutores Alice Alfieri, Ana Paula Bracarense e Julio Cesar de Freitas pelas sugestões e correções como membros da banca de qualificação;

Aos professores do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva -UEL pelos ensinamentos e colaboração para o desenvolvimento da pesquisa;

A Prof. Dra. Ângela Teresa Silva e Souza pelo incentivo, apoio, ensinamentos, carinho, paciência, confiança e amizade;

Ao Departamento de Biologia Animal e Vegetal pela estrutura da Estação de Piscicultura da UEL onde os experimentos foram realizados e pelos peixes cedidos;

As Profas. Dras. Ana Paula Bracarense, Roberta Freire e Daisy Pontes Netto, pelo apoio, conhecimentos, auxílio na finalização dos trabalhos, carinho e amizade;

Aos funcionários do DMVP-UEL pela amizade e carinho;

Aos Biólogos Mauro Caetano Filho e Heitor Frossard Santos da Estação de Piscicultura da UEL pela colaboração em todas as etapas da pesquisa;

Aos funcionários Estação de Piscicultura da UEL pela paciência e ajuda durante o desenvolvimento dos trabalhos experimentais;

Aos meus pais pelo amor, carinho, apoio e ajuda em todas as horas;

Aos meus irmãos, cunhados e sogra pelo incentivo e apoio;

A Vanessa G. da Silva, pela ajuda durante todos experimentos, pelas risadas e amizade;

As amigas Cibele Rodrigues, Lucimara Alves e Márcia Barros por sempre estarem ao meu lado;

Ao colega José Aldevino pela paciência e colaboração.

GIORDANO, Lucienne Garcia Pretto. ***Streptococcus agalactiae***: avaliação da patogenicidade “in vivo” e eficácia da vacina experimental em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). 2007. 62 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

RESUMO

A piscicultura é atualmente um dos segmentos da produção animal que mais cresce no Brasil e com enorme potencial de expansão. Entre as espécies de peixes cultivados, a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma das mais importantes, e no estado do Paraná ocupa a primeira posição. O cultivo intensivo de peixes, dependendo da qualidade da água, alimentação e manejo, tornam os peixes mais susceptíveis às doenças. Entre as infecções de origem bacteriana, a causada por *Streptococcus agalactiae* é a de maior repercussão econômica em tilápias cultivadas em regiões de águas quentes. Para minimizar os impactos da estreptococose em cultivos intensivos de peixes, diferentes tipos de vacinas estreptocócicas, com ou sem adição de extrato de produtos extracelulares ou adjuvantes, vêm sendo estudadas. Os objetivos deste trabalho foram verificar a taxa de mortalidade, sinais clínicos e lesões macroscópicas em tilápias inoculadas experimentalmente com diferentes concentrações de

S. agalactiae e avaliar a eficácia da vacina inativada de *S. agalactiae* para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Para o preparo das inoculações experimentais e da vacina de células inativadas, foi utilizado *S. agalactiae* isolado de tilápias naturalmente infectadas. Para a determinação da taxa de mortalidade os peixes foram inoculados pela via intraperitoneal (i.p) com doses infectantes variando de $1,0 \times 10^6$ a $1,5 \times 10^8$ UFC/peixe, em três períodos diferentes. Para a eficácia da vacina, dois grupos de peixes, com peso aproximado de 20g, foram inoculados com 0,1 mL ($2,0 \times 10^8$ UFC/mL) por via i.p. Um grupo (Tratamento 1) foi vacinado com uma dose e o outro (Tratamento 2) com duas, com intervalo de 21 dias. O grupo controle foi inoculado por via i.p. com 0,1 mL de “Tryptic Soy Broth”. Os peixes foram desafiados, 30 dias após a aplicação da vacina, com a cepa homóloga de *S. agalactiae*, 0,1 mL (3×10^6 UFC/peixe) por via i.p. e monitorados durante 16 dias. Nos peixes inoculados com diferentes doses infectantes de *S. agalactiae*, os sinais clínicos observados foram anorexia, letargia, natação errática, exoftalmia e ascite. As lesões macroscópicas foram hemorragia na pele, esplenomegalia, hepatomegalia com palidez do órgão e aderências viscerais. As taxas de mortalidade nos grupos inoculados variaram de 67,5 a 90,0%. *S. agalactiae* foi re-isolado em todos os peixes inoculados experimentalmente. Houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,0045$) entre os coeficientes de mortalidade dos peixes vacinados com uma e duas doses da vacina e a porcentagem relativa da sobrevivência (RPS) foi de 83,6% e de 96,4%, respectivamente. Os resultados mostram que o *S. agalactiae* isolado de tilápias naturalmente infectadas reproduziu a doença em condições experimentais e os peixes vacinados com uma e duas doses da vacina apresentaram proteção eficaz ao desafio experimental.

Palavras-chave: *Streptococcus agalactiae*. Vacina inativada. Piscicultura. Sinais clínicos. Porcentagem relativa de sobrevivência (RPS).

GIORDANO, Lucienne Garcia Pretto. *Streptococcus agalactiae*: avaliação da patogenicidade "in vivo" e eficácia da vacina experimental em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). 2007. 62 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

ABSTRACT

Aquaculture is one of the most developing areas in animal production in Brazil. Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) now constitutes the most important fish farmed in Paraná. Because of bad water quality, feeding and handling conditions, fish are very susceptible to infectious diseases in intensive farming systems. *Streptococcus agalactiae* has proven to be the main cause of infection in tilapia farmed in hot water regions. Different streptococcus vaccine types, with or without adding ECP or adjuvant were experimentally researched. The objectives of this work were to evaluate mortality rate, clinical signs and macroscopic lesions in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) inoculated experimentally with different concentrations of *S. agalactiae* and evaluate the efficacy of *S. agalactiae* inactivated vaccine for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). The experimental doses and cells inactivated vaccine were prepared with a *S. agalactiae* strain isolated from naturally infected fish (UEL 12). In order to determine the mortality rate the fish were inoculated with concentrations ranging from 6.0×10^6 to $1,5 \times 10^8$ CFU/fish, in three different periods. To evaluate vaccine efficacy, two fish groups, average weight of 20g, were inoculated with 0,1 mL (2.0×10^8 CFU/mL) by intraperitoneal injection. A group of fish (Treatment 1) received one dose of the vaccine and the other (Treatment 2) was given two doses 21 days apart. The unvaccinated control was inoculated with 0.1 mL of "Tryptic Soy Broth" by intraperitoneal injection. The fish were challenged 30 days after the vaccination with a homologous strain of *S. agalactiae* with 0.1 mL (3.0×10^6 CFU/fish) by intraperitoneal injection and monitored for 16 days. The following clinical signs were observed in fish inoculated with different concentrations: anorexia, lethargy, erratic swimming, exophthalmia and abdominal distension. The macroscopic lesions were skin hemorrhage, splenomegaly, hepatomegaly with paleness in this organ and abdominal adherence. The mortality rates in experimental groups varied from 67, 5 to 90,0%. *S. agalactiae* was re-isolated in all analyzed fish. There was significant difference ($p=0,0045$) between Treatments 1 and 2 concerning mortality rates, and the relative survival percentage (RPS) was of 83,6% and 96,4%, respectively. The results showed that *S. agalactiae* isolated from naturally infected tilapia reproduced the disease in experimental conditions and vaccinated fish with one and two doses showed efficient protection against experimental challenge.

Keywords: *Streptococcus agalactiae*. Inactivated vaccine. Tilapia. Clinical signs. Rate mortality.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DE LITERATURA	12
3	OBJETIVOS	25
4	ARTIGO A – AVALIAÇÃO EXPERIMENTAL DA PATOGENICIDADE DE <i>Streptococcus agalactiae</i> EM TILÁPIA DO NILO (<i>Oreochromis niloticus</i>)	26
	RESUMO	26
	ABSTRACT.....	26
4.1	INTRODUÇÃO.....	27
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	29
4.2.1	Peixe.....	29
4.2.2	Manutenção dos Peixes	29
4.2.3	Controle da Qualidade da Água	29
4.2.4	Preparo do Inóculo	30
4.2.5	Experimento	30
4.2.6	Colheita e Análise das Amostras	31
4.2.7	Estatística	31
4.3	RESULTADOS	32
4.4	DISCUSSÃO.....	34
4.5	CONCLUSÕES	36
4.6	REFERÊNCIAS	36
5	ARTIGO B – AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA VACINA EXPERIMENTAL DE <i>Streptococcus agalactiae</i> INATIVADO EM TILÁPIA DO NILO (<i>Oreochromis niloticus</i>)	39
	RESUMO	39
	ABSTRACT.....	39
5.1	INTRODUÇÃO.....	40
5.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	42

5.2.1	Peixes.....	42
5.2.2	Controle da Qualidade da Água	42
5.2.3	Vacina.....	42
5.2.4	Desafio	43
5.2.5	Tratamentos	43
5.2.6	Exame Bacteriológico	44
5.2.7	Estatística.....	44
5.3	RESULTADOS	45
5.4	DISCUSSÃO.....	46
5.5	CONCLUSÕES	49
5.6	REFERÊNCIAS	49
	REFERÊNCIAS.....	55

1 INTRODUÇÃO

Nos diferentes segmentos da produção de proteína animal, a aquicultura é a que mais cresceu nos últimos 10 anos. A produção brasileira corresponde aproximadamente a 1% da mundial (CAPOBIANCO, 2006). Dentro da aquicultura, a piscicultura ocupa a primeira posição em produção (47,4%) correspondendo a 53,9% do valor total da atividade (FAO, 2006).

Com o crescimento da população mundial, a produção de peixe cultivado, ao contrário do estoque de peixes marinhos, também vem aumentando, constituindo-se em importante fonte de proteína para o homem (NAYLOR et al., 2000). A carne de peixe tem um perfil nutricional superior às outras carnes, sendo uma excelente fonte de proteína e energia digestível, rica em Omega-3, vitaminas lipossolúveis A, D e E, vitaminas hidrossolúveis do Complexo B e minerais como cálcio, fósforo, ferro, iodo e selênio (TACON, 2000).

A tilápia é o terceiro tipo de peixe mais cultivado no mundo, com a perspectiva de se tornar um dos produtos aquícolas de comércio internacional mais importante do século 21 (CAPOBIANCO, 2006). O Brasil se insere no contexto mundial como um dos países com grande potencial para a piscicultura, pois além de possuir um vasto território, suas condições climáticas favorecem o cultivo de peixes de água doce (KUBITZA, 1999). Em 2004, o Brasil, foi considerado o sétimo maior produtor de tilápia do mundo, mas responsável por apenas 4,07% da produção total (FAO, 2006). O estado do Paraná contribuiu com 11.921 toneladas, correspondendo a 72% da produção de peixes do estado (PARANÁ, 2005). A produção nacional de tilápia destina-se principalmente a pesque-pagues, comércio de peixe inteiro em feiras e supermercados e venda de filé congelado, com menos de 10% da produção sendo exportada (CAPOBIANCO, 2006).

O aumento da produção de tilápias tem ocorrido principalmente em sistemas de cultivo intensivo que se caracterizam por alta taxa de estocagem. O maior contato entre os peixes, práticas de manejo constantes e inadequadas e falhas nutricionais podem alterar a qualidade da água propiciando a ocorrência de enfermidades infecciosas (PLUMB, 1997; SHOEMAKER et al., 2000). O maior problema sanitário em sistemas de cultivo intensivo de tilápias é a estreptococose (SURESH, 1999), que faz parte de um complexo de doenças similares causadas por

diferentes gêneros e espécies de bactérias capazes de lesar o sistema nervoso central (TORANZO et al., 2005). Os principais sinais clínicos observados em tilápias com infecção natural por *Streptococcus spp.* são comportamento anormal relacionado com natação errática, letargia, exoftalmia uni ou bilateral, opacidade de córnea, anorexia, ascite e escurecimento da pele (PLUMB, 1997; EVANS et al., 2002).

O controle de doenças bacterianas em pisciculturas deve estar associada a práticas adequadas de manejo, qualidade da água, densidade de estocagem, fornecimento de alimentação balanceada e emprego de antibacterianos. A utilização de antibióticos, muitas vezes de forma incorreta, predispõe ao aparecimento de linhagens de microrganismos resistentes, riscos ao meio ambiente e eventual presença de resíduos no produto final que colocam em risco a saúde do consumidor (SHOEMAKER; KLESIUS, 1997). Neste contexto a imunoprofilaxia deve ser considerada como uma importante alternativa.

Diferentes tipos de vacinas estreptocócicas, com ou sem adição de extrato de produtos extracelulares ou adjuvantes foram estudadas experimentalmente (KLESIUS et al., 2004). A maioria das pesquisas refere-se a *S. iniae* (ELDAR et al., 1997; KLESIUS et al., 2000; EVANS et al., 2004). Eldar et al. (1995a) pesquisaram dois tipos de vacinas, uma com células inativadas e a outra com concentrado de produtos extracelulares de *S. difficile*. Nos últimos 10 anos a vacinação tem se tornado uma ferramenta importante para prevenção de doenças infecciosas em peixes marinhos e de água doce cultivados.

Atualmente já estão disponíveis em alguns países da Ásia, vacinas comerciais elaboradas com *S. iniae* e *Lactococcus garviae* (AquaVac™ Garvetil™, AquaVac™ Garvetil™ Oral, Schering-Plough Ltd) e de *S. iniae* (Norvax® Strep Si, INTERVET).

Esta pesquisa teve como objetivos estudar a taxa de mortalidade, sinais clínicos, lesões macroscópicas em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) inoculadas experimentalmente com diferentes concentrações de *S. agalactiae* e avaliar a eficácia da vacina de células inativadas de *S. agalactiae*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A aquicultura mundial teve um crescimento expressivo nos últimos cinquenta anos. Na década de 50 a produção foi de aproximadamente um milhão de toneladas, e no ano de 2004 atingiu 59.4 milhões de toneladas, com crescimento médio de 8,8% ao ano. Desse total, 69,6% correspondeu a produção da China, 21,9% ao restante da Ásia e região do Pacífico, 3,9% a Europa, 2,3% a América Latina e Caribe, 1,3% a América do Norte e 1,1% a África. O maior crescimento médio anual foi de 21,3%, verificado na América Latina e região do Caribe. Na aquicultura a piscicultura ocupa a primeira posição em produção (47,4%) correspondendo a 53,9% do valor econômico total da atividade (FAO, 2006).

Nos diferentes segmentos da produção de proteína animal, segundo dados de estatística da FAO, a aquicultura é a que mais cresceu nos últimos 10 anos com taxa de crescimento anual de 9,4% seguida da avicultura de 5,1%, suinocultura de 3,1%, a bovinocultura de 1,2% e caprinocultura 1,0% (BONDAD-REANTASO et al., 2005).

