

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO  
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO  
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS  
INSTITUTO DE PESCA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

EFICÁCIA DE VACINA CONTRA *Streptococcus agalactiae* EM JUVENIS DE  
TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*) SOB INFECÇÃO EXPERIMENTAL

Jessyca Ellen Alexandre

Orientador: Dr. Leonardo Tachibana

Coorientadora: Dra. Danielle de Carla Dias

São Paulo

2021

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO  
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO  
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS  
INSTITUTO DE PESCA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

EFICÁCIA DE VACINA CONTRA *Streptococcus agalactiae* PARA JUVENIS DE  
TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*) SOB INFECÇÃO EXPERIMENTAL

Jessyca Ellen Alexandre

Orientador: Dr. Leonardo Tachibana

Coorientadora: Dra. Danielle de Carla Dias

São Paulo

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Elaborada pelo Núcleo de Informação e Documentação. Instituto de Pesca, São Paulo

A369e Alexandre, Jessyca Ellen  
Eficácia de vacina contra *Streptococcus agalactiae* em juvenis de tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*) sob infecção experimental/ Jessyca Ellen Alexandre – São Paulo, 2021  
vii; 41f.; fig.; tab; graf.

Dissertação (mestrado) apresentada ao Programa de Pós-graduação em  
Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca – APTA – Secretaria de Agricultura e  
Abastecimento.

Orientador: Dr. Leonardo Tachibana. Coorientadora: Dra. Danielle de Carla Dias

1. Infecção. 2. Sanidade. 3. Imunidade. 4. Profilaxia. 5. Microbiologia.  
I. Tachibana, Leonardo. II. Título.

CDD 571.96

Permitida a cópia parcial, desde que citada a fonte – O autor

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais, meu padrasto e meu irmão, pelo apoio.

Ao meu namorado, Luiz Fernando, por todo apoio e companherismo.

A co-orientadora e grande amiga Dra. Danielle de Carla Dias, pelo incentivo, ajuda, amizade e todo aprendizado que me foi dado.

Ao orientador Dr. Leonardo Tachibana pela oportunidade de realizar o mestrado, pela credibilidade e confiança.

Aos pesquisadores Dra. Erna Elizabeth Bach, Dr. Carlos Massatoshi Ishikawa e Dra. Ana Maria Cristina Rebello Pinto da Fonseca Martins por repassar seu conhecimento.

Aos amigos e colegas de laboratório Luara Lucena Cassiano, Crystal Lodi Conde, Beatriz Nogueira e Claudio Cirineu Ciola.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
INTRODUÇÃO GERAL.....	12
REFERÊNCIAS.....	14
1. INTRODUÇÃO.....	19
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
2.1. Condições experimentais e aclimação dos animais.....	21
2.2. Vacinação.....	21
2.3. Cultivo da bactéria patogênica e preparação do inóculo para infecção experimental.....	21
2.4. Ensaio de Infecção Experimental.....	22
2.5. Extração de DNA.....	24
2.6. Diagnóstico Microbiológico e identificação por PCR.....	24
2.7. Imunodifusão em gel.....	25
2.8. Análises hematológicas.....	26
2.9. Análises estatísticas.....	27
3. RESULTADOS.....	27
3.1. Parâmetros de qualidade de água.....	27
3.2. Teste de infecção experimental <i>in vivo</i> .....	27
3.3. Identificação por PCR.....	28
3.4. Imunodifusão em gel.....	30

3.5. Eritrograma, leucograma, trombograma e glicemia.....	31
DISCUSSÃO .....	33
3.6. Hematologia .....	35
3.7. Vacinação e infecção experimental com <i>S. agalactiae</i> .....	36
CONCLUSÃO .....	37
REFERÊNCIAS .....	37

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Organograma com a descrição dos tratamentos referentes ao teste de Infecção Experimental em juvenis de tilápia-do-Nilo com <i>S. agalactiae</i> . .....	23
Figura 2. Análise pela técnica PCR para determinação do <i>Streptococcus agalactiae</i> utilizando “primer” específico para espécie e posterior confirmação do sorotipo. Amostras 1, 4, 7, 26, 29 e 30 (amostras coletadas de cérebro de tilápia-do-nilo infectadas experimentalmente. ....	29
Figura 3. Segunda reação de PCR para identificação dos sorotipos Ib e III de <i>Streptococcus agalactiae</i> . Amostras 1Ib, 4 Ib, 7 Ib, 26 Ib, 29 Ib e 30 Ib (amostras coletadas de cérebro de tilápia-do-Nilo infectadas experimentalmente com <i>S. agalactiae</i> e testadas com primers do sorotipo Ib). Amostras 1III, 4III, 7III, 26III, 29III e 30III (amostras coletadas de cérebro de tilápia-do-Nilo infectadas experimentalmente com <i>S. agalactiae</i> e testadas com primers do sorotipo III). CN: controle negativo. 100 bp: peso molecular.....	29
Figura 4. Lâmina contendo amostras de soro de peixes coletados no momento zero (peixes 3, 4, 5, 6 e 8) nos poços da extremidade, e anti-IgM de tilápia no poço central.....	30
Figura 5. Lâmina com amostras de soro de peixes 28 dpv (peixes 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8) nos poços da extremidade e no poço central, anti-IgM de tilápia no poço central. ....	31

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Sequência de primers usados nas reações de PCR.....	25
Tabela 2. Média e desvio-padrões das variáveis dos parâmetros de qualidade de água dos aquários durante experimento com tilápia-do-nilo ( <i>O. niloticus</i> ) vacinadas durante 30 dias.	27
Tabela 3. Mortalidade acumulada no desafio de infecção experimental, sobrevivência total (Sobrev.) e nível de proteção relativa (NPR) de tilápias-do-nilo (n=40 por tratamento), após 15 dias de infecção (dpi) com <i>S. agalactiae</i> sorotipo III. ....	27
Tabela 5. Eritrograma, leucograma e trombograma de tilápias-do-nilo, <i>O. niloticus</i> , vacinadas contra <i>S. agalactiae</i> antes e após 28 dias.....	32
Tabela 6. Níveis de glicose de tilápias-do-nilo, ( <i>O. niloticus</i> ), vacinadas contra <i>S. agalactiae</i> antes e após 28 dias. ....	33

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Mortalidade acumulada de tilápias-do-Nilo após 15 dias de desafio de infecção experimental (dpi) com <i>S. agalactiae</i> sorotipo III (C-: controle negativo; C+: controle positivo; V: vacinados).....	28
---	----

## RESUMO

A aquicultura tem se desenvolvido consideravelmente nos últimos 20 anos, apresentando crescimento anual, superior ao crescimento da indústria pesqueira ligada a captura. A intensificação do cultivo de peixes eleva a ocorrência de enfermidades, como aquelas causadas por bactérias. Essas patologias geram perda significativa na produção, afetando o desempenho zootécnico e econômico do setor. O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta imunológica e o Nível de Proteção Relativa (NPR) de uma vacina de bactéria inativada em juvenis de tilápia-do-nilo desafiados, experimentalmente, com a bactéria patogênica *Streptococcus agalactiae*. A pesquisa foi realizada no Instituto de Pesca, na unidade de São Paulo/SP e na Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Pirassununga/SP. O delineamento foi inteiramente casualizado, com três tratamentos (C- = controle negativo; C+ = controle positivo e V = vacinados) e seis repetições. O desafio da infecção experimental foi realizado por injeção intraperitoneal com *S. agalactiae* sorotipo III, de acordo com a DL50 determinada em estudo prévio com a mesma estirpe e animais da mesma faixa de peso. Ao término do experimento, com duração de 45 dias, foi avaliado o nível de proteção relativa da formulação vacinal, bem como foram realizadas análises hematológicas, imunodifusão em gel e recuperação e identificação da bactéria por PCR. Os dados foram submetidos aos testes de normalidade e homocedasticidade, análise de variância (ANOVA) e testes de Tukey ( $\alpha < 0,05$ ). Observou-se no grupo dos animais Vacinados, a taxa de sobrevivência foi de 80% após o desafio com *S. agalactiae*, enquanto nos animais dos grupos C- e C+ obteve-se, respectivamente, 100% e 32,5% de sobrevivência. O nível de proteção relativa da vacina foi de 70,37%, proporcionando boa proteção contra infecção por *S. agalactiae*. O grupo vacinado apresentou maior nível de reação entre antígeno e anticorpo no teste de imunodifusão em gel. As análises hematológicas demonstraram que houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o grupo vacinado após 28 dias e os demais, para a taxa de hemoglobina, nas contagens de leucócitos totais e linfócitos. Portanto, a vacinação foi eficaz para proteção de juvenis de tilápia-do-nilo contra *S. agalactiae* sorotipo III e deve ser incentivada como medida profilática na tilapicultura onde ocorre maior incidência dessa bactéria patogênica, afim de amenizar mortalidades e perdas econômicas.

**Palavras-chave:** infecção, sanidade, imunidade, profilaxia, microbiologia.

## ABSTRACT

Aquaculture has developed considerably in the last 20 years, presenting annual growth, superior to the growth of the fishing industry linked to capture. The intensification of fish farming increases the occurrence of diseases, such as those caused by bacteria. These pathologies generate significant loss in production, affecting the zootechnical and economic performance of the sector. The objective of this work was to evaluate the immunological response and the Relative Protection Level (RN) of an inactivated bacterial vaccine in Nile tilapia juveniles experimentally challenged with the pathogenic bacterium *Streptococcus agalactiae*. The research was carried out at the Instituto de Pesca, at the São Paulo/SP unit and at the Pirassununga/SP Research and Development Unit. The design was completely randomized, with three treatments (C- = negative control; C+ = positive control and V = vaccinated) and six replications. The challenge of the experimental infection was performed by intraperitoneal injection with *S. agalactiae* serotype III, according to the LD50 determined in a previous study with the same strain and animals of the same weight range. At the end of the experiment, which lasted 45 days, the relative protection level of the vaccine formulation was evaluated, as well as hematological analyses, gel immunodiffusion and recovery and identification of the bacteria by PCR. Data were submitted to normality and homoscedasticity tests, analysis of variance (ANOVA) and Tukey's tests ( $\alpha < 0.05$ ). It was observed in the group of vaccinated animals, the survival rate was 80% after the challenge with *S. agalactiae*, while in the animals of the C- and C+ groups, 100% and 32.5% of survival were obtained, respectively. The relative protection level of the vaccine was 70.37%, providing good protection against *S. agalactiae* infection. The vaccinated group showed a higher level of reaction between antigen and antibody in the gel immunodiffusion test. Hematological analyzes showed that there was a significant difference ( $p < 0.05$ ) between the vaccinated group after 28 days and the others, for the hemoglobin rate, in the total leukocyte and lymphocyte counts. Therefore, vaccination was effective to protect Nile tilapia juveniles against *S. agalactiae* serotype III and should be encouraged as a prophylactic measure in tilapia farming where there is a higher incidence of this pathogenic bacterium, in order to alleviate mortality and economic losses.

