



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ELAINE LONGHI

**AVALIACAO DA EFICACIA DE UMA VACINA AUTOCTONE
DE *Streptococcus agalactiae* INATIVADO APLICADA POR
BANHO DE IMERSAO EM TILAPIA DO NILO
(*Oreochromis niloticus*)**

Londrina
2010

ELAINE LONGHI

**AVALIACAO DA EFICACIA DE UMA VACINA AUTOCTONE
DE *Streptococcus agalactiae* INATIVADO APLICADA POR
BANHO DE IMERSAO EM TILAPIA DO NILO
(*Oreochromis niloticus*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciencia Animal (área de concentração - Sanidade Animal) do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do titulo de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Ernst Ekehardt Muller

Londrina
2010

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

L854a Longhi, Elaine.

Avaliação da eficácia de uma vacina autóctone de *Streptococcus agalactiae* inativado aplicada por banho de imersão em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) / Elaine Longhi. – Londrina, 2010.

50 f. : il.

Orientador: Ernst Ekehardt Müller.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2010.

Inclui bibliografia.

1. Tilápia (Peixes) – Doenças – Teses. 2. Estreptococo – Teses. 3. Vacinas – Teses. 4. Peixe – Imunologia – Teses. I. Müller, Ernst Ekehardt. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 619:597.583.4

ELAINE LONGHI

**AVALIACAO DA EFICACIA DE UMA VACINA AUTOCTONE
DE *Streptococcus agalactiae* INATIVADO APLICADA POR
BANHO DE IMERSAO EM TILAPIA DO NILO
(*Oreochromis niloticus*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciencia Animal (área de concentração - Sanidade Animal) do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do titulo de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

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

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

Dra. Lucienne Garcia Pretto – Giordano
UEL – Londrina – PR

Londrina, 03 de maio de 2010.

DEDICATÓRIA

Com muito amor e carinho dedico aos meus pais por tantos anos de paciência, de luta e esperança, por sempre acreditarem no meu sucesso, permitindo sonhos possíveis...

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, que me deu forças e esperanças para chegar até aqui...

Aos meus pais que mesmo na distância, sempre me permitindo ir além do horizonte em busca da realização de muitos sonhos...

Meus irmãos, Eliane, Lidiane e Ricardo pelo amor e compreensão...

Ao Tiago pela dedicação, apoio, companheirismo que sempre dispôs.

À Renata por tantas horas apenas ouvindo...

Ao Professor Muller, pelo aceite nesta instituição, pela oportunidade concedida, com muito respeito e admiração...

À Professora Ângela pelos ensinamentos e ajuda em parasitologia e hematologia...

Ao IAPAR pela disponibilização dos laboratórios...

Ao Professor Julio Hermann pela doação dos peixes...

Às professoras Alice e Roberta pelas correções e sugestões na qualificação...

Aos amigos, tantos, ou tão poucos, que valem tanto, que me seguraram para que eu não caísse ou desanimasse... E também por suportarem os momentos de desespero e medo...

Aos colegas, amigos que durante esses dois anos, me deram carona, me emprestaram suas coisas, seus materiais, sua bicicleta, seu tempo, sua amizade...

Àqueles que me ajudaram por um dia ou por todo o tempo, anotando a temperatura e o oxigênio, tirando fotos, “pescando”, ouvindo, participando... etc...

Aos laboratórios de inspeção, microbiologia, leptospirose, zoonoses, micologia, virologia, protozoologia, patologia clínica... pelas conversas, conselhos, ajuda técnica, profissional e emocional...

Ao Heitor, pela amizade, viagem e apoio sempre...

Ao Mauro e ao Clóvis pelo ensinamento e paciência...

Ao Departamento de Biologia Animal e Vegetal também agradeço

Ao Valdenir, Jurandir e Valdemar, pela colaboração no trabalho, pela paciência e amizade...

Ao José Aldevino, sem palavras pra descrever tanto tempo de carinho e aprendizado...

Às pessoas da limpeza, do café e dos bolos...

Ao Hélio pela assistência sempre...

À Juliane, Aline F., Aline B., Vanessa, Lucimara, Aline B., Dalíria, Elis, Kerlei, Adriana, Beti, Marcela, Cris, Ronaldo, Fernanda, Fernanda, Lívia, Dauton, Letícia, Bia, Alessandra, Mi, Ademir, Eliana, Luciana, Rita, Dalva, Agostinho, Eidi, Silas... cada um do seu modo, pela contribuição durante estes dois anos...

A mente que se abre a uma nova idéia jamais
volta ao seu tamanho original.

(Albert Einstein)

LONGHI, Elaine. **Avaliação da eficácia de uma vacina autóctone de *Streptococcus agalactiae* inativado aplicada por banho de imersão em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2010. 48 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

RESUMO

A aquicultura mundial está crescendo num ritmo mais rápido que outros setores da produção de alimentos de origem animal e seu crescimento é proporcionalmente maior que o da população humana mundial. Mais da metade dessa produção é representada por espécies de peixes de água doce. A aquicultura exerce importante função social contribuindo para a subsistência de milhões de pessoas. O Brasil se destaca na aquicultura e, em 2004, ocupou a 18ª colocação em produção aquícola e a 12ª em valores gerados. O grupo das tilápias aparece como uma das espécies de maior importância no cenário mundial, principalmente devido à sua rusticidade, hábitos alimentares e adaptação em sistema intensivo. Por outro lado, o cultivo intensivo pode ser prejudicado pelo manejo inadequado, que predispõe doenças infecciosas como a estreptococose, responsável por elevados prejuízos para os produtores. *Streptococcus iniae* e *Streptococcus agalactiae* são as espécies de estreptococos de maior relevância para a piscicultura. O desenvolvimento e uso de vacinas tem sido considerado como alternativa no combate destas doenças. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia de uma vacina autóctone de *S. agalactiae* inativado aplicada por banho de imersão (b.i.) em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e desafiadas com cepa homóloga. Foram utilizadas 421 tilápias com peso médio de 38,38 g, distribuídas em dois tratamentos (T1 e T2) e um grupo controle. No T1, os peixes foram vacinados com uma dose por b.i., com concentração de $5,4 \times 10^8$ UFC mL⁻¹. O T2 recebeu duas doses de vacina por b.i., com intervalo de 25 dias. O grupo controle recebeu um banho de água ultrapura. Os peixes foram desafiados por via intraperitoneal (i.p.), com concentração de $3,0 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ de *S. agalactiae*, 43 dias após a primeira ou segunda dose da vacina, de acordo com o tratamento. Os peixes foram monitorados durante 16 dias após o desafio. Comparativamente ao grupo controle os resultados obtidos para o T1 foram: $p = 0,0805$, RR = 0,79 (IC 95%: 0,61 – 1,01) e RPS = 21%. Para o T2 foram: $p = 0,0296$, RR = 0,74 (IC 95%: 0,56 – 0,96) e RPS = 26%. A mortalidade após o desafio foi de 57 peixes (40,71%) no T1, 51 (38,06%) no T2 e 76 (51,7%) no grupo controle. Não houve diferença significativa entre T1 e T2 e $p=0,7445$. Este resultado permite concluir que a vacina testada apresentou baixa eficácia na imunização das tilápias.

Palavras-chave: *Streptococcus agalactiae*. Tilápia do Nilo. Vacina. Banho de imersão.

LONGHI, Elaine. **Evaluation of the effectiveness of a vaccine homologous *Streptococcus agalactiae* inactivated applied by bath in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)**. 2010. 48 f. Dissertation (Master's in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

ABSTRACT

Worldwide aquaculture is growing at a faster pace than other sectors in the production of food of animal origin, and its growth is higher than the human world's population. More than half of this production is represented by species of freshwater fish. Aquaculture has an important social function by contributing to the livelihoods of millions of people. Brazil is becoming increasingly important in aquaculture and in 2004, occupied the 18th in aquaculture production and 12 th place in relation to the values generated. The group of tilapia appears as one of the most important species on the world stage, mainly because of its hardiness, eating habits and adaptation in intensive system. Moreover, the intensive cultivation may be hampered by inadequate management, which predisposes the emergence of infectious diseases such as streptococcosis, responsible for high losses for producers. *Streptococcus iniae* and *Streptococcus agalactiae* are the species of streptococci are most relevant to farming. The development and use of vaccines has been recognized as an alternative in fighting these diseases. So this study was to evaluate the efficacy of the inactivated cells of *S. agalactiae* by immersion bath (bi) in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and challenge with homologous strain. We used 421 tilapias with an average weight of 38.38 g, distributed in two treatments (T1 and T2) and a control group. At T1, the fish were vaccinated with one dose of vaccine for bi, with a concentration of 5.4×10^8 CFU mL⁻¹. The T2 received two doses of vaccine per billion, with an interval of 25 days. The control group received a bath of pure water. The fish were challenged by intraperitoneal (ip) with a concentration of 3.0×10^8 CFU mL⁻¹ of *S. agalactiae* 43 days after the first or second dose of vaccine, according to the treatment. The fish were monitored for 16 days after challenge. Compared with the control group results were obtained for T1: p = 0.0805, RR = 0.79 (95% CI: 0.61 - 1.01) and RPS = 21%. For T2 were: p = 0.0296, RR = 0.74 (95% CI 0.56 to 0.96) and RPS = 26%. Mortality after challenge was 57 fish (40.71%) in T1, 51 (38.06%) at T2, and 76 (51.7%) in the control group. There was no significant difference between T1 and T2, p = 0.7445. This result shows that the vaccine tested had low efficacy in vaccination of tilapia.