A piscicultura é um dos segmentos da produção animal que apresenta maior desenvolvimento no mundo e no Brasil (PEREZ, 1999). É uma atividade relativamente nova e que tem se firmado como uma exploração economicamente rentável. Com o crescimento da população mundial, a produção de peixe cultivado, ao contrário do estoque de peixes marinhos, também vem aumentando, constituindo-se em importante fonte de proteína para o homem (NAYLOR et al., 2000). A carne de peixe tem um perfil nutricional superior às outras carnes, sendo uma excelente fonte de proteína e energia digestível, rica em Omega-3, vitaminas lipossolúveis A, D e E, vitaminas hidrossolúveis do Complexo B e minerais como cálcio, fósforo, ferro, iodo e selênio (TACON, 2000).

No contexto mundial, a tilápia ocupa posição de destaque entre as espécies de água doce cultivadas, superada apenas em produção pelas carpas (KUBITZA, 2000). A tilápia pode tornar-se um dos produtos aquícolas de comércio internacional mais importante do século 21 (CAPOBIANCO, 2006). A produção de tilápias tem se expandido, apresentando crescimento anual acima de 14% desde 1984 (SURESH, 1999). De acordo com as estatísticas da FAO (LOVSHIM, 1997), em 1990 foram produzidas 390 mil toneladas de tilápias cultivadas e em 1996 houve

um crescimento significativo, sendo produzidas 800 mil toneladas. Segundo dados da FAO (2006), os dez maiores produtores de tilápia produziram em 2004, um total de 1.694.998,00 toneladas, sendo a China responsável por 52,93% dessa produção. O Brasil com uma produção de 69.078 toneladas (4,07%), foi classificado como o sétimo maior produtor. O estado do Paraná contribuiu com 11.921 toneladas de tilápias, correspondendo a 72% da produção total de peixes do estado (PARANÁ, 2005).

O Brasil se insere no contexto mundial como um dos países com grande potencial para a piscicultura, pois além de possuir um vasto território, suas condições climáticas favorecem o cultivo de peixes de água doce (KUBITZA, 1999). Observa-se grande contraste entre as regiões, tanto pela espécie de peixe produzida, quanto pela tecnologia de produção utilizada. A maior produção é verificada na região Sul, onde se estima que 43,2% dos peixes sejam produzidos em cativeiro. Entre as espécies cultivadas, destacam-se as carpas, tilápia, jundiá e “catfish”. A região Sudeste é a mais tecnificada, destacando-se a produção intensiva em viveiros e tanques-rede, estimando que 24,9% da produção esteja concentrada nos estados dessa região. As principais espécies cultivadas são tilápia, pacu e tambaqui. A balança comercial do setor em 2004 apresentou crescimento nas exportações de produtos com maior valor agregado, como filés de peixe, filé defumado, preparações e conservas (DALTON et al., 2005). Dentre os três produtos da aquicultura mais importados pelos EUA entre os anos de 2000 e 2005, a maior taxa média de crescimento anual foi de tilápia com 31%. A produção nacional de tilápia destina-se principalmente a pesque-pagues, comércio de peixe inteiro em supermercados e feiras e venda de filé congelado (CAPOBIANCO, 2006).

Bozano e Romero (2001) relataram que nos últimos 10 anos, o sistema de criação mais utilizado no Brasil foi o de tanque-rede. Fitzsimmons (2001) afirmou que o Brasil será o maior produtor de tilápia das Américas nas próximas duas décadas.

O crescimento, muitas vezes, desordenado da atividade tem sido acompanhado de um descontrole sanitário, o que tem colaborado com a produção de pescado com qualidade duvidosa e alta taxa de mortalidade, decorrente principalmente de doenças bacterianas (PEREZ, 1999).

Com a criação de tilápia em sistemas intensivos, os aspectos sanitários tornaram-se um problema para os piscicultores (PLUMB, 1997). A alta

densidade de estocagem, conseqüentemente, arraçoamento intensivo, com diminuição da qualidade da água devido à diminuição de oxigênio, aumento de amônia, nitrito e gás carbônico, levam a uma situação de estresse para os peixes, tornando-os susceptíveis às doenças (PLUMB, 1997; SHOEMAKER et al., 2000). Com o objetivo de minimizar os problemas sanitários os produtores utilizam, muitas vezes de forma indiscriminada, antibacterianos e produtos químicos, prejudiciais ao meio ambiente (KLESIUS et al., 2004).

O maior problema sanitário em sistemas de cultivo intensivo de tilápias é a estreptococose (SURESH, 1999). Outras doenças bacterianas foram descritas como a septicemia por *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda* e *Pseudomonas fluorescense*, septicemia hemorrágica por *Vibrio anguillarum* e *Vibrio vulnificus* e necroses por *Flavobacterium columnaris* (ROBERTS; SOMMERVILLE, 1982).

A estreptococose em peixes foi relatada pela primeira vez em 1957, em truta arco-íris no Japão, por Hoshina et al. (1958). Desde então, outras espécies de peixes têm sido afetadas (INGLIS et al., 1993).

Várias espécies de estreptococos foram descritas como causadoras de doenças em peixes como *Streptococcus faecium* (KUSUDA et al., 1976; MINAMI et al., 1979), *Streptococcus agalactiae* (KUSUDA; KOMATSU, 1978), *Streptococcus equisimilis* (MINAMI et al., 1979), *Streptococcus equi*, *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus zooepidemicus* (UGAJIN, 1981), *S. dysgalactiae* (NOMOTO et al., 2004).

A estreptococose em peixes deve ser considerada como um complexo de doenças similares causadas por diferentes gêneros e espécies capazes de lesar o sistema nervoso central (TORANZO et al., 2005).

O primeiro relato de isolamento de *Streptococcus spp.* em tilápias foi descrito por Wu (1970). Desde então, este patógeno tem sido identificado como sendo o principal agente de infecções bacterianas em peixes, responsável por elevados prejuízos, no Japão (KITAO et al., 1981), Taiwan (MING – CHEN et al., 1985), Israel (HUBERT, 1989), Arábia Saudita (AL-HARBI, 1994) Estados Unidos e América Central (PLUMB, 1997) e no Brasil (SALVADOR et al., 2003; 2005; FIGUEIREDO et al. 2006).

Pier e Madim (1976) caracterizaram *Streptococcus iniae* isolado de lesões de pele de golfinhos capturados no rio Amazonas. Posteriormente, este

agente foi isolado de diversas espécies de peixes em várias partes do mundo (KITAO et al., 1981; OHNISHI; JO, 1981; UGAJIN, 1981; KAWAHARA; KUSUDA, 1987; SAKAI et al., 1989). Shoemaker et al. (2001) afirmaram que mundialmente existem relatos de 22 espécies de peixes em sistemas de cultivo e em ambientes naturais afetadas por *S. iniae*, e que o impacto para a aqüicultura foi estimado em valores superiores a \$100 milhões. Esse microrganismo é considerado pela Associação Americana de Tilápias como o mais importante patógeno na produção de tilápias.

Eldar et al. (1994) isolaram de tilápias (*Oreochromis sp.*) e trutas (*Oncorhynchus mykiss*) apresentando meningoencefalite, duas novas espécies de estreptococos, uma não hemolítica e outra alfa hemolítica denominadas, respectivamente de *Streptococcus difficile* e *Streptococcus shilloi*. Em 1995, os mesmos autores observaram uma homologia genotípica de 70% a 100% entre as cepas de *S. iniae* e *S. shilloi*, sugerindo que *S. shilloi* poderia ser considerado sinônimo do *S. iniae*.

Estudos realizados por Vandamme et al. (1997) revelaram que *S. difficile* apresenta o antígeno polissacarídeo capsular Ib, específico das cepas de *Streptococcus agalactiae*, sendo classificado no grupo B de Lancefield tipo Ib estreptococos com perfil eletroforético de proteína celular indistinguível de *S. agalactiae*, contrariando a afirmação de Eldar et al. (1994), como uma nova espécie. Kawamura et al., 2005, após análises comparativas de cinco seqüências de genes, observaram que *S. agalactiae* e *S. difficile* apresentam semelhança na seqüência de valores de 100 % para 16S rRNA, 99,6 % para *gyrB*, 98,6 % para *sodA*, 99,5 % para *gyrA* e 99,8 % para *parC* genes, sugerindo que *S. difficile* é sinônimo de *S. agalactiae*.

Estreptococos do grupo B (GBS) tem sido isolado de caninos, eqüinos, suínos, bovinos, peixes e humanos. Nos bovinos, o microrganismo pode colonizar a glândula mamária, onde pode sobreviver por longos períodos causando mastite clínica ou subclínica, caracterizada por diminuição da produção e da qualidade do leite. Nos humanos, é caracterizado como patógeno oportunista que coloniza o trato gastrointestinal e urinário de mais de 50% dos indivíduos saudáveis. Esse microrganismo pode causar pneumonia, septicemia e meningite em recém nascidos. Ainda é responsável por significativa morbidade em gestantes, idosos e imunocomprometidos. Os isolados de GBS podem ser divididos em nove sorotipos

(Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII), relacionados ao polissacarídeo capsular (CPS) que são estrutura e antígenicamente diferentes (JOHRI et al., 2006).

Bunch e Bejerano (1997) observaram que as infecções causadas por *S. difficile* foram predominantes em tilápia cultivadas em regiões de clima quente (26°C -28°C) e em regiões de temperatura mais baixa (15°C -16°C), por *S. iniae*. No norte do Paraná, Brasil, foram isolados estreptococos de tilápias cultivadas em tanque rede e tanque de terra com sinais clínicos compatíveis com estreptococose e histórico de elevada taxa de mortalidade. Esses estreptococos foram caracterizados como não hemolíticos pertencentes ao grupo B de Lancifield e com características fenotípicas semelhantes ao *S. agalactiae* (SALVADOR et al., 2003; 2005). Figueiredo et al. (2006) relataram o isolamento de *S. agalactiae* de tilápia criadas em tanque rede com histórico de alta mortalidade, localizadas no estado de Minas Gerais e Espírito Santo.

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

Os estreptococos são bactérias oportunistas amplamente distribuídas no ambiente aquático e sua patogenicidade está associada às condições de estresse relacionados à qualidade da água e condições de criação intensiva (BUNCH; BEJERANO, 1997). Fatores ambientais têm sido amplamente pesquisados e associados à mortalidade de tilápias por *Streptococcus spp.* (SHOEMAKER et al., 2000), os principais fatores são o nível de oxigênio dissolvido, concentração de amônia e nitrito, alcalinidade total, pH, transparência da água, dureza total e temperatura (MCGEACHIN et al., 1987).

Shoemaker et al. (2000) relataram que a morbidade e mortalidade de peixes por estreptococose podem ser influenciadas pela densidade de estocagem. O aumento da densidade de estocagem exige maiores quantidades de ração e reduz a disponibilidade de oxigênio dissolvido e qualidade da água. Os autores observaram em infecção experimental com *S. iniae*, aumento da taxa de mortalidade das tilápias submetidas à alta densidade de estocagem.

Os peixes refugos foram considerados por Minami (1979), fonte de infecção de *Streptococcus spp.* O aumento da densidade de estocagem provocou um aumento das lesões de pele dos peixes, indicando ser esta uma das principais

vias de infecção para estreptococos (CLARK et al., 2000). A ingestão de olhos e vísceras de peixes mortos, por peixes saudáveis, sugere que a infecção estreptocócica pela via oral e olfatória também pode ocorrer (SHOEMAKER et al., 2000). O patógeno introduzido diretamente no trato digestivo, provavelmente não seja capaz de afetar populações de peixes saudáveis. Portanto, se houver injúrias na parede do intestino e/ou estômago, por outras bactérias, produtos químicos ou outros poluentes da água, o *Streptococcus spp.* pode causar infecção (RASHEED; PLUMB, 1984).

Em 1997, Shoemaker e Klesius relataram dificuldades na utilização de antibióticos para o tratamento de infecções por *Streptococcus spp.*, pois o patógeno pode sobreviver no interior de macrófagos, onde muitas drogas antimicrobianas não agem. Os antibióticos podem eliminar os sinais clínicos, mas não o agente e os peixes doentes devido a anorexia não se alimentam da ração medicada predispondo à seleção de linhagens do microrganismo resistentes. Somente a utilização de antibióticos não é eficiente para eliminar o patógeno, devendo estar associada às práticas adequadas de manejo como a rápida remoção das fontes de infecção, peixes mortos e doentes, adequar a densidade de estocagem e fornecimento de alimentação balanceada.

Evans et al. (2002) relataram que o *S. agalactiae* isolado de peixes naturalmente infectados foi sensível a oxitetraciclina, ampicilina, ciprofloxacina, amoxicilina com ácido clavulônico, cloranfenicol, rifampicina e sulfa com trimetoprim, em ordem decrescente de sensibilidade. Os isolados foram resistentes a gentamicina e estreptomina. No Brasil, Figueiredo et al. (2006) verificaram que *S. agalactiae* isolado de tilápias naturalmente infectadas, foram sensíveis a amoxicilina, cloranfenicol, eritromicina, norfloxacina, tetraciclina e a sulfonamida e resistentes ao ácido nalidíxico, gentamicina e neomicina.

Os sinais clínicos de tilápias infectadas por *Streptococcus spp.* são similares aos de outras infecções de origem bacteriana. Isto torna o diagnóstico laboratorial de fundamental importância para o diagnóstico da estreptococose em peixes (PLUMB, 1997).

A patogenicidade dos estreptococos é atribuída às exotoxinas, que podem ser altamente tóxicas a baixas concentrações (RASHEED; PLUMB, 1984).

Os principais sinais clínicos observados em tilápias com infecção natural por *Streptococcus spp.* são típicos de septicemia (PLUMB, 1999). Os sinais

mais freqüentes são: comportamento anormal, natação errática, letargia, exoftalmia uni ou bilateral, opacidade de córnea, anorexia, ascite e escurecimento da pele (PLUMB, 1997; EVANS et al., 2002). Sinais como letargia, diminuição do apetite, exoftalmia, distensão visceral, natação errática e movimentos circulares, escurecimentos dos peixes e petéquias na base das nadadeiras ventrais foram relatados em tilápias naturalmente infectadas por *S. agalactiae* no Brasil (SALVADOR et al., 2005; FIGUEIREDO et al., 2006).

Eldar et al. (1995a), no norte de Israel, isolaram *S. difficile* e *S. shiloi* de tilápias cultivadas com sinais de letargia, diminuição de apetite, natação errática, exoftalmia bilateral e ascite no estágio pré-agônico. Para a infecção experimental os autores utilizaram peixes de 160g, DL₅₀ de *S. difficile* na concentração de $1,0 \times 10^7$ UFC i.p., em tilápias e *S. shiloi* de $1,0 \times 10^8$ UFC i.p., em trutas. Os peixes desenvolveram sinais clínicos semelhantes aos apresentados pelos naturalmente infectados. Os autores observaram que após sucessivas inoculações destas espécies de estreptococos, em tilápias ocorreu um aumento da virulência, com uma diminuição progressiva da DL₅₀, na ordem de 3 a 5 logarítimos, após três passagens in vivo.