Keywords: infection, sanity, immunity, prophylaxis, microbiology.

## INTRODUÇÃO GERAL

A aquicultura vem desempenhando um papel cada vez mais importante no fornecimento de alimento de qualidade. Em 2018, a produção mundial proveniente da aquicultura foi de 82,1 milhões de toneladas e um faturamento de 250 bilhões de dólares. Já a aquicultura continental contribui com 51,3 milhões de toneladas, representando 62,5% da produção aquícola total, superando a produção da atividade pesca extrativa (FAO, 2020).

Esse desenvolvimento também pode ser visto na piscicultura brasileira, que vem apresentando um aumento significativo de produção. Nos últimos seis anos, a produção de peixes de cultivo teve crescimento de 72% no país: de 578.800 toneladas em 2014 a 802.930 toneladas em 2020. Dentre as espécies de peixe cultivadas em nosso país, a tilápia-do-nilo mantém-se na liderança entre as espécies mais produzidas, com volume de produção de 486.155 ton, representou 60,6% de toda a piscicultura brasileira em 2020. Esse resultado foi 12,5% superior ao de 2019, que comprova a preferência nacional pela espécie (Peixe BR, 2021).

Altas produções podem ser alcançadas com o regime de cultivo intensivo ou super intensivo, que são usualmente praticados pelas pisciculturas industriais, tendo como características altas densidades de estocagem e elevado nível de arraçoamento (Evans; Shoemaker; Klesius, 2000). Nesse regime de cultivo, frequentemente surgem problemas de manejo inadequado, nutricionais, enfermidades parasitárias e infecciosas.

Dentre as principais bactérias causadoras de enfermidades em peixes, estão *Aeromonas* sp., *Flavobacterium* sp., *Francisella* sp., *Vibrio* sp. e *Streptococcus* spp. Os principais sinais clínicos observados são lesões de pele, abscessos, sangramento e sepsis, causando perdas econômicas significativas (Austin & Austin, 2007). Entre as diferentes espécies de estreptococos responsáveis por infecções em peixes, destaca-se a septicemia causada por *Streptococcus agalactiae*, considerada a enfermidade de maior impacto nos cultivos comerciais, caracterizada principalmente por sinais de meningoencefalite (Salvador *et al.*, 2005).

Surtos provocados por essa bactéria levam a altas taxas de morbidade e mortalidade de animais, resultando em sérios prejuízos econômicos, especialmente na tilapicultura (Amal *et al.*, 2011). O nível de mortalidade em um cultivo pode atingir 90% do lote produtivo, geralmente no período antes da comercialização (Ali *et al.*, 2010).

No Brasil, existe alta prevalência e encontra-se amplamente distribuído geograficamente, sendo detectado em estados como Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Santa Catarina, Bahia, Ceará, Mato Grosso, Pernambuco, Goiás e Espírito Santo (Salvador *et al.*, 2005; Barony *et al.*, 2017).

O *Streptococcus agalactiae* é um coco Gram positivo que causa septicemia e meningocéfale em muitas espécies de peixes marinhos e de água doce em todo o mundo (Soto *et al.*, 2015). Essa bactéria também pode causar septicemia e meningite em recém-nascidos humanos (Bohnsack *et al.*, 2008) e já foi relatada em outros animais, incluindo camelos, gatos, golfinhos, cavalos e sapos (Johri *et al.*, 2006). Os principais sinais clínicos da Estreptococose incluem letargia, exoftalmia, opacidade da córnea, anorexia, escurecimento da coloração da pele, natação errática, presença de úlceras na epiderme e morte (Marcusso, 2015). A via horizontal representa a principal forma de transmissão do patógeno, sendo que peixes saudáveis adquirem a doença através do contato com peixes enfermos, alimentos contaminados ou ainda por contato indireto mediado pela água (Webster, 2006).

Frente a essa realidade, a utilização de antibióticos para o tratamento de doenças bacterianas tem causado efeitos adversos relacionados à seleção de cepas resistentes, poluição e degradação do meio ambiente, além de riscos diretos à saúde do consumidor devido aos resíduos na carne (Rattanachaikunsopon & Phumkhachorn 2009). Por isso, a substituição do uso de antibióticos na aquicultura tem se tornado foco nas pesquisas atuais, sendo a vacinação a alternativa profilática mais viável na prevenção de doenças bacterianas (Melo *et al.*, 2015).

Por outro lado, as vacinas têm uma maior aplicabilidade preventiva, visto que podem ser administradas anteriormente ao período de ocorrência de doenças, sem causar qualquer impacto ao ambiente ou gerar resíduos.

Devido aos seus benefícios, as vacinas produzidas a partir de células inativadas são largamente utilizadas para a proteção dos animais na presença de doenças bacterianas (Dumrongphol *et al.*, 2009). As primeiras vacinas foram desenvolvidas com células inativadas de *S. agalactiae* e concentrados de produtos extracelulares (Klesius *et al.*, 2004).

O desenvolvimento de novas vacinas e a melhoria nas técnicas de vacinação têm auxiliado no controle de algumas doenças infecciosas na aquicultura, de modo geral (Hastein; Gudding; Evensen, 2005). Desta forma, como há diferenças entre cepas de *S. agalactiae* e seus sorotipos, busca-se desenvolver vacinas que dispõem de proteção cruzada contra isolados heterólogos de *S. agalactiae*.

O sorotipo predominante no Brasil é o Ib eo sorotipo III, esses sorotipos são relatados como patógenos adaptados de peixes (Soto, 2015). Porém, em 2016, o sorotipo III foi diagnosticado no país. Este sorotipo foi detectado em diferentes unidades de produção de tilápia-do-nylo na região Nordeste (Johri, 2006). Ou seja, a população de *S. agalactiae* tem uma diversidade genética ainda não conhecida totalmente, espacialmente distribuída de acordo com seu tipo de sequência genética e que eventos evolutivos estão levando à criação de novos grupos.

Além disso, Barony *et al.* (2017) em seu estudo, revelou que existem eventos atuais que levam ao aumento da diversidade de *S. agalactiae* no Brasil, provavelmente evoluindo junto com a expansão da aquicultura nas últimas décadas.

A ocorrência de infecções ocasionadas por *S. agalactiae* mostraram-se em evidência por ser um grande obstáculo à expansão da aquicultura brasileira e por sua alta prevalência nos cultivos de tilápia-do-nilo. Novas vacinas contra a bactéria e seus sorotipos estão sendo estudadas, podendo atender à demanda por imunoprolifáticos em outras regiões do país. Este trabalho tem como objetivo avaliar as alterações no sistema imune pós vacina e eficiência da mesma, contra *S. agalactiae* sob desafio experimental em juvenis de tilápia-do-nilo (*O. niloticus*).

No capítulo I, apresentamos o artigo intitulado “EFICÁCIA de vacina contra *Streptococcus agalactiae* em juvenis de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) com infecção experimental” redigido nas normas da revista científica Fish and Shellfish Immunology.

## REFERÊNCIAS

- Ali, A., Hassan, D., Saleha, A. A., Siti, K. B., & Milud, A., 2010. *Streptococcus agalactiae* the etiological agent of mass mortality in farmed red tilapia (*Oreochromis sp.*). *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9(20), 2640-2646.  
<http://docsdrive.com/pdfs/medwelljournals/javaa/2010/2640-2646.pdf>
- Amal, M. N. A., & Zamri-Saad, M., 2011. Streptococcosis in tilapia (*Oreochromis niloticus*): a review. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 34(2), 195-206.
- Austin, B., & Austin, DAWN., 2007. Bacterial fish pathogens: diseases of farmed and wild fish. *Springer Publishers*.
- Barony, G.M., Tavares, G.C., Pereira, F.L., Carvalho, A.F., Dorella, F.A., Leal, C.A.G., Figueiredo, H.C.P., 2017. Large-scale genomic analyses reveal the population structure and evolutionary trends of *Streptococcus agalactiae* strains in Brazilian fish farms. *Scientific reports*, 7(1), 1-10.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-13228-z>
- Bohnsack, J. F., Whiting, A., Gottschalk, M., Dunn, D. M., Weiss, R., Azimi, P. H., Philips III, J. B., Weisman, L. E., Rhoads, G. G. & Lin, F. Y. C., 2008. Population structure of invasive and colonizing strains of *Streptococcus agalactiae* from neonates of six US Academic Centers from 1995 to 1999. *Journal of clinical microbiology*, 46(4), 1285-1291.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.02105-07>

- Dumrongphol, Y., Hirota, T., Kondo, H., Aoki, T., & Hirono, I., 2009. Identification of novel genes in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) head kidney up-regulated after vaccination with *Streptococcus iniae* formalin-killed cells. *Fish and Shellfish Immunology*, 26(1), 197–200. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.03.014>
- Evans, J. J., Shoemaker, C. A., & Klesius, P. H., 2000. Experimental *Streptococcus iniae* infection of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*) by nares inoculation. *Aquaculture*, 189(3-4), 197-210. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00376-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00376-8)
- FAO. 2020. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>
- Hasten, T., Guo’ding, R.; Eve-Risen, B., 2005. Bacterial vaccines for fish an update of the current situation worldwide. *Developments in biologicals*. Basel, 121, 55-74.
- Johri, A. K., Paoletti, L. C., Glaser, P., Dua, M., Sharma, P. K., Grandi, G., & Rappuoli, R., 2006. Group B Streptococcus: global incidence and vaccine development. *Nature Reviews Microbiology*, 4(12), 932-942. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1552>
- Klesius, P. H., Evans, J. J., Shoemaker, C. A., 2004. Warmwater fish vaccinology in catfish production. *Animal health research reviews*, 5(2), 305. <https://doi.org/10.1079/AHR200489>
- Kubitza, F., 1999. Principais parasitoses e doenças dos peixes cultivados. Panorama da Aquicultura. v. 60.
- Webster, C. D., & Lim, C. (Eds.), 2006. *Tilapia: biology, culture, and nutrition*. CRC Press.
- Marcusso, P. F., Eto, S. F., Claudiano, G. D. S., Vieira, F. C. F., Salvador, R., Moraes, J. R. E. D., & Moraes, F. R. D., 2015. Isolamento de *Streptococcus agalactiae* em diferentes órgãos de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*) criadas em tanques-rede. *Bioscience Journal*, 549-554. <https://doi.org/10.14393/BJ-v31n2a2015-22504>
- Melo, C. C. V., Bruhn, F. R. P., Ascari, I. J., Leira, M. H., Zangeroni, M. G., Pereira, L. J., & Mian, G. F., 2015. A eficácia das vacinas contra *Streptococcus agalactiae* em tilápias: uma revisão sistemática. *Revista Científica de Medicina Veterinária*, Ano XIII-Número.
- Peixe BR, 2021. Anuário PeixeBr da Piscicultura. Associação Brasileira de Piscicultura. 1-136
- Pretto-Giordano, L. G., Müller, E. E., Klesius, P., & Da Silva, V. G., 2010. Efficacy of an experimentally inactivated *Streptococcus agalactiae* vaccine in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in Brazil. *Aquaculture Research*, 41(10), 1539-1544. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02449.x>
- Rattanachaiakunsopon, P. & Phumkhachorn, P., 2009. Prophylactic effect of *Andrographis paniculata* extracts against *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Bioscience and Bioengineering* 107(5), 579-582. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.01.024>