Key words: *Streptococcus agalactiae*. Nile tilapia. Vaccine. Bath.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Volume da produção aquícola mundial: principais grupos de espécies em 2006 13
- Figura 2** – Valor da produção aquícola mundial: principais grupos de espécies em 2006. 13
- Figura 3** – Produção e posição brasileira no ranking da FAO em relação à aquicultura de 1984 a2004 14
- Figura 4** – Evolução da produção paranaense de pescado de 1996 a 2005 15

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Produção mundial da captura e aquicultura e sua utilização de 2002 a 2006 (milhões de toneladas/ano)	12
Quadro 2 – Principais espécies de peixes cultivadas no Brasil e a respectiva produção no ano de 2005	16
ARTIGO	
Quadro 1 – Delineamento experimental da avaliação da eficácia de uma vacina de <i>Streptococcus agalactiae</i> inativado aplicada por banho de imersão (b.i) em tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) e desafiadas por via intraperitoneal (i.p.), em Londrina, PR, 2009	30

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 REVISÃO DE LITERATURA	12
1.1.1 Aquicultura no Brasil.....	12
1.1.2 Produção Brasileira	14
1.1.3 Produção de Tilápias.....	15
1.1.4 Estreptococose em Peixes	17
1.1.5 Vacinação em Peixes	20
2 OBJETIVO	24
3 ARTIGO: AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE UMA VACINA DE <i>Streptococcus agalactiae</i> INATIVADO APLICADA POR BANHO DE IMERSÃO EM TILÁPIAS DO NILO (<i>Oreochromis niloticus</i>)	25
3.1 RESUMO	25
3.2 ABSTRACT	25
3.3 INTRODUÇÃO	26
3.4 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.4.1 Peixes	28
3.4.2 Controle da Qualidade da Água	28
3.4.3 Vacina	29
3.4.4 Desafio	30
3.4.5 Delineamento Experimental	30
3.4.6 Estatística	31
3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
3.6 CONCLUSÃO	36
3.7 REFERÊNCIAS	36
REFERÊNCIAS	40
ANEXOS	46
ANEXO A	47

1 INTRODUÇÃO

1.1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1.1 Aquicultura Mundial

A aquicultura vem crescendo mais rapidamente que outros setores na produção de alimentos de origem animal e em um ritmo maior que o da população mundial. Em 2006, foram produzidas 143,6 milhões de toneladas (t), das quais, 110,4 milhões destinadas ao consumo humano, com um consumo per capita de 16,7 kg/ano. Desta produção 51,7(47%) milhões de t correspondem à aquicultura marinha e continental. No início da década de 1950, a produção não alcançava um milhão de t e quando comparada ao ano de 2006, o crescimento médio anual foi de 7% (Quadro 1) (FAO, 2009).

Quadro 1 – Produção mundial da captura e aquicultura e sua utilização de 2002 a 2006 (milhões de toneladas/ano).

	2002	2003	2004	2005	2006
Produção					
Continental					
Captura	8,7	9	8,9	9,7	10,1
Aquicultura	24	25,5	27,8	29,6	31,6
Total Continental	32,7	34,4	36,7	39,3	41,7
Marinha					
Captura	84,5	81,5	85,7	84,5	81,9
Aquicultura	16,4	17,2	18,1	18,9	20,1
Total Marinha	100,9	98,7	103,8	103,4	102
Total Captura	93,2	90,5	94,6	94,2	92
Total Aquicultura	40,4	42,7	45,9	48,5	51,7
Total Pesca Mundial*	133,6	133,2	140,5	142,7	143,6
Utilização					
Consumo humano	100,7	103,4	104,5	107,1	110,4
Uso não alimentício	32,9	29,8	36	35,6	33,3
População (bilhões)	6,3	6,4	6,4	6,5	6,6
Abastecimento de pescado <i>per capita</i> para consumo humano (Kg)	16	16,3	16,2	16,4	16,7

*não estão contabilizadas as plantas aquáticas

Fonte: FAO (2009) – dados trabalhados

Em 2006, mais da metade da produção aquícola mundial foi composta por peixes de água doce. A produção alcançou 27,8 milhões t, com valor de 29.500 milhões de US\$ (Figura 1 e 2)

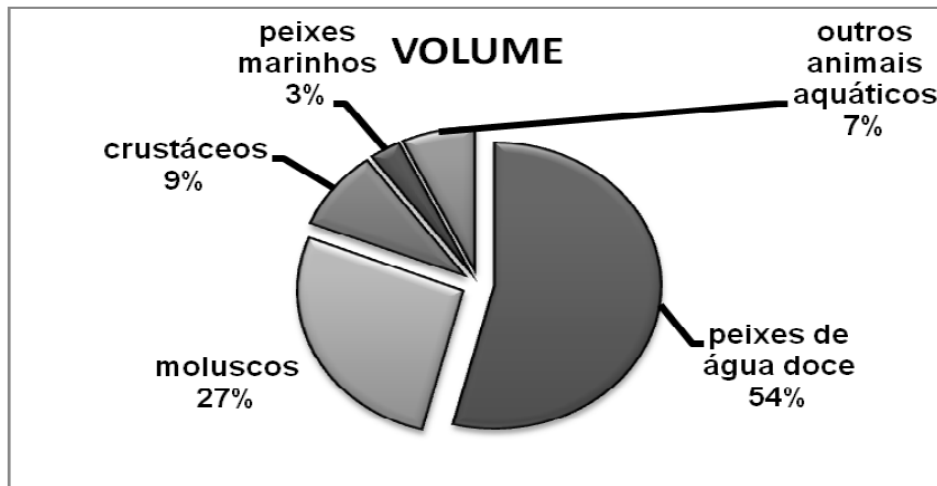


Figura 1 – Volume da produção aquícola mundial: principais grupos de espécies em 2006.

Fonte: FAO (2009) – dados trabalhados.

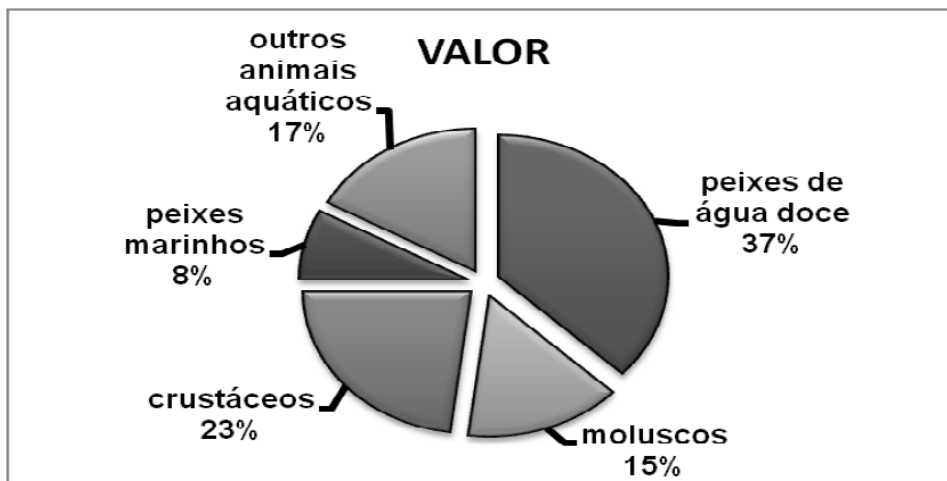


Figura 2 – Valor da produção aquícola mundial: principais grupos de espécies em 2006.

Fonte: FAO (2009) – dados trabalhados.

Mundialmente, estima-se que, em 2006, 43,5 milhões de pessoas trabalharam em tempo integral ou parcial na produção primária do pescado, e outras quatro milhões, exerceram a atividade ocasionalmente. Acredita-se que para cada pessoa empregada no setor primário, pelo menos mais quatro atuam no setor secundário. Assim, cerca de 520 milhões de indivíduos dependem deste segmento de produção, o que representa praticamente 8% da população mundial (FAO, 2009).

1.1.2. Produção Brasileira

A produção da aquicultura brasileira vem se destacando na classificação internacional estabelecida pela Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO). Em 1994, o Brasil ocupou o 32º lugar em produção e 26º em receitas geradas, em 2004, sua posição foi a 18ª em produção aquícola, representando 0,5% da produção mundial e 12ª em relação aos valores gerados, 1,4% do total (Figura 3) (OSTRENSKY et al., 2008).

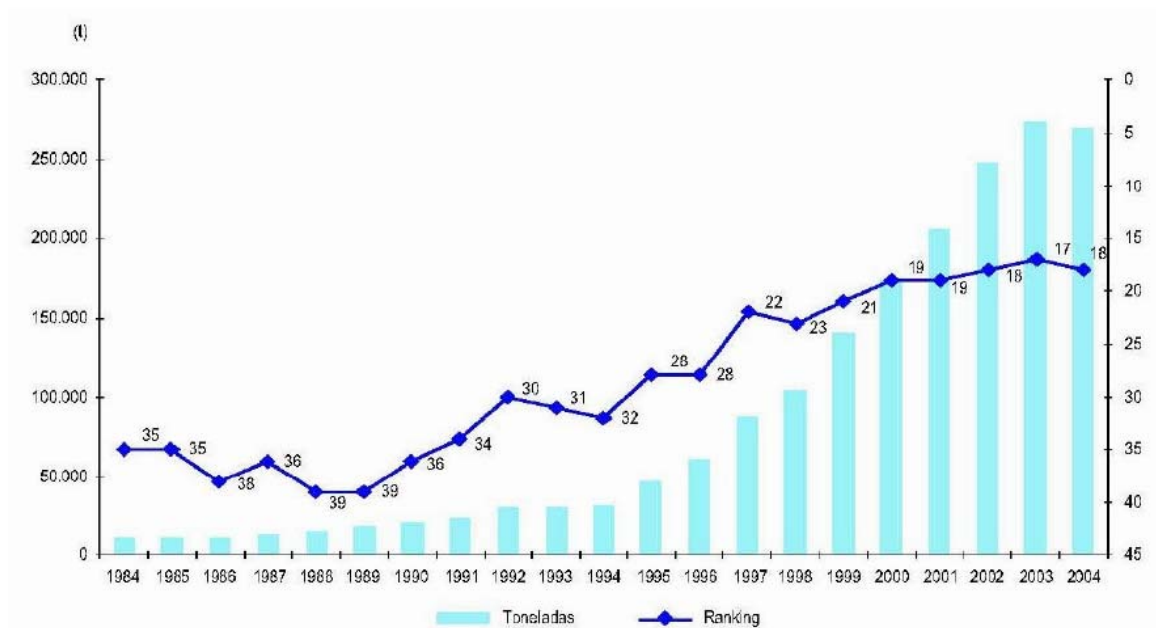


Figura 3 – Produção e posição brasileira no ranking da FAO em relação à aquicultura de 1984 a 2004.

