

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE MESTRADO PROFISSIONAL EM DEFESA
AGROPECUÁRIA

DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DE UM
ELISA INDIRETO PARA DIAGNÓSTICO DE *Streptococcus*
agalactiae EM TILÁPIAS DO NILO (*Oreochromis niloticus*)

Daniel Ribeiro Cruz

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
2016**

**DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DE UM
ELISA INDIRETO PARA DIAGNÓSTICO DE *Streptococcus
agalactie* EM TILÁPIAS DO NILO (*Oreochromis niloticus*)**

Daniel Ribeiro Cruz
Médico Veterinário
Universidade Estadual de Santa Cruz, 2012

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação do curso de Mestrado Profissional em Defesa Agropecuária do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Defesa Agropecuária.

Orientador: Prof. Dr. Robson Bahia Cerqueira

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
2016**

FICHA CATALOGRÁFICA

C957d	<p>Cruz, Daniel Ribeiro.</p> <p>Desenvolvimento e padronização de um elisa indireto para diagnóstico de <i>streptococcus agalactiae</i> em tilápias do nilo (<i>oreochromis niloticus</i>)/ Daniel Ribeiro Cruz._ Cruz das Almas, BA, 2016.</p> <p>46f.; il.</p> <p>Orientador: Robson Bahia Cerqueira.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.</p>
-------	--

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas - UFRB.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE MESTRADO PROFISSIONAL EM DEFESA
AGROPECUÁRIA**

**DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DE UM
ELISA INDIRETO PARA DIAGNÓSTICO DE *Streptococcus
agalactiae* EM TILÁPIAS DO NILO (*Oreochromis niloticus*)**

**Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação de
Daniel Ribeiro Cruz**

Aprovada em 30 de julho de 2016

Prof. Dr. Robson Bahia Cerqueira
Universidade Federal da Bahia - Orientadora

Prof^a. Pós- doutorado Denise Soledade P. Pereira
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - Coorientadora

Prof^a. Dra Veridiana Fernandes da Silveira
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Examinadora interna

Prof^a. Dra Bartira Guerra
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Examinadora externa ao programa

DEDICATÓRIA

Àquele que nos permite sonhar, DEUS. À Minha guerreira mãe, certeza de amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia por ter aberto suas portas para o meu futuro.

Ao meu orientador Dr. Robson Bahia e a coorientadora Dra. Denise, pela oportunidade, orientação, atenção e confiança o que está sendo fundamental para construção da minha carreira.

Aos professores Dr. Ricardo e Dra. Isabela pelo incentivo e apoio.

Aos colegas e amigos do Laboratório de doenças infecciosas (LDI) e da Universidade Federal do Recôncavo Baiano, pelo coleguismo e pela colaboração com a flexibilidade de horários, principalmente aos amigos Vinícius, Thaise e Marilúcia pelo apoio incondicional durante toda minha jornada.

A minha esposa Bárbara, companheira de todas as horas, pela paciência, carinho e amor que me ajudou bastante nos momentos mais difíceis.

À minha família, pelo amor e por estar ao meu lado, sempre compartilhando as escolhas certas. A todos os amigos e aqueles que contribuíram e apoiaram a minha formação.

**DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DE UM
ELISA INDIRETO PARA DIAGNÓSTICO DE *Streptococcus agalactiae*
EM TILÁPIAS DO NILO (*Oreochromis niloticus*)**

RESUMO: O presente trabalho teve como objetivo padronizar um Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA) para o diagnóstico da estreptococose em Tilápia-do-Nilo, utilizando como antígeno a linhagem *S. agalactiae*. O experimento foi conduzido no Laboratório de Doenças Infecciosas localizado no Hospital Universitário de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Foram coletados 124 peixes da piscicultura Bahia Pesca com peso médio de 80g, os quais passaram por um período de 20 dias de aclimação em tanques de 500 litros, divididos em dois grupos com 62 animais em cada. O antígeno foi produzido a partir da linhagem de *Streptococcus agalactiae* sp. disponibilizada pelo Laboratório de Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Os animais do grupo infectado (G.I.) foram inoculados com a concentração de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL de *Streptococcus agalactiae* sp. por via intraperitoneal e subcutânea 0,1 mL, já os animais do grupo controle (G.C) foram inoculados com 0,1mL solução salina a 0,9% estéril. Durante o experimento 46 animais vieram a óbito, sendo assim, foram utilizadas 78 amostras no total, destas 33 foram soro negativo e 45 soro positivo. O Ensaio Imunoenzimático obteve sensibilidade de 100% e especificidade 76%, com êxito maior na sensibilidade, apresentando o ELISA como um importante método na detecção de animais que tiveram contato com o *Streptococcus agalactiae*.