Soto, E., Wang, R., Wiles, J., Baumgartner, W., Green, C., Plumb, J., & Hawke, J., 2015. Characterization of isolates of *Streptococcus agalactiae* from diseased farmed and wild marine fish from the US Gulf Coast, Latin America, and Thailand. *Journal of aquatic animal health*, 27(2), 123-134. <https://doi.org/10.1080/08997659.2015.1032439>

## **Capítulo 1**

### **Artigo científico 1**

**EFICÁCIA DE VACINA CONTRA *Streptococcus agalactiae* PARA JUVENIS DE  
TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*) SOB INFECÇÃO EXPERIMENTAL**

**Artigo será enviado para o periódico científico:**

**Fish and Shellfish Immunology**

**Classificação A1**

## EFICÁCIA DE VACINA CONTRA *Streptococcus agalactiae* PARA JUVENIS DE TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*) SOB INFECÇÃO EXPERIMENTAL

Jessyca Ellen ALEXANDRE\*<sup>1</sup>; Danielle de Carla DIAS<sup>1</sup>; Carlos Massatoshi ISHIKAWA<sup>1</sup>; Maria José Tavares RANZANI-PAIVA<sup>1</sup>; Erna Elisabeth BACH<sup>2</sup>; Crystal Lodi CONDE<sup>1</sup>; Luara Lucena CASSIANO<sup>2</sup>; Ana Maria Cristina Rebello Pinto da Fonseca MARTINS<sup>2</sup>; Leonardo TACHIBANA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Pesca de São Paulo – APTA/SAA – Brasil/ email: Ltachibana@.sp.gov.br

<sup>2</sup>Instituto Biológico de São Paulo – APTA/SAA – Brasil

### RESUMO

A bactéria patogênica *Streptococcus agalactiae* é atualmente um dos principais entraves na piscicultura mundial. Dentre os diversos sorotipos existentes, o sorotipo III tem ocasionado altas taxas de mortalidade nas produções de tilápia, ocorrendo na região Nordeste do Brasil, causando surtos, geralmente em tilápias na fase de juvenis (> 30 g) e principalmente no verão, onde a temperatura pode chegar a 32°C. O método mais eficiente na prevenção dessa doença é a vacinação, que vêm sendo aplicada nas pisciculturas. Diante disso, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a eficácia de uma vacina contra *S. agalactiae* em juvenis de tilápia, sob desafio de infecção experimental com *S. agalactiae* sorotipo III. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três grupos (C- = controle negativo; C+ = controle positivo; V= vacina) e seis repetições. Os juvenis de tilápia-do-nilo receberam a dose de 0,05 mL da vacina, e após 30 dias os peixes foram desafiados com *S. agalactiae* sorotipo III. Foram avaliados a taxa de sobrevivência dos animais, nível de proteção relativa da vacina, e hematologia. O grupo vacinado apresentou sobrevivência de 80% após desafio com *S. agalactiae* sorotipo III e NPR de 70,37%. As análises hematológicas demonstraram que houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o grupo vacinado após 28 dias e os demais, para a taxa de hemoglobina, nas contagens de leucócitos e linfócitos. Palavras-chave: aquicultura, estreptococose, imunoglobulina, soro.

### ABSTRACT

The pathogenic bacterium *Streptococcus agalactiae* is currently one of the main obstacles in fish farming worldwide. Among the various existing serotypes, serotype III has caused high mortality rates in tilapia production, occurring in the Northeast region of Brazil. Causing outbreaks of

septicemia and meningoencephalitis, usually in tilapia in the juvenile stage (> 30 g) and especially in summer, where the temperature can reach 32 ° C. The most efficient method for preventing this disease is vaccination, which is applied in national farms. Therefore, the objective of this research was to evaluate the efficacy of a vaccine against *S. agalactiae* in tilapia juveniles under challenge of experimental infection with *S. agalactiae* serotype III. The experimental design was completely randomized with three groups (C- = negative control; C + = positive control; V = vaccine) and six replications. Nile tilapia juveniles received a dose of 0.05 mL of the vaccine. After 30 days after vaccination, fish were challenged with *S. agalactiae* serotype III. The survival rate of the animals, the relative protection level of the vaccine and hematology were adopted. The hematological analyzes showed that there was a reduced difference ( $p < 0.05$ ) between the vaccinated group after 28 days and the others, for hemoglobin rate, in the counts of leukocytes and lymphocytes. The vaccinated group presented 80% after challenge with *S. agalactiae* serotype III and NPR of 70.37%.

**Keywords:** aquaculture, streptococcosis, immunoglobulin, serum.

## 1. INTRODUÇÃO

A piscicultura brasileira alcançou em 2020, o volume de produção de 802.930 toneladas, que representa um crescimento de 5,93% comparado ao ano anterior (Peixe BR, 2021). Dentre as espécies cultivadas no país, destaca-se a tilápia-do-nylo, que representou 60,6% da produção nacional. É uma das espécies de peixes de água doce mais produtiva e comercializada, pela sua rusticidade, tolerância a altas temperaturas, bom desempenho zootécnico e fácil comercialização.

Embora o cultivo de tilápia-do-Nylo tenha se desenvolvido rapidamente, também enfrenta grandes desafios de doenças bacterianas causadas por *Vibrio* spp. (Shoemaker et al., 2011), *Aeromonas hydrophila* (Ibrahim et al., 2008), *Flavobacterium* spp. (Shoemaker & LaFrentz, 2015), *Francisella tularensis* (Hsieh et al., 2006) e *Edwardsiella tarda* (Thune et al., 1993).

O *Streptococcus agalactiae*, um estreptococo do grupo B (GBS) (Ye et al., 2011; Lusiastuti et al., 2014), é uma bactéria associada a alta mortalidade em peixes marinhos, estuarinos e de água doce, incluindo a tilápia-do-nylo. A infecção estreptocócica é caracterizada por septicemia e meningoencefalite grave (Ye et al., 2011).

A severidade da estreptococose depende de vários fatores ambientais, incluindo temperatura da água elevada, aumento dos níveis de amônia e baixos níveis de oxigênio

dissolvido, tais fatores podem ser causados por manejo inadequado e alta densidade de estocagem (Bromage e Owens, 2002).

As estratégias de controle incluem manejo (remoção de animais mortos e moribundos), tratamentos (antibioticoterapia) e prevenção (vacinas) (Shoemaker, 2010). Apesar de essas estratégias terem demonstrado melhora na taxa de sobrevivência dos peixes, é fundamental aprimorar esses métodos para obtenção de melhores resultados (Gudding, 2015). Deste modo, as vacinas são uma das medidas mais sustentáveis e eficazes contra os agentes bacterianos, principalmente aqueles que apresentam resistência aos antibióticos.

Em 2019, no Egito iniciaram estudos com um novo tipo de vacina multivalente para tilápia nos laboratórios da MEVAC. A vacina ME-VAC Aqua Strept foi formulada como uma microemulsão inativada polivalente contendo antígenos de *Streptococcus* spp. (*S. agalactiae* e *S. iniae*), *L. garvieae* e *E. faecalis* juntamente com Montanide IMS 1312 VC como um nano-adjuvante, originado de Seppic, na França. Já aqui no Brasil, a MSD Saúde Animal traz ao mercado a vacina bivalente AQUAVAC STREP® SA1 para a piscicultura, a fim de auxiliar na prevenção dessa enfermidade em tilápias, dessa vez a companhia dispõe de uma vacina com duas combinações, sorotipo Ia e III.

As vacinas autógenas também atendem ao mercado aquícola trazendo mais segurança e benefícios sanitários na produção de peixes. As vacinas autógenas podem ser produzidas a partir de microorganismos isolados da propriedade na qual esteja ocorrendo enfermidades causadas pelos mesmos. Algumas empresas atendem ao mercado nacional com vacinas autógenas, dentre elas a Vaxxinova Biovet, que apresenta em seu portfólio a produção e comercialização de vacinas contra diferentes espécies, sorotipos e combinações de *Streptococcus* sp.

O método mais correto, seguro e eficiente de prevenção e controle de doenças é a vacinação, que tem sido amplamente utilizado contra diversas doenças em peixes, evitando infecção e mortalidade em massa. Assim, busca por vacinas para prevenção de *S. agalactiae* se intensificou significativamente junto com a expansão da tilapicultura nas últimas duas décadas.

Portanto, objetivou-se neste trabalho avaliar a resposta imunológica e o Nível de Proteção Relativa (NPR) da utilização de vacina contra *Streptococcus agalactiae* em juvenis de tilápia-do-Nilo (*O. niloticus*) sob desafio de infecção experimental com sua estirpe homóloga.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Condições experimentais e aclimação dos animais**

O experimento foi realizado no Instituto de Pesca, na unidade de São Paulo/SP e na Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Pirassununga/SP. Foram utilizados 270 juvenis de tilápia, com peso médio de  $11,97 \pm 1,62$  g e comprimento médio de  $11,56 \pm 0,23$  cm (Figura 1). Foram estocados em um sistema de recirculação composto por aquários com volume de 50 litros, na densidade de 15 animais por aquário. A alimentação foi *ad libitum*, duas vezes ao dia, utilizando ração extrusada com 32% de proteína bruta, 10% de umidade, 6,5% de extrato etéreo, 7% de fibras e 14% de matéria mineral.

### **2.2. Parâmetros de qualidade de água**

Durante o período de aclimação e pós vacinação dos peixes, os parâmetros de qualidade de água foram aferidos diariamente para evitar estresse aos animais e desestabilização do filtro biológico. O oxigênio dissolvido, a temperatura da água e o pH foram aferidos com o auxílio de sondas multiparâmetros (Hanna® Akso®). A amônia e o nitrito foram aferidos por meio de testes colorimétricos (Labcon®).