Fonte: IBAMA/FAO (Fishery statistical databases, 2006), dados trabalhados por Ostrenski et al. (2008).

Em 2005 (IBAMA, 2007) a produção total de pescado no Brasil foi de 1.009.073 t. A região sul produziu 236.586 t, correspondendo a Santa Catarina 151.677 t, Rio Grande do Sul 64.651 t e Paraná 20.258 t. Do total produzido no Brasil a aquicultura continental representou 179.746 t (17,8%). A região sul produziu 59.204,5 t, contribuindo com a maior fatia da produção nacional (32,9%), o Rio Grande do Sul produziu 23.314 t, Santa Catarina, 19.133,5 t e Paraná, 16.757 t. Com relação a evolução da produção de pescado no Paraná, em 1996 foram produzidas 12.685 t, ocorrendo anualmente um incremento na produção, alcançando 26.676 t em 2002. Nos dois anos subsequentes houve uma diminuição acentuada na produção com tendência de recuperação em 2005 (Figura 4).

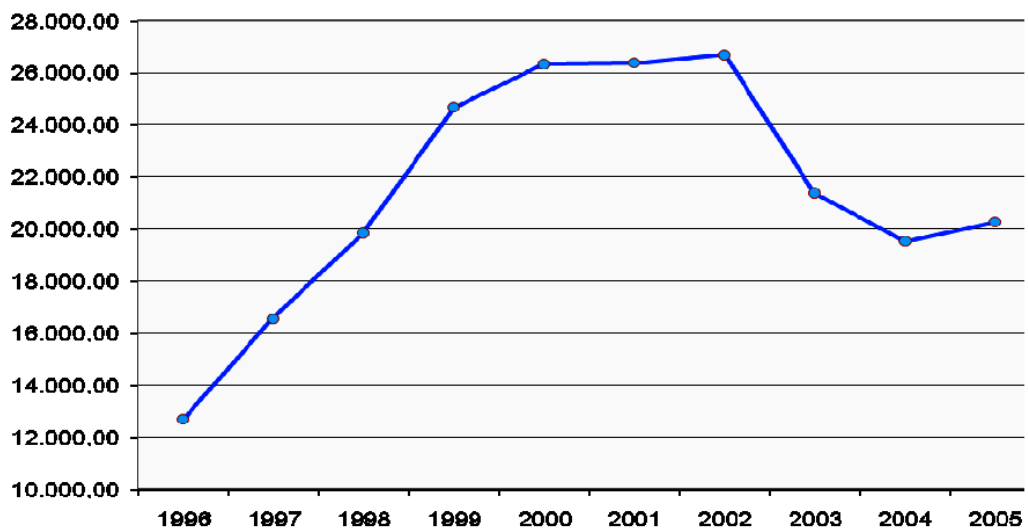


Figura 4 – Evolução da produção paranaense de pescado de 1996 a 2005.
Fonte: IBAMA (2007) – dados trabalhados.

1.1.3 Produção

Em 2005, o Brasil produziu 67.850,5 t. de tilápias das quais 12.097 t no estado do Paraná. No Quadro 2, observa-se que tilápias, carpas e tambaquis foram as espécies mais cultivadas no país neste ano, correspondendo a 75,85% do total dos peixes produzidos (IBAMA, 2007).

Quadro 2 – Principais espécies de peixes cultivadas no Brasil e a respectiva produção no ano de 2005.

Espécie de peixe	Quantidade (t)	%
Tilápia	67.850,5	38,0
Carpa	42.490,5	23,8
Tambaqui	25.011,0	14,0
Tambacu	10.874,5	6,1
Pacu	9.044,0	5,1
Piau	4.066,5	2,3
Tambatinga	2.494,5	1,4
Truta	2.351,5	1,3
Outros	17.058,8	8,0
Total	178.746,5	100,0

Fonte: IBAMA (2007) – dados trabalhados por Figueiredo Jr. e Valente Jr. (2008).

Em 2006, de acordo com dados da FAO (2007), a China produziu 897.276 t, o Brasil com uma produção de 69.078 t de tilápias, ocupou a sétima posição no cenário mundial, atrás da China, Egito, Filipinas, Indonésia, Tailândia e Taiwan.

As tilápias são originárias da África do Sul e do Oriente Médio, tiveram maior expansão em sua produção no século XX, e atualmente estão presentes em cerca de 100 países (CASTAGNOLLI; CYRINO, 1986; FITZSIMMOS, 2000).

Apesar da introdução da tilápia em caráter experimental no Brasil ainda na metade do século passado, somente em 1971, foi implementado um programa oficial de produção de alevinos para povoamento dos reservatórios públicos, principalmente da região Nordeste. Esta tentativa não obteve sucesso devido aos poucos conhecimentos das técnicas de manejo. O cultivo de tilápias estabeleceu-se como atividade empresarial a partir da década de 1980, quando surgiram os primeiros empreendimentos. Estes inicialmente também tiveram suas atividades limitadas pela escassez de pesquisas, conhecimentos básicos das técnicas de cultivo, inexistência de rações adequadas, baixa qualidade dos alevinos, entre outras. No Paraná ocorreu a primeira iniciativa de organizar de forma racional a atividade, inclusive com a implantação de frigoríficos especializados em beneficiamento de tilápia, com destaque para os municípios de Toledo e Assis Chateaubriand (FIGUEIREDO JR; VALENTE JR, 2008).

O interesse dos produtores em relação ao cultivo das tilápias foi principalmente devido à sua rusticidade e hábitos alimentares. Consomem preferencialmente fitoplâncton e zooplâncton, mas alimentam-se também de bentos, detritos, alimentos artificiais e resíduos orgânicos (LEONHARDT et al., 2003).

De acordo com Igarashi (2008), as tilápias apresentam crescimento rápido e alta taxa de sobrevivência em sistemas de cultivo intensivo, permitindo taxas de densidade de estocagem e produção superiores as obtidas no sistema extensivo. Em contraposição, Plumb (1997) e Shoemaker et al. (2000) apontaram que este tipo de criação exige a utilização de grandes volumes de ração e quando associado a problemas de manejo, interfere na qualidade da água levando a aumento de estresse nos peixes, favorecendo a disseminação de doenças, principalmente de origem bacteriana.

1.1.4 Estreptococose em Peixes

As principais bactérias patogênicas para peixes são *Aeromonas hydrophila*, *Flavobacterium columnare*, *Edwardsiella tarda*, *Vibrio vulnificus*, *Streptococcus iniae* e *Streptococcus agalactiae* (ROBERTS; SOMMERVILLE, 1982; FIGUEIREDO et al., 2008).

Os estreptococos estão entre os principais agentes bacterianos que acometem o cultivo de peixes no mundo e no Brasil, estando associado a altos prejuízos para os produtores (SALVADOR et al., 2005; PASNIK et al., 2005; PARK et al., 2009). A estreptococose em peixes deve ser considerada como um grupo de doenças similares causada por diferentes gêneros e espécies capazes de lesar o sistema nervoso central. Neste grupo de bactérias incluem-se *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus piscium*, *S. iniae*, *S. agalactiae*, *Streptococcus parauberis* e *Vagococcus salmoninarum* (TORANZO et al., 2005).

Oficialmente, o primeiro relato de estreptococose em peixes foi feito por Hoshina et al., (1958) em trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). Posteriormente a doença foi descrita em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), e tainha (*Liza klunzingeri*) (Day) (EVANS et al., 2002). Dados atuais mostram a ocorrência da

estreptococose em mais de 20 espécies de peixes (OLIVARES; FUSTER et al., 2008).

As espécies de estreptococos de maior relevância para a produção de peixes em sistemas de cultivo intensivo são: *S. iniae* (SHOEMAKER et al., 2000), *Streptococcus dysgalactiae* (NOMOTO et al., 2004) e *S. agalactiae* (SUANYK et al., 2005).

Infecções causadas por *S. agalactiae* em diferentes espécies animais e no homem, vem sendo relatadas na literatura desde meados da década de 30 do século passado e nas últimas décadas, tem sido descrito como emergente na piscicultura (MAIONE et al., 2005). No Brasil, os primeiros relatos de infecções por *Streptococcus spp.* e *S. agalactiae* em tilápias foram descritos por Salvador et al. (2003) e Figueiredo et al. (2006).

S. agalactiae pertence ao grupo B de Lancefield (EVANS et al., 2002) e com base na composição do polissacarídeo capsular é classificado em dez sorotipos (Ia, Ib e II à IX) (CHAFFIN et al., 2000; PERSSON et al., 2004; SLOTVED et al., 2007), sendo os sorotipos Ia e Ib reportado em peixes (VANDAMME et al., 1997; GARCIA et al. 2008). *S. agalactiae* isolados de peixes são cocos gram-positivos, catalase e oxidase negativas, CAMP positivo e hidrólise de hipurato negativa, podendo ser α , β ou não hemolítico (FIGUEIREDO et al., 2006; GARCIA et al., 2008).

A estreptococose está associada a fatores predisponentes que aumentam a susceptibilidade dos peixes a esta infecção. Fatores como qualidade da água, mudança brusca de temperatura, alcalinidade, transparência, dureza e densidade de estocagem propiciam o estresse dos animais, tornando – os mais suscetíveis a doenças. Baixas concentrações de oxigênio dissolvido, níveis tóxicos de amônia e nitrito e pH são algumas características da água responsáveis pelo aumento da mortalidade (MCGEACHIN et al., 1987; BUNCH; BEJERANO, 1997; SALVADOR et al., 2003; PASNIK et al., 2005).

É importante ressaltar que as características físicas e químicas da água estão relacionadas entre si, sendo que, alterações em um parâmetro interferem com o outro, podendo acarretar problemas ao fitoplâncton, zooplâncton e finalmente nos peixes (CASTAGNOLLI, 1992).