Palavras-chave: ELISA; Peixe; Imunodiagnóstico

**DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DE UM
ELISA INDIRETO PARA DIAGNÓSTICO DE *Streptococcus agalactiae*
EM TILÁPIAS DO NILO (*Oreochromis niloticus*)**

ABSTRACT: This study aimed to gage a n enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for diagnosis of streptococcosis in nile tilapia, using *Streptococcus agalactiae* strain as antigen. The investigation was carried out in the Laboratory of Infection Disease at Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. A total of 124 fishes from Bahia Pesca with average bodyweight of 80 g were acclimated in a reservoir of 500 litris for 20 d and placed in two groups of 62 animals each. The antigen was produced from *S. agalactiae* strain in the Laboratory of Infection Disease at Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. The animals from infected group (IG) were inoculated with 108 CFU/mL of *S. agalactiae* via intraperitoneal and subcutaneous route (0.1 mL). The control group (CG) was inoculated with 0.1 mL of sterile saline solution. During the experiment 46 animals came to death. The experiment evaluated 78 samples, from which 45 samples were positive. The ELISA showed 100% of sensibility and 76% of specificity. These results suggest that ELISA method is an important tool to detect streptococcosis in nile tilapia.

Keywords: ELISA; Fish; Immunodiagnostic

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Amostras de soro positivo	33
Figura 2. Amostras de soro negativo	33

LISTA DE ABREVIATURAS

BHI	Brain heart infusion
B.i	Banho por imersão
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECP	Concentrado de produtos extracelulares
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
i.p.	Intra-peritoneal
MLST	Sistema de tipificação de multi lócus
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PFGE	Eletroforese em campo pulsado
RPS	Porcentagem de sobrevivência relativa
UFC	Unidade formadora de colônias
V.o.	Via oral

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	Pág 11
2.OBJETIVOS	13
2.1. Objetivo geral	13
2.2. Objetivos específicos	14
3.REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1. RELEVÂNCIA DA PISCICULTURA	14
3.2. EPIDEMIOLOGIA	15
3.3. ESTREPTOCOCOS EM PEIXES	15
3.4. VACINAS	21
3.5. DIAGNÓSTICO	23
3.5.1. Diagnóstico sorológico	23
3.5.2. Diagnóstico molecular	24
3.6. ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO INDIRETO (ELISA)	25
ARTIGO	27
4.CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS	

1 INTRODUÇÃO

A aquicultura é praticada pelo ser humano há milhares de anos. Existem registros de que os chineses já tinham conhecimentos sobre essas técnicas há muitos séculos e de que os egípcios criavam a tilápia há cerca de quatro mil anos (CAMARGO, 2005). Segundo dados de levantamento da Food and Agriculture Organization (FAO, 2012) a aquicultura é o setor da agropecuária brasileira que mais cresceu nos últimos anos sendo que a piscicultura destaca-se como umas das principais especialidades dentro desta atividade.

A tilápia está entre os peixes mais cultivados em todo o mundo, com perspectiva de se tornar um dos produtos aquícolas de comércio internacional mais importante do século XXI (DALTON et al., 2005). Fatores importantes nas características zootécnicas como rusticidade, qualidade da carne, fácil adaptação são fundamentais para esse desenvolvimento na produção tão expressivo além de um amplo conhecimento de sua fisiologia bem como evolução da tecnologia de criação (FITZSIMMONS, 2000).

O sistema de cultivo intensivo, muito utilizado na produção de tilápias, é caracterizado pela alta quantidade de animais em um pequeno espaço, e como consequência maior estresse e menor qualidade da água, o que torna os animais mais susceptíveis a contaminação bacteriana. Dentre inúmeras patologias que podem acometer tilápias em criação intensiva destaca-se a septicemia por *Streptococcus spp.*, sendo a espécie *Streptococcus agalactiae* uma das mais importantes (SHOEMAKER et al., 1997; PLUMB, 1997; FIGUEIREDO e LEAL, 2008).

Medidas relacionadas ao manejo, alimentação, utilização de antibióticos e outros produtos são utilizadas na tentativa de controlar a estreptococose que é caracterizada por ser um complexo de doenças similares causadas por diferentes gêneros e espécies de bactérias cuja *S. agalactiae* é a espécie mais isolada no Brasil (TORANZO et al., 2005; SALVADOR et al., 2003, 2005; FIGUEIREDO et al., 2006).

No entanto, na tentativa de controlar essa doença, muitos produtos químicos e antibióticos são utilizados indiscriminadamente podendo causar sérios problemas ambientais e principalmente selecionar cepas cada vez mais

resistentes causando um risco ao consumidor e conseqüentemente a saúde pública (GRISEZ e OLLEVIER, 1995; SWAIN et al., 2002).

Atualmente a vacinação tem-se tornado importante ferramenta para a prevenção e controle de doenças infecciosas na aquicultura oferecendo diversos benefícios principalmente econômicos (HASTEIN et. al, 2005; DUMRONGPHOL et al., 2009). Os peixes podem ser imunizados pela via intraperitoneal, oral e por banho de imersão sendo que cada um desses métodos apresentam pontos positivos e negativos quando relacionados com o nível de proteção, efeitos colaterais, praticidade e custo-benefício (GOMES et. al, 2006).

A primeira vacina de *S. agalactiae* inativado para tilápias, Aquavac® STREP As, foi aprovada em 2011 no Brasil e é indicada na imunização ativa de tilápias para reduzir a mortalidade e a doença decorrente da estreptococose causada por *Streptococcus agalactiae*. A aplicação deve ser por via intraperitoneal e a dosagem recomendada é de 0,05mL por peixe (MSD SAÚDE ANIMAL, 2015).

2- OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

- Padronizar um ensaio imunoenzimático indireto a partir de frações antigênicas de *Streptococcus agalactiae*, avaliando o desempenho do mesmo frente a amostras de soro de tilápias infectados e não infectados.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir as frações antigênicas a partir de uma cepa de *Streptococcus agalactiae* fornecida pelo Laboratório de Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (LDI).
- Identificar e acompanhar em diferentes tanques animais infectados e não infectados com uma cepa da referida bactéria.
- Avaliar desempenho de especificidade e sensibilidade do ensaio imunoenzimático indireto em estudo.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 RELEVÂNCIA DA PISCICULTURA

A piscicultura no Brasil possui uma importância fundamental para prover alimento necessário não apenas para a sua população local, mas para exportação para países onde a produção é insuficiente e/ou inexistente. Dados do Ministério da Aquicultura e da Pesca - MPA (2012) dão destaque para a produção brasileira de tilápia, que apenas no ano de 2010, foi responsável por quase 40% de todo o pescado produzido no País. Apesar do aumento da produção brasileira de pescado, o país foi responsável por apenas 0,86 % da produção mundial no ano de 2009, ocupando assim o 18º lugar no ranking mundial, com 1.264.765 toneladas de pescado.

Porém, é importante ressaltar que embora com uma produção modesta quando comparada com outros países, o Brasil apresentou nos últimos anos um aumento na produção de pescados, provenientes da piscicultura, muito superior a outras criações já consolidadas no país. Segundo dados do MPA (2012), a atividade teve um crescimento entre os anos de 2007 e 2009 de 60,2 %. O mesmo órgão também informa que, em conjunto, a aquicultura teve um crescimento de 43,8 % entre os anos de 2007 e 2009, sendo a aquicultura a atividade que mais cresceu no mercado nacional de carnes no período.

Dados da FAO (2009) indicam que a piscicultura contribui atualmente com aproximadamente 50 % de todo o pescado consumido no mundo, por conta do aumento da população mundial e da mudança dos seus hábitos alimentares.

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é a espécie de peixe que possui maior produção e importância na aquicultura nacional. Ela é proveniente da África e possui características como rusticidade, grande adaptação a diferentes tipos de ambientes e sistemas de produção, é resistente a enfermidades, suporta variações de temperatura e baixos níveis de oxigênio dissolvidos na água, se reproduz facilmente e tem rápido crescimento além de baixo custo de produção. Atualmente destaca-se por apresentar uma carne de excelente qualidade nutricional com elevado valor proteico (RODRIGUES, 2007).

Um dos principais entraves para a expansão da tilapicultura no Brasil é a ocorrência de surtos de doenças infecciosas, sendo a bactéria *Streptococcus agalactiae* a de maior prevalência no país (PEREIRA et al., 2010).

3.2 EPIDEMIOLOGIA

O *Streptococcus agalactiae* é uma bactéria cosmopolita amplamente distribuída nos sistemas aquáticos e provoca surtos infecciosos que podem ocasionar altas taxas de mortalidade na piscicultura podendo alcançar taxas de até 90% na idade pré-comercialização (EVANS, 2002; SALVADOR et al., 2005; SHOEMAKER, 2006; ABUSELIANA et al., 2010).

São bactérias oportunistas e podem sobreviver em condições ambientais desfavoráveis. A má qualidade da água, manejo inadequado e grande quantidade de matéria orgânica, além de aumentar a susceptibilidade dos peixes a infecções, são condições favoráveis para a proliferação das bactérias e facilitam a instalação de surtos nos animais (BUNCH et al., 1997; SALVADOR et al., 2003).

Fontes importantes de infecção são os peixes doentes e mortos. Estes são primordiais em grandes surtos da enfermidade uma vez que em um mesmo ambiente aquático coabitam outras espécies, inclusive predadores de peixes doentes e mortos o que intensifica a contaminação (MINAMI et al., 1979; ZLOTKIN et al., 1998; CLARK et al., 2000).

3.3 ESTREPTOCOCOS EM PEIXES

A estreptococose é uma das principais doenças que acometem o cultivo de peixes em todo o mundo e suas consequências relacionam-se a um elevado prejuízo econômico para o setor. Ela é caracterizada como sendo um grupo de bactérias formado por diferentes gêneros e espécies capazes de lesionar o

sistema nervoso central. Neste grupo incluem-se *Streptococcus parauberis*, *S. iniae*, *S. agalactiae* dentre outras (TORANZO et al., 2005; SALVADOR et al., 2005; PARK et al., 2009).