### **2.3. Vacinação**

A vacina utilizada foi a CampVac Streptomune, produzida pela Biocamp Laboratórios Ltda. (Campinas, São Paulo). A vacina é composta por duas estirpes de *S. agalactiae* sendo sorotipo 1B e sorotipo III. Os isolados bacterianos foram inativados e emulsionados em adjuvante oleoso comercial, de acordo com protocolos previamente estabelecidos. Os animais foram anestesiados em eugenol ( $0,2 \text{ mL.L}^{-1}$ ) e a dose de 0,05 mL da vacina foi aplicada via intraperitoneal.

### **2.4. Cultivo da bactéria patogênica e preparação do inóculo para infecção experimental**

A cepa da bactéria patogênica *S. agalactiae* sorotipo III foi cedida pela Biocamp Laboratórios Ltda ao Laboratório de Microbiologia do Instituto de Pesca. A identidade foi confirmada por análise molecular, onde realizou-se a extração de DNA bacteriano, utilizando como *template* na reação de PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) com primer específico para *S. agalactiae*. Após a identificação a cepa foi cultivada em meio líquido BHI (*brain heart infusion*, DIFCO) e incubada em estufa B.O.D a  $28^{\circ}\text{C}$ , por 24h seguindo a metodologia descrita por Guimarães (2020).

Para preparação do inóculo bacteriano utilizado na infecção experimental, seguiu-se a mesma metodologia do cultivo. Após o período de 24h incubada em estufa B.O.D., a bactéria patogênica foi semeada em placa de Petri com auxílio de alça de platina, esse procedimento foi realizado em duplicata e incubada em estufa B.O.D. a 28°C, por 24h.

Uma alíquota da bactéria patogênica foi retirada da placa com auxílio da alça de platina e transferida para um tubo plástico cônico (15mL) com solução PBS com volume de 5 mL, onde foi homogeneizada em vórtex. Para realização da leitura, foi retirado 1 mL do inóculo da bactéria e realizada a leitura em espectrofotômetro. Foram realizados ajustes na turbidez no meio inoculado, com auxílio de espectrofotômetro a 640 nm, para obter a absorbância em 0,800, que corresponde de  $10^8$  a  $10^9$  UFC. mL<sup>-1</sup>.

## **2.5. Ensaio de Infecção Experimental**

A infecção experimental foi realizada na Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Pirassununga (UPD/Centro de Pesquisa de Aquicultura/Instituto de Pesca/APTA/SAA), conforme normas e recomendações da Resolução nº 592 de junho de 1992, do Conselho Federal de Medicina Veterinária, e preceitos de Princípios Éticos da Experimentação Animal. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para experimentação animal do Instituto de Pesca (Protocolo 01/2018). A infecção experimental seguiu o protocolo de DL50 realizado anteriormente para determinar a dose a ser injetada, onde foram analisadas duas concentrações diferentes e um tratamento controle. A dose letal de 50% estabelecida foi de  $1,4 \times 10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup>.

O delineamento foi inteiramente casualizado, com três tratamentos e seis repetições (Figura 1). Os animais infectados possuíam peso médio de  $37,36 \pm 10,23$  g e comprimento médio de  $12,71 \pm 1,11$  cm. Os grupos experimentais foram: C-: controle negativo (sem vacina e sem infecção); C+: controle positivo (sem vacina e submetido ao desafio com *S. agalactiae* sorotipo III); V3: vacinados e submetido ao desafio com *S. agalactiae* sorotipo III.

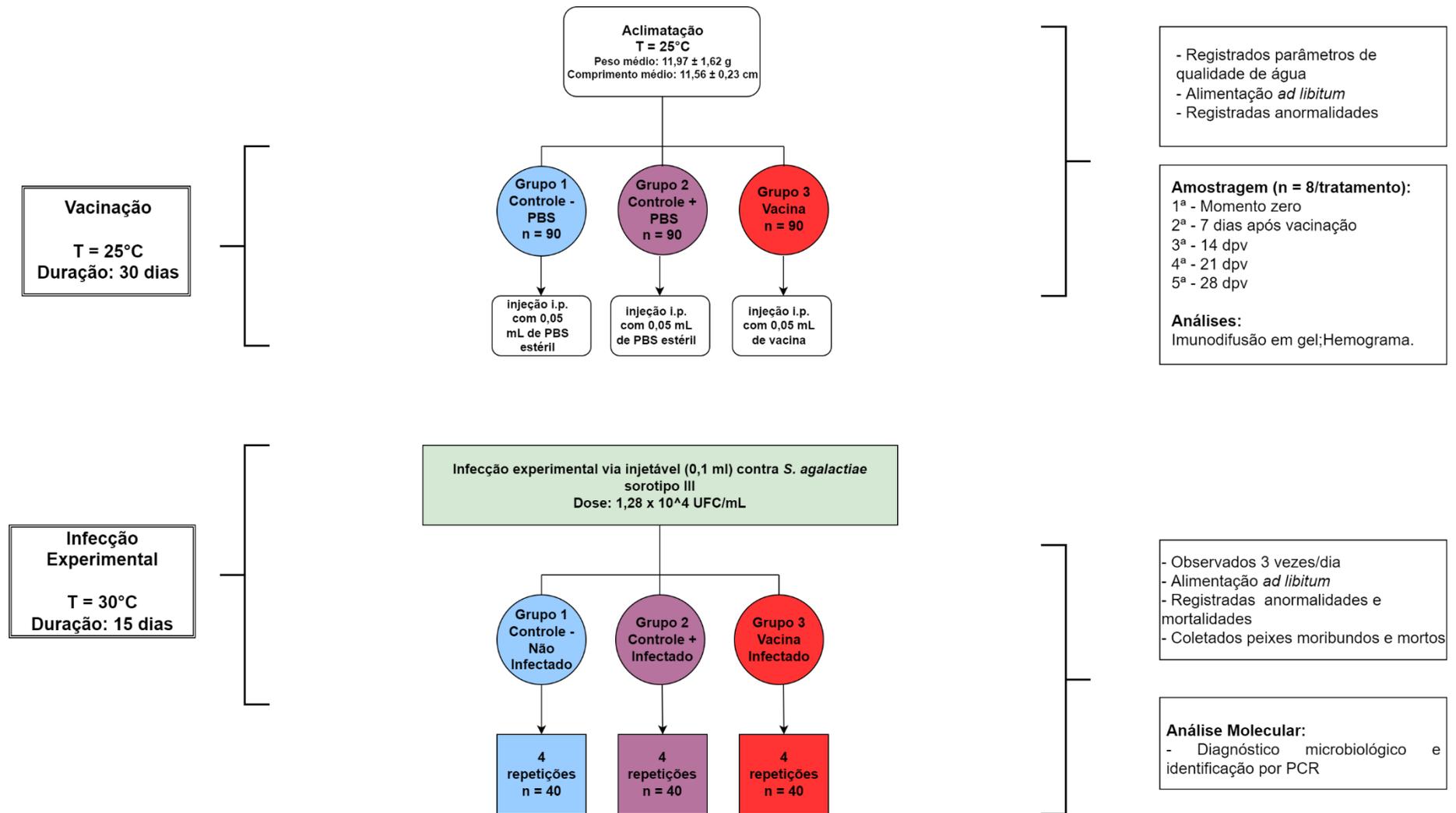


Figura 1. Organograma com a descrição dos tratamentos referentes ao teste de Infecção Experimental em juvenis de tilápia-do-Nilo com *S. agalactiae*.

## **2.6. Extração de DNA**

O DNA total foi extraído a partir de amostras de bactéria coletadas de cérebro de tilápia-do-nylo, de acordo com o protocolo descrito por Martínez et al. (1998), modificado por Tapiapaniagua et al. (2010), com base em precipitação salina, o meio de cultura contendo a bactéria passou por centrifugação a 10.000 x g por 5 min para separação do pellet bacteriano, em seguida foi homogeneizado em 300 µL de tampão de ressuspensão (0,1 M Tris-HCl, 0,01 M NaCl, 0,1 EDTA, pH 8) e em 300 µL de tampão de lise celular (0,1 M Tris-HCl, 0,1 M EDTA, 0,01 M NaCl, 1% SDS, pH 8).

As amostras foram tratadas com 90 µL de proteinase K (150 µg mL<sup>-1</sup>) a 65°C por 2h. Após o tratamento, foram adicionados 197 µL de NaCl 6M. As soluções foram resfriadas em gelo por 10 min e centrifugada a 12.000 x g por 30 min. O sobrenadante contendo DNA genômico foram transferidos para outros tubos contendo volume igual de isopropanol.

O DNA de cada amostra foi sedimentado por centrifugação a 12.000 x g por 15 min. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se volume igual de etanol a 70%. Os tubos foram centrifugados a 12.000 x g por 6 min, o sobrenadante foi descartado novamente e os material sedimentado moderadamente seco foi ressuspendido em 500 µL de TE e armazenado a 4°C.

## **2.7. Diagnóstico Microbiológico e identificação por PCR**

Durante o período de infecção experimental, os peixes mortos ou moribundos foram coletados e armazenados a -20°C. Para realização do diagnóstico microbiológico e molecular, os peixes foram retirados do freezer e mantidos em geladeira por 12h. Após esse período, foram realizados cortes nos peixes para ter acesso ao cérebro e rim encefálico e, com auxílio de alça de platina, coletou-se amostra desses órgãos em cada peixe para semeadura em placa contendo ágar BHI, com incubação em estufa B.O.D a 28°C, por 24h.

A multiplicação dos isolados foi evidenciada pelo surgimento de colônias bacterianas sobre o ágar, sendo avaliadas a morfologia pela coloração de Gram e identificação molecular.

A técnica de PCR utilizada foi seguindo a metodologia utilizada por Fiolo (2011) com algumas modificações. Foram designados um par de primers para cada sorotipo, nesse caso o sorotipo 1b e o sorotipo III e um par de primer para confirmar o microorganismo como realmente sendo *Streptococcus agalactiae* (Tabela 1).