Bunch e Bejerano (1997) observaram que infecções causadas por *S. iniae* estão mais associadas às tilápias cultivadas em regiões com baixas

temperaturas (15 à 16°C), enquanto que *S. agalactiae* acomete animais de regiões com temperaturas mais quentes, variando entre 26 e 28°C.

As infecções por *S. agalactiae* em tilápias tem como principal característica a septicemia e meningoencefalite. Os sinais clínicos por *S. iniae* podem variar de acordo com o sorovar envolvido, podendo ocorrer na forma de abscessos multifocais na musculatura dos peixes ou na forma septicêmica e meningoencefálica (AGNEW; BARNES, 2007).

Salvador et al. (2003; 2005), no estado do Paraná, identificaram as principais alterações clínicas e macroscópicas causadas por infecção natural de *Streptococcus spp* em peixes oriundos de propriedades com sistema intensivo e observaram que os principais sinais clínicos foram escurecimento da pele, natação errática e circular, letargia, diminuição do apetite, deslocamento espinhal, exoftalmia uni ou bilateral, distensão abdominal e líquido na cavidade visceral. Neste estudo, foram isolados *Streptococcus spp* de diferentes órgãos, em 100% das amostras de líquido visceral, 70,6% de encéfalos e 29,4% de fígado e rim. Os pesquisadores ainda relataram lesões de pele e na base das nadadeiras com áreas descamadas ou inflamadas e ulceradas, palidez de brânquias com necrose na extremidade, hepato e esplenomegalia.

Figueiredo et al. (2008) citaram os mesmos sinais de estreptococose descritos por outros pesquisadores e incluem, além destes, a formação de múltiplos abscessos na musculatura de peixes infectados, bem como o escurecimento do tegumento, perda de escamas, excitabilidade e morte.

Inocente Filho et al. (2009) estudaram os sinais clínicos e alterações histológicas de *S. agalactiae* inoculando experimentalmente tilápias por via i.p. utilizando inóculo de 0,1 mL de 10^5 UFC mL⁻¹. Os pesquisadores puderam observar que os primeiros sinais clínicos surgiram no terceiro dia após inoculação, com anorexia, desorientação e natação errática, alguns peixes apresentavam ainda, exoftalmia e opacidade de córnea. Alterações como escurecimento da pele, esplenomegalia e opacidade epicardial foram encontrados a partir do terceiro dia. Exames histopatológicos mostraram que o encéfalo, as meninges do telécefalo e cerebelo apresentavam infiltrado de macrófagos e linfócitos, além de, em alguns casos, hemorragia e leve infiltrado de eosinófilos. Ainda foram observadas lesões como epicardites, caracterizadas por infiltrados de macrófagos e linfócitos e infiltrado

de macrófagos no bulbo arterial de alguns peixes. Os olhos apresentavam infiltrado de macrófagos e eosinófilos tanto no tecido coróide como no periorbital, o que envolvia o nervo óptico e o músculo reto. Os vasos de rim e baço apresentavam-se congestionados.

Pretto – Giordano et al. (2010) estudaram a patogenicidade de *S. agalactiae* em infecção experimental de tilápias e observaram que 44% de frequência acumulada de mortalidade, ocorreu nos dois primeiros dias após inoculação e o segundo pico de mortalidade, ocorreu no sexto e sétimo dias após a inoculação. Os peixes desafiados demonstraram alterações de comportamento e presença de sinais clínicos como anorexia, letargia, natação errática, exoftalmia e ascite. Os animais apresentavam ainda, pele hemorrágica, espleno e hepatomegalia e aderência visceral.

Para a prevenção e o controle da estreptococose na aquicultura tem-se associado manejo adequado, alimentação balanceada, uso de agentes antimicrobianos, produtos químicos e vacinação (KLESIUS et al, 2004). A utilização indiscriminada de antibióticos pode causar problemas para o ambiente, seleção de cepas resistentes, e ainda, eventual presença de resíduos no produto final, o que coloca em risco a saúde do consumidor (GRISEZ; OLLEVIER, 1995; KLESIUS et al, 2004; SWAIN et al., 2002; SERRANO, 2005).

1.1.5 Vacinação de Peixes

O primeiro relato sobre imunização de peixes é de 1930 (NYBELIN, 1935). Na década de 70 ocorreu a intensificação das pesquisas e o incentivo ao desenvolvimento de métodos de profilaxia (NEWMAN, 1993).

Para a prevenção de doenças bacterianas, as principais vacinas utilizadas, são constituídas de células inativadas por formalina. A produção é economicamente viável, permite associar diferentes antígenos e a proteção é satisfatória (DUMRONGPHOL et al., 2009).

As principais vias de administração de vacina em peixes são intraperitoneal (i.p.), banho de imersão (b.i.) e oral (v.o.). Esses métodos apresentam

vantagens e desvantagens relacionadas ao nível de proteção, efeitos colaterais, praticidade e custo-benefício (GOMES et al., 2006).

A administração por via i.p. é bastante utilizada em criações intensivas, principalmente em salmonídeos, promove resposta imune eficaz e de longa duração, porém tem elevado custo e não é recomendada para peixes pequenos (ELLIS, 1997). Em contraste, a vacinação por b.i. é mais prática para imunização de grande quantidade de peixes, principalmente para alevinos, embora seja necessário maior volume de vacina, com proteção de curta duração e de menor eficácia quando comparada com as vacinas injetáveis (NAKANISHI; OTOTAKE, 1997).

Os trabalhos referentes às vacinas estreptocócicas estão direcionados principalmente ao *S. iniae*, mas devido a importância que o *S. agalactiae* vem assumindo como patógeno de peixes cultivados, em regiões com temperatura ambiente mais elevada, vacinas para esta doença estão sendo pesquisadas com maior ênfase.

Eldar et al. (1995) avaliaram uma vacina constituída de células inativadas de *S. difficile*, na concentração de $1,0 \times 10^{10}$ UFC mL⁻¹. Tilápias de 150-180g foram vacinadas com duas doses por via i.p. com intervalo de quatro semanas e desafiadas três semanas após com inóculo de $1,0 \times 10^5$ UFC peixe⁻¹, i.p. Após 75 dias de observação, verificaram que 100% dos peixes do grupo controle morreram e nos grupos vacinados, não ocorreu mortalidade.

Klesius et al. (2000) compararam a via de inoculação i.p. e i.m de uma vacina de *S. iniae* com concentração celular de $4,0 \times 10^8$ UFC/peixe, em tilápias de 18g. Os peixes foram desafiados, com $1,0 \times 10^7$ UFC peixe⁻¹ por via i.p., 30 dias após a imunização com cepas homóloga e heteróloga. A porcentagem de sobrevivência relativa (RPS) nos grupos de animais vacinados via i.p., desafiados com cepa homóloga, foi de 45,6% e com cepa heteróloga, de 93,7%. Os grupos vacinados via i.m., um desafiado com cepa homóloga e o outro com heteróloga, apresentaram RPS de 17,7% e 59,5%, respectivamente.

Nakanishi et al. (2002) testaram uma vacina de *S. iniae* inativada na concentração de $1,0 \times 10^9$ UFC mL⁻¹ por b.i. em trutas arco íris (*Oncorhynchus mykiss*) de 4 a 10g. O inóculo com $2,3 \times 10^3$ UFC peixe⁻¹ foi utilizado como desafio

nos grupos controle e vacinado, 14 dias após via i.p. a mortalidade foi de 80% nos dois grupos, demonstrando a ineficácia da via de administração utilizada. Ainda, nesta pesquisa, para melhorar a absorção da vacina, os autores associaram micro lesões na pele dos peixes ao b.i. e obtiveram 60% de sobrevivência no grupo vacinado.

Nos EUA, Evans et al. (2004) pesquisaram uma vacina elaborada com *S. agalactiae* inativado ($4,0 \times 10^9$ UFC mL⁻¹) e concentrado de produtos extracelulares (ECP) aplicada por via i.p. Um grupo de tilápias com peso médio de 5g foi desafiado 46 dias após a vacinação e outro com peso médio de 30g, 30 dias após, com $1,5 \times 10^4$ UFC peixe⁻¹ via i.p. Os peixes foram monitorados por 14 dias e o RPS obtido foi de 25 e 80%, respectivamente. A mesma vacina foi testada por b.i., em grupos de tilápias com 5 e 30g, desafiadas por via i.p. com cepa homóloga na concentração de $3,6 \times 10^5$ UFC/peixe, 30 dias após e de $1,7 \times 10^6$ UFC peixe⁻¹, 34 dias após, respectivamente. Após 14 dias de observação, o RPS foi de 34% no grupo de 5g e 35% no grupo de 30g. Os autores concluíram que a vacina aplicada via i.p., apresentou boa eficácia em peixes de 30g, enquanto a eficácia da vacina aplicada por via b.i. pode ser considerada satisfatória quando utilizada em sistemas de larvicultura e produção de juvenis.

Pasnik et al. (2005) testaram a mesma vacina de *S. agalactiae* utilizada por Evans et al. (2004) em tilápias com peso de 30g, porém a vacina foi estocada à 4°C durante um ano, antes da utilização. A vacina e o desafio foram administrados via i.p. O desafio com $1,0 \times 10^4$ UFC peixe⁻¹ foi realizado 31 dias após a vacinação e o RPS foi de 29%, demonstrando que a vacina conservada apresenta diminuição de eficácia, quando comparada à utilizada imediatamente após o preparo.

Shoemaker et al. (2006) compararam a eficácia da vacina inativada e liofilizada de *S. iniae* na concentração de $4,0 \times 10^9$ células mL⁻¹ administrada por via i.p. e via oral incorporada à ração utilizando a tecnologia Oralject™ em tilápias. O RPS dos peixes vacinados pela via oral foi de 63,1% e do grupo vacinado por via i.p. de 100%. Apesar da vacina protegida ter apresentado menor eficácia, o método é menos estressante e possibilita vacinação de grandes populações de peixes.