Duas espécies têm sido descritas como os principais agentes etiológicos causadores de infecções nervosas em peixes: *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus iniae*. Infecções por *S. agalactiae* são relatadas em animais e nos homens desde o século passado, porém os achados na piscicultura são considerados recentes (MAIONE et al., 2005). No Brasil, os primeiros relatos de infecções em peixes foram descritos por Salvador et al. (2005) e Figueiredo et al. (2006). Fatores como qualidade de água, mudança brusca de temperatura, excesso de amônia, alcalinidade, transparência, dureza e alta densidade de estocagem são primordiais para o aumento da susceptibilidade dos peixes uma vez que propiciam o estresse dos animais diminuindo a imunidade (BUNCH et al., 1997; SALVADOR et al., 2003; PANISK et al., 2005). Em trabalho descrito por Bunch et al. (1997) observou-se que em criações de tilápia do Nilo as espécies de *Streptococcus* variavam de acordo com o aumento ou diminuição de temperatura da água.

A *Streptococcus agalactiae* pertence ao grupo B de Lancefield cujas células são esféricas ou ovóides, Gram-positivas, catalase-negativas e se apresentam aos pares ou em cadeias. Elas são imóveis, não esporuladas e anaeróbias facultativas. Além disso, obtêm energia por meio da fermentação de carboidratos como a glicose, que resulta na maior parte em ácido láctico (HARDIE et al., 1997; KILLIAN, 1998; EVANS et al., 2002).

As primeiras classificações constavam basicamente na atividade hemolítica e nas reações sorológicas com anticorpos de Lancefield. Com o tempo classificou-se os estreptococos com base nas características antigênicas do carboidrato C da parede celular e então passou-se a diferenciar o estreptococo hemolítico bovino, através de sorologia, classificando-o no grupo b. Atualmente a *S. agalactiae* encontra-se no subgrupo “piogênico” que também inclui outras espécies exemplo *S. pyogenes* (LANCEFIELD, 1933; SHERMAN, 1937; KAWAMURA et al., 1995).

A espécie *S. agalactiae* possui dez sorotipos classificados na composição do polissacarídeo capsular sendo que os sorotipos Ia e Ib são encontrados em peixes (VANDAME et al., 1997; GARCIA et al., 2008). Vandamme et al. (1997) e Berridge et al. (2001) observaram que a espécie *Streptococcus difficile*, que também pode ser encontrada com menor frequência em criações intensivas, apresentava o antígeno capsular Ib e proteína celular indistinguível do *S. agalactiae* além de significativa homologia na sequência de ácidos nucleicos, identificando-se uma semelhança entre essas duas espécies.

Tilápias foram desafiadas experimentalmente com inóculo de 0,1 mL de 10^5 UFC mL⁻¹ de *S. agalactiae* pela via intraperitoneal (i.p.) e observou-se que os primeiros sinais clínicos surgiram no terceiro dia após a inoculação com anorexia, desorientação e natação errática. Sintomas como exoftalmia, opacidade de córnea, escurecimento da pele, esplenomegalia e opacidade epicardial também puderam ser encontrados em alguns animais a partir do terceiro dia (FILHO et al., 2009).

De acordo com Filho et al. (2009) no exame histopatológico o encéfalo, as meninges de telencéfalo e o cerebelo apresentavam infiltrado de macrófagos e linfócitos, além de casos de hemorragia e leve infiltrado de eosinófilos. Lesões como epicardites que apresentavam infiltrados de macrófagos e linfócitos também foram vistas com menor frequência. Enfim os olhos apresentavam infiltrados de macrófagos e eosinófilos tanto no tecido coróide como no periorbital, o que envolvia o nervo óptico e o músculo reto.

Acredita-se que a principal via de transmissão de agentes patogênicos de peixes seja a horizontal, principalmente diretamente quando há o contato dos animais saudáveis com os contaminados, inclusive com alimentos contaminados (WONGSATHEIN, 2012).

O contato indireto através da água contaminada em sistemas de criação intensivo também é uma importante fonte de contaminação. A mucosa do sistema respiratório assim como receptores do sistema ocular demonstrou ser susceptíveis de infecção por *S. iniae* em peixes imersos em ambientes desafiados (EVANS et al., 2000).

Outra fonte de transmissão é a oral devido ao canibalismo de animais mortos e debilitados. No entanto, ainda são poucas informações descritas por infecções

em tilápia por *S. agalactiae* (WONGSATHEIN, 2012). Transmissão vertical não foi detectada por Hernández et al. (2009) e Jiménez et al. (2011) uma vez que não foi observado as bactérias nas larvas oriundas do peixes progenitores infectados.

A fisiopatologia da infecção por *S. agalactiae* não está totalmente esclarecida, porém alguns estudos demonstram que as bactérias, quando instaladas, causam necrose local, invadem e se multiplicam dentro de macrófagos que atuam como veículo para o *S. agalactiae*, permitindo a invasão e disseminação pela corrente sanguínea para vários órgãos, incluindo-se a transposição da barreira hematoencefálica, características de septicemia (ELDAR et al., 1994; NGUYEN et al., 2001; EVANS et al., 2002).

Os estreptococos patogênicos possuem várias características predisponentes para a infecção. Assim, aderência às superfícies epiteliais, capacidade de invasão de epitélio e endotélio e injúria direta aos tecidos são algumas delas (NIZET, 2002). Um fator de virulência importante é a invasão através da aderência das cápsulas às superfícies epiteliais. Outra característica fundamental, considerada a mais importante, é a capacidade de seus polissacarídeos inibirem a fagocitose por macrófagos e neutrófilos do hospedeiro. Isso só acontece, pois o ácido siálico impede a deposição do componente C3b do sistema complemento, impedindo a fagocitose (NIZET, 2002; JARVA et al., 2003).