Evans et al. (2000) a partir de uma cepa de *S. iniae* previamente isolada de “striped bass” (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*) naturalmente infectados, foram preparados inóculos com diferentes concentrações para infectar “striped bass” e tilápias. Nos “striped bass”, o inóculo foi de $1,0 \times 10^5$ UFC por via nasal e ocular. Em tilápias o inóculo foi de $1,0 \times 10^5$ UFC por via ocular e $1,4 \times 10^8$ UFC por via nasal. A mortalidade dos “striped bass” foi de 98,3% e das tilápias 28,3% inoculados por via nasal. Os autores afirmaram que a diferença de mortalidade entre as duas espécies de peixes pode ser devida a origem do *S. iniae*. Não foi observada mortalidade nos peixes inoculados por via ocular.

Evans et al. (2002) inocularam *S. agalactiae* isolado de peixes naturalmente infectados, na concentração de $1,0 \times 10^7$ UFC/tilápia, via i.p. e observaram mortalidade de 60% em um período de sete dias após a inoculação. Nas primeiras 24 horas após a inoculação as tilápias apresentaram natação errática e letargia. *S. agalactiae* foi re-isolado do rim cranial dos peixes em 90% dos casos.

McNulty et al. (2003) pesquisaram a possibilidade do *S. iniae* infectar “striped bass” pelas guelras e posterior disseminação do agente no organismo.

Foram instilados nas guelras $5,0 \times 10^5$; $2,6 \times 10^6$; $5,0 \times 10^6$ e $1,0 \times 10^8$ UFC de *S. iniae*/peixe e a mortalidade acumulada foi de 13; 27; 100 e 100%, respectivamente durante um período de observação de 14 dias. Esse estudo demonstrou que o *S. iniae* pode invadir o epitélio filamentosso das guelras, disseminar-se pela corrente circulatória e atingir o encéfalo.

Evans et al. (2002) determinaram a DL_{50} do *S. agalactiae*, $1,9 \times 10^3$ UFC/peixe, em peixes submetidos a níveis normais de oxigênio dissolvido. Evans et al. (2003) submeteram tilápias a uma baixa concentração de oxigênio dissolvido (≤ 1 mg/L) durante 24 horas e posteriormente inocularam $7,5 \times 10^2$ UFC de *S. agalactiae*/peixe, via i.p. A mortalidade acumulada foi de 80% em 14 dias de observação, demonstrando que em sistemas de cultivo intensivo, com alta densidade de estocagem, a baixa quantidade de oxigênio disponível, pode ser uma condição de estresse para os peixes favorecendo a infecção estreptocócica.

Evans et al. (2004) inocularam $4,6 \times 10^6$ UFC de *S. agalactiae*/tilápia por via i.p. e 30% dos peixes morreram 24h após a inoculação, e ao final do experimento a mortalidade acumulada foi de 50%. Em 100% dos peixes mortos foi re-isolado *S. agalactiae* das amostras colhidas de narinas, encéfalo e rim cranial.

As lesões macroscópicas relacionadas com infecção estreptocócica em peixes caracterizam-se por líquido esbranquiçado a sanguinolento na cavidade visceral, esplenomegalia, peritonite fibrinosa e oftalmite com edema corneal e hipópion. Em cortes histológicos foram verificados hemorragia na região subaracnóidea e infiltrado de células mononucleares no encéfalo, pericardite, inflamação granulomatosa em fígado, panoftalmite e meningoencefalite (ELDAR, et al., 1995a; PERERA, et al., 1998; PLUMB, 1999).

O sistema imune de peixes embora filogeneticamente sofisticado é primitivo quando comparado com o dos mamíferos. Dos peixes pesquisados, principalmente as espécies de interesse econômico, todas produzem uma classe dominante de imunoglobulina (Ig) com molécula tetramérica similar a Ig M dos mamíferos. Algumas espécies de peixes produzem ainda uma Ig de baixo peso molecular (NEWMAN et al., 1993). Alguns relatos mostram a existência de mais três Ig, sendo elas a IgD (HIRONO et al., 2003), IgZ (DANILOVA et al., 2005) e a IgT (HANSEN et al., 2005). A IgM existe sob duas formas alternadas: uma como receptor de membrana para antígenos de superfície de células B e outra como

proteína solúvel secretada pelos fluídos corporais (LITMAN et al., 1999). Os peixes apresentam subclasses de linfócitos com papel similar às células B e T. A resposta imune nos peixes é temperatura dependente existindo forte correlação entre a temperatura da água e a intensidade da resposta imune. A idade e o peso do peixe no momento da imunização são também de fundamental importância para o desenvolvimento de imunidade eficaz e duradoura (NEWMAN et al., 1993).

O primeiro relato sobre imunização de peixes é de 1930 (NYBELIN, 1935). Mas somente na década de 70 ocorreu a intensificação das pesquisas e incentivo ao desenvolvimento de vacinas comerciais, desde então, a imunização de peixes tem-se difundido (NEWMAN, 1993).

A maioria das vacinas bacterianas é inativada e administrada por injeção ou imersão. Infecções bacterianas causadas por bactérias gram-negativas como *Vibrio sp.*, *Aeromonas sp.* e *Yersinia sp.* tem sido eficazmente controladas pela vacinação. A vacinação tem reduzido consideravelmente a morbidade e mortalidade de peixes e, conseqüentemente, diminuído a utilização indiscriminada de antibióticos (GUDDING, 1999).

A aplicação das vacinas por via i.p. é o método mais confiável e eficaz, quando comparada à via oral e de imersão. As desvantagens da via i.p. incluem estresse para os peixes, custos com a mão de obra, segurança e tempo requerido tanto para quem administra como para os animais. A administração de vacinas injetáveis é inadequada para peixes juvenis, pequenos e frágeis. Em contraste, a vacinação por imersão é um método prático para vacinação de grande quantidade de peixes, principalmente para peixes pequenos, embora seja necessário maior volume de vacina e a proteção geralmente é menos eficaz quando comparada com as vacinas injetáveis (NAKANISHI; OTOTAKE, 1997).

Toranzo et al. (1995) avaliaram a eficácia de uma vacina composta de toxóide e células inativadas de *Enterococcus sp.* e compararam a aplicação por via i.p. e imersão. Os peixes de 45g, foram vacinados por via i.p. e desafiados 4 semanas após, apresentando porcentagem relativa de sobrevivência (RPS) de 100%. Os peixes de 150g vacinados via i.p. e desafiados 4 meses após apresentaram RPS de 77 a 86%, dependendo da concentração do desafio. Entretanto, esta vacina aplicada por imersão não conferiu proteção aos peixes.

Huising et al. (2003) testaram uma vacina contra *Aeromonas salmonicida* aplicada por imersão, utilizando um pré-tratamento com uma solução

hiperosmótica durante dois minutos, para aumentar a absorção da vacina. Os autores demonstraram que a principal vantagem desse esquema de vacinação é a maior disponibilidade do antígeno solúvel e conseqüente aumento da eficácia da vacina. A solução hiperosmótica age como adjuvante estimulando a resposta inata e adquirida, melhorando a eficiência da vacina quando aplicada por imersão.

Eldar et al. (1995b) elaboraram duas vacinas contra *S. difficile*, sendo uma com células de estreptococos inativadas por formalina, e a outra com concentrado de produtos extracelulares (ECP) de *S. difficile*. Os peixes com peso de 150-180g foram vacinados via i.p. com duas doses da vacina composta de células inativadas com intervalo de quatro semanas e, via intramuscular (i.m.), com duas doses do ECP, com intervalo de duas semanas e, nos dois experimentos, os peixes foram desafiados com $1,0 \times 10^5$ UFC de *S. difficile* via i.p. Não foi observada morte nos peixes vacinados com células inativadas em um período de 75 dias após o desafio, entretanto, nos peixes não vacinados a mortalidade foi de 100%. Nos peixes inoculados com ECP, a mortalidade foi de 8% e nos não vacinados foi de 100%.

Eldar et al. (1997) avaliaram uma vacina com *S. iniae* inativado por formalina. A vacina foi aplicada via i.p. em 150 trutas arco-íris mantidas em laboratório e em 40.000 trutas arco-íris por via i.p. em uma propriedade de criação, com histórico de estreptococose e mortalidade de 60%. Nas condições experimentais, os animais foram desafiados com inóculo de $1,0 \times 10^5$ UFC/peixe via i.p., 1, 3 e 6 meses após a vacinação, e apresentaram 90% de sobrevivência, mesmo após o segundo e terceiro desafio. Na propriedade, a mortalidade acumulada dos peixes vacinados foi de 4,5% e o peso médio de 410g. Nos peixes não vacinados a mortalidade foi de 53% e o peso médio de 340g após 4 meses de avaliação.

Klesius et al. (1999) desenvolveram uma bacterina modificada contra *S. iniae* para tilápias, utilizando células inativadas adicionadas de ECP. Grupos de tilápias de 25g e de 100g foram vacinadas com $4,0 \times 10^{10}$ UFC/mL pela via i.p. e desafiados 30 dias após com inóculo de $1,0 \times 10^9$ UFC/mL. No quinto dia após o desafio, os autores observaram o início dos sintomas nos peixes não vacinados e a mortalidade se estendeu até o 12^o dia. Após 60 dias de observação, o RPS foi de 95,3% no grupo de peixes com 25g e 84,2% no grupo com 100g. Os autores

verificaram que a vacinação eliminou os sinais clínicos nos animais vacinados e que os produtos celulares do *S. iniae* poderiam conter antígenos de superfície, provavelmente envolvidos na patogenicidade.

Klesius et al. (2000) compararam a via de inoculação i.p. e i.m. e desafio com cepas homólogas e heterólogas em tilápias de 18g vacinadas contra *S. iniae*. Os resultados demonstraram que a via i.p. proporcionou um RPS de 93,7% quando os peixes foram desafiados com cepa heteróloga e 45,6% com homóloga. Pela via i.m. o RPS foi de 59,5% com cepa heteróloga e 17,7% com homóloga.

Nakanishi et al. (2002) demonstraram que micro lesões na pele de trutas antes da aplicação da vacina de *S. iniae* por banho de imersão, melhoraram a absorção da vacina. A mortalidade dos peixes vacinados foi de 40% e do grupo controle 80%, resultados similares aos obtidos com a aplicação da vacina por via i.p.

Evans et al. (2004), nos EUA, pesquisaram duas vacinas experimentais elaboradas com *S. iniae* e *S. agalactiae*. Estas vacinas continham estreptococos inativados ($4,0 \times 10^9$ UFC/mL) e ECP. Um grupo de 80 tilápias de 30g cada foi vacinado com *S. agalactiae* na concentração de $4,0 \times 10^9$ UFC/mL por via i.p. e desafiado com cepa homóloga, $1,5 \times 10^4$ UFC/peixe, i.p., 30 dias após. Os peixes foram monitorados por 14 dias e a mortalidade foi de 15% no grupo vacinado e de 76% no controle, correspondendo a uma RPS de 80%. Para avaliar a eficácia da vacina de *S. agalactiae* aplicada por imersão foram utilizados dois grupos. Um grupo com 65 peixes de 5g foi desafiado com $3,6 \times 10^5$ UFC/peixe e outro com 23 peixes de 30g foi desafiado com $1,7 \times 10^6$ UFC/peixe, ambos por imersão. A RPS foi de 34 e 35%, respectivamente. Em um grupo vacinado com *S. iniae* por via i.p. e desafiado com *S. agalactiae* por via i.p., a mortalidade foi 100%, sugerindo não existir imunidade cruzada entre *S. iniae* e *S. agalactiae*. A vacina de *S. agalactiae* apresentou boa eficácia quando inoculada por via i.p. e a imersão pode ser uma alternativa para vacinar peixes pequenos.

Shelby et al. (2004) avaliaram a resposta imunológica de “striped bass” (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*) vacinados com células mortas de *S. iniae* com adjuvante completo de Freund's. No nono dia após o desafio, a taxa de mortalidade no grupo dos peixes não vacinados foi de 100% e no grupo vacinado 13%.

Pasnik et al. (2005) avaliaram a influência do tempo de estocagem por um ano a 4°C, sobre a eficácia de uma vacina de células inativadas de *S. agalactiae* e ECP. Após 30 dias da vacinação por via i.p., os peixes foram desafiados i.p. com $1,7 \times 10^4$ UFC de *S. agalactiae*/peixe. Os peixes vacinados e não vacinados apresentaram sinais clínicos como letargia, anorexia, alteração na coloração da pele e natação errática desde o primeiro dia após o desafio. Por um período de observação de 21 dias, a mortalidade acumulada do grupo controle foi de 45% e do vacinado de 32% correspondendo a uma RPS de 29%. Em estudo prévio sobre a eficácia desta vacina, aplicada imediatamente após o preparo, foi verificado RPS de 80% demonstrando que o tempo de estocagem diminuiu a eficácia da vacina.

Os produtos celulares são importantes fatores de virulência dos patógenos de peixes e imunogênicos o suficiente para conferir proteção (PASNIK et al., 2005). O ECP faz parte da constituição da maioria das vacinas eficazes contra microrganismos patogênicos para peixes como *Photobacterium damsela* spp. *piscida* (MAGARIÑOS et al., 1994), *Vibrio harveyi* (ZORILLA et al., 2003) e *Flavobacterium psychrophilum* (LAFRENTZ et al., 2004).

Shoemaker et al. (2006) avaliaram a eficácia de vacina inativada e liofilizada de *S. iniae* na concentração de $4,0 \times 10^9$ células/mL administrada por via i.p. e via oral incorporada à ração utilizando a tecnologia Oralject™ (vacina protegida) em tilápias. O RPS dos peixes vacinados pela via oral foi de 63,1% e do grupo vacinado por via i.p. de 100%. Este estudo sugere que a administração por via oral da vacina protegida de *S. iniae* é um método, não estressante, eficaz e econômico para vacinação de grandes populações de peixes.

Pasnik et al. (2006) avaliaram a imunização passiva de tilápias, o soro hiperimune de *S. agalactiae* foi obtido de peixes vacinados e desafiados com *S. agalactiae*. Foi aplicado 0,1 mL do soro por via i.p. em um grupo de tilápias com peso médio de 3,3g e desafiado 72 horas após com $1,5 \times 10^4$ UFC/peixe. A mortalidade acumulada foi de 10% no grupo de peixes vacinados e 72,7% no controle, demonstrando que a vacinação passiva poderia ser considerada como ferramenta profilática ou terapêutica contra infecções por *S. agalactiae* em peixes.