Soltani et al. (2007) avaliaram a eficácia de vacinas de *S. iniae*, constituídas de células inativadas, células inativadas mais ECP e células inativadas mais ECP e adjuvante de Freud em trutas arco-íris de 40±5g. O grupo de peixes vacinados por via i.p. apresentou RPS de 73,9 a 100%, por b.i. 30,4 a 45,8% e por v.o. 8,7 a 29%. Não houve diferença significativa com relação ao tipo de vacina utilizada.

Pretto – Giordano et al (2009) utilizaram tilápias de 20g para avaliar a eficácia da vacina de células inativadas de *S. agalactiae*, com uma e duas doses, com concentração de $2,0 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ por via i.p. Os peixes foram desafiados por via i.p., 30 dias após, com concentração de $3,0 \times 10^6$ UFC peixe⁻¹. A eficácia da vacina foi de 83,6%, no grupo imunizado com uma dose e 96,6% no grupo com duas doses da vacina. As tilápias inoculadas com duas doses da vacina apresentaram sobrevivência de 97,7%, e os inoculados com uma dose 89,3%. Os autores concluíram que apesar da melhor eficácia da vacinação com duas doses, estudos detalhados devem ser efetuados para avaliar o custo benefício.

Ra et al. (2009) compararam a eficácia de uma vacina elaborada com células inativadas e uma vacina recombinante de *S. iniae*. Os autores verificaram 100% de mortalidade no grupo controle, 66% no grupo imunizado com vacina inativada e 54% com a vacina recombinante, após o desafio com *S. iniae*.

Na Ásia, o laboratório Intervet Schering-Plough comercializa duas vacinas para estreptococose, uma bivalente contendo *S. iniae* e *Lactococcus garvieae* (AquaVac Garvetil™) e outra monovalente com *S. iniae* (Norvax® Strep Si). AquaVac Garvetil™ é prescrita para vacinação de alevinos por b.i. com uma dose reforço, incorporada na ração, na fase juvenil. Segundo Conroy (2006) essa vacina apresenta eficácia de 50%. A vacina Norvax® Strep Si, pode ser administrada por b.i. ou via i.p., segundo o fabricante, a eficácia quando obedecidas às normas de conservação e uso, pode alcançar 68% quando aplicada por imersão e 100% por i.p.

O laboratório espanhol Hipra comercializa vacinas de *Lactococcus garvieae* (Icthiovac-Lg®) para truta arco-íris e *S. parauberis* (Icthiovac®-str) para robalos. Para obter eficácia $\geq 75\%$, o fabricante recomenda a aplicação i.p. da vacina em trutas com peso médio de 20g e em robalos de 30 a 40g. Segundo Vendrell et al. (2007) a eficácia da vacina Icthiovac-Lg®, em trutas arco-íris de 35g, desafiadas com cepa heteróloga, foi de 94%.

2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia de uma vacina autóctone de *Streptococcus agalactiae* inativado aplicada por banho de imersão em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em condições experimentais.

3 ARTIGO – AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE UMA VACINA AUTÓCTONE DE *Streptococcus agalactiae* INATIVADO APLICADA POR BANHO DE IMERSÃO EM TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*).

3.1 RESUMO

O crescimento da aquicultura brasileira tem sido maior que a média mundial e está entre os setores de maior destaque na produção animal. Da mesma forma, tem aumentado a incidência de doenças infecciosas na produção de peixes e a estreptococose é uma das enfermidades que causam grandes prejuízos. O objetivo deste trabalho foi testar uma vacina de *Streptococcus agalactiae* inativado aplicada por banho de imersão (b.i) e desafio com cepa homóloga. Foram utilizadas 421 tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com peso médio de 38,38 gramas, distribuídas em dois tratamentos (T1 e T2) e um grupo controle. No T1, os peixes foram vacinados com uma dose da vacina por b.i., com concentração de $5,4 \times 10^8$ UFC mL⁻¹. O T2 recebeu duas doses da mesma vacina por b.i., com intervalo de 25 dias. O grupo controle recebeu água ultrapura por b.i. Os peixes foram desafiados por via intraperitoneal (i.p.), com concentração de $3,0 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ 43 dias após a primeira ou segunda dose da vacina, de acordo com o tratamento. Os peixes dos tratamentos e controle foram monitorados durante 16 dias após o desafio. Comparativamente ao grupo controle os resultados obtidos para o T1 foram: p = 0,0805, RR = 0,79 (IC 95%: 0,61 – 1,01) e RPS = 21%. Para o T2 foram: p = 0,0296, RR = 0,74 (IC 95%: 0,56 – 0,96) e RPS = 26%. A mortalidade após o desafio foi de 57 peixes (40,71%) no T1, 51 (38,06%) no T2, e 76 (51,7%) no grupo controle. Não houve diferença significativa entre T1 e T2 e p=0,7445. Este resultado permite concluir que a vacina testada apresentou baixa eficácia na imunização das tilápias.

Palavras chave: *Streptococcus agalactiae*. Tilápia do Nilo. Vacina. Banho de imersão.

EVALUATION OF THE EFFECTIVENESS OF A VACCINE HOMOLOGOUS *Streptococcus agalactiae* INACTIVATED APPLIED BY BATH IN NILE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*)

3.2 ABSTRACT

The growth of aquaculture in Brazil has been higher than the world average and is among the most prominent sectors. But likewise, has increased the incidence of

infectious diseases in the production of fish, streptococcosis is one of the diseases that cause great damage. This study aimed to test a vaccine administered by immersion bath (b.i.) against *Streptococcus agalactiae* and challenge with homologous strain. We used 421 Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) with an average weight of 38.38 grams, divided into two treatments (T1 and T2) and a control group. At T1, the fish were vaccinated with one dose of vaccine for b.i., with a concentration of 5.4×10^8 CFU mL⁻¹. The T2 received two doses of vaccine per b.i., with an interval of 25 days. The control group received a bath of pure water. The fish were challenged by intraperitoneal (i.p.) with a concentration of 3.0×10^8 CFU mL⁻¹ 43 days after the first or second dose of vaccine, according to the treatment. The fish were monitored for 16 days after challenge. Compared with the control group results were obtained for T1: $p = 0.0805$, RR = 0.79 (95% CI: 0.61 1.01) and RPS = 21%. For T2 were: $p = 0.0296$, RR = 0.74 (95% CI 0.56 to 0.96) and RPS = 26%. Mortality after challenge was 57 fish (40.71%) in T1, 51 (38.06%) at T2, and 76 (51.7%) in the control group. There was no significant difference between T1 and T2, $p = 0.7445$. This result shows that the vaccine tested had low efficacy in vaccination of tilapia.

Key words: *Streptococcus agalactiae*. Nile tilapia. Vaccine. Immersion bath.

3.3 INTRODUÇÃO

O crescimento da aquicultura brasileira nos últimos anos tem sido acima da média mundial, sendo considerado o segmento de maior expansão do agronegócio (FAO, 2006; OSTRENSKY et al. 2008). Em 2005, o Brasil produziu um total de 1.009.073 t de pescado. A aquicultura continental representou 17,8% deste valor com 179.746 t (IBAMA, 2007). Segundo a FAO (2006), em 2005, a região Sul produziu 59.204,5 t de pescado contribuindo com a maior parcela da produção nacional, 32,9%. A carpa e a tilápia são as espécies mais representativas, tendo suas maiores produções concentradas nos estados do Rio Grande do Sul e Paraná. Em 2005 o estado do Paraná produziu 20.258 toneladas de pescado sendo 16.757 t provenientes da aquicultura continental, correspondendo 12.097 t a produção de tilápia.

O grupo das tilápias é um dos mais importantes entre os peixes cultivados. O sistema de cultivo normalmente utilizado é o intensivo, caracterizado por alta taxa de estocagem de peixes e, conseqüentemente, arraçoamento intensivo, podendo ocorrer diminuição da qualidade da água e estresse nos animais, tornando-

os susceptíveis às enfermidades infecciosas (PLUMB, 1997; SHOEMAKER et al., 2000). As principais espécies de bactérias patogênicas para peixes são *Aeromonas hydrophila*, *Flavobacterium columnare*, *Edwardsiella tarda*, *Vibrio vulnificus*, *Streptococcus iniae* e *Streptococcus agalactiae* (ROBERTS; SOMMERVILLE, 1982; FIGUEIREDO et al., 2008).

Entre as doenças de origem bacteriana que causam maiores problemas, destaca-se a estreptococose por provocar elevados prejuízos para a produção de peixes de água doce e salgada. A doença tem sido relatada como uma das principais em diversos países de destaque na aquicultura, inclusive no Brasil (SALVADOR et al., 2005; PARK et al., 2009).

Segundo Toranzo et al. (2005) a estreptococose deve ser considerada como um complexo de doenças similares causadas por diferentes gêneros e espécies de bactérias (*Lactococcus garvieae*, *Lactococcus piscium*, *S. iniae*, *S. agalactiae*, *Streptococcus parauberis* e *Vagococcus salmoninarum*) capazes de lesar o sistema nervoso central. No Brasil, *S. agalactiae* é a espécie mais isolada em tilápias e os principais sinais clínicos observados são opacidade de córnea, exoftalmia uni ou bilateral, natação errática, letargia, ascite e escurecimento da pele (SALVADOR et al., 2003; 2005; FIGUEIREDO et al., 2006)

As principais medidas utilizadas no controle das estreptococoses estão relacionadas com manejo, alimentação, utilização de antibióticos e produtos químicos. Porém o uso indiscriminado de antibióticos e produtos químicos pode causar poluição e degradação do meio ambiente, além de seleção de cepas resistentes e risco à saúde do consumidor (GRISEZ; OLLEVIER, 1995; KLESIUS et al., 2004; SWAIN et al., 2002; SERRANO, 2005).

O desenvolvimento de novas vacinas e esquemas de vacinação tem auxiliado o controle de algumas doenças infecciosas na aquicultura (HASTEIN et al., 2005). Devido aos benefícios econômicos, as vacinas de células inativadas por formalina são amplamente usadas para a proteção dos peixes frente a diferentes doenças bacterianas (DUMRONGPHOL et al., 2009). Os peixes podem ser imunizados pelas vias intraperitoneal (i.p.), oral (v.o.) e por banho de imersão (b.i.). Esses métodos apresentam vantagens e desvantagens relacionadas ao nível de proteção, efeitos colaterais, praticidade e custo-benefício (GOMES et al., 2006).