Os antígenos protéicos C, R e X, que juntamente com os polissacarídeos capsulares específicos podem ser requeridos para a virulência, são os principais expressos por alguns sorotipos de estreptococos (FERRIERI, 1988). Além disso, o alfa antígeno protege a bactéria contra a fagocitose na ausência de anticorpo específico, assim como a capsula (HAUGE et al., 1996).

O “fator CAMP” é uma proteína secretada por estreptococos do grupo B que interage com a beta- hemolisina secretada por *Staphylococcus aureus* e produz sinergia e aumento da hemólise. Esta proteína é muito estudada nos laboratórios de diagnóstico uma vez que causa a morte de coelhos e ratos após a injeção, porém sua atuação na patogenia de infecções em peixes ainda é pouco elucidada (CHRISTIE et al., 1944; SKALKA et al. 1981; JURGENS et al., 1987; LIU, 2004).

Participação de fatores genéticos do microrganismo e/ou fatores fisiológicos do próprio hospedeiro geralmente favorecem a infecção sendo que podem determinar a resistência ou suscetibilidade à doença. A capacidade de união das respostas imune específicas e não específicas, são consequências da predisposição do indivíduo a determinada doença, podendo ser maior ou menor, dependendo da sua resposta à agressão (CALICH et al., 1998).

Fenômeno semelhante a resposta inflamatória em mamíferos ocorre com menor complexidade em peixes teleósteos como fagocitose por células competentes, produção de peptídeos envolvidos no controle microbiano, atividade de lisozimas, sistema complemento e outras proteínas sanguíneas (COLONNA et al., 2006).

A resposta imune adaptativa é iniciada em resposta a antígenos específicos, sendo que ela pode ser direcionada para características próprias do patógeno e geralmente elimina a infecção e protege o hospedeiro contra a reinfecção (FEARON et al., 1996). Divide-se em resposta imune humoral e resposta imune celular e envolve órgãos e tecidos linfóides, células apresentadoras de antígeno, linfócitos T e B, imunoglobulinas e moléculas do sistema complemento (ZAPATA et al., 1996; WATTS et al., 2001).

Reações mediadas pela produção de imunoglobulinas (Ig) representam a resposta imune celular. Estas imunoglobulinas são constituídas por uma molécula tetramérica similar a Imunoglobulina M de mamíferos, após a sensibilização prévia (SCAPIGLIATI et al., 1999). Linfócitos B produzem principalmente a IgM que, por sua vez, reconhecem e neutralizam antígenos e os preparam para a eliminação através de diversos mecanismos efetores. Então as imunoglobulinas unem-se aos antígenos solúveis e formam complexos antígenos-anticorpo que serão eliminados pela fagocitose. (RUBIO-GODOY, 2010).

A resposta imune humoral nos peixes ainda é pouco definida, porém relatos demonstram a existência, mesmo que pouco desenvolvidas. De acordo com Grimholt et al. (1993) e Aoyagi et al. (1999) existem genes ligados a expressão moléculas de MHC de classe I em peixes, além disso evidenciou-se reação de hipersensibilidade tardia a enxertos primários e secundários, demonstrando

que ocorre a ativação de tipos celulares funcionalmente equivalentes às células T de mamíferos.

As ações profiláticas podem ser estabelecidas de acordo com níveis de prevenção, seja ela primária ou secundária. Na prevenção primária, as ações são aplicadas a etapa correspondente ao período pré-patogênico da doença, impedindo sua introdução no ecossistema. Esta atuação é conhecida como promoção da saúde, e inclui as ações inespecíficas visando melhor qualidade de vida. Já a secundária diz respeito ao insucesso do período pré-patogênico e se dirigem a determinada doença, por meio de vacinação ou utilização de medicamentos específicos (FORATTINI, 1992).

Seguindo a tendência de expansão da atividade em todo mundo, o uso de vacinas como método imunoprolático na aquicultura tem aumentado significativamente. Porém a vacinologia em peixes é ainda uma área prematura, tanto cientificamente como na capacidade de transferência de tecnologia para as indústrias. Os peixes podem ser imunizados por via injetável, preferencialmente por injeção intra-peritoneal (i.p.); por imersão, onde os animais são imersos em solução aquosa contendo os antígenos vacinais; ou pela administração oral das vacinas. Esses métodos apresentam diferentes vantagens e desvantagens quanto à eficiência da imunização, praticidade, efeitos colaterais e custo – benefício (GUDDING et al., 1999). Métodos não injetáveis, como a imersão, permitem a imunização de milhares de peixes em um período reduzido de tempo (KLESIUS et al., 2004), contudo, grandes quantidades de vacina são necessárias (VANDERBERG, 2004).