A principal dificuldade encontrada para o desenvolvimento de vacina de GBS com eficácia global para humanos e animais é a existência de vários

sorotipos com distribuição geográfica diferente e reação cruzada heterogênea entre os sorotipos. As vacinas baseadas no CPS têm mostrado boa imunogenicidade mas tem como limitação a necessidade da utilização de diferentes sorotipos. Mais recentemente as pesquisas em humanos estão direcionadas para vacinas a base de proteínas. Um número limitado de proteínas como a C5a peptidase, fração β da proteína C, proteína de ligação à laminina (LmbP), proteína imunogênica de superfície (Sip), proteína de repetição rica em leucina (Lrrg), estão sendo estudadas como potenciais componentes de vacinas apresentando com vantagem a expressão em quase todas as cepas e sorotipos de GBS (JOHRI et al., 2006).

Atualmente já estão disponíveis vacinas comerciais para doenças de peixes na Ásia, como a elaborada com *S. iniae* e *Lactococcus garviae* (AquaVac™ Garvetil™, SCHERING-PLOUGH). Segundo o Laboratório responsável pela fabricação, a vacinação de alevinos por imersão com uma dose reforço, incorporada na ração, e administrada na fase juvenil apresenta uma eficácia de 50% contra as bactérias utilizadas na elaboração da vacina (CONROY, 2006). A vacina inativada de *S. iniae* (Norvax® Strep Si, INTERVET) pode ser administrada por imersão ou via i.p. Segundo o Laboratório a eficácia da vacina, quando obedecidas às normas de conservação e uso, pode alcançar 68% e 100% de eficácia quando aplicada por imersão e por injeção i.p., respectivamente.

3 OBJETIVOS

- Avaliar a taxa de mortalidade, sinais clínicos, lesões macroscópicas em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) inoculadas experimentalmente com diferentes concentrações de *S. agalactiae*.
- Avaliar a eficácia da vacina de células inativadas de *S. agalactiae* isolada de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) naturalmente infectadas no norte do Paraná, Brasil.

4 ARTIGO 1 – AVALIAÇÃO EXPERIMENTAL DA PATOGENICIDADE DE *Streptococcus agalactiae* EM TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)

Resumo

No contexto mundial, as tilápias ocupam posição de destaque entre as espécies cultivadas de água doce. O cultivo em sistemas intensivos tem aumentado os problemas sanitários, acarretando sérios prejuízos aos piscicultores. O estresse provocado pela alta densidade de estocagem, arraçoamento intensivo e diminuição da qualidade da água torna a tilápia mais susceptível às doenças infecciosas. O maior problema verificado em sistemas de cultivo intensivo em regiões de clima quente é a septicemia causada por *Streptococcus agalactiae*. Os objetivos deste trabalho foram avaliar a taxa de mortalidade, sinais clínicos e lesões macroscópicas em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) inoculadas experimentalmente com diferentes doses infectantes de *S. agalactiae*. Para a realização dos experimentos foram constituídos nove grupos de peixes, com 40 animais cada, mantidos em caixas de fibra de vidro com capacidade para 500L de água. Os peixes foram inoculados pela via intraperitoneal com doses de infectantes variando de $1,0 \times 10^6$ a $1,5 \times 10^8$ UFC/peixe, em três períodos diferentes e monitorados duas vezes ao dia, por um período de 12 dias. Os sinais clínicos observados foram anorexia, letargia, natação errática, exoftalmia e ascite e as lesões macroscópicas hemorragia na pele, esplenomegalia, hepatomegalia com palidez do órgão e aderências viscerais. *S. agalactiae* foi re-isolado de todos os peixes submetidos a exame bacteriológico. As taxas de mortalidade nos grupos experimentais variaram de 67,5 a 90,0%. Os resultados mostram que o *S. agalactiae* isolado de tilápias naturalmente infectadas reproduziu a doença em condições experimentais.

Palavras-chave: Estreptococos. Tilápia do Nilo. Sinais clínicos. Taxa de mortalidade.

EXPERIMENTAL EVALUATION OF *Streptococcus agalactiae* PATOGENICITY IN NILE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*)

Abstract

Tilapia have an outstanding position in cultured freshwater fish worldwide. Intensive aquaculture systems have increased sanitary problems, causing serious economic losses to fish farmers. The stress caused by the high stocking density leading to intensive feeding and decrease in water quality makes tilapia susceptible to infectious diseases. The biggest problem in tilapia intensive aquaculture systems in hot climate regions is septicemia caused by *Streptococcus agalactiae*. The purpose

of this work was to evaluate mortality rate, clinical signs and macroscopic injuries in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) inoculated experimentally with different concentrations of *S. agalactiae*. The experiment was made with nine groups with 40 fish in each one. The fish were remained in fiber glass boxes with 400L of water. The fish were inoculated by intraperitoneal (i.p.) route with *S. agalactiae* concentrations ranging from $1,0 \times 10^6$ to $1,5 \times 10^8$ UFC/fish in three different periods and observed twice a day during 12 days. The following clinical signs were observed: anorexia, lethargy, erratic swimming, exophthalmia and abdominal distension. The macroscopic injuries were skin hemorrhage, splenomegaly, hepatomegaly with paleness in this organ and abdominal adherence. *S. agalactiae* was re-isolated in all analyzed fish. The mortality rates in experimental groups varied from 67,5 to 90,0%. The results showed that *S. agalactiae* isolated from naturally infected tilapia reproduced the disease in experimental conditions.

Keywords: Streptococcus. Nile tilapia. Clinical signs. Mortality rate.

4.1 INTRODUÇÃO

Atualmente a aquicultura mundial é o setor da produção de alimentos de maior expansão, com uma média anual de crescimento de 8,9% (BONDAD-REANTASO, et al. 2005). Na década de 1950 a produção foi de aproximadamente um milhão de toneladas, e no ano de 2004 atingiu 59,4 milhões. O maior crescimento médio anual, de 21,3% ocorreu na América Latina e na região do Caribe, que é responsável por apenas 2,3% da produção mundial (FAO, 2006).

Em 2004, o Brasil produziu 177.518 toneladas de peixes de água doce das quais 69.078 de tilápia. O Brasil foi classificado como o 7º maior produtor de tilápias no mundo (FAO, 2006). Segundo dados Paraná (2005), o estado do Paraná produziu 11.921 toneladas de tilápia em 2004.

O crescimento da aquicultura mundial, associado à globalização do comércio, introdução de novas espécies e sistemas intensivos de manejo entre outros, tem acentuado os problemas sanitários, além do surgimento de doenças emergentes (BONDAD-REANTASO et al., 2005). Dentre as doenças bacterianas, as de origem estreptocócicas aumentaram com o cultivo intensivo de peixes de água doce, sendo *Streptococcus spp.* considerado o principal patógeno em diferentes espécies de peixes.

Streptococcus agalactiae é a espécie comumente encontrada em regiões de clima quente estando associado a diferentes espécies de peixes de água doce, marinha e estuarina (EVANS et al., 2002). O primeiro relato de estreptococose

em peixes foi de Hoshina et al. (1958), no Japão, em truta arco-íris cultivada. Desde então, a infecção por este patógeno foi relatada em muitas outras espécies de peixes (INGLIS et al., 1993). *Streptococcus difficile* foi descrito pela primeira vez por Eldar et al. (1994), em Israel, como um cocos não hemolítico que causava septicemia e meningoencefalite em tilápia (*Oreochromis spp.*) e em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). Estudos recentes demonstraram que o *S. difficile* é do grupo B de Lancefield, tipo Ib, com perfil eletroforético de proteína celular indistinguível do *S. agalactiae* (VANDAMME et al., 1997). Kawamura et al. (2005) propuseram uma reclassificação do *S. difficile* para unificar a nomenclatura, considerando *S. difficile* e *S. agalactiae* sinônimos. No Brasil, Salvador et al. (2005) isolaram de tilápias cultivadas em tanque-rede e viveiros de terra, no estado Paraná, *Streptococcus spp.* Não-hemolítico do grupo B de Lancifield e Figueiredo et al. (2006), nos estados de Minas Gerais e Espírito Santo isolaram *S. agalactiae* de tilápias cultivadas em tanque-rede.

Eldar et al. (1995), em Israel, observaram em peixes infectados por *S. difficile*, natação errática, diminuição no apetite, letargia, exoftalmia com hemorragia intraocular e opacidade de córnea e ascite A natação em círculos, movimentos descordenados e a rigidez dorsal indicam o comprometimento do sistema nervoso central. Salvador et al. (2005) observaram em propriedades de cultivo de tilápia em tanque-rede, uma alta morbidade e mortalidade por *S. agalactiae*, sendo os principais sinais clínicos, escurecimento da pele, letargia, natação errática e circular, diminuição de apetite, exoftalmia uni ou bilateral e distensão da cavidade visceral. As principais alterações macroscópicas encontradas por Salvador et al. (2003) foram lesões na pele, nadadeiras e brânquias, opacidade da córnea, líquido na cavidade visceral, hepato e esplenomegalia.

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

Os objetivos deste trabalho foram avaliar a taxa de mortalidade, sinais clínicos e lesões macroscópicas em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) inoculadas experimentalmente com uma amostra de campo de *S. agalactiae* em diferentes concentrações.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Peixe

Para a realização deste trabalho foram utilizadas 360 tilápia do Nilo (*O. niloticus*) com peso médio de 50g (40 a 60g), gentilmente cedidas pela Estação de Piscicultura, do Departamento de Biologia Animal e Vegetal, da Universidade Estadual de Londrina. Os peixes não apresentavam sinais de infecção por estreptococos e nas três tilápias de cada período experimental submetidas ao exame bacteriológico, antes do início do experimento, não foi possível o isolamento de estreptococos em diferentes órgãos.

4.2.2 Manutenção dos Peixes

Para a realização dos experimentos foram constituídos nove grupos de peixes, com 40 animais cada, mantidos em caixas de fibra de vidro com capacidade para 500L, volume de água de 400L e taxa de renovação de 3L por minuto. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia com ração extrusada (FISH™ 30% de proteína bruta, Cooperativa Integrada), na proporção de 3% do peso vivo. Nestas mesmas condições os peixes foram aclimatados durante 10 dias antes do início dos experimentos.

4.2.3 Controle da Qualidade da Água

As caixas continham água de poço semi-artesiano, com fluxo e aeração contínua e a limpeza realizada diariamente por sucção. Durante o experimento, a média da concentração de oxigênio dissolvido foi mantida em 3.8 ± 0.5 mg/L, temperatura em $26.0 \pm 0.8^\circ\text{C}$, amônia em 0.05 mg/L e nitritos 0.25mg/L. O oxigênio dissolvido e a temperatura foram medidos diariamente com equipamento modelo YSI 55 (Yellow Spring Instrument, Yellow Springs, OH, USA). A amônia foi mensurada quinzenalmente pela reação de Berthelot (SOLARANZO, 1969) e o nitrito pela reação de Griess (AMINOT; CHAUSSEPIED, 1983).

4.2.4 Preparo do Inóculo

O *S. agalactiae* (UEL 12) utilizado como inóculo nos diferentes experimentos foi isolado a partir de um surto que se caracterizou por elevada morbidade e mortalidade de tilápias em uma propriedade de criação intensiva em tanques-rede na região Norte do Paraná. A cepa isolada foi alíquotada e mantida congelada em nitrogênio líquido até o seu uso.

Uma alíquota *S. agalactiae* foi semeada em meio TSB (Tryptic Soy Broth -Difco Laboratories, Sparks, MD) e incubada a 30° C por 48 horas. Para verificar a pureza do inóculo, uma alíquota da cultura foi semeada em Agar Columbia (Difco Laboratories, Sparks, MD) adicionado de 5% de sangue ovino (ACS) e incubadas a 30° C por 48 horas.

Para cada período do experimento foi preparado uma cultura com concentração de $1,5 \times 10^9$ UFC/mL padronizado por espectrofotometria (Cintra 5) com comprimento de onda de 540nm e densidade óptica (OD) de 0,60 e contagem em placas (UFC/mL) com TSA (Tryptic Soy Agar -Difco Laboratories, Sparks, MD). A partir dessa concentração foram realizadas diluições em TSB (Tryptic Soy Broth - Difco Laboratories, Sparks, MD) para obtenção das doses infectantes, confirmadas por contagem em placas de TSA.

4.2.5 Experimento

O experimento foi realizado em três períodos. Em cada período foram analisadas duas doses infectantes de *S. agalactiae*. Os peixes desafiados foram inoculados por via intraperitoneal (i.p.) com 0,1 mL de suspensão bacteriana, e os dos grupos controle com 0,1 mL i.p. de TSB estéril. No primeiro período (abril/2004), os grupos 1, 2 e 3, foram inoculados com uma suspensão bacteriana de $1,5 \times 10^8$ UFC/peixe, 5×10^7 UFC/peixe e TSB, respectivamente. No segundo período (junho/2004), os grupos 4, 5 e 6, foram inoculados com suspensão bacteriana de $2,0 \times 10^7$ UFC/peixe, $6,0 \times 10^6$ UFC/peixe e TSB, respectivamente. No

terceiro período (agosto/2005), os grupos 7, 8, e 9, foram inoculados com suspensão bacteriana de $1,2 \times 10^8$ UFC/peixe, $1,0 \times 10^6$ UFC/peixe e TSB, respectivamente.

Após a inoculação os peixes foram monitorados duas vezes ao dia, por um período de 12 dias. Foi observada a mortalidade diária e os principais sinais clínicos. Os peixes mortos foram recolhidos em sacos plásticos estéreis para realização de necropsia, observação das lesões macroscópicas e colheita de material para exames bacteriológicos.

4.2.6 Colheita e Análise das Amostras

Para a colheita do material biológico foram necropsiadas 12 tilápias com sinais clínicos em cada período. Foram colhidas 107 amostras assepticamente, sendo 36 de rim, 32 de encéfalo, e as demais de olho, fígado, líquido visceral e coração. As amostras foram semeadas em ACS e as placas incubadas a 30°C durante 24 a 72h, foi observada a morfologia das colônias e ausência de hemólise. As colônias consideradas típicas foram submetidas à Coloração de Gram, prova da catalase, esculina, NaCl 6,5% e crescimento em Agar Azul de Metileno. A identificação do *S. agalactiae* foi realizada segundo Evans et al., 2002. Para a identificação bioquímica foi utilizado Api 20 Strep (BioMerieux, France) e para a classificação no grupo de Lancefield o Slidex strepto kit (BioMerieux, França).

4.2.7 Estatística

Foram calculadas as frequências absoluta e relativa para a mortalidade diária de tilápias por concentração de *S. agalactiae*. Para comparar as proporções de mortalidade em cada concentração, foi utilizado o teste Qui-Quadrado com nível de significância de 5%.