As vacinas estreptocócicas aplicadas por via i.p. apresentam melhores resultados na proteção de tilápias, mas tem como desvantagem o estresse

causado aos peixes, a pouca praticidade e os custos com mão de obra. Por outro lado, o b.i. é menos eficaz, mas tem como vantagem o baixo custo e a praticidade, podendo ser utilizado em peixes de menor porte e em grande quantidade (NAKANISHI et al., 2002; EVANS et al., 2004b; PRETTO-GIORDANO et al., 2009). O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia de uma vacina autóctone de *S. agalactiae* inativado aplicada por b.i. em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em condições experimentais.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi registrado e aprovado no Comitê de Ética em Experimentação Animal, sob o número 57/08 (Anexo 1).

3.4.1 Peixes

Foram utilizadas 421 tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), com peso médio de 38,38g. O experimento foi conduzido na Estação de Piscicultura do Departamento de Biologia Animal e Vegetal da Universidade Estadual de Londrina, em Londrina, Paraná.

As tilápias foram distribuídas em caixas de fibra de vidro com capacidade de 500L (Quadro 1), 10 dias antes do início do experimento, para aclimatação. O arraçoamento foi realizado duas vezes ao dia na proporção de 1,5% do peso vivo, com ração extrusada, com pelets de 2 mm, e 35% de proteína bruta (FISH 35%, Extrusada, Cooperativa Integrada®). Antes do início do experimento foram necropsiados aleatoriamente nove peixes, colhido material de rim cranial, encéfalo e fígado para exame bacteriológico. As amostras colhidas foram negativas para *S. agalactiae* e/ou outros agentes bacterianos.

3.4.2 Controle da Qualidade da Água

As caixas continham 400L de água de poço semi-artesiano, com fluxo de 3L de água/minuto, aeração contínua e limpeza realizada diariamente por sucção.

A temperatura e o oxigênio dissolvido foram mensurados diariamente com oxímetro YSI 55 (Yellow Spring Instrument, Yellow Springs, OH, USA). A temperatura foi mantida com média de 23,5°C (19,3 – 25,1) e o oxigênio dissolvido com média de 4,61 mg/L (1,17 – 6,64).

Os níveis limnológicos de amônia foram mensurados semanalmente, pela reação de Berthelot (SOLARANZO, 1969) e nitrito pela reação de Griess (AMINOT;CHAUSSEPIED, 1983). A concentração média de amônia foi de 0,22 mg/L (0,11 – 0,86) e a de nitrito de 0,029 mg/L (0 – 0,66).

3.4.3 Vacina

A vacina foi preparada segundo Pretto – Giordano et al. (2009). Foi utilizado *S. agalactiae* isolado de um surto de estreptococose em tilápias cultivadas em tanque-rede no norte do estado do Paraná.

O cultivo da cepa vacinal foi realizado em meio Tryptic Soy Broth (TSB) (Difco Laboratories, Sparks, MD) e incubado a 30±1°C/72h. Uma alíquota foi utilizada para determinar a concentração bacteriana por espectrofotometria (Modelo Cintra 5), comprimento de onda de 540nm, densidade óptica (OD) de 0,7860, e contagem em placas (UFC mL⁻¹) com Tryptic Soy Agar (TSA) (Difco Laboratories, Sparks, MD). A pureza da cultura foi confirmada por semeadura em Ágar Columbia (Difco Laboratories, Sparks, MD) adicionado de 5% de sangue ovino (ACS). A cultura em TSB foi inativada por adição de formalina tamponada a 10%, 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 7000 x g por 30 min, a 10°C e o pelet mantido sob refrigeração até o momento do uso. Para a vacinação, 10 mL do pelet foram diluídos em 990 mL de salina estéril a 0,85% e posteriormente em 9000 mL de água ultrapura, totalizando 10.000 mL, correspondendo a uma concentração final de $5,4 \times 10^8$ UFC mL⁻¹.

3.4.4 Desafio

O desafio foi realizado com a mesma cepa utilizada na produção da vacina. *S.agalactiae* foi cultivado em 100 mL de TSB a 30±1°C/24 h e a concentração celular de $3,0 \times 10^8$ UFC mL⁻¹, de acordo com Pretto-Giordano et al (2009). O inóculo foi padronizado por espectrofotometria com comprimento de onda de 540nm, OD de 0,7846 e contagem em placas (UFC mL⁻¹) com TSA. A pureza do inóculo foi verificada por semeadura em placas de ACS, incubadas a 30±1°C/48 h.

3.4.5 Delineamento experimental

Foram utilizados dois tratamentos e um grupo controle com três repetições cada (Quadro 1). No tratamento 1 (T1), 140 peixes foram vacinados com uma dose da vacina, administrada por b.i. No tratamento 2 (T2), 134 peixes foram vacinados com duas doses de vacina por b.i. com intervalo de 25 dias. No grupo controle, 147 peixes foram submetidos a b.i. em água ultrapura.

Tratamentos	Repetições	Nº de tilápias	Esquema de Vacinação 5,4 x 10 ⁸ UFC mL ⁻¹		Desafio 3,0 x 10 ⁸ UFC mL ⁻¹	Período de observação
			Dia 0	Dia 25	Dia 78	
T1	1	47		1ª dose b.i.	Desafio 0,1mL i.p	16 dias
	2	47				
	3	46				
Total	3	140				
T2	1	45	1ª dose b.i.	2ª dose b.i.	Desafio 0,1mL i.p	16 dias
	2	45				
	3	44				
Total	3	134				
Controle	1	49		Água ultrapura b.i.	Desafio 0,1mL i.p	16 dias
	2	49				
	3	49				
Total	3	147				

Quadro 1 – Delineamento experimental da avaliação da eficácia de uma vacina de *Streptococcus agalactiae* inativado aplicada por banho de imersão (b.i) em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e desafiadas por via intraperitoneal (i.p.), em Londrina – PR, 2009.

Para a vacinação e banho de água ultrapura, os peixes de cada tratamento foram divididos em grupos de 25 peixes, e cada grupo foi imerso por 20 minutos em 10.000 mL da solução de vacina ou água ultrapura, com aeração constante e, em seguida, recolocados nas caixas de origem (EVANS et al., 2004b).

Os peixes do T1, T2 e controle foram desafiados com 0,1mL de inóculo de *S. agalactiae*, com concentração de 3,0 x 10⁸ UFC mL⁻¹ por i.p. (PRETTO - GIORDANO et al., 2009), 43 dias após a aplicação da vacina (Quadro 1).

Os peixes foram monitorados durante 16 dias após o desafio e diariamente eram retirados os mortos e moribundos. Dos 184 mortos dos dois tratamentos e grupo controle, 23 peixes foram submetidos a exame macroscópico e bacteriológico. Amostras de encéfalo, rim, fígado, coração, líquido visceral e olhos foram semeadas em ACS, incubadas a 30±1°C/48 h. Foi observada a morfologia das colônias e ausência de hemólise e quando consideradas típicas foram submetidas à Coloração de Gram, prova da catalase e esculina. Para a identificação bioquímica foi utilizado o Api 20 Strep (BioMérieux, France) e para a classificação no grupo de Lancefield o Slidex Strepto Kit (BioMerieux, França) (EVANS et al., 2002).

3.4.6. Estatística

Para verificar a significância estatística entre os grupos vacinados e controle, utilizou-se 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 força de associação entre a exposição à vacina e o seu efeito protetor. Para os cálculos citados 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): $RPS = 1 - (\% \text{ mortalidade dos animais vacinados} / \% \text{ mortalidade dos animais controle}) \times 100$.

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A mortalidade de peixes no T1 foi de 57 (40,71%), no T2, 51 (38,06%) e no grupo controle, 76 (51,7%). Comparativamente ao grupo controle, os peixes do T1, imunizados com uma dose da vacina, e no T2, imunizados com duas doses, apresentaram os seguintes valores: $p=0,0805$, $RR=0,79$ (IC 95%: 0,61 – 1,01) e $RPS=21,0\%$ no T1, e $p=0,0296$, $RR=0,74$ (IC 95%: 0,56 – 0,96) e $RPS=26,0\%$. Não houve diferença significativa entre T1 e T2 ($p = 0,7445$) (Tabela 1).

Tabela 1 – Eficácia de uma vacina de *Streptococcus agalactiae* inativado aplicada por banho de imersão em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em condições experimentais, Londrina, 2009.

Tratamentos	Óbitos/Total (%)	p* (≤ 0,05)	RR (IC 95%) ^a	RPS% ^b
T1 ^c	57/140 (40,7)	0,0805	0,79 (0,61 – 1,01)	21
Controle	76/147 (51,7)			
T2 ^d	51/134 (38,06)	0,0296	0,74 (0,56 – 0,96)	26
Controle	76/147 (51,7)			
T2 ^d	51/134 (38,06)	0,7445	0,93 (0,70-1,25)	
T1 ^c	57/140 (40,7)			

* Qui-quadrado corrigido de Yates

^a RR – Risco relativo

^b Porcentagem relativa de sobrevivencia

^c T1 – peixes vacinados com uma dose

^d T2 – peixes vacinados com duas doses

Poucos trabalhos foram realizados com vacinas estreptocócicas aplicadas por b.i. e a maioria dos resultados se assemelha aos desta pesquisa. A baixa eficácia da vacina administrada por b.i., quando comparada a outros métodos de inoculação também foi observada por outros pesquisadores.

Nakanishi et al. (2002) testaram uma vacina de *S. iniae* inativada na concentração de $1,0 \times 10^9$ UFC mL⁻¹ por b.i. em trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) de 4 a 10g. Os grupos, controle e vacinado, foram desafiados 14 dias após com dose de $2,3 \times 10^3$ UFC peixe⁻¹ por via i.p. A mortalidade foi de 80% nos dois grupos, demonstrando a ineficácia da via de administração da vacina. Os autores, com a mesma vacina e desafio, imunizaram um grupo de peixes por método que associou micro lesões na pele à b.i. para aumentar a absorção da vacina, e obtiveram taxa de mortalidade de 40%, melhorando a eficácia.