Vacinas vivas e inativadas são os principais tipos utilizados. Diversas metodologias são utilizadas para o desenvolvimento dessas vacinas, porém para a obtenção de produtos eficientes a identificação dos principais fatores de virulência dos microrganismos deve ser o ponto de partida. Esses são utilizados posteriormente como antígenos vacinais para a imunização dos animais. Porém apesar de tal premissa, a maioria das vacinas utilizadas na aquicultura tem sido desenvolvidas de forma empírica, muitas vezes por tentativa e erro. (GUDDING et al., 1999).

A utilização de antibióticos para o tratamento de infecções por *Streptococcus* sp. ainda é um pouco controversa pois sabe-se que o patógeno pode

sobreviver no interior de macrófagos onde muitas drogas antimicrobianas não os alcançam. Dessa forma os antibióticos podem eliminar os sinais clínicos, mas não o agente. Somente a utilização de antibióticos não é eficiente, devendo estar associada às práticas adequadas de manejo (SHOEMAKER et al., 1997; NAKANISHI et al., 2002).

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 vacinação em aquicultura surge como alternativa ao uso de antibióticos e outros produtos químicos, na prevenção de infecções (ROMANO et al., 2003). A utilização indiscriminada de antibióticos pode causar graves problemas para o ambiente, seleção de cepas resistentes e presença de resíduos no produto final, tudo isso ocasiona pouca aceitação dos consumidores a animais tratados (SHOEMAKER et al., 1997; NAKANISHI et al., 2002)

3.4. VACINAS

As principais vacinas utilizadas na prevenção de doenças bacterianas são as constituídas por células inativadas por formalina. Elas apresentam diversos aspectos desejáveis como produção economicamente viável, permite associar diferentes antígenos e a proteção é satisfatória (DUMRONGPHOL et al., 2009). De acordo com Gudding et al. (1999), a habilidade dos peixes em desenvolverem imunidade contra determinado microrganismo depende da idade do peixe, da temperatura da água, do agente de imunização e do método de vacinação.

A via intraperitoneal, o banho de aspersão e a via oral são as principais vias de administração de vacinas em peixes e cada um deles apresenta vantagens e desvantagens em relação ao nível de proteção, efeitos colaterais, praticidade e custo-benefício (GOMES et al., 2006).

O método mais confiável e eficaz de aplicação de vacinas é o pela via intraperitoneal, porém essa via possui a desvantagem de ser muito estressante

para o animal, ter um custo mais elevado, segurança e maior tempo requeridos para a administração da vacina e conseqüentemente o desenvolvimento da imunidade. Além disso, vacinas injetáveis não são adequadas para peixes jovens, pequenos e frágeis (NAKANISHI et al., 1997).

Evans et al. (2004) avaliaram duas vacinas elaboradas com *S. iniae* e *S. agalactiae* inativados, e inoculados via intra-celomática (i.c.) em tilápias que foram desafiadas com cepas homólogas. Após 14 dias a mortalidade foi de 15,0% no grupo vacinado e de 76,0% no controle. Já Pretto-Giordano et al. (2010) obtiveram resultados de 83,6 e 96,4% de porcentagem relativa de sobrevivência em tilápias do Nilo imunizadas com vacinas inativadas contra *S. agalactiae* em dose única e com reforço, respectivamente.

Embora seja necessário maior volume de vacina e a proteção geralmente é menos eficaz quando comparada com as vacinas injetáveis, a vacinação por banho de imersão é uma prática muito utilizada atualmente, principalmente para peixes pequenos, uma vez que acaba sendo mais prática e o custo um pouco menor (NAKANISHI et al., 1997).

Em um trabalho realizado por EVANS et al. (2004) foram pesquisadas duas vacinas elaboradas com *S. iniae* e *S. agalactiae* inativados ($4,0 \times 10^9$ UFC/mL) e concentrado de produtos extracelulares (ECP). Um grupo de 80 tilápias de 30,0g cada foi vacinado com *S. agalactiae* na concentração de $4,0 \times 10^9$ UFC/mL, intraperitoneal (i.p) e desafiado com cepa homóloga, $1,5 \times 10^4$ UFC/peixe, i.p., 30 dias após. Os peixes foram monitorados por 14 dias e a mortalidade foi de 15,0% no grupo vacinado e de 76,0% no controle. Em outro teste com a mesma vacina para avaliar a eficácia da vacina de *S. agalactiae* aplicada por banho de imersão foram utilizados dois grupos. Um grupo com 65 peixes de 5,0g foi desafiado com $3,6 \times 10^5$ UFC/peixe e o outro com 23 peixes de 30,0g foi desafiado com $1,7 \times 10^6$ UFC/peixe, ambos por imersão. Em um grupo vacinado com *S. iniae*, i.p. e desafiado com *S. agalactiae* pela mesma via, a mortalidade foi 100,0%, sugerindo não existir imunidade cruzada entre *S. iniae* e *S. agalactiae*. Os autores chegaram a conclusão que a vacina contra *S. agalactiae* apresentou boa eficácia quando inoculada i.p. e a imersão pode ser considerada satisfatória para vacinar peixes juvenis (EVANS et al., 2004).

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

No Brasil já está disponível uma vacina comercial contra *S. agalactiae* em peixes (MSD Saúde Animal, 2015). Ela é inativada e administrada via i.c. na dose de 0,05 mL/peixe, em animais de pelo menos 15 gramas.