4.3 RESULTADOS

Nos seis experimentos de inoculação (grupos 1 e 2, 4 e 5, 7 e 8) com diferentes concentrações de *S. agalactiae* morreram 198/240 (82%) tilápias. Nos três grupos controle (3, 6 e 9) morreram 2/120 (1,67%) tilápias. Na Tabela 1, constam os resultados da porcentagem da mortalidade diária e acumulada em relação à mortalidade total de 198 peixes. Verifica-se que as mortes ocorreram ao longo dos 12 dias de observação após a inoculação. Os coeficientes de mortalidade mais elevados ocorreram no primeiro e segundo dia, 60 (30,3%) e 28 (14,1%), respectivamente e com porcentagem de mortalidade acumulada de 44,4%. Um segundo pico de mortalidade ocorreu entre o sexto 23 (11,6%) e o sétimo dia com 25 (12,6%) peixes. Até o sétimo dia a mortalidade acumulada de peixes foi de 83,2%. Observa-se que não houve diferença significativa na mortalidade acumulada entre os grupos 1, 2, 4, 5 e 7, com inóculos variando de $6,0 \times 10^6$ a $1,5 \times 10^8$ UFC/peixe. O grupo 8 inoculado com $1,0 \times 10^6$ UFC/peixe apresentou uma mortalidade acumulada de 67,5%, diferença significativa quando comparada aos demais grupos, exceto com o grupo 5.

Tabela 1 – Mortalidade diária e acumulada de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) inoculadas em três períodos, com diferentes doses infectantes de *Streptococcus agalactiae* isolado de tilápia naturalmente infectada, Londrina, 2005.

*Grupo	N ^o Peixes	Período	Inóculo UFC/peixe	1º d	2º d	3º d	4º d	5º d	6º d	7º d	8º d	9º d	10º d	11º d	12º d	Total	%
1 ^a	40	Abril/2004	1,5 x 10 ⁸	5	8	0	5	0	4	6	3	1	1	3	0	36	90,0
2 ^a	40	Abril/2004	5,0 x 10 ⁷	7	3	3	4	2	5	5	3	0	3	0	0	35	87,5
3 ^c	40	Abril/2004	Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4 ^a	40	Junho/2004	2,0 x 10 ⁷	9	6	2	1	1	5	4	4	2	1	0	0	35	87,5
5 ^{a,b}	40	Junho/2004	6,0 x 10 ⁶	2	4	0	0	4	5	8	1	2	1	1	2	30	75,0
6 ^c	40	Junho/2004	Controle	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	2,5
7 ^a	40	Agosto/2005	1,2 x 10 ⁸	25	1	0	1	4	2	1	1	0	0	0	0	35	87,5
8 ^b	40	agosto/2005	1,0 x 10 ⁶	12	6	0	0	2	2	1	1	1	1	0	1	27	67,5
9 ^c	40	agosto/2005	Controle	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,5
Total de óbitos diário				60	28	05	11	13	23	25	13	6	7	4	3	198	
%				30,3	14,1	2,5	5,5	6,6	11,6	12,6	6,6	3,1	3,5	2,1	1,5		
% Acumulada				30,3	44,4	46,9	52,4	59,0	70,6	83,2	89,8	92,9	96,4	98,5	100,0		

* Letras diferentes: P ≤ 0,05; teste de Qui-Quadrado

Grupos Controle: excluídos do cálculo de óbitos diário e porcentagem.

Os peixes dos grupos controle se alimentaram normalmente e permaneceram ativos durante todo o experimento. Os peixes, de todos os grupos inoculados com *S. agalactiae*, apresentaram alterações de comportamento e sinais clínicos similares. No primeiro dia após a inoculação, ocorreu uma elevada taxa de mortalidade caracterizada por morte súbita, enquanto a maioria dos peixes estavam letárgicos no fundo do tanque, com alteração de coloração da pele e anorexia. A partir do segundo dia, ocorreu agravamento dos sinais clínicos como natação errática, exoftalmia uni e bilateral, opacidade de córnea e distensão da cavidade visceral.

Nos 36 peixes necropsiados, as lesões predominantes foram hemorragia na pele, ascite, encéfalo e fígado amolecido, hepatomegalia e palidez do órgão, esplenomegalia e aderência visceral. Nas 107 amostras submetidas ao exame bacteriológico, foi isolado *S. agalactiae* com as mesmas características morfológicas, culturais, fenotípicas e sorológicas da cepa utilizada para a inoculação experimental das tilápias. *S. agalactiae* foi re-isolado do rim cranial, encéfalo, fígado, coração, olho e líquido ascítico. Dos peixes do grupo controle, que morreram ao longo do experimento, não foi isolado *S. agalactiae*.

4.4 DISCUSSÃO

Evans et al. (2002) observaram início dos sinais clínicos com 24 horas após inoculação experimental com *S. agalactiae* na concentração de $1,0 \times 10^7$ UFC/peixe por via IP e mortalidade acumulada de 60% após sete dias de observação. Taxa de mortalidade de 30% foi relatada nas 24 horas após a inoculação de tilápias com *S. agalactiae* na concentração de $4,5 \times 10^6$ e $5,5 \times 10^2$ UFC/peixe, com mortalidade ao final do experimento de 60 e 50%, respectivamente (EVANS et al., 2004).

Pasnik et al. (2005) verificaram mortalidade de 84 a 96% em grupos controle utilizados em experimento com vacina estreptocócica desafiados com *S. agalactiae* ($1,89 \times 10^4$ e $2,11 \times 10^4$ UFC/peixe), respectivamente.

Comparando os dados desta pesquisa (Tabela 1) com os da literatura observa-se uma diferença acentuada entre os coeficientes de mortalidade

relatados. Vários fatores como, concentração de células dos inóculos, cepa de *S. agalactiae*, via de inoculação, período de observação após o desafio, idade e peso dos peixes, reativação ou não da patogenicidade podem ter induzido essas diferenças.

Neste trabalho a cepa de *S. agalactiae* utilizada não foi reativada para inoculação dos peixes nos diferentes grupos experimentais o que justifica a maior concentração de bactérias no inóculo. Entretanto, ressalta-se que não houve diferença significativa entre os coeficientes de mortalidade dos peixes dos grupos 1 e 7 (Tabela 1), realizados com intervalo de 16 meses utilizando a mesma cepa de *S. agalactiae*, mantida em nitrogênio líquido. Eldar et al. (1995) verificaram que a virulência de uma cepa de *S. difficile* isolada de infecção natural em tilápias aumentou após três passagens “in vivo”. A DL₅₀ diminuiu na ordem de cinco logaritmos, da concentração inicial de 10^7 para 10^2 /UFC. Rasheed e Plumb (1984) reativaram a virulência de *Streptococcus* não hemolítico do grupo B de Lancefield e observaram uma mortalidade de 50% após 96 horas da inoculação por via i.p. de $1,4 \times 10^4$ UFC/peixe (DL₅₀).

A via de inoculação influencia a taxa de mortalidade dos peixes inoculados experimentalmente. Perera et al. (1997) infectaram tilápias experimentalmente com *S. iniae* através da via oral (inoculação no intestino através de cateter), por imersão dos peixes em solução de bactéria e injeção i.p. e observaram mortalidade de 50%, 34% e 95%, respectivamente. McNulty et al. (2003) demonstraram que o *S. iniae* pode invadir o epitélio filamentos das guelras e causar septicemia, entretanto observaram baixa mortalidade de peixes (13,33%) quando instilados experimentalmente nas guelras com $5,0 \times 10^5$ UFC/peixe.

Sinais clínicos semelhantes aos deste trabalho foram relatados por Salvador et al. (2003; 2005), no estado do Paraná e Figueiredo et al. (2006), nos estados do Espírito Santo e Minas Gerais em tilápias cultivadas em viveiros de terra e tanque-rede. Os autores observaram, letargia, anorexia, escurecimento da pele, natação errática, exoftalmia uni ou bilateral, ascite e alta mortalidade. Sinais clínicos semelhantes também foram observados em tilápias com infecção natural em Israel, e nos EUA (ELDAR et al., 1995; PLUMB, 1999). Os sinais clínicos observados em peixes inoculados experimentalmente com *S. difficile* e *S. agalactiae* descritos na literatura foram similares aos observados na infecção natural (ELDAR et al., 1995;

EVANS et al., 2002; EVANS et al., 2004). Sinais clínicos similares também são observadas em tilápias infectadas experimental ou naturalmente por *S. iniae* (PERERA et al., 1994; EVANS et al., 2000; SHELBY et al., 2002).

Lesões hemorrágicas na pele, ascite, hepatomegalia e esplenomegalia observadas nos peixes inoculados desse experimento são compatíveis com as relatadas por Salvador et al., 2005; Figueiredo et al., 2006, em tilápias naturalmente infectadas no Brasil.

Segundo Austin e Austin (1987), apesar do desafio experimental não ter acurácia para estimar a patogenicidade da bactéria porque os procedimentos não mimetizam necessariamente a via de infecção natural, eles dão importantes indicações do potencial patogênico do agente infeccioso.

4.5 CONCLUSÕES

A cepa de *S. agalactiae* isolada de tilápias naturalmente infectadas reproduziu a doença em peixes inoculados experimentalmente por via intraperitoneal com diferentes doses infectantes. Os sinais clínicos e as lesões macroscópicas foram similares aos descritas na infecção natural.

4.6 REFERÊNCIAS

AMINOT, A.; CHAUSSEPIED, M. **Manuel des analyses chimiques em milieu Marin**. Brest: CNEXO; 1983.

AUSTIN, B.; AUSTIN, D. A. Gram-positive cocci. In: **BACTERIAL Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish**. Ellis Horwood, Chichester; 1987. p. 97-107.

BONDAD-REANTASO, M. G. et al. Disease and health management in Asian aquaculture. **Veterinary Parasitology**, v. 132, p. 249-272, 2005.

CHANG, P. H.; PLUMB, J. A. Effects of salinity on Streptococcus infection of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Journal of Applied Aquaculture**, v. 6, p. 39-45, 1996.

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

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

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

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

EVANS, J. J. et al. Survival of *Streptococcus agalactiae* from frozen fish following natural and experimental infections. **Aquaculture**, v. 233, p. 15–21, 2004.

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

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, State of world aquaculture 2006. Rome, 2006, 134 p. (FAO fisheries technical paper, n. 500).

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

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

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

McNULTY, S.T. et al. *Streptococcus iniae* infection and tissue distribution in hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*) following inoculation of the gills. **Aquaculture**, v. 220, p. 165–173, 2003.

PARANÁ. Secretaria da Agricultura e do Abastecimento. Levantamento de dados piscicultura do estado do Paraná, 2005. mensagem recebida por <lgiordano@uel.br> em 12 dez. 2006.

PASNIK, D. J.; EVANS, J. J.; KLESIUS, P. H. Duration of protective antibodies and correlation with survival in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* following *Streptococcus agalactiae* vaccination. **Diseases of aquatic organisms**, v. 66, p. 129-134. 2005.

PERERA, R. P. et al. *Streptococcus iniae* associated with mortality of *Tilapia nilotica* x *T. aurea*. **Journal Aquatic Animal Health**, v. 6, p. 335-340, 1994.

PERERA, R. P.; JOHNSON, S. K.; LEWIS, D.H. Epizootiological aspects of *Streptococcus iniae* affecting tilapia in Texas. **Aquaculture**, v. 152, p. 25-33, 1997.

- PLUMB, J. A. Tilapia bacterial diseases. In: HEALTH: maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes. Ames: Iowa State University, 1999. p. 297-305.
- RASHEED, V.; PLUMB J. A. Pathogenicity of a non-hemolytic group B Streptococcus sp. in Gulf killifish (*Fundulus grandis* Baird and Girard). **Aquaculture**, v. 37, p. 97–105, 1984.
- SALVADOR, R. et al. Isolamento de Streptococcus spp de tilápia do Nilo (*Oreochromis Niloticus*) e qualidade da água de tanques rede na Região Norte do Estado do Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 24, p. 35-42, 2003.
- SALVADOR, R. et al. Isolation and characterization of Streptococcus spp. group B in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in hapas nets and earth nurseries in the northern region of Parana State, Brazil. **Ciência Rural**, v. 35, p. 1374-1378, 2005.
- SHELBY, R. A. et al. Passive immunization of tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), with anti-Streptococcus iniae whole sera. **Journal of fish diseases**, v. 25, p. 1-6, 2002.
- SOLORZANO, L. Determination of ammonia in natural waters by the phenylhypochlorite method. **Limnology Oceanography**, v. 14, p. 799-801, 1969.
- VANDAMME, P. et al. Streptococcus difficile is a nonhemolytic Group B, type Ib Streptococcus. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, p. 81-85, 1997.

5 ARTIGO B – AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA VACINA EXPERIMENTAL DE *Streptococcus agalactiae* INATIVADO EM TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)

Resumo

A piscicultura é um dos segmentos da produção animal que mais cresce no Brasil. Entre as diferentes espécies de peixes, a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é a mais cultivada no estado do Paraná. O incremento da produção ocorreu em sistemas intensivos de cultivo que podem, dependendo das condições de manejo, predispor os peixes a doenças de origem infecciosa. As pesquisas mostram que *Streptococcus agalactiae* é um dos principais agente bacteriano em tilápias cultivadas em regiões de clima quente (temperatura 26 -28°C). O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia da vacina inativada de *S. agalactiae* em tilápias. A vacina foi preparada com células inativadas por formalina a partir de uma cepa de *S. agalactiae* isolada de tilápias naturalmente infectadas. As tilápias, com peso aproximado de 20g, foram inoculadas com 0,1 mL ($2,0 \times 10^8$ UFC/mL) por via intraperitoneal (i.p.). Um grupo de peixes (Tratamento 1) recebeu uma dose da vacina e outro (Tratamento 2) duas, com intervalo de 21 dias. O grupo controle foi inoculado por via i.p. com 0,1 mL de “Tryptic Soy Broth”. Os peixes foram desafiados, 30 dias após a aplicação da vacina, com a cepa homóloga de *S. agalactiae*, 0,1 mL (3×10^6 UFC/peixe) por via i.p. e monitorados durante 16 dias. Houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,0045$) entre os coeficientes de mortalidade dos Tratamentos 1 e 2 e a porcentagem da sobrevivência relativa (RPS) foi de 83,6% e de 96,4%, respectivamente. Os peixes vacinados com uma e duas doses da vacina apresentaram proteção eficaz ao desafio experimental.

Palavras-chave: Estreptococos. Imunoprofilaxia. Peixes cultivados.

EXPERIMENTAL EVALUATION OF THE EFFICACY OF *S. agalactiae* INACTIVATED VACCINE FOR NILE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*)

Abstract

Aquaculture is one of the most developing areas in animal production in Brazil. Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) now constitutes the most important fish farmed in Paraná state. An improvement in production occurred due to intensive breeding systems but it may also lead to infectious diseases, depending on handling conditions. *Streptococcus agalactiae* has proven to be one of the most important causes of infection in tilapia farmed in hot climate regions (temperature 26-28°C). The objective of this work was to evaluate the efficacy of *S. agalactiae* inactivated vaccine for Nile tilapia. The vaccine was prepared with cells inactivated by formalin from a *S. agalactiae* strain isolated from naturally infected fish. The fish, average

weight of 20g, were inoculated with 0.1 mL (2.0×10^8 CFU/mL) by intraperitoneal injection. A group of fish (Treatment 1) received one dose of the vaccine and the other (Treatment 2) was given two doses 21 days apart. The unvaccinated control was inoculated with 0.1 mL of "Tryptic Soy Broth" by intraperitoneal injection. The fish were challenged 30 days after the vaccination with a homologous strain of *S. agalactiae* with 0.1 mL (3.0×10^6 CFU/fish) by intraperitoneal injection and monitored for 16 days. There was significant difference ($p=0.0045$) between Treatments 1 and 2 concerning mortality rates and the relative survival percentage (RPS) was of 83.6% and 96.4%, respectively. The vaccinated fish with one and two doses showed efficient protection against experimental challenge.