Evans et al. (2004a) pesquisaram uma vacina com $4,0 \times 10^9$ UFC mL⁻¹ de células inativadas de *S. agalactiae* e concentrado de produtos extracelulares administrada por b.i.. No experimento foram vacinados dois grupos de tilápias, um

com peixes de 5g e outro com 30g. Os peixes foram desafiados por via i.p. com cepa homóloga na concentração de $3,6 \times 10^5$ UFC/peixe, 30 dias após imunização e na concentração de $1,7 \times 10^6$ UFC/peixe, 34 dias após, respectivamente. O RPS foi de 34% no grupo de 5g e 35% no grupo de 30g. Os autores concluíram que a via por b.i., apesar do baixo RPS, pode ser considerada satisfatória quando utilizada em larvicultura e em sistemas de produção de juvenis.

Vacina inativada elaborada com *S. iniae* e *Lactococcus garvieae* é comercializada na Ásia (AquaVac Garvetil™, SCHERING-PLOUGH). Segundo dados do laboratório responsável, a vacinação de alevinos por b.i. com uma dose reforço, incorporada na ração (Aquavac Garvetil™ Oral), 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) administrada por b.i. ou via i.p., segundo o fabricante, quando obedecidas às normas de conservação e uso, pode alcançar eficácia de 68% e 100%, respectivamente.

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⁻¹ administrada por via i.p. e v.o. incorporada à ração utilizando a tecnologia Oralject™ em tilápias. O RPS dos peixes vacinados pela v.o. foi de 63,1% e do grupo vacinado por via i.p. de 100%. Apesar da vacina protegida ter apresentado menor eficácia o método é menos estressante e possibilita vacinação de grandes populações de peixes.

Outras pesquisas com vacinas inativadas de estreptococos também mostraram que a administração por via i.p. apresentou melhor eficácia. Eldar et al. (1995) em Israel, pesquisaram vacinas constituídas de células inativadas (10^{10} UFC mL⁻¹), de diferentes cepas de *S. difficile*. Os autores utilizaram tilápias de 150-180g, vacinadas com duas doses i.p. com intervalo de quatro semanas e desafiados três semanas após com inóculo de $1,0 \times 10^5$ UFC peixe⁻¹, via i.p. Após 75 dias de observação verificaram que 100% dos peixes do grupo controle morreram e nos grupos vacinados não ocorreu mortalidade.

Evans et al. (2004b) pesquisaram uma vacina experimental elaborada com *S. agalactiae* inativado e concentrado de produtos extracelulares por via i.p. em tilápias de 5 e 30 g. Os peixes desafiados por via i.p. com cepa homóloga

de *Streptococcus agalactiae*, 46 e 30 dias após, apresentaram RPS de 25 e 80%, respectivamente.

Pretto – Giordano et al. (2009) no Brasil, testaram em condições experimentais semelhantes às utilizadas nesse estudo, uma vacina inativada de *S. agalactiae* por via i.p. com uma e duas doses em tilápias com 20 gramas de peso. Os peixes foram desafiados 30 dias após por via i.p. e o RPS foi de 83,6 e 96,4%, respectivamente.

Neste trabalho, o início da mortalidade dos peixes, T1, T2 e grupo controle, foi observado a partir do segundo dia após o desafio com pico entre o oitavo e décimo dia. Inicialmente os peixes apresentaram letargia e diminuição de apetite evoluindo para exoftalmia uni e bilateral e posteriormente natação errática, opacidade de córnea, distensão visceral e alteração da coloração de pele. A única diferença observada foi que os peixes dos T1 e T2, ao contrário dos do grupo controle, recuperaram gradativamente o apetite a partir do 11º dia após o desafio.

A cepa utilizada nesta pesquisa, apesar de três passagens prévias em tilápias para reativação, apresentou taxa de mortalidade atípica, entretanto, os sinais clínicos observados foram semelhantes aos descritos na literatura.

Os principais sinais clínicos observados em tilápias com infecção natural ou experimental por *Streptococcus spp* são típicos de septicemia e meningoencefalite. 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; PLUMB, 1999; EVANS et al., 2002). No Brasil, Salvador et al. (2005), Figueiredo et al. (2006), Preto-Giordano et al. (2009), também relataram sinais semelhantes em tilápias com infecção natural ou experimental.

Evans et al. (2002) inocularam *S. agalactiae* isolados de peixes de diferentes regiões naturalmente infectados, em tilápias na concentração de $1,0 \times 10^7$ UFC peixe⁻¹, via i.p. e observaram mortalidade variando de 60% a 100%, em um período de sete dias após a inoculação.

Evans et al. (2004a) verificaram morbidade e mortalidade de 40 e 50% em tilápias, nas primeiras 24 horas após inoculação, por via i.p. de *S. agalactiae* nas concentrações de $4,5 \times 10^6$ e $5,5 \times 10^2$ UFC peixe⁻¹, respectivamente.

Pretto-Giordano et al. (2010) avaliaram experimentalmente a patogenicidade de *S. agalactiae* isolados de infecções naturais em tilápias por inoculação i.p, em concentrações que variaram de $1,0 \times 10^6$ a $1,5 \times 10^8$ UFC peixe⁻¹ e observaram dois picos de mortalidade, um entre o primeiro e segundo dia após a inoculação, e outro entre o sexto e o sétimo dia. As taxas de mortalidade acumulada variaram de 67,5 a 90%, dependendo da concentração do desafio.

Mian et al. (2009) avaliaram a DL₅₀ de cinco cepas de *S. agalactiae*, isoladas de tilápia do Nilo em diversos estados brasileiros e observaram taxas de mortalidade de 90 a 100%, com apresentação dos primeiros sinais clínicos 24 h após a infecção, e a maior mortalidade com 72 h. Os autores afirmaram que as cepas de *S. agalactiae* mostraram ser extremamente virulentas para tilápias, necessitando de mais estudos sobre os fatores de virulência e interação agente, hospedeiro e ambiente.

Segundo Chang e Plumb (1996) a intensidade das lesões e sinais clínicos em tilápia depende de fatores relacionados à cepa de *S. agalactiae*, dose infectante, qualidade da água, temperatura, biomassa e manejo.

Os peixes moribundos ou mortos submetidos à necropsia apresentaram como principais lesões macroscópicas: pele esbranquiçada, exoftalmia, opacidade de córnea, presença de líquido amarelado na cavidade visceral, encéfalo hemorrágico, hepatomegalia, esplenomegalia, coração com pontos de fibrose e rim pálido. Estas lesões são compatíveis com as infecções causadas por estreptococos em peixes e são semelhantes às descritas por vários pesquisadores (SALVADOR et al., 2003; PRETTO-GIORDANO et al., 2009; INOCENTE FILHO et al., 2009; HERNANDEZ et al., 2009).

No exame direto e cultivo das amostras de sangue, olho, líquido visceral, fígado, baço, rim e encéfalo com alterações macroscópicas, foi observado a presença de cocos gram positivos dispostos em pequenas cadeias. Nas 48/52 amostras biológicas foram isoladas colônias pequenas, não hemolíticas, cocos gram positivos, pertencentes ao grupo B de Lancefield e características fenotípicas correspondentes às descritas para *S. agalactiae* isolados de tilápias (SALVADOR et al., 2005; MIAN et al., 2009). Estas características foram idênticas as da cepa utilizada para a elaboração da vacina e desafio.

3.6 CONCLUSÃO

Nas condições deste experimento, os resultados mostraram que a vacina de *Streptococcus agalactiae* inativado aplicada por banho de imersão em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) apresentou baixa eficácia.

A vacinação com duas doses não alterou significativamente a eficácia da vacina.

A cepa de *Streptococcus agalactiae* utilizada neste trabalho apresentou características de virulência e picos de mortalidade atípicos.

Os sinais clínicos e lesões macroscópicas foram semelhantes às descritas na literatura.

3.7 REFERÊNCIAS

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.

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.

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.

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

DUMRONGPHOL, Y. et al. Identification of novel genes in japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) head kidney up-regulated after vaccination with *Streptococcus iniae* formalin-killed cells. **Fish and Shelfish immunology**, v. 26, p. 197 – 200, 2009.

ELDAR, A. et al. Experimental streptococcal meningo-encephalitis in cultured fish.

Veterinary Microbiology, v. 43, p. 33–40, 1995.

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.; KLESIUS, 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, 2004a.

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

FAO. **State of World Aquaculture**, FAO Fisheries Department. Rome, Italy. 2006. p.145.

FIGUEIREDO, H. C. P. et al. Streptococcus agalactiae associado à meningoencefalite e infecção sistêmica em tilápia do Nilo (O. niloticus). *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootécnica*, v. 58, n. 4, p. 678 – 680, 2006.

FIGUEIREDO, H. C. P.; LEAL, C. A. G. Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 37, supl. esp., p. 8–14, 2008.

GOMES, S., AFONSO, A.; GARTNER, F. Fish vaccination against infections by Streptococcal species and the particular case of Lactococcosis. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v. 101, p. 25–35, 2006.

GRISEZ, L.; OLLEVIER, F. Vibrio (Listonella anguillarum) infections in marine fish larviculture. In: LAVENS, P., JASPER, ROELANDS, I. (ed.). Larvi 91. Fish and Crustacean Larviculture Symposium. European Aquaculture Society, Gent. 1995. p. 497.

HASTEIN, T.; GUDDING, R.; EVENSEN, O. Bacterial vaccines for fish-an update of the current situation worldwide. *Development Biology (Basel)*, v. 121, p. 55–74, 2005.
HERNANDEZ, E.; FIGUEROA, J.; IREGUI, C. Streptococcosis on a red tilapia, Oreochromis sp., farm: a case study. *Journal of fish diseases*, v. 32, p. 247–252, 2009.