Tabela 1. Sequência de primers usados nas reações de PCR

Primer	Sorotipo alvo	Sequência (5' - 3')	Tm (°C)
S. agalactiae F	<i>S. agalactiae</i>	ATGATGTATCTATCTGGAACCTCTAGTG	
S. agalactiae R	<i>S. agalactiae</i>	CGCAATGAAGTCTTTAATTTTTC	
S. agalactiae Ib F	1B	TTTAGAAGTCCAGAATTTTCATAGAGTC	60,8
S. agalactiae Ib R	1B	CAAAGAAAGCCATTGCTCTCTG	
S. agalactiae III F	III	CCACATATGAGAATAAGACTTGC	
S. agalactiae III R	III	CCTAGTGATAGTACTTTGGTTTCTG	

Após a extração de DNA, as amostras passaram por duas reações no termociclador, sendo a primeira apenas com os primers que definiam a espécie *S. agalactiae* F e *S. agalactiae* R. As amostras que amplificaram nessa etapa, seguiram para a segunda reação com os outros dois pares de primers (*S. agalactiae* Ib F e *S. agalactiae* Ib R, *S. agalactiae* III F e *S. agalactiae* III R) na quantidade de 0,5 µl de cada primer, misturados em mix (10,5 µl de água MilliQ®, 5 µl de Tampão Buffer, 2 µl de tampão MgCl<sub>2</sub>, 1 µl de dNTP, 0,5 µl de primer forward, 0,5 µl de primer reverse e 0,5 µl de Taq polimerase) para cada amostra. O volume do mix é de 20 µl e ao final, adiciona-se 5 µl do DNA da amostra de interesse. O ciclo realizado foi programado nas seguintes condições, 94°C por 5 min, 35 ciclos de 94°C por 30 s, 60,8°C por 30 s, 72°C por 30 s, 72° por 5 min e final de 4°C.

## 2.8. Imunodifusão em gel

O procedimento ocorreu em transferir para lâmina de microscópio, 5mL de 1% de ágar bacteriológico em PBS. Após a solidificação do ágar, foram realizadas cinco perfurações, sendo quatro em volta e uma central, usando cânula de espessura de 2mm. O poço central foi

preenchido com 20µL de anti-IgM de tilápia, enquanto os poços adjacentes foram preenchidos com 20 µL de cada amostra de soro dos peixes controles e tratados (após 28 dias da vacina). As lâminas foram mantidas em placa de Petri com algodão úmido e temperatura ambiente por 20h e observadas diariamente (Ouchterlony, 1958).

Após esse período, foi colocado um pedaço de papel de filtro encima do ágar e as lâminas foram secas em estufa a 40°C over night. Para melhor visualização das reações, as lâminas foram coradas com o corante amido black (Bayer®) 1% junto com solvente ácido acético, etanol, água (10:45:45), em berço de coloração, onde permaneceram por 2h. Em seguida, foram retiradas e imergidas em descorante (mesma mistura de solvente sem corante) por 15 minutos. As lâminas são secas a temperatura ambiente e fotografadas. No caso da linha de precipitação em alguma lâmina não tenha sido visualizada, esta foi repetida e pipetando ou carregando mais o antígeno (soro) em intervalo de tempo acima de 4 horas sendo a recarga feita de 2 em 2 horas.

## **2.9. Análises hematológicas**

Para as análises hematológicas, foram coletados 8 animais de cada tratamento em dois momentos durante o experimento, no momento zero que corresponde ao momento antes da vacinação e 30 dias após vacinação. Os animais foram anestesiados em eugenol 0,2 mL.L<sup>-1</sup>, (Nakandakare, 2013) e coletadas alíquotas de sangue por punção do vaso caudal, com auxílio de seringas heparinizadas.

Foram determinados: número total de células, contado em câmara de Neubauer, utilizando como diluente PBS; contagem diferencial e total dos leucócitos e trombócitos pelo método indireto em extensões sanguíneas, coradas com Rosenfeld (1947) hematócrito, pelo método de microhematócrito; taxa de hemoglobina, pelo método da cianometahemoglobina e glicose, utilizando aparelho de medição digital.

Com os valores da taxa de hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht) e número de eritrócitos (Er) foram calculados os índices hematimétricos absolutos: Volume corpuscular médio ( $VCM = (Ht \times$

10)/Er); Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM = (Hb x 100)/Ht) e Hemoglobina corpuscular média (HCM = (Hb x 10)/Er) (Ranzani-Paiva, 2010).

### 2.10. Análises estatísticas

Os dados foram submetidos aos testes Qui-quadrado, teste de Kruskal Wallis e Dunn para dados não paramétricos, que não atendam as premissas. O nível de significância estatística para todos os testes considerado foi de 5% ( $p < 0,05$ ).

## 3. RESULTADOS

### 3.1. Parâmetros de qualidade de água

Os parâmetros de qualidade de água (Tabela 2) dos aquários mantiveram-se em níveis desejáveis para um bom crescimento e integridade imunológica dos peixes (SÁ, 2012).

Tabela 2. Média e desvio-padrões das variáveis dos parâmetros de qualidade de água dos aquários durante experimento com tilápia-do-nilo (*O. niloticus*) vacinadas durante 30 dias.

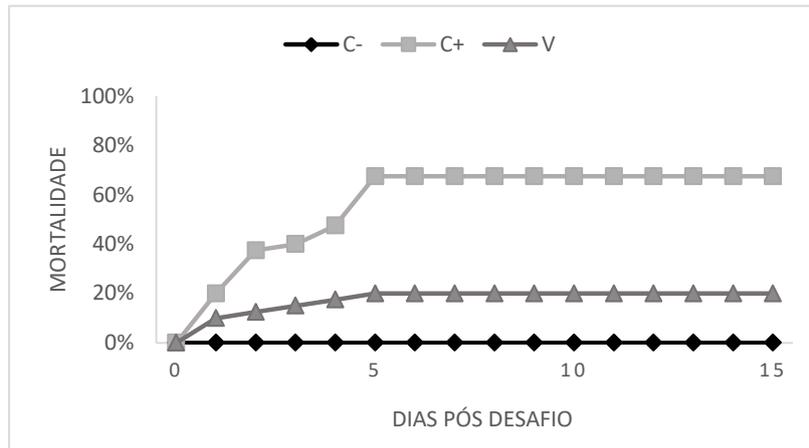
Parâmetros de qualidade de água				
Oxigênio (mg.L <sup>-1</sup> )	pH	Temperatura (°C)	Amônia (ppm)	Nitrito (ppm)
5,27 ± 0,475	6,82 ± 0,257	24,6 ± 1,158	0,20 ± 0,099	0,71 ± 0,552

### 3.2. Teste de infecção experimental *in vivo*

A vacina proporcionou proteção significativa no grupo vacinado, com sobrevivência de 80% no grupo Vacina, enquanto que o tratamento C+ e C-, apresentaram respectivamente, 32,5% e 100%. O nível de proteção relativa do tratamento Vacina foi 70,37% (Figura 2). Os principais sinais clínicos observados foram natação errática, opacidade ocular, exoftalmia, ascite, escurecimento da pele, anorexia e letargia. Os demais tratamentos apresentaram diferença estatística ( $P < 0,05$ ) em comparação ao controle, em relação a sobrevivência (Tabela 3)

Tabela 3. Mortalidade acumulada no desafio de infecção experimental, sobrevivência total (Sobrev.) e nível de proteção relativa (NPR) de tilápias-do-nilo (n=40 por tratamento), após 15 dias de infecção (dpi) com *S. agalactiae* sorotipo III.

Tratamento	Mortalidade acumulada						Sobrev. (%)*	NPR
	dpi	2	3	4	6	9		
Controle negativo		0	0	0	0	0	0	100%*



<b>Controle positivo</b>	15	16	19	27	27	27	32,5%*
<b>Vacina</b>	5	6	7	8	8	8	80%* 70,37%

\*Diferença estatística em comparação entre o tratamento controle e os demais tratamentos pelo teste Qui-quadrado ( $P < 0,01$ ).

Gráfico 1. Mortalidade acumulada de tilápias-do-Nilo após 15 dias de desafio de infecção experimental (dpi) com *S. agalactiae* sorotipo III (C-: controle negativo; C+: controle positivo; V: vacinados).

### 3.3. Identificação por PCR

O resultado foi positivo para todas as amostras coletadas dos peixes submetidos à infecção experimental, utilizados primers específicos para a espécie *S. agalactiae* (Figura 3).

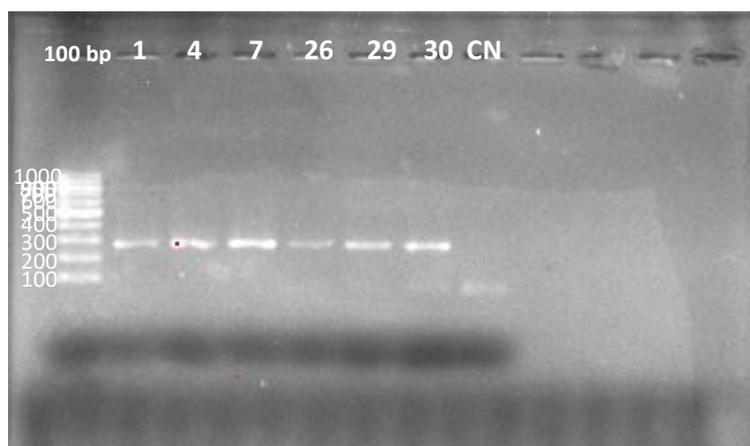


Figura 2. Análise pela técnica PCR para determinação do *Streptococcus agalactiae* utilizando “primer” específico para espécie e posterior confirmação do sorotipo. Amostras 1, 4, 7, 26, 29 e 30 (amostras coletadas de cérebro de tilápia-do-nilo infectadas experimentalmente).

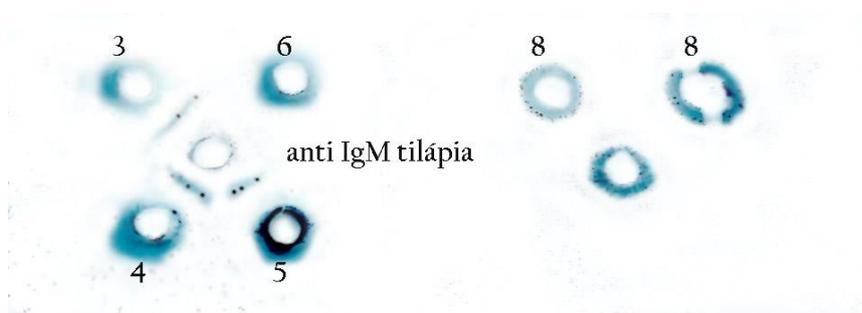
Na segunda reação utilizando quatro pares de primers específicos para os sorotipos q (Ib e III), os resultados foram positivos para o sorotipo III. As mesmas amostras em que foram utilizados os primers específicos do sorotipo Ib, não houve amplificação. Confirmando a infecção experimental com *S. agalactiae* sorotipo III (Figura 4).



Figura 3. Segunda reação de PCR para identificação dos sorotipos Ib e III de *Streptococcus agalactiae*. Amostras 1Ib, 4 Ib, 7 Ib, 26 Ib, 29 Ib e 30 Ib (amostras coletadas de cérebro de tilápia-do-Nilo infectadas experimentalmente com *S. agalactiae* e testadas com primers do sorotipo Ib). Amostras 1III, 4III, 7III, 26III, 29III e 30III (amostras coletadas de cérebro de tilápia-do-Nilo infectadas experimentalmente com *S. agalactiae* e testadas com primers do sorotipo III). CN: controle negativo. 100 bp: peso molecular.