Keywords: Streptococcus. Prophylactic immunization. Reared fish.

5.1 INTRODUÇÃO

A aquicultura mundial teve um crescimento expressivo nos últimos 50 anos. No início da década de 50 a produção era de aproximadamente de um milhão de toneladas e em 2004, de 59,4 milhões. Desse total, 897.276 toneladas foram de tilápia (*Oreochromis spp.*). Segundo dados da FAO (2006), o Brasil foi o sétimo maior produtor em 2004, com 69.078 toneladas. No estado do Paraná, a produção total nesse ano, foi de 16.558 toneladas, sendo 72% (11.921 toneladas) de tilápia (PARANÁ, 2005).

Mundialmente, entre as doenças bacterianas, a septicemia causada por *Streptococcus spp.* é o maior problema sanitário em criação intensiva de tilápia (SURESH, 1999). Wu (1970), relatou o primeiro isolamento de *Streptococcus spp.* em tilápia e desde então este patógeno tem sido associado a alta mortalidade no Japão (KITAO et al., 1981), em Israel (HUBERT, 1989), na Arabia Saudita (AL-HARBI, 1994), nos Estados Unidos e na América Central (PLUMB, 1997) e no Brasil (SALVADOR et al., 2003; 2005; FIGUEIREDO et al., 2006). Entre os estreptococos, *S. iniae* foi isolado de 22 espécies de peixes nativos e cultivados, com perdas anuais estimadas em aproximadamente 100 milhões de dólares (SHOEMAKER et al., 2001). Bunch e Bejerano (1997) observaram que as infecções por *S. iniae* foram predominantes em tilápias cultivadas em baixas temperaturas (15°C a 16°C). Em regiões de clima quente com média de 26°C a 28°C, as infecções em tilápias são causadas por *Streptococcus difficile*, posteriormente denominado de *Streptococcus agalactiae* (KAWAMURA et al., 2005).

S. agalactiae causa doença de caráter septicêmico em tilápias, atingindo órgãos como encéfalo, rim, intestinos, entre outros. Os sinais clínicos mais freqüentes são anorexia, exoftalmia, ascite e natação errática (PLUMB, 1999; EVANS et al., 2002; SALVADOR et al., 2005).

O aumento da produção de tilápia tem ocorrido principalmente em sistemas de cultivo intensivo que se caracterizam por alta taxa de estocagem. O maior contato entre os peixes, práticas de manejo constantes e inadequadas associadas à falhas nutricionais podem alterar a qualidade da água propiciando a ocorrência de enfermidades infecciosas (PLUMB, 1997; MARTINS, 1998; SHOEMAKER et al., 2000). Na tentativa de controlar essas enfermidades, os produtores têm utilizado, muitas vezes, de forma indiscriminada, antibacterianos e produtos químicos, prejudiciais ao meio ambiente e colocando em risco a saúde do consumidor (KLESIUS et al., 2004). Neste sentido a pesquisa sobre a utilização de vacinas antibacterianas em peixes cultivados foi intensificada nos últimos 10 anos (GUDDING et al., 1999; HUISING et al., 2003).

Diferentes tipos de vacinas estreptocócicas, com ou sem adição de extrato de produtos extracelulares ou adjuvantes foram estudadas experimentalmente (KLESIUS et al., 2004). A maioria das pesquisas refere-se a *S. iniae* (ELDAR et al., 1997; KLESIUS et al., 2000; EVANS et al., 2004). Eldar et al. (1995a) pesquisaram dois tipos de vacinas, uma com células inativadas e a outra com concentrado de produtos extracelulares de *S. difficile*. Toranzo et al. (1995), estudaram uma vacina inativada de células de *Enterococcus spp.* adicionada de toxóide. Akhlaghi et al. (1996), avaliaram uma vacina experimental com células inativadas de *Streptococcus spp.* com adjuvante incompleto de Freund's.

Atualmente já estão disponíveis em alguns países da Ásia, vacinas comerciais elaboradas com *S. iniae* e *Lactococcus garviae* (AquaVac™ Garvetil™, AquaVac™ Garvetil™ Oral, Schering-Plough Ltd) e de *S. iniae* (Norvax® Strep Si, INTERVET). Evans et al. (2004) mostraram que peixes imunizados com vacina de *S. iniae* não apresentaram imunidade para *S. agalactiae*.

O objetivo do trabalho foi avaliar a eficácia de uma vacina composta de células inativadas de *S. agalactiae* isolado de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) naturalmente infectadas.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Peixes

Foram utilizadas 412 tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), gentilmente cedidas pela Estação de Piscicultura do Departamento de Biologia Animal e Vegetal, da Universidade Estadual de Londrina. Os peixes com peso médio de 20g foram mantidos em caixas de fibra de vidro (500L) com volume de 400L de água e taxa de renovação de 3L de água/minuto. As tilápias foram colocadas nos aquários 10 dias antes do início do experimento para aclimatação. Antes do início do experimento foram necropsiados aleatoriamente três peixes de cada tratamento, colhido material de rim cranial e encéfalo para exame bacteriológico com o objetivo de verificar se os mesmos eram livres de *S. agalactiae*. Os peixes foram alimentados com ração extrusada (Fish TM 30% de proteína bruta -Cooperativa Integrada, Londrina, PR) na proporção de 3% do peso vivo, duas vezes ao dia.

5.2.2 Controle da Qualidade da Água

As caixas continham água de poço semi-artesiano, com fluxo e aeração contínua e a limpeza realizada diariamente por sucção. Durante o experimento, a média da concentração de oxigênio dissolvido foi mantida em 3.8 ± 0.5 mg/L, temperatura em $26.0 \pm 0.8^\circ\text{C}$, amônia em 0.05 mg/L e nitritos 0.25mg/L. O oxigênio dissolvido e a temperatura foram medidos diariamente com equipamento modelo YSI 55 (Yellow Spring Instrument, Yellow Springs, OH, USA). A amônia foi mensurada quinzenalmente pela reação de Berthelot (SOLARANZO, 1969) e o nitrito pela reação de Griess (AMINOT; CHAUSSEPIED, 1983).

5.2.3 Vacina

A vacina foi preparada segundo Klesius et al. (1999) e Evans et al. (2004) com modificações. Foi utilizado *S. agalactiae* (UEL 12) isolado de um surto de estreptococose em tilápias cultivadas em tanque-rede no norte do estado do

Paraná. O cultivo foi realizado em meio “tryptic soy broth” TSB, (Difco Laboratories, Sparks, MD) e incubado a 30°C/72h. Para verificar a pureza da cultura, uma alíquota foi semeada em Ágar Columbia (Difco Laboratories, Sparks, MD) adicionado de 5% de sangue ovino (ACS). Para a inativação da cultura em TSB, foi adicionado formalina tamponada 10% para obtenção de concentração final de 3%, em temperatura ambiente por 48 h. Uma alíquota da cultura tratada foi semeada em ACS para confirmar a inativação das células. A cultura inativada foi centrifugada a 7000X g / 30 min, a 10°C e o “pellet” diluído em TSB na concentração final de $2,0 \times 10^8$ UFC/mL, previamente padronizado por espectrofotometria (Cintra 5) com comprimento de onda de 540nm e contagem em placas (UFC/mL) com TSA (Tryptic Soy Agar -Difco Laboratories, Sparks, MD).

5.2.4 Desafio

Alíquotas de 1 mL da cepa vacinal de *S. agalactiae* foram mantidas em nitrogênio líquido, até a sua utilização. A suspensão bacteriana foi realizada a partir de uma alíquota repicada em 100mL de TSB, cultivada a 30°C/24h. A concentração celular de $3,0 \times 10^7$ UFC/mL foi obtida a partir de um inóculo inicial de $3,0 \times 10^8$ UFC/mL padronizado por espectrofotometria com comprimento de onda de 540nm e densidade óptica (OD) de 0,42 e contagem em placas (UFC/mL) com TSA (Tryptic Soy Agar -Difco Laboratories, Sparks, MD) e diluído em TSB (Tryptic Soy Broth -Difco Laboratories, Sparks, MD) na proporção de 1:10 e confirmada por contagem em placas com TSA. A pureza do inóculo foi verificada por semeadura em ACS e as placas incubadas a 30°C durante 48h e observado o crescimento de colônias puras de *S. agalactiae*.

5.2.5 Tratamentos

Para realização do experimento, foram utilizados dois tratamentos com três repetições cada (Figura 1). No primeiro tratamento os peixes foram vacinados com 0,1 mL da vacina ($2,0 \times 10^8$ UFC/mL) via intraperitoneal (i.p.) e

desafiados 30 dias após com $3,0 \times 10^6$ UFC/peixe, i.p. No segundo, as tilápias foram inoculadas via i.p. com duas doses de 0,1mL da vacina ($2,0 \times 10^8$ UFC/mL), com intervalo de 21 dias e desafiadas 30 dias após a dose reforço com $3,0 \times 10^6$ UFC/peixe, i.p. No grupo controle os peixes foram inoculados com 0,1 mL de TSB estéril, i.p. e desafiados 30 dias após com $3,0 \times 10^6$ UFC/peixe, i.p. Os peixes foram monitorados diariamente por um período de 16 dias e anotados os principais sinais clínicos e a mortalidade. Os peixes mortos e moribundos foram retirados duas vezes ao dia. Durante e ao término dos experimentos foram necropsiados 23 peixes, 13 do grupo controle durante o experimento e três ao término, um do Tratamento 1 durante o experimento e seis, três de cada tratamento, ao término do experimento. Foram colhidas amostras de sangue, rim cranial, encéfalo, coração, olho, fígado e líquido ascítico para exames bacteriológicos.

5.2.6 Exame Bacteriológico

As amostras de sangue, líquido visceral e decalque dos órgãos foram submetidas à coloração de Gram. Posteriormente, as amostras foram semeadas em ACS, incubadas a 30°C, em aerofilia, durante 48 horas. Colônias com características de *S. agalactiae*, não hemolíticas foram submetidas à coloração de Gram e identificadas por provas bioquímicas (HOLT, 1994). Para uma caracterização fenotípica e sorológica mais precisa, as cepas isoladas foram analisadas no Api 20 Strep Microtest (BioMerieux, France) e a classificação do grupo de Lancefield realizada pelo Slidex Strepto-kit (BioMerieux, France), seguindo as recomendações de Evans et al. (2002).

5.2.7 Estatística

Foi utilizado o teste de Qui-quadrado corrigido de Yates, com nível de significância de 5%. O cálculo do Risco Relativo (RR) com intervalo de confiança de 95% foi realizado para verificar a presença de associação entre vacina e fator protetor. Utilizou-se o pacote estatístico Epi6 6,04 (DEAN et al., 1994). A eficácia da

vacina foi calculada como porcentagem de sobrevivência relativa (RPS), segundo Amend, 1981, conforme a fórmula: $RPS = 1 - (\% \text{ mortalidade dos animais vacinados} / \% \text{ mortalidade dos animais controle}) \times 100$

5.3 RESULTADOS

Os resultados da eficácia das vacinas de *S. agalactiae* constam na Tabela 1. Nas tilápias do Tratamento 1, o RR foi de 0,16 e a RPS de 83,6% ($p=0,0001$). No Tratamento 2, o RR foi de 0,03 e a RPS de 96,6% ($p=0,0001$).

O coeficiente de mortalidade do Tratamento 1 foi de 10,74%, (IC 95% = 6,49 – 16,50) e do Tratamento 2 de 2,26% (IC 95% = 0,58 – 6,01). Houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,0045$) entre as proporções nos dois tratamentos.

Nas Figuras 2 e 3, constam os dados relativos a mortalidade diária dos dois tratamentos e do grupo controle após desafio. No Tratamento 1, morreram 16 peixes (16/149), dos quais 13 no segundo dia após o desafio e os demais até o 11º dia. No Tratamento 2, morreram três tilápias (3/133), entre o segundo e oitavo dia. No grupo controle morreram 85 peixes (85/130), com dois picos de mortalidade bem caracterizados, um no segundo dia e outro no sétimo e oitavo dia após desafio. As tilápias do grupo controle que morreram no primeiro pico apresentavam anorexia, alteração de coloração da pele e letargia. A partir do quinto dia, foi observado o agravamento dos sinais clínicos, com anorexia, ascite, natação errática, letargia, manchas esbranquiçadas no corpo e exoftalmia uni e bilateral, sendo observado um número mais elevado de mortes no sétimo e oitavo dia.

Nos peixes necropsiados do grupo controle durante e ao final do experimento foram observadas alterações macroscópicas como: líquido amarelado, serosanguinolento ou esbranquiçado na cavidade visceral, aderência dos órgãos, estômago vazio, vesícula biliar repleta, encéfalo e fígado amolecidos e hemorrágicos.

Os peixes dos Tratamentos 1 e 2 estavam ativos e se alimentaram normalmente durante o experimento. As tilápias que morreram nesses tratamentos não apresentaram sinais clínicos, exceto um peixe do Tratamento 1 que apresentou exoftalmia bilateral, letargia e anorexia no 11º dia após desafio. Nesses tratamentos,

os animais comeram as vísceras e olhos dos animais mortos. No final do experimento os peixes necropsiados não apresentaram alterações macroscópicas e nas 12 amostras de material biológico colhidos de seis peixes ao final do experimento não foi isolado *S. agalactiae*.

No exame direto dos materiais biológicos obtidos de peixes com alterações macroscópicas foi observada a presença de cocos Gram positivos com disposição em cadeia. Nas 71 amostras colhidas dos peixes do grupo controle, durante e ao término do experimento, e nas três amostras de um peixe do Tratamento 1, submetidas ao exame bacteriológico foi isolado *S. agalactiae* com as mesmas características morfológicas, tintoriais, bioquímicas e sorológicas da cepa utilizada para o desafio.

5.4 DISCUSSÃO

Eldar et al. (1995a), em Israel, pesquisaram quatro vacinas constituídas de células inativadas (10^{10} UFC/mL), de quatro cepas de *S. difficile*, isoladas de peixes com sinais clínicos de estreptococose. Os autores utilizaram cinco grupos de peixes com 25 cada, peso de 150-180g, sendo um controle e quatro vacinados com duas doses i.p. com intervalo de 4 semanas e desafiados 3 semanas após com *S. difficile*, sendo três grupos com cepa heteróloga e um com homóloga. O inóculo foi de $1,0 \times 10^5$ UFC/peixe, i.p., previamente reativado por três inoculações sucessivas em tilápia. Após período de observação de 75 dias, verificaram que nos grupos vacinados não ocorreu mortalidade de peixes, enquanto no grupo controle foi de 100%. Os autores relataram que houve proteção cruzada frente as quatro cepas de *S. difficile*. Uma quinta vacina constituída somente de produtos extracelulares concentrados de *S. difficile*, aplicada por via intramuscular, duas doses com intervalo de duas semanas, apresentou mortalidade de 8% e o grupo controle 100%.