IBAMA. Ministério do Meio Ambiente. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Estatística da pesca 2005 – Brasil. Brasília 2007.

INOCENTE FILHO, C. et al. Histological findings of experimental Streptococcus agalactiae infection in Nile tilapias (Oreochromis niloticus). *Brazilian Journal of Veterinary pathology*, v. 2, n. 1, p. 12–12, 2009.

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.

MIAN, F.C. et al. Aspects of the natural history and virulence of S. agalactiae infection in Nile tilapia. *Veterinary Microbiology*, v. 139, p. 180 – 183, 2009.

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. 2, p. 3764 – 3769, 2002.

OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R.; SOTO, D. Aquicultura no Brasil: o desafio é crescer. Brasília. 2008. 276 p.

PARK, Y. K. et al. Antibiotic susceptibility and resistance of *Streptococcus iniae* and *Streptococcus parauberis* isolated from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Veterinary Microbiology. Republico of Korea**, v. 136, p. 76 – 81, 2009.

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

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

PRETTO – GIORDANO, L. G. et al. Efficacy of na experimental inactivated *Streptococcus agalactiae* vaccine in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in Brazil. *Aquaculture Research*, p. 1 – 6, 2009.

PRETTO – GIORDANO et al. Evaluation on the pathogenesis of *Streptococcus agalactiae* in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n.1, p. 87 – 92, 2010.

ROBERTS, R. J.; SOMMERVILLE, C. Diseases of tilapias. In: PULLIN, S. V.; LOWE-MAC CONNEL, R.H. (ed.). The biology and culture of tilapias, Manila: International Center for Living Aquatic Resources Management, p.247 -263. 1982.

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.

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

SCHERING-PLOUGH INTERVET 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.

SCHRING-PLOUGH INTERVET ANIMAL HEALTH -AQUACULTURE. Disease prevention. Norvax® Strep Si Asia: Disponível em: <http://spaquaculture.com/assets/Garvetil.pdf>. Acesso em 15 fev. 2010.

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. et al. Efficacy of a *Streptococcus iniae* modified bacterin delivered using OraljectTM technology in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 255, 151 – 156, 2006.

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

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

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.

REFERÊNCIAS

AGNEW, W.; BARNES, A. C. Streptococcus iniae: An aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for realible vaccination. *Veterinary Microbiology*, v. 122, p.1 – 5, 2007.

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.

CASTAGNOLLI, N.; CYRINO, J. E. P. Piscicultura nos trópicos. São Paulo: Manole, 1986. 152 p.

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

CHAFFIN, D. O. et al. The serotype of type Ia and III group B streptococci is determined by the polymerase gene within the polycistronic capsule operon. *Journal Bacteriology*, v. 182, p. 4466 – 4477, 2000.

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.

DUMRONGPHOL, Y. et al. Identification of novel genes in japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) head kidney up-regulated after vaccination with *Streptococcus iniae* formalin-killed cells. *Fish and Shelfish immunology*, v. 26, p. 197 – 200, Japan, 2009.

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

ELLIS, A. E. Immunisation with bacterial antigens: Furunculosis. *Development in Biological Standardisation*, v. 90, p.107–116, 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.; KLESIUS, 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.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2006**. Roma. 2007.

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

FIGUEIREDO, H. C. P. et al. *Streptococcus agalactiae* associado à meningoencefalite e infecção sistêmica em tilápia do Nilo (*O. niloticus*). **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária de Zootecnista**, v. 58, n. 4, p. 678 – 680, 2006.

FIGUEIREDO, H. C. P.; LEAL, C. A. G. Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, supl. esp., p. 08-14, 2008.

FIGUEIREDO JUNIOR, C. A.; VALENTE JUNIOR, A. S. Cultivo de tilápias no Brasil: Origens e cenário atual. XLVI Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural. Acre, 20 a 23 de julho de 2008.

FITZSIMMONS, K. Tilapia: the most importante aquaculture species of the 21st century. In: INTERNATIONAL SYPOSIUM ON TILAPIA AQUACULTURE, 5, 2000, Rio de Janeiro. Brasil. **Anais...** Botafogo, RJ. Panorama da Aquicultura, v.2, p. 545 – 551, 2000.

GARCIA, J. C. et al. Non – infectivity of cattle *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, and channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **Aquaculture**, v. 281, p. 151 – 154, 2008.

GOMES, S., AFONSO, A.; GARTNER, F. Fish vaccination against infections by *Streptococcal* species and the particular case of Lactococcosis. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 101, p. 25 – 35, 2006.

GRISEZ, L.; OLLEVIER, F. *Vibrio* (*Listonella anguillarum*) infections in marine fish larviculture. In: LAVENS, P., JASPER, ROELANDS, I. (ed.), **Larvi 91**. Fish and Crustacean Larviculture Symposium. European Aquaculture Society. p. 497. Gent. 1995.

HIPRA Laboratories. Ichtiovac – Lag®. Vaccine of *Lactococcus garvieae* for rainbow trout. Disponível em: <http://www.hipra.com/ENGLISH/notamp.asp?idNew=369&topico=39421>. Acesso em: 08 fev. 2010.

HIPRA Laboratories. Ichtiovac® str. Vaccine of *S. parauberis*. Disponível em: <http://www.hipra.com/ENGLISH/notamp.asp?idNew=369&topico=39421>. Acesso dia 08 fev. 2010.

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

IBAMA. Ministério do Meio Ambiente. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Estatística da pesca 2005 – Brasil. Brasília 2007.

IGARASHI, M. A. Característica do agronegócio da tilápia cultivada no Brasil: uma força ascendente. **Pubvet**, v. 2, n. 25, Atr261, jun. 2008.

INOCENTE FILHO, C. et al. Histological findings of experimental *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Brazilian Journal Veterinary Pathology**, v. 2,1, p. 12-15, 2009.

KLESZIUS, 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.

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

LEONHARDT, J. H.; FROSSARD, H.; CAETANO, M. F. Piscicultura. In: MEDRI, M. E. et al. **A bacia do Rio Tibagi**. [s.l: s.n], 2003. 505 p.

MAIONE, D. et al. Group B *Streptococcus* Vaccine by Multiple Genome Screen. **Science**, v. 309, p. 148 – 150, 2005.

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

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

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.

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.

OLIVARES – FUSTER, O. et al. Molecular typing of Streptococcus agalactiae isolates from fish. **Journal of Fish Diseases**, v. 31, p. 277 – 283, 2008.

OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R.; SOTO, D. **Aquicultura no Brasil: o desafio é crescer**. Brasília: Brasil, 2008. 276 p.

PARK, Y. K. et al. Antibiotic susceptibility and resistance of Streptococcus iniae and Streptococcus parauberis isolated from olive flounder (Paralichthys olivaceus). **Veterinary Microbiology. Republico of Korea**, v. 136, p. 76 – 81, 2009.

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

PERSSON, E. et al. Serotypes and clinical manifestations of invasive group B streptococcal infections in western Sweden 1998–2001. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, p. 791 – 796, 2004.

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

PRETTO – GIORDANO, L. G. et al. Efficacy of an experimental inactivated *Streptococcus agalactiae* vaccine in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in Brazil. **Aquaculture Research**, p. 1 – 6, 2009.

PRETTO – GIORDANO, L.G. et al. Evaluation on the pathogenesis of *Streptococcus agalactiae* in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 1, p. 87 – 92, 2010.

RA, C. H. et al. Production of recombinant ghost bacterial vaccine against streptococcal disease of olive flounder. *Process Biochemistry*. 2009.

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.

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.

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

SCHERING-PLOUGH INTERVET 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.

SCHERING-PLOUGH INTERVET ANIMAL HEALTH -AQUACULTURE. **Disease prevention. Norvax® Strep Si Asia**: Disponível em: <http://spaquaculture.com/assets/Garvetil.pdf>. Acesso em 15 fev. 2010.

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. et al. Efficacy of a *Streptococcus iniae* modified bacterin delivered using OraljectTM technology in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 255, p. 151 – 156, 2006.

SLOTVED, H. C. et al. Serotype IX, a Proposed New *Streptococcus agalactiae* Serotype. *Journal Clinical Microbiology*, v. 45, p. 2929–2936, 2007.

SOLTANI, M. et al. Vaccination of rainbow trout against *Streptococcus iniae* infection: comparison of different routes of administration and different vaccines. **Iranian Journal of Fisheries Sciences**. (Resumo), v. 7, n. 1, p. 129 – 140, 2007.

SUANYUK, N. et al. *Streptococcus agalactiae* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Songklanakarin Journal of Science and Technology: Aquatic Science*, v. 27, p. 307 – 319, 2005.

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

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.

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.

VENDRELL, D. et al. Safety and efficacy of an inactivated vaccine against *Lactococcus garvieae* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Preventive Veterinary Medicine**, v. 80, p. 222 – 229, 2007.

ANEXOS

**ANEXO A – APROVAÇÃO E REGISTO NO COMITÊ DE ÉTICA EM
EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL**



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CÓPIA



COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

OF. CIRC. CEEA Nº 94/2008

Londrina, 16 de outubro de 2008

Prezado Pesquisador

O CEEA/UEL, reunido aos 14 de outubro do ano corrente, avaliou o projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação experimental da eficácia da bacterina de *Streptococcus agalactiae* em Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) administrada por banho de imersão**", registrado no CEEA sob o nº 57/08, Dissertação do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, desenvolvido sob sua responsabilidade e orientação, julgando-o *aprovado* para execução por entender que os princípios éticos postulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal estão respeitados.

Serão utilizadas 360 Tilápias, machos, procedentes da Estação de Piscicultura da UEL. O projeto está previsto para ser executado entre outubro de 2008 e fevereiro de 2010.

Cumprе orientar que caso se pretendam quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação do CEEA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Sem mais para o momento, subscrevo-me.

Cordialmente,

Prof. Dr. Júlio Augusto Naylor Lisbôa
Coordenador do CEEA/UEL

Hmo. Sr.

Prof. Dr. Ernst Ekehardt Müller
Coordenador e Orientador do Projeto
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva
Centro de Ciências Agrárias