3.5. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico sugestivo de estreptococose é baseado na presença de sinais clínicos característicos da doença e na ocorrência de cocos Gram-positivos no cérebro, rim ou outros órgãos internos. Para realizar o diagnóstico definitivo faz-se o isolamento e subsequente verificação das características sorológicas e/ou moleculares das bactérias (PAVANELLI et al., 2008).

3.5.1 DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

Estreptococos são bactérias exigentes em relação as suas necessidades nutritivas. A maioria dos estreptococos patogênicos cresce bem, em meio definido. Em meios sólidos, as cepas de estreptococos produzem colônias translúcidas, pequenas, delicadas e com aproximadamente 1 mm de diâmetro. Inóculos maiores produzem crescimento confluyente que é quase transparente. A superfície de crescimento é lisa, brilhante e de contorno circular. As colônias crescidas mais profundamente no agar são lenticulares e as colônias crescidas em meio fluido podem ser globulares e dificilmente visíveis a olho nu. Cepas

que produzem cadeias longas geram sedimento no fundo do tubo. Amostras capsuladas e amostras com cadeias curtas permanecem mais tempo em suspensão (GOMES, 2013).

A maioria dos estreptococos cresce bem em aerobiose e anaerobiose, embora poucas cepas se desenvolvam em condições de anaerobiose. Anaeróbios estritos, são nutricionalmente exigentes, requerem fontes ricas em carboidratos e proteínas podendo se desenvolver em tecidos, trato intestinal de animais, no leite, produtos de laticínios, material vegetal entre outros. Todos os estreptococos crescem bem no leite e a maioria das amostras produz ácido láctico neste substrato (JONES, 1978).

Entre as bactérias aeróbias que não sintetizam citocromo, os estreptococos são únicos incapazes de produzir fosforilação oxidativa por meio da cadeia de transporte de elétrons através do sistema citocromo. Os estreptococos são catalase negativos e fermentam açúcares até o ácido D-lático. A temperatura ideal de crescimento varia de -10°C a 45°C (GOMES, 2013).

3.5.2 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

As técnicas de biologia molecular permitiram um significativo desenvolvimento na eficiência e qualidade do diagnóstico de enfermidades de peixes, principalmente para doenças causadas por vírus e bactérias de difícil isolamento e cultivo em laboratório. As primeiras técnicas de hibridização baseavam-se na comparação de porções do genoma dos microrganismos. Porém, na década de 80 foi desenvolvida a reação em cadeia da polimerase (PCR). Essa técnica permite a clonagem "*in vitro*" de segmentos específicos do DNA patógenos, detectados por meio de pequenas sondas chamadas de primers. Esses se ligam a sequências específicas e são reconhecidos pela enzima DNA polimerase que inicia a produção de uma sequência complementar a fita molde. Na sequência os produtos são visualizados por eletroforese em gel de agarose (FIGUEIREDO et al., 2008).

De acordo com Figueiredo et al. (2008), devido à especificidade dos primers e agilidade a PCR é ferramenta molecular mais utilizada para o diagnóstico de doenças em animais, seres humanos e plantas. Outra aplicação importante dessa técnica é para a detecção de genes de virulência nos isolados, permitindo inferência sobre a patogenicidade das diferentes amostras.

Diversas técnicas moleculares têm sido utilizadas para a caracterização molecular de *S. agalactiae* principalmente a eletroforese em campo pulsado (PFGE) e o sistema de tipificação de multi locus (MLST). A PFGE requer a utilização de uma única enzima de restrição que possua sítio pouco frequente no DNA, o que resulta em um número reduzido de fragmentos grandes, facilitando sua visualização, e tem boa reprodutibilidade. Portanto, os perfis eletroforéticos obtidos para as diferentes cepas são mais facilmente comparados em relação aos obtidos com técnicas de eletroforese convencionais (FASOLA et al., 1993).

Já técnica de MLST baseia-se na amplificação e sequenciamento de no mínimo três genes conservados, o que permite realizar inferências sobre proximidade evolutiva dos diferentes isolados (MARTINS et al., 2007).

3.6. ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO INDIRETO (ELISA)

Dentre as diversas técnicas moleculares utilizadas para a caracterização molecular de *S. agalactiae*, a técnica de ELISA pode ser utilizada no diagnóstico indireto da enfermidade, demonstrando a presença de anticorpos. O teste não distingue entre resposta à vacina e à infecção, mas a magnitude dos títulos de anticorpos permite essa diferenciação. Os soros são classificados como negativo (sem anticorpos), fraco positivo (baixo nível de anticorpos), positivo moderado, positivo forte, e positivo muito forte. Recentemente a proteína M recombinante produzida no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, RS, foi utilizada como antígeno em reações de ELISA com resultados promissores na identificação do *S. equi* (MORAES et al., 2007).