### 3.4. Imunodifusão em gel

Foram preparadas duas lâminas no teste de Ouchterlony realizado a partir das amostras dos soros dos peixes coletados no momento zero, antes da primeira vacinação. Na lâmina possível observar



visíveis que mostram identidade com o anticorpo anti-IgM de tilápia produzido em coelho. As soluções contendo antígeno (soro dos peixes no momento zero) e anticorpo (anti-IgM de tilápia produzida em coelho) foram pipetadas nas perfurações do ágar e a lâmina foi incubada em câmara úmida por 4 horas. Neste período, não foi possível visualizar nenhuma linha de precipitação. Após o período de 4 a 6 horas e mais algumas alíquotas de amostras de soro dos peixes a cada duas horas, foi observada reação com linha de precipitação indicando identidade, para os peixes 3, 4 e 5. A reação com linha de precipitação não foi observada nos peixes 6 e 8.

Figura 4. Lâmina contendo amostras de soro de peixes coletados no momento zero (peixes 3, 4, 5, 6 e 8) nos poços da extremidade, e anti-IgM de tilápia no poço central.

Na segunda lâmina, onde estão presentes as amostras de soro dos peixes vacinados (Figura 6) foi possível verificar a reação de precipitação em amostras de soros de peixes 28 dpv. As lâminas foram incubadas em câmara úmida por 8 horas. Após este período, foi adicionado novamente alíquota de amostras de soros dos peixes vacinados, onde permaneceram em incubação até 20

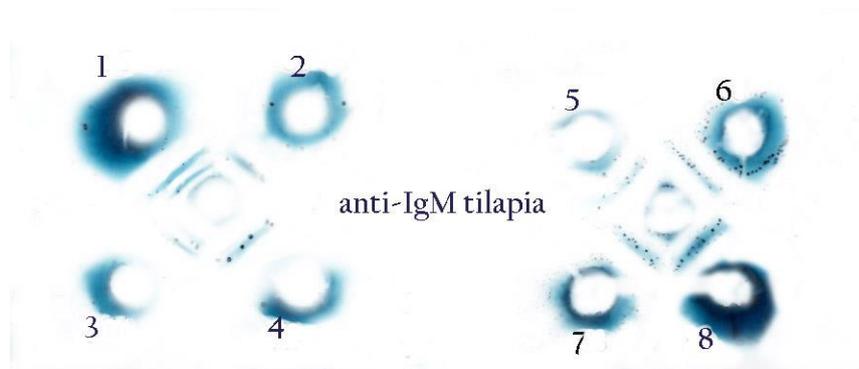
horas. Foi possível observar reação de precipitação em todas as amostras de soros dos peixes vacinados. Para os peixes 1 e 3, foram observadas mais de uma linha de precipitação.

Figura 5. Lâmina com amostras de soro de peixes 28 dpv (peixes 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8) nos poços da extremidade e no poço central, anti-IgM de tilápia no poço central.

### 3.5. Eritrograma, leucograma, trombograma e glicemia.

As análises hematológicas demonstraram que a concentração de hemoglobina e contagens de, linfócitos e leucócitos totais foram diferentes significativamente ( $p < 0,05$ ) no tratamento Vacina em relação ao Momento Zero e ao Controle. A taxa de hemoglobina e o número de linfócitos e leucócitos de peixes vacinados foram inferiores em relação ao momento zero (MZ) e controle. Para os demais índices, estes foram semelhantes entre os tratamentos (Tabela 5). Quanto ao nível de glicose, não

diferença  
( $p > 0,05$ ) entre  
tratamentos



houve  
significativa  
os  
(Tabela 6).

Tabela 4. Eritrograma, leucograma e trombograma de tilápias-do-nilo, *O. niloticus*, vacinadas contra *S. agalactiae* antes e após 28 dias.

Vacina (dose: 0,05 mL)				
Variáveis	MZ	C-	V	p-valor
RBC ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	1393750 <sup>a</sup> ± 153104,8	1503750 <sup>a</sup> ± 146208	1441250 <sup>a</sup> ± 190333,4	0,42
Ht (%)**	22,87 <sup>a</sup> ± 7,71	24,93 <sup>a</sup> ± 3,33	28,62 <sup>a</sup> ± 3,09	0,06
Hb (g dL <sup>-1</sup> )*	6,66 <sup>b</sup> ± 1,09	10,03 <sup>a</sup> ± 2,95	8,65 <sup>ab</sup> ± 1,76	0,01***
VCM (fL)**	196,93 <sup>a</sup> ± 66,03	186,63 <sup>a</sup> ± 21,39	211,59 <sup>a</sup> ± 19,70	0,10
HCM (pg)*	51,44 <sup>a</sup> ± 11,95	69,82 <sup>a</sup> ± 18,81	64,03 <sup>a</sup> ± 16,09	0,08
CHCM (g dL <sup>-1</sup> )*	33,41 <sup>a</sup> ± 11,77	42,30 <sup>a</sup> ± 11,13	31,80 <sup>a</sup> ± 5,34	0,09
Leuc ( $\mu\text{L}^{-1}$ )**	70813,00 <sup>a</sup> ± 25416,81	51908,03 <sup>a</sup> ± 24332,92	20126,98 <sup>b</sup> ± 5802,81	<0,01***
Lf ( $\mu\text{L}^{-1}$ )**	65268,33 <sup>a</sup> ± 23068,03	48914,65 <sup>a</sup> ± 23799,66	18258,03 <sup>b</sup> ± 5018,70	<0,01***
Nt ( $\mu\text{L}^{-1}$ )**	3544,53 <sup>a</sup> ± 2518,85	1538,94 <sup>a</sup> ± 1030,26	1628,72 <sup>a</sup> ± 778,39	0,09
Bs ( $\mu\text{L}^{-1}$ )**	311,51 <sup>a</sup> ± 435,73	320,48 <sup>a</sup> ± 262,15	168,24 <sup>a</sup> ± 136,89	0,49
Es ( $\mu\text{L}^{-1}$ )**	388,31 <sup>a</sup> ± 291,54	374,18 <sup>a</sup> ± 446,16	119,45 <sup>a</sup> ± 119,99	0,19
Mn ( $\mu\text{L}^{-1}$ )*	1219,87 <sup>a</sup> ± 885,73	889,36 <sup>a</sup> ± 621,28	755,15 <sup>a</sup> ± 479,67	0,39
Tr ( $\mu\text{L}^{-1}$ )*	14876,19 <sup>a</sup> ± 9809,31	17586,39 <sup>a</sup> ± 6186,18	14076,83 <sup>a</sup> ± 8166,47	0,67

MZ - momento zero; C - controle negativo (28 dpv); V - vacinados (28 dpv); RBC = Eritrócitos; Ht = hematócrito; Hb = Hemoglobina; VCM= Volume Corpuscular Médio; HCM = Hemoglobina Corpuscular Médio; CHCM = Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média; Leuc = Leucócitos Totais; Lf = Linfócitos; Nt = Neutrófilo; Bs = Basófilo; Es = Eosinófilo; Mn = Monócito; Tr = Trombócito. \*ANOVA (análise paramétrica). Letras diferentes em mesma linha demonstra diferença significativa entre as médias pelo teste de Duncan ( $p < 0,05$ ). \*\*Teste de Kruskal-Wallis (análise não paramétrica). Letras diferentes em mesma linha demonstra diferença significativa entre as medianas pelo teste de Post Hoc Dunn ( $p < 0,05$ ).

Tabela 5. Níveis de glicose de tilápias-do-nylo, (*O. niloticus*), vacinadas contra *S. agalactiae* antes e após 28 dias.

Variáveis	Vacina (dose: 0,05 ml)			<i>p</i> -valor
	MZ	C-	V	
Glicose*	77,37 <sup>a</sup> ± 14,25	70,37 <sup>a</sup> ± 18,18	62,25 <sup>a</sup> ± 9,70	0,67

MZ - Momento zero; C - controle negativo (28 dpv); V - vacinados (28 dpv);

\*ANOVA (análise paramétrica).

## DISCUSSÃO

### 3.6. Imunodifusão em gel

A medida das interações entre antígeno-anticorpo com o propósito de diagnóstico é conhecida como imunoserologia. As técnicas imunoserológicas fundamentam-se na natureza da interação antígeno-anticorpo, nas quais podem expressar-se de duas formas distintas, em decorrência da utilização de imuno-reagentes livres de marcação ou de reagentes marcados. As técnicas em que não se empregam marcadores demonstram-se por fenômenos visíveis. Portanto, ao se combinar anticorpos com antígenos solúveis, os complexos resultantes podem formar precipitados insolúveis (Molinari, 2009).

A precipitação é uma técnica usada para mensurar a presença e a concentração de antígeno-anticorpo. A precipitação máxima ocorre em áreas de equivalência, ou seja, concentrações semelhantes de antígeno e anticorpo, diminuindo em áreas de excesso de um dos componentes. A imunodifusão é uma técnica que pode ser realizada por difusão simples ou dupla. Na imunodifusão dupla, tanto o antígeno como o anticorpo incorporado ao meio sólido se movem um em direção ao outro, até haver a precipitação do imunocomplexo (Chakraborty, B.N & Saha, 1994; Mineo et al., 2016; Ouchterlony, 1967).

Assim, a sensibilidade do teste pode variar dependendo da concentração de antígeno-anticorpos presentes. Segundo Ouchterlony (1967) uma concentração baixa de antígeno ou anticorpo aumenta a sensibilidade, mas não permite a medida de concentração ou visualização da precipitação.

Segundo resultados, na primeira fase onde as lâminas receberam no orifício do ágar o antígeno e anticorpo no período de 4 horas não apareceram as linhas de precipitação o que podia estar indicando a ausência de quantidades de antígeno ou anticorpo. Mas, assim que após o período os orifícios receberam outra carga de antígeno (soros dos peixes), a reação foi observada. Outro fator importante está na linha de precipitação formada, indicando uma reta com possível formação de um arco contínuo, produzindo uma reação com identidade, isto é, os peixes 3, 4 e 5, apresentaram no soro uma IgM que reagiu com a anti-IgM da tilápia produzida no coelho (Figura 5). Como foi necessário pipetar a solução de antígeno por 3 vezes isto determinou que a presença da IgM no soro teve concentração baixa. Em relação aos peixes 6 e 8, onde não apareceu a linha de precipitação, isto veio indicar que a concentração de IgM estava muito baixa e não foi detectada na reação de dupla difusão.