Evans et al. (2004), nos EUA, pesquisaram duas vacinas experimentais elaboradas com *S. agalactiae* e *S. iniae*. Estas vacinas continham estreptococos inativados ($4,0 \times 10^9$ UFC/mL) e concentrado de produtos extracelulares (ECP) e foram testadas por via i.p e banho de imersão. Um grupo de 80 tilápias com 30g cada foi vacinado com *S. agalactiae* por via i.p. e desafiado com

cepa homóloga, $1,5 \times 10^4$ UFC/peixe i.p., 30 dias após. Os peixes foram monitorados por 14 dias e a mortalidade dos peixes vacinados foi de 15% e a do controle foi 76%, correspondendo a RPS de 80%. Os grupos vacinados com *S. agalactiae* por banho de imersão, um grupo com peixes de 5g desafiados por imersão com cepa homóloga ($3,6 \times 10^5$ UFC/peixe) e outro com peixes de 30g e desafiados por imersão com cepa homóloga ($1,7 \times 10^6$ UFC/peixe), apresentaram RPS de 34 e 35%, respectivamente. O grupo de peixes vacinado com *S. iniae* por via i.p. e desafiado com *S. agalactiae* por via i.p., apresentou 100% de mortalidade, esses dados sugerem não existir imunidade cruzada entre *S. iniae* e *S. agalactiae*.

Analisando os diferentes experimentos com vacinas estreptocócicas para peixes, observa-se que vários fatores podem influenciar a eficácia da vacina: composição e concentração da vacina, via de inoculação, idade dos peixes, temperatura da água, concentração do inóculo para o desafio, período de observação pós-desafio, espécie e cepa de estreptococos, uso de adjuvante e dose reforço, entre outros.

As concentrações das vacinas estudadas por Eldar et al. (1995a), Evans, et al. (2004) e por Pasnik et al. (2005), variaram de $4,0 \times 10^9$ a $1,0 \times 10^{10}$ UFC/mL e as concentrações dos inóculos utilizados para o desafio dos peixes vacinados e não vacinados de $2,6 \times 10^3$ a $1,7 \times 10^6$ UFC/peixe. A variação da mortalidade dos peixes não vacinados foi de 45 a 100%. No presente trabalho foi utilizada uma vacina com concentração de $2,0 \times 10^8$ UFC/mL e inóculo para o desafio de $3,0 \times 10^6$ UFC/peixe. A mortalidade dos peixes do grupo controle foi de 64,5% (Tabela 1).

Na literatura existem poucos trabalhos sobre a temperatura da água, idade e peso das tilápias correlacionados a imunocompetência. Segundo Newman et al. (1993) a resposta imune nos peixes é temperatura dependente existindo forte correlação entre a temperatura da água e a intensidade da resposta imune. A idade e o peso do peixe no momento da imunização são também de fundamental importância para o desenvolvimento de imunidade eficaz e duradoura. Acredita-se que a partir dos 21 dias de idade os peixes sejam imunocompetentes (EVANS et al., 2004). A maioria dos experimentos com vacinas utilizam tilápia com idade superior a

21 dias e peso variando de 5 a 180g (ELDAR et al., 1995a; EVANS et al., 2004). Evans et al. (2004) realizaram pesquisa com vacina de *S. agalactiae* aplicada pela via i.p. em peixes de 5 e 30g e observaram RPS de 25% e 80%, respectivamente. Neste trabalho foram utilizados peixes com aproximadamente 20g de peso e 45 dias de idade, vacinados com uma dose por via i.p. apresentando um RPS de 83,6% (Tabela 1).

Tabela 1 – Eficácia da vacina de células inativadas de *Streptococcus agalactiae* aplicada por via intraperitoneal em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em condições experimentais, Londrina, 2006.

Tratamentos	Óbitos/Total (%)	P*	RR (IC 95%) ^a	RPS% ^b
1^c	16/149 (10,74)	0,0001	0,16 (0,10 – 0,27)	83,6
Controle	85/130 (64,5)			
2^d	3/133 (2,26)	0,0001	0,03 (0,01 – 0,11)	96,6
Controle	85/130 (64,5)			

* Qui-quadrado corrigido de Yates

^a RR – Risco relativo

^b Porcentagem relativa de sobrevivência

^c Tratamento 1 – peixes vacinados com uma dose de vacina

^d Tratamento 2 – peixes vacinados com duas doses de vacina

Há poucos relatos de experimentos com a utilização de duas doses da vacina estreptocócica. Eldar et al. (1995a) observaram que 100% dos peixes vacinados com duas doses sobreviveram ao desafio com *S. difficile*. No presente trabalho as tilápias inoculadas com duas doses da vacina apresentaram sobrevivência de 97,7%, e os inoculados com uma dose 89,3%. Apesar da melhor eficácia da vacinação com duas doses, estudos detalhados devem ser efetuados para avaliar o custo benefício. Evans et al. (2004) afirmaram que não há necessidade da aplicação da dose reforço.

Os peixes podem ser imunizados por três vias de aplicação, via i.p., imersão na solução da vacina e administração oral através da ração. Esses métodos apresentam vantagens e desvantagens com relação ao nível de proteção, efeitos

colaterais, praticidade e custo benefício. Somente vacinas de administração injetável e por banho de imersão têm sido desenvolvida para utilização em larga escala (GUDDING et al., 1999). A injeção i.p. é o método mais eficaz quando comparado aos métodos oral e de imersão, as desvantagens incluem estresse para os peixes, pouca praticidade e custos com a mão de obra. As injeções não são adequadas para peixes juvenis, devido à fragilidade e tamanho dos peixes. Em contraste, a vacinação por imersão é um método eficaz para uma população de peixes, principalmente para peixes pequenos, embora seja necessário um grande volume de vacina e a proteção geralmente é inferior quando comparada com as vacinas injetáveis (NAKANISHI; OTOTAKE, 1997).

Evans et al. (2004) observaram que a vacinação por via i.p. apresentou RPS de 70 a 80% e por banho de imersão 35%. Neste experimento foi utilizada a via i.p. e os peixes vacinados e desafiados aparentemente não apresentaram alterações de comportamento em relação à via de aplicação. Evans et al. (2005) demonstraram que peixes vacinados pela via i.p. com vacina inativada de *S. agalactiae* apresentaram baixo nível de estresse, avaliado através da dosagem de glicose sangüínea.

5.5 CONCLUSÕES

Os resultados mostram a eficácia da vacina de células inativadas de *S. agalactiae* para tilápias. A aplicação da dose reforço aumentou significativamente a proteção quando comparada a utilização de uma dose.

5.6 REFERÊNCIAS

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

AL-HARBI, A. H. First isolation of Streptococcus sp. from hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*) in Saudi Arabia. **Aquaculture**, v. 128, p. 263-271, 1994.

AMEND, D. F. Potency testing of fish vaccines. **Development in biological standartization**, v. 49, p. 447-454, 1981.

AMINOT, A.; CHAUSSEPIED, M. **Manuel des analyses chimiques em milieu. Marin.** Brest: CNEXO, 1983

BUNCH, E. C.; BEJERANO, I. The effect of environmental factors on the susceptibility of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*) to streptococcosis. **The Israeli Journal of Aquaculture**, v. 49, p. 67-76, 1997.

DEAN, A. G. et al. **Epi Info, Version 6:** a word processing, database, and statistic program for epidemiology on microcomputers. Atlanta: Center for Diseases Control and Prevention, 1994.

ELDAR, A. et al. Vaccination with whole-cell vaccine and bacterial protein extract protects tilapia against *Streptococcus difficile* meningoencephalitis. **Vaccine**, v. 13, p. 867-870, 1995a.

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

ELDAR, A.; HOROVITCZ, A.; BERCOVIER, H. Development and efficacy of a vaccine against *Streptococcus iniae* infection in farmed rainbow trout. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 56, p. 175-183, 1997.

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

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

EVANS, J. J. et al. *Streptococcus agalactiae* vaccination and infection stress in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of Applied Aquaculture*, v. 16, p. 105-115, 2005.

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

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, State of world aquaculture 2006. Rome, 2006. 134 p. (FAO fisheries technical paper, n. 500).

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

HOLT, J. G. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9. ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1994.

HUBERT, R. M. Bacterial diseases in warm water aquaculture. In: SHILO, M.; SARIG, S. **Fish culture in warm water systems: problems and trends**. Florida: Boca Raton, 1989. p. 194-197.

HUISING, M. O. et al. Increased efficacy of immersion vaccination in fish with hyperosmotic pretreatment. *Vaccine*, v. 21, p. 4178–4193, 2003.

INTERVET. Disease prevention. Asia: Intervet Norbio Singapore Pte. 2005. Disponível em <http://aqua.intervet.com/binaries/127_112423.pdf> Acesso em: 29 mar. 2007.

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

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

KLESIUS, P. H.; SHOEMAKER, C. A; EVANS, J. J. Efficacy of a killed *Streptococcus iniae* vaccine in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Bulletin European Association Fish Pathology**, v. 19, p. 39-41, 1999.

KLESIUS, P. H.; SHOEMAKER, C. A; EVANS, J. J. Efficacy of single and combined *Streptococcus iniae* isolate vaccine administered by intraperitoneal and intramuscular routes in tilapia. **Aquaculture**, v. 188, p. 237-246, 2000.

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

MARTINS, M. L. Doenças infecciosas e parasitárias de peixes. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP, 1998.

NAKANISHI, T.; OTOTAKE, M. Antigen uptake and immune responses after immersion vaccination. **Fish vaccinology**, p. 59–68, 1997.

NEWMAN, S. G. Bacterial vaccines for fish. **Annual Review of fish diseases**, v. 3, p. 145-185, 1993.

PARANÁ. Secretaria da Agricultura e do Abastecimento. Levantamento de dados piscicultura do estado do Paraná, 2005. mensagem recebida por <lgjordano@uel.br> em 12 dez. 2006.

PASNIK, D. J. et al. Antigenicity of *Streptococcus agalactiae* extracellular products and vaccine efficacy. **Journal of fish diseases**, v. 28, p. 205-212, 2005.

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

PLUMB, J. A. Tilapia bacterial diseases. In: HEALTH: maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes. Ames: Iowa State University, 1999, p. 297-305.

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

SALVADOR, R. et al. Isolation and characterization of Streptococcus spp. group B in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in hapas nets and earth nurseries in the northern region of Parana State, Brazil. **Ciência Rural**, v. 35, p. 1374-1378, 2005.

SCHERING-PLOUGH ANIMAL HEALTH-AQUACULTURE. Total Protection Strategies against Streptococcosis in farmed tilapia. AquaVac™ Garvetil™, AquaVac™ Garvetil™ Oral. Disponível em:
<<http://spaquaculture.com/assets/Garvetil.pdf>> Acesso em: 29 mar. 2007.

SHOEMAKER, C. A.; EVANS, J. J; KLESIUS, P. H. Density and dose: factors affecting mortality of Streptococcus iniae infected tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 188, p. 229-235, 2000.

SHOEMAKER, C. A.; KLESIUS, P. H.; EVANS, J. J. Prevalence of Streptococcus iniae in tilapia, hybrid striped bass, and channel catfish on commercial fish farms in United States. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, p. 174-177, 2001.

SOLARANZO, L. Determination of ammonia in natural waters by the phenolhypoclorite method. **Limnology Oceanography**, v. 14, p. 799-801, 1969.

SURESH, A. V. Tilapia update 1998. **World Aquaculture**, v. 30, p. 8-68, 1999.

TORANZO, A. E. et al. Efficacy of intraperitoneal and immersion vaccination against Enterococcus sp. Infection in turbot. **Aquaculture**, v. 134, p. 17-27, 1995.

WU, S. Y. New bacterial disease of tilapia. **Fish Culture Bulletin**, v. 23, p. 3-40, 1970.

Tratamentos	Repetições	Nº de tilápias	Esquema de Vacinação 2×10^8 UFC/mL		Desafio 3×10^6 UFC/peixe	Período de observação
			Dia 0	Dia 21	Dia 51	
1	1	50	—	1ª dose 0,1mL i.p.	Desafio 0,1mL i.p.	16 dias
	2	50				
	3	49				
Total	3	149				
2	1	49	1ª dose 0,1mL i.p.	2ª dose 0,1mL i.p.	Desafio 0,1mL i.p.	16 dias
	2	41				
	3	43				
Total	3	133				
Controle	1	44	—	TSB 0,1mL i.p.	Desafio 0,1mL i.p.	16 dias
	2	43				
	3	43				
Total	3	130				

Figura 1- Esquema dos tratamentos utilizados para avaliação da eficácia da vacina com células inativadas de *Streptococcus agalactiae* em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), Londrina, 2006.

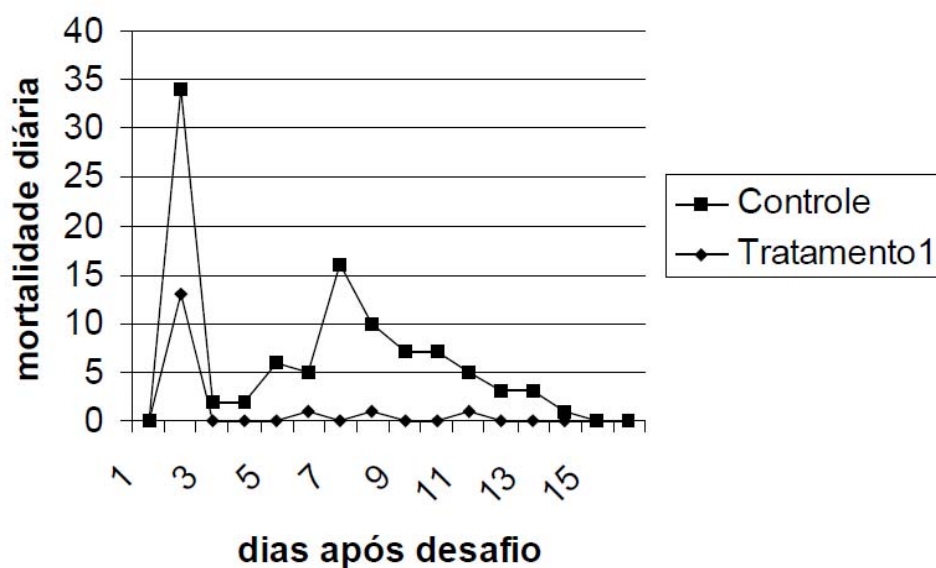


Figura 2 – Mortalidade diária de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) vacinadas por via intraperitoneal com uma dose da vacina inativada de *Streptococcus agalactiae* e desafiadas após 30 dias.