Existem vários modelos de testes de ELISA; em sua forma mais simples, chamada ELISA indireto, um antígeno aderido a um suporte sólido (placa de ELISA) é preparado; a seguir coloca-se sobre este os soros em teste (ex. soro animal), na busca de anticorpos contra o antígeno. Se houver anticorpos no soro em teste ocorrerá a formação da ligação antígeno-anticorpo, que posteriormente é detectada pela adição de um segundo anticorpo dirigido contra imunoglobulinas da espécie onde se busca detectar os anticorpos (animal, no caso), a qual é ligada à peroxidase. Este anticorpo anti-IgG, ligado à enzima denomina-se conjugado. Ao adicionar-se o substrato apropriado para a enzima (isto é, H_2O_2 dissolvida em uma substância química que dá uma reação colorida quando H_2O_2 é desdobrada). Os orifícios onde ocorreram as reações antígeno-anticorpo apresentam uma coloração variável dependendo do substrato (MOLINARO et. Al., 2009).

ARTIGO

**A SER SUBMETIDO À REVISTA DE CIÊNCIAS MÉDICAS
BIOLÓGICAS DO ICS-UFBA**

1 PADRONIZAÇÃO DE TESTE DE ELISA PARA O DIAGNÓSTICO DE
2 streptococcus agalactiae EM TILÁPIA DO NILO (OREOCHROMIS NILOTICUS)
3
4 ELISA TEST FOR STANDARDIZATION streptococcus agalactiae DIAGNOSIS IN
5 NILE TILAPIA (OREOCHROMIS NILOTICUS)

6 **Daniel Ribeiro Cruz**^{1*}, **Robson Bahia Cerqueira**², **Rodrigo Fortes da Silva**³,
7 **Andrine Virgínia Silva de Jesus**⁴, **Isabela Emília da Silva Oliveira**⁵, **Vinícius**
8 **Pereira Vieira**⁶, **Denise Soledade Peixoto Pereira**⁷.

9 ^{1*} Mestre em Defesa Agropecuária - Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas - Universidade
10 Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Bahia, Brasil – CCAAB - UFRB. ² Doutor em
11 Imunologia pelo Programa de Pós- Graduação em Imunologia – Universidade Federal da Bahia. ³ Pós-
12 Doutor Universitat Zu Köln/Alemanha – Instituto de Limnologia. ⁴ Mestranda em Defesa Agropecuária –
13 CCAAB - UFRB. ^{5 6 7} Graduando em Medicina Veterinária – CCAAB – UFRB.

14 **Resumo**

15 As enfermidades associadas ao *Streptococcus agalactiae* têm gerado muitos surtos nas
16 produções de Tilápia-do-Nilo em todo mundo, o que leva a altos índices de mortalidade
17 na produção e transtornos aos produtores. Esses possuem sérias dificuldades com o
18 tratamento, com isso coloca-se em risco a saúde do consumidor. As vacinas têm se
19 tornado uma importante alternativa no controle e prevenção da estreptococose, pois
20 estimulam o sistema imune do animal, que conseguem responder melhor a ação do
21 patógeno, adquirindo resistência. O ensaio imunoenzimático ELISA auxilia na detecção
22 de animais portadores e identificam quais apresentam resposta vacinal ao agente. O
23 presente trabalho teve como objetivo padronizar um Ensaio Imunoenzimático Indireto
24 (ELISA) para o diagnóstico da estreptococose em Tilápia-do-Nilo, utilizando como
25 antígeno a linhagem *S. agalactiae*. No experimento foram utilizadas 78 amostras no
26 total, destas 33 foram soro negativo e 45 soro positivo. O Ensaio Imunoenzimático
27 obteve sensibilidade de 100% e especificidade 76%, com êxito maior na sensibilidade,
28 apresentando o ELISA como um importante método na detecção de animais que
29 sofreram contato com o *Streptococcus agalactiae*.

30 **Palavras-chaves:** Tilapia do Nilo; *Streptococcus agalactiae*; ELISA

32 **Abstract**

33 The diseases associated with *Streptococcus agalactiae* have generated many outbreaks
34 in the production of Nile tilapia worldwide which leads to high mortality rates in
35 production and inconvenience to producers. These have serious difficulties with the
36 treatment, it puts at risk the health of consumers. Vaccines have become an important
37 alternative for the control and prevention of estreptococose, they stimulate the immune
38 system of the animal, who can best respond to pathogen action, acquiring resistance.
39 The enzyme-linked immunosorbent assay ELISA helps animals detect and identify
40 carriers which have vaccine response to the agent. This study aimed to standardize a
41 immunoenzymatic assay Indirect (ELISA) for the diagnosis of estreptococose in Nile
42 tilapia using as antigen *S. agalactiae* strain. In the experiment were used 78 samples in
43 total, these 33 were negative and 45 positive serum serum. The immunosorbent assay
44 had a sensitivity of 100% and specificity 76%, sensitivity is most successful in
45 presenting the ELISA as an important method for the detection of animals undergoing
46 contact with *Streptococcus agalactiae*.

47 **Keywords:** Tilapia Nile; *Streptococcus agalactiae* ; ELISA

48

49 **Correspondente/Corresponding. Daniel Ribeiro Cruz.**

50 Correspondente/ Corresponding .End: Laboratório de Doenças Infecciosas –
51 Hospital Universitário