Quando os reagentes (antígeno-anticorpo) estão em quantidades equimolares, a linha de precipitação aparece formando até curvatura podendo ser identidade total, parcial ou de não identidade (Molinari, 2009). Neste caso dos resultados todos tem aparência de identidade total. Quando analisados os soros dos peixes submetidos a vacinação após 28 dias, ocorreu formação de mais de uma linha de precipitação (Figura 6). A primeira indica a pureza do antígeno ou do anticorpo e as outras indicam moléculas de massa molecular maior que se difundem mais lentamente. Isto pode ser visualizado no peixe de número 1 e 3 após vacinação. Cada precipitado funcionou como uma barreira para os reagentes que o formam e impedem sua difusão além do sítio da precipitação. Esta barreira é imuno específica. Outro fator importante a ser citado é que bastou somente uma pipetagem nos poços para que a reação fosse equimolecular. Em relação aos outros soros dos peixes (2, 4, 5, 6, 7, 8) apresentaram uma só banda, mas mais difusa ou maior ou ainda com maior intensidade na cor.

Assim, a imunodifusão conseguiu determinar a reação com peixes vacinados apresentando linhas de precipitação maiores ou em maior número do que os peixes controles.

### 3.7. Hematologia

Os parâmetros hematológicos têm sido considerados importantes indicadores da saúde dos peixes (Abu-Elala et al., 2019). No hemograma, não se registraram diferenças significativas entre o grupo vacinado quando comparados ao controle, exceto para os valores de leucócitos totais, linfócitos e hemoglobina.

No estudo realizado por Ramos-Espinoza et al. (2020) as análises mostraram a taxa de hemoglobina significativamente maior na segunda semana após vacinação (14 dias) no grupo onde a vacina continha H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em sua composição em comparação ao grupo em que a vacina continha H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + hidróxido de alumínio, o que pode estar relacionado às alterações fisiológicas dos peixes durante o estudo. Assim como, os valores de hemoglobina dos grupos vacinados foram significativamente menores na segunda semana após vacinação em comparação com 4 semanas após vacinação (28 dias). No presente estudo, os valores de hemoglobina em peixes vacinados após 28 dias se mostraram significativamente superior ( $p < 0,05$ ) em comparação a peixes antes da vacinação e significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) em comparação ao tratamento controle. Bishlawy et al. (1999) hipotetizou uma relação entre eritrócitos, hemoglobina e resposta imune, sugerindo uma participação ativa na resposta imune contra patógenos, além disso, estudos desenvolvidos no molusco *Tegillarca granosa* reportaram participação da hemoglobina na resposta imune contra patógenos (Bao et al., 2011).

Para Ramos-Espinoza et al. (2020) os valores de linfócitos nos grupos vacinados foram menores do que no grupo não vacinado após duas semanas da vacinação (14 dias). No presente estudo, ocorreu situação semelhante nos valores de leucócitos e linfócitos, após 28 dias da vacinação. Pereira et al. (2016) reportou situação similar de valores menores de linfócitos em híbridos de surubim vacinados contra *Aeromonas hydrophila* aos 21 dias após vacinação. Neste caso, a diminuição do total de linfócitos e leucócitos pode ser explicada devido à migração das células imunes para os tecidos onde a presença do antígeno está em desenvolvimento (Mutoloki et al., 2014).

Alguns estudos recentes demonstraram que, após vacinação ou infecção, células pertencentes à resposta imune inata exibem mudanças ao longo prazo que melhoram a resposta após estímulos por patógenos (Netea et al., 2016).

### **3.8. Vacinação e infecção experimental com *S. agalactiae***

A vacinação é um método eficaz e sustentável de controle de doenças e redução do uso de substâncias antimicrobianas na aquicultura (Marcusso, 2021; Brudeseth et al., 2013). Vários estudos relatam a eficácia da vacinação em *Oreochromis niloticus* para combater a estreptococose, a principal doença infecciosa na criação intensiva de tilápia (Marcusso, 2021).

Na produção de tilápia, a tendência é uma produção cada vez mais intensiva e, grandes empresas aquícolas terão foco na redução do uso de antibióticos. Portanto, o teste de vacinas aprimoradas e o seu desenvolvimento contínuo são um importante passo para os produtores e as empresas veterinárias (Brudeseth et al., 2013).

A concentração bacteriana durante o desafio pode influenciar a eficácia da vacina, segundo Pretto-Giodarno et al. (2010). Midtlying (2016) recomendou que percentuais de mortalidade maiores ou iguais a 60% nos grupos desafiados não vacinados são necessários para garantir o sucesso dos ensaios de eficácia de vacina. Entretanto, Aasjord e Slinde (1994) afirmaram que percentagens de 50 a 90% são adequadas para testes de vacinas. Os peixes do ensaio de DL50 eram menores, portanto, as diferenças na mortalidade esperada e na taxa de mortalidade obtida no grupo desafiado não vacinado provavelmente, foram devido ao crescimento dos peixes, que pode influenciar sua resposta imune. Pois, a resposta imune dos peixes depende muito do peso, devido ao número de células imunocompetentes (Tort et al., 2003).

No presente estudo, o grupo onde foi injetada a vacina contra *S. agalactiae* apresentou eficácia e segurança na proteção da tilápia-do-Nilo durante a infecção experimental com cepa homóloga, tornando-se evidente pela presença de sinais clínicos e comportamentais. Obteve-se a porcentagem de sobrevivência de 80%. O grupo Controle positivo, peixes não vacinados e

infectados, sobreviveram 32,5%. Os principais sinais clínicos observados foram natação errática, opacidade ocular, exoftalmia, ascite, escurecimento da pele, anorexia e letargia.

Evans et al. (2004) e Pasnik et al. (2005) em seus estudos com vacina inativada contra *S. agalactiae* em tilápia, apresentaram a sobrevivência em peixes vacinados de 85% e 68% e em peixes não vacinados de 24% e 55% após desafio de infecção experimental em 30 e 21 dias após vacinação, respectivamente.

O estudo em questão mostra que o NPR da vacina foi de 70,37%, sendo considerado moderadamente alto. Midtlying (2016) concluiu que NPR ideal são aqueles maiores ou iguais a 60%. Os resultados obtidos no presente mostraram que, a vacina obteve nível moderado de proteção contra a cepa homóloga de *S. agalactiae* do sorotipo III sob condições experimentais, mostrando excelente resultado.

Segundo Schmidt (2016), podem ocorrer mortalidades após a vacinação devido a estresse, reações adversas ou lesões no local da injeção após a vacinação com a administração de uma única dose. No presente estudo, não ocorreram alterações comportamentais ou lesões na pele associadas a administração da vacina após 30 dias nos peixes vacinados.

## CONCLUSÃO

Os resultados observados neste estudo são promissores no uso da vacina como medida profilática para juvenis de tilápia-do-nilo. A vacina demonstrou ser eficaz e segura para controle de doenças e bem-estar dos peixes, podendo ser utilizada na produção de peixes em larga escala.

## REFERÊNCIAS

- N. Abu-Elala, A. Samir, M. Wasfy, M. Elsayed, Efficacy on injectable and immersion polyvalent vaccine against streptococcal infections in broodstock and offspring of Nile tilapia, *Fish Shellfish Immunol.* 88 (2019) 293–300, <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.02.042>
- Ali, A., Hassan, D., Saleha, A. A., Siti, K. B., & Milud, A., 2010. *Streptococcus agalactiae* the etiological agent of mass mortality in farmed red tilapia (*Oreochromis* sp.). *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9(20), 2640-2646.

<http://docsdrive.com/pdfs/medwelljournals/javaa/2010/2640-2646.pdf>

Aly, S. M., Mohamed, M. F., & John, G., 2008. Effect of probiotics on the survival, growth and challenge infection in *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture research*, 39(6), 647-656. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.01932.x>

Amal, M. N. A., & Zamri-Saad, M., 2011. Streptococcosis in tilapia (*Oreochromis niloticus*): a review. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 34(2), 195-206.

Austin, B., Austin, D. A., 2012. Bacterial fish pathogens (Vol. 481, p. 482). Dordrecht, The Netherlands. Springer.

Aasjord, P.M., Slinde, E., 1994. Fish vaccine: Development, production and use of bacterial vaccines, with special reference to salmon. In: Martins, A.M. (Ed.), *Fisheries Processing*. Springer, Boston, pp. 432-465.

Barony, G.M., Tavares, G.C., Pereira, F.L., Carvalho, A.F., Dorella, F.A., Leal, C.A.G., Figueiredo, H.C.P., 2017. Large-scale genomic analyses reveal the population structure and evolutionary trends of *Streptococcus agalactiae* strains in Brazilian fish farms. *Scientific reports*, 7(1), 1-10. <http://doi:10.1038/s41598-017-13228-z>

Bao, Y.; Wang, Q.; Lin, Z., 2011. Hemoglobin of the bloody clam *Tegillarca granosa* (Tg-HbI) is involved in the immune response against bacterial infection. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 31, n. 4, p. 517-523.

Bishlawy I. M, 1999. Red blood cells, hemoglobin and the immune system. *Medical Hypotheses*. v. 53, p 345-346.

Bohnsack, J. F., Whiting, A., Gottschalk, M., Dunn, D. M., Weiss, R., Azimi, P. H., Philips Iii, J. B., Weisman, L. E., Rhoads, G. G. & Lin, F. Y. C., 2008. Population structure of invasive and colonizing strains of *Streptococcus agalactiae* from neonates of six US Academic Centers from 1995 to 1999. *Journal of clinical microbiology*, 46(4), 1285-1291. <https://doi.org/10.1128/JCM.02105-07>

Brudeseth, B. E., Wiulsrød, R., Fredriksen, B. N., Lindmo, K., Løkling, K. E., Bordevik, M., ... & Gravningen, K., 2013. Status and future perspectives of vaccines for industrialised fin-fish farming. *Fish & shellfish immunology*, 35(6), 1759-1768.

Chakraborty, B.N.; Saha, A., 1994. Detection and cellular location of cross-reactive antigens shared by *Camellia sinensis* and *Bipolaris carbonum*. *Physiol and Molec Plant Pathology* 44:403-416.

Dias, D. D. C., 2010. Probiótico no desempenho produtivo, hematologia e migração de macrófagos do matrinxã, *Brycon amazonicus*.

Dias, Danielle De Carla *et al.* Histopathological evaluation of the spleen, heart, and brain of the tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) exposed to mercury chloride. *Boletim do Instituto de Pesca*, [S.l.], v. 33, n. 2, p. 213-220, oct. 2018. ISSN 1678-2305. Available at: <https://www.pesca.agricultura.sp.gov.br/boletim/index.php/bip/article/view/756>. Date accessed: 15 apr. 2021.