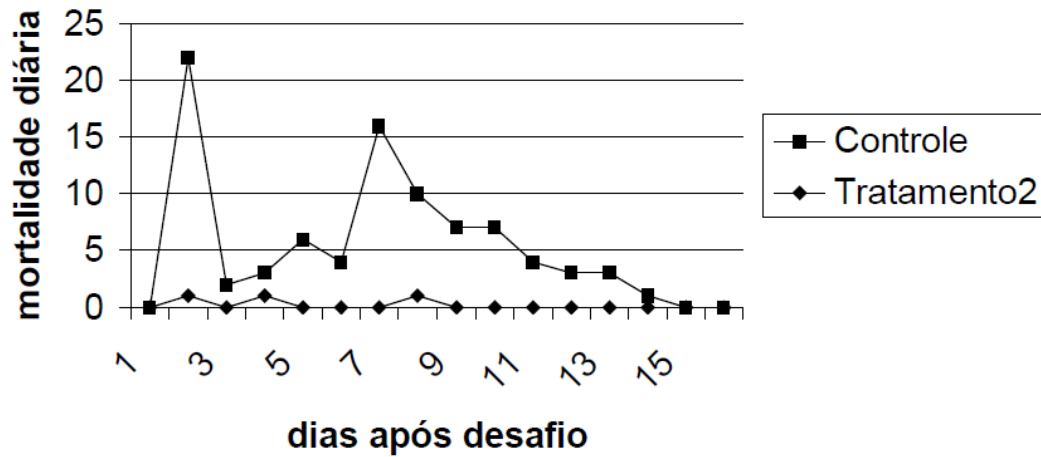


Figura 3 – Mortalidade diária de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) vacinadas por via intraperitoneal com duas doses da vacina inativada de *Streptococcus agalactiae*, com intervalo de 21 dias e desafiadas após 30 dias.

REFERÊNCIAS

AL-HARBI, A.H. First isolation of *Streptococcus* sp. from hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*) in Saudi Arabia. **Aquaculture**, v. 128, p. 263-271, 1994.

BONDAD-REANTASO, M. G. et al. Disease and health management in Asian aquaculture. **Veterinary Parasitology**, v. 132, p. 249-272, 2005.

BUNCH, E. C.; BEJERANO, I. The effect of environmental factors on the susceptibility of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*) to streptococcosis. **The Israeli Journal of Aquaculture**, v. 49, p. 67-76, 1997.

BOZANO, L.; ROMERO, S. Criação de tilápias em gaiolas. In: WORKSHOP INTERNACIONAL DE TILAPIA, CULTIVO Y COMERCIALIZACIÓN. 2001, Tarapoto, S.M.

CAPOBIANCO, T. L. Tendências do mercado mundial de pescados. São Paulo: Associação Brasileira da Indústria de processamento de Tilápia, 2006. Disponível em: <<http://www.abtilapia.com.br/Reportagem/SindiracoesCoaqua25102006.pdf>> Acesso em: 12 abr. 2007.

CLARK, J. S.; PALLER, B.; SMITH, P. D. Prevention of streptococcosis in tilapia by vaccination: the Philippine experience. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TILAPIA AQUACULTURE, 5, 2000, Rio de Janeiro, RJ. **Proceedings...** Rio de Janeiro, 2000. v. 2, p. 545-551.

CONROY, G. El empleo de las vacunas Aquavac Garvetil de Inmersión y AquaVac Garvetil Oral para el control de la Estreptococosis en Tilapias cultivadas. Indicadores prácticos y resultados basados en el uso en pruebas de campo a gran escala Informe del Estudio: Vacunación de Tilapia. Schering-Plough Ltd, 2006.

DALTON, S. S. et al. O desenvolvimento recente da aqüicultura brasileira. **Anuário da Pecuária Brasileira**, p. 252-256. 2005

DANILOVA, N. et al.. The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin Z. **Nature Immunology**, v. 6, n. 3, p. 295-302, 2005.

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

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

ELDAR, A. et al. Vaccination with wholecell vaccine and protein extract protects tilapia against Streptococcus difficile meningoencephalitis. **Vaccine**, v. 13, p. 867-870, 1995b.

ELDAR, A.; HOROVITCZ, A.; BERCOVIER, H. Development and efficacy of a vaccine against Streptococcus iniae infection in farmed rainbow trout. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 56, p. 175-183, 1997.

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

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

EVANS, J. J.; SHOEMAKER, C. A.; KLESIOUS, P. H. Effects of sublethal dissolved oxygen stress on blood glucose and susceptibility to Streptococcus agalactiae in Nile Tilapia (Oreochromis niloticus). **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 15, p. 202-208, 2003.

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

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

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

FITZSIMMONS, K. **Tilapia Production in the USA and Latin America**. 2001.

Disponível em:

<http://ag.arizona.edu/azaqua/ista/Malaysia/Tilapia_Production_in_the_USA_and_Latin_America.doc> Acesso em: 10 abr. 2007.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, **State of world aquaculture 2006**, Rome, 2006. 134 p. (FAO fisheries technical paper, n. 500).

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

HANSEN, J. D.; LANDIS, E. D.; PHILLIPS, R. B. Discovery of a unique Ig heavy chain isotype (Ig T) in rainbow trout: implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. **Proceedings National Academy Science USA**, v. 102, n. 19, p. 6919-6924, 2005.

HIRONO, I. et al. Cloning and characterization of a cDNA encoding Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* Ig D. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 15, n. 1, p. 63-70, 2003.

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

HUBERT, R.M. Bacterial diseases in warm water aquaculture. In: SHILO, M.; SARIG S. (ed). **Fish culture in warm water systems: problems and trends**. Florida: Boca Raton, 1989. p. 194-197.

HUISING, M. O. et al. Increased efficacy of immersion vaccination in fish with hyperosmotic pretreatment. **Vaccine**, v. 21, p. 4178-4193, 2003.

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

INTERVET. Disease prevention. Asia: Intervet Norbio Singapore Pte. 2005. Disponível em <http://aqua.intervet.com/binaries/127_112423.pdf> Acesso em: 29 mar. 2007.

JOHRI, A.,K. et al. Group B Streptococcus: global incidence and vaccine development. **Nature**, v. 4, p. 932-942, 2006.

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

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

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

KLESIUS, P. H.; SHOEMAKER, C. A; EVANS, J. J. Efficacy of a killed Streptococcus iniae vaccine in tilapia (Oreochromis niloticus). **Bulletin European Association of Fish Pathology**, v. 19, p. 39-41, 1999.

KLESIUS, P. H.; SHOEMAKER, C. A; EVANS, J. J. Efficacy of single and combined Streptococcus iniae isolate vaccine administered by intraperitoneal and intramuscular routes in tilapia. **Aquaculture**, v. 188, p. 237-246, 2000.

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

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

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

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

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

LAFRENTZ, B. R. et al. Protective immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following immunization with distinct molecular mass fractions isolated from *Flavobacterium psychrophilum*. **Diseases of aquatic Organisms**, v. 59, p. 17-26, 2004.

LITMAN, G. W; ANDERSON, M. K.; RAST, J. P. Evolution of antigen binding receptors. **Annual Review of Immunology**, v. 17, p. 109-147, 1999.

LOVSHIN, L. L. Worldwide tilapia culture. In: WORKSHOP INTERNACIONAL DE AQUICULTURA, 1, 1997, São Paulo. **Anais...** São Paulo, 1997. p. 96-116.

MAGARIÑOS, B. et al. Vaccination trials on gilthead seabream (*Sparus aurata*) against *Pasteurella piscida*. **Aquaculture**, v. 120, p. 201-208, 1994.

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

McNULTY, S. T. et al. Streptococcus iniae infection and tissue distribution in hybrid "striped bass" (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*) following inoculation of the gills. **Aquaculture**, v. 220, p. 165-173. 2003.

MINAMI, T. et al. A beta-hemolytic Streptococcus isolated from cultured yellowtail. **Fish Pathology**, v. 14, p. 15-19, 1979.

MING-CHEN, T.; CHEN, S. C.; TSAI, S. S. **General septicemia of streptococcal infection in cage cultured tilapia in southern Taiwan**. Fish Disease Research (VII), 1985. (CAO Fisheries Series, n. 4).

NAKANISHI, T.; OTOTAKE, M. Antigen uptake and immune responses after immersion vaccination. In: GUDDING R. et al. **Fish vaccinology**. Basel: Karger, 1997. p. 59–68.

NAKANISHI, T; KIRYU, I; OTOTAKE, M. Development of a new vaccine delivery method for fish: percutaneous administration by immersion with application of a multiple puncture instrument. **Vaccine**, v. 20, p. 3764–3769, 2002.

NAYLOR, R. L. et al. Effect of aquaculture on world fish supplies. **Nature**, v. 405, p. 1017-1024, 2000.

NEWMAN, S. G. Bacterial vaccines for fish. **Annual Review of fish diseases**, v. 3, p. 145-185, 1993.

NOMOTO, R. et al. Lancifield group C Streptococcus dysgalactiae infection responsible for fish mortalities in Japan. **Journal of Fish Diseases**, v. 27; p. 679-686, 2004.

NYBELIN, O. Untersuchungen über den bei Fischen Krankheitsgegen en Spatpilz Vibrio anguillarum. **Meddelanden frau Statens Undersoknings-och Fasok-sanstalt fur Sotvattenfisket**, v .8, p. 5-62, 1935.

OHNISHI, K.; JO, Y. Studies of streptococcal infection in pond-cultured fishes. Characteristics of a beta-hemolytic Streptococcus isolated from cultured ayu and amago in 1977-1978. **Fish Pathology**, v. 16, p. 63-67, 1981.

PARANÁ. Secretaria da Agricultura e do Abastecimento. **Levantamento de dados piscicultura do estado do Paraná, 2005**. [Mensagem pessoal]. Mensagem recebida por <lgiordano@uel.br> em 12 dez. 2006.

PASNIK, D. J. et al. Antigenicity of Streptococcus agalactiae extracellular products and vaccine efficacy. **Journal of fish diseases**, v. 28, p. 205-212, 2005.

PASNIK, D. J.; EVANS, J. J.; KLESZIUS, P. H. Passive immunization of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) provides significant protection against Streptococcus agalactiae. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 21, p. 365-371, 2006.

PERERA, R. P.; FISKE, R. A.; JOHNSON, S. K. Histopathology of hybrid Tilapias infected with a biotype of Streptococcus iniae. **Journal of aquatic Animal Health**, v. 10, p. 294-299. 1998.

PEREZ, A. C. Empreendimentos piscícolas e o médico veterinário. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, v. 2, p. 43-65, 1999.

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

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

- PLUMB, J. A. Tilapia bacterial diseases. In: HEALTH: maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes. Ames: Iowa State University, 1999. p. 297-305.
- RASHEED, V.; PLUMB, J. A. Pathogenicity of a non-hemolytic group B Streptococcus sp. in gulf killifish (*Fundulus Grandis* Baird and Girard). **Aquaculture**, v. 37, p. 97-105, 1984.
- ROBERTS, R. J.; SOMMERVILLE, C. Diseases of tilapias. In: PULLIN, S. V.; LOWE-MAC CONNELL, R. H. (ed.). **The biology and culture of tilapias**. Manila: International Center for Living Aquatic Resources Management. 1982. p. 247-263.
- SAKAI, M.; ATSUTA, S.; KOBAYASHI, M. Protective immune response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, vaccinated with beta-hemolytic streptococcal bacterin. **Fish Pathology**, v. 24, p. 169-173, 1989.
- SALVADOR, R. et al. Isolamento de Streptococcus spp. de tilápia do Nilo (*Oreochromis Niloticus*) e qualidade da água de tanques rede na Região Norte do Estado do Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 24, p. 35-42, 2003.
- SALVADOR, R. et al. Isolation and characterization of Streptococcus spp. group B in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in hapas nets and earth nurseries in the northern region of Parana State, Brazil. **Ciência Rural**, v. 35, p. 1374-1378, 2005.
- SHELBY, R. A.; SHOEMAKER, C. A.; KLESIOUS, P. H. Development of an ELISA to measure the humoral immune response of hybrid "striped bass" (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*) to Streptococcus iniae. **Aquaculture Research**, v. 35, p. 997-1001, 2004.
- SCHERING-PLOUGH ANIMAL HEALTH-AQUACULTURE. Total Protection Strategies against Streptococcosis in farmed tilapia. AquaVac™ Garvetil™, AquaVac™ Garvetil™ Oral. Disponível em: <<http://spaquaculture.com/assets/Garvetil.pdf>> Acesso em: 29 mar. 2007.
- SHOEMAKER, C.; KLESIOUS, P. Streptococcal disease problems and control: a review. **Tilapia Aquaculture**, v. 2, p. 671-680, 1997.
- SHOEMAKER, C. A.; EVANS, J. J.; KLESIOUS, P. H. Density and dose: factors affecting mortality of Streptococcus iniae infected tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 188, p. 229-235, 2000.

SHOEMAKER, C. A.; KLESIUS, P. H.; EVANS, J. J. Prevalence of *Streptococcus iniae* in tilapia, hybrid striped bass, and channel catfish on commercial fish farms in United States. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, p. 174-177, 2001.

SHOEMAKER, C. A. et al. Efficacy of a *Streptococcus iniae* modified bacterin delivered using Oralject™ technology in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 255, p. 151-156, 2006.

SURESH, A. V. Tilapia update 1998. **World Aquaculture**, v. 30, p. 8-68. 1999.

TACON, A. G. J. **Increasing contribution of aquaculture for food security and poverty alleviation**. In: CONFERENCE ON AQUACULTURE IN THE THIRD MILLENIUM, 2000, Bangkok,. Disponível em: <<http://www.fao.org/DOCREP/003/AB412E/ab412e30.htm>> Acesso em: 20 mar. 2007.

TORANZO, A. E. et al. Efficacy of intraperitoneal and immersion vaccination against *Enterococcus* sp. infection in turbot. **Aquaculture**, v. 134, p. 12-27, 1995.

TORANZO, A. E.; MAGARIÑOS, B., ROMALDE, J. L. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. **Aquaculture**, v. 246, p. 37– 61, 2005.

UGAJIN, M. Studies on *Streptococcus* sp. as a causative agent of an epizootic among the cultured ayu (*Plecoglossus altivelis*) in Tochigi Prefecture, Japan, 1980. **Fish Pathology**, v. 16, p. 119-127, 1981.

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

WU, S. Y. New bacterial disease of tilapia. *Fish Culture Bulletin*, v. 23, p. 3-40, 1970.

ZORILLA, I. et al. *Vibrio* species isolated from diseased farmed sole, *Solea senegalensis* (Kaup), and evaluation of the potential virulence role of their extracellular products. **Journal of fish diseases**, v. 26, p. 103-108, 2003.