Evans, J.J., Klesius, P.H., Shoemaker, C.A., 2004. Efficacy of *Streptococcus agalactiae* (group B) vaccine in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by intraperitoneal and bath immersion administration. *Vaccine* 22, 3769–3773. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.03.012>

Fiolo, K., 2011. Identificação dos sorotipos de *Streptococcus agalactiae* pela técnica de PCR de amostras isoladas em pacientes colonizados e infectados na cidade de Campinas e região.

Gram, L., Melchiorson, J., Spanggaard, B., Huber, I., & Nielsen, T. F., 1999. Inhibition of *vibrio anguillarum* by *pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. *Applied and environmental microbiology*, 65(3), 969-973. <http://doi:10.1128/AEM.65.3.969-973.1999>

Gudding, R., Lillehaug, A., Tavoranpanich, S., 2015. Immunoprophylaxis in biosecurity programs. *Journal of Applied Aquaculture*, 27(3), 220-227. <http://doi:10.1080/10454438.2015.1036956>

Guimarães, M. C., 2020. *Probióticos e vacinas na criação de tilápia-do-nilo (Oreochromis niloticus)* / Mateus Cardoso Guimarães.

Hsieh, C. Y., Tung, M. C., Tu, C., Chang, C. D., Tsai, S.S., 2006. Enzootics of visceral granulomas associated with Francisella-like organism infection in tilapia (*Oreochromis spp.*). *Aquaculture* 254(1-4), 129–138. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.03.044>

Ibrahim, M., Mostafa, M., Arab, R., Rezk, M., 2008. Prevalence of *Aeromonas hydrophila* infection in wild and cultured tilapia nilotica (*O. niloticus*) in Egypt. In: Elghobashy H, Fitzsimmons K, Diab AS (eds) Proc 8th Int Symp on Tilapia in Aquaculture, Cairo, Egypt, 2: 1257–1270

Imperi, M., Pataracchia, M., Alfarone, G., Baldassarri, L., Orefici, G., & Creti, R., 2010. A multiplex PCR assay for the direct identification of the capsular type (Ia to IX) of *Streptococcus*

*agalactiae*. *Journal of microbiological methods*, 80(2), 212-214.  
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.11.010>

Johri, A. K., Paoletti, L. C., Glaser, P., Dua, M., Sharma, P. K., Grandi, G., & Rappuoli, R., 2006. Group B Streptococcus: global incidence and vaccine development. *Nature Reviews Microbiology*, 4(12), 932-942. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1552>

Klesius, P. H., Evans, J. J., & Shoemaker, C. A., 2004. Warmwater fish vaccinology in catfish production. *Animal health research reviews*, 5(2), 305-311. <http://doi:10.1079/AHR200489>

Liu, G., Zhu, J., Chen, K., Gao, T., Yao, H., Liu, Y., Lu, C., 2016. Development of *Streptococcus agalactiae* vaccines for tilapia. *Diseases of aquatic organisms*, 122(2), 163-170. <https://doi.org/10.3354/dao03084>

Lusiastuti, A., Textor, M., Seeger, H., Akineden, O., Zschock, M., 2014. The occurrence of *Streptococcus agalactiae* sequence type 261 from fish disease outbreaks of tilapia *Oreochromis niloticus* in Indonesia. *Aquaculture Research*. 45(7), 1260-1263. <https://doi.org/10.1111/are.12069>

Maione, D., Margarit, I., Rinaudo, C. D., Masignani, V., Mora, M., Scarselli, M., Grandi, G., 2005. Identification of a universal Group B streptococcus vaccine by multiple genome screen. *Science*, 309(5731), 148-150. <http://doi:10.1126/science.1109869>

Marcusso, P. F., Da Silva Claudiano, G., Yunis-Aguinaga, J., De Almeida Marinho-Neto, F., Eto, S. F., Fernandes, D. C., Rosolem, M. C., Salvador, R., De Moraes, J. R. E. & De Moraes, F. R. (2021). Immunogenicity in *Oreochromis niloticus* vaccinated with sonicated antigens against streptococcosis. *Fish & Shellfish Immunology*. 115(1), 134-141. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.04.030>

Marengoni, N. G., 2006. Produção de tilapia do Nilo *Oreochromis niloticus* (linhagem Chitralada), cultivada em tanques-rede sob diferentes densidades de estocagem. *Arquivos de Zootecnia*. 55 (210):127-138. Data de acesso: 17 de maio de 2021. ISSN: 0004-0592. Disponível em: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=49521001>

Midtlyng, P.J., 2016. Methods for measuring efficacy, safety and potency of fish vaccines. In: Adams, A. (Ed.), *Fish Vaccines*. Springer Basel, pp. 119-142.

Mineo, J. R.; Silva, M. C.; Brígido, P. C.; Penha, H. M. C. A., 2016. Manual ilustrado de práticas laboratoriais em Imunologia. *Uberlândia: EDUFU*. ISBN 978-85-7078-445-2.

- Mo, X. B., Wang, J., Guo, S., & Li, A. X., 2020. Potential of naturally attenuated *Streptococcus agalactiae* as a live vaccine in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, v. 518, p. 734774.
- Molinaro, E. M., 2009. Conceitos e Métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde: v. 1/ Organização de Etelcia Moraes Molinaro, Luzia Fátima Gonçalves Caputo e Maria Regina Reis Amendoeira. - Rio de Janeiro: *Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio*; IOC. p. 290 ISBN: 978-85-98768-41-0
- Mutoloki, S., J. Jørgensen, Ø. Evensen, in: R. Gudding, A. Lilleaug, Ø. Evensen (Eds.), 2014. The Adaptive Immune Response in Fish, Fish Vaccination, Wiley Blackwell, UK., pp. 104–115.
- Netea, M. G.; Joosten, L. A.; Kingston, H. G.; Natoli, G.; Stunnenberg, H. G.; O’neill, L. A.; Xavier, R. J., 2016. Trained immunity: a program of innate immune memory in health and disease. *Science*, v. 352, n. 6284, aaf1098.
- Ouchterlony, O. (1958). "Diffusion-in-gel methods for immunological analysis". *Progress in Allergy*. 5: 1–78. PMID 13578996
- Ouchterlony, O., 1967. Immunodifusion and immunoelectrophoresis. In: Weir, D.M. ed. *Handbook of Experimental Immunology*, Oxford, *Lackwell Scientific Publications*.
- Pasnik, D.J., Evans, J.J., Panangala, V.S., Klesius, P.H., Shelby, R.A., Shoemaker, C.A., 2005. Antigenicity of *Streptococcus agalactiae* extracellular products and vaccine efficacy. *Journal of Fish Diseases*. v. 28, p. 205–212. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2005.00619.x>
- Pretto-giordano, L.G., Muller, E.E., Klesius, P., Silva, V.G., 2010. Efficacy of an experimentally inactivated *Streptococcus agalactiae* vaccine in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in Brazil. *Aquaculture Research*. 41, 1539–1544. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02449.x>
- Pereira, G. D. V.; Jesus, G. F. A.; Vieira, F. D. N.; Pereira, S. A.; Ushizima, T. T; Mouriño, J. L. P.; Martins, M. L., 2016. Probiotic supplementation in diet and vaccination of hybrid surubim (*Pseudoplatystoma reticulatum*♀ x *P. corruscans*♂). *Ciência Rural*, v. 46, n. 2, p. 348-353.
- Ramos-Espinoza, F. C., Cueva-Quiroz, V. A., Yunis-Aguinaga, J., & de Moraes, J. R. E., 2020. A comparison of novel inactivation methods for production of a vaccine against *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, v. 528, p. 735484.
- Salvador, R., Claudiano, G. D. S., Loureiro, B. A., Marcusso, P. F., Eto, S. F., Pilarski, F. & Moraes, F. R. D., 2013. Desempenho e hematologia de tilápias-do-nilo alimentadas com

*Saccharomyces cerevisiae* e vacinadas contra *Streptococcus agalactiae*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 48(8), 892-898. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2013000800012>

Salvador, R., Muller, E., Freitas, J., Leonhardt, J., Pretto-Giordano, L., Dias, J., 2005. Isolamento e caracterização de *Streptococcus* spp. do grupo B em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) criadas em tanques rede e em viveiros de terra na região norte do Estado do Paraná, Brasil. *Ciência Rural* 35, 1374-1378. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782005000600023>

Shoemaker, C. A., & Lafrentz, B. R., 2015. Lack of association between *Flavobacterium columnare* genomovar and virulence in hybrid tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) × *Oreochromis aureus* (Steindachner). *Journal of fish diseases*, 38(5), 491-498. <https://doi.org/10.1111/jfd.12262>

Shoemaker, C. A., Lafrentz, B. R., & Klesius, P. H., 2011. Vaccination of sex reversed hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) with an inactivated *Vibrio vulnificus* vaccine. *Biologicals*, 39(6), 424-429. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2011.08.004>

Shoemaker, C.A., Lafrentz, B. R., Klesius, P.H., Evans, J. J., 2010. Protection against heterologous *Streptococcus iniae* isolates using a modified bacterin vaccine in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, *Journal of Fish Diseases*. 33(7), 537-544, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2010.01148.x>

Soto, E., Wang, R., Wiles, J., Baumgartner, W., Green, C., Plumb, J., & Hawke, J., 2015. Characterization of isolates of *Streptococcus agalactiae* from diseased farmed and wild marine fish from the US Gulf Coast, Latin America, and Thailand. *Journal of aquatic animal health*, 27(2), 123-134. <https://doi.org/10.1080/08997659.2015.1032439>

Tapia-Paniagua, S.T., Fumanal, M., Anguís, V., Fernández-Díaz, C., Alarcón, F.J., Moriñigo, M.A., Balebona, M.C., 2019. Modulation Of Intestinal Microbiota In *Solea senegalensis* fed low dietary level of *Ulva ohnoi*. *Frontiers in microbiology*. 10, 171. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00171>

Thune, R. L., Stanley, L. A., & Cooper, R. K., 1993. Pathogenesis of gram-negative bacterial infections in warmwater fish. *Annual Review of Fish Diseases*, 3, 37-68. [https://doi.org/10.1016/0959-8030\(93\)900208-A](https://doi.org/10.1016/0959-8030(93)900208-A)

Tort, L., Balasch, J.C., Mackenzie, S., 2003. Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. *Inmunología* v. 2, p. 277-286.

Ye, X., Li, J., Lu, M., Deng, G., Jiang, X., Tian, Y., Quan, Y., Jian, Q., 2011. Identification and molecular typing of *Streptococcus agalactiae* isolated from pond-cultured tilapia in China. *Fisheries Science*. 77(4), 623–632. <https://doi.org/10.1007/s12562-011-0365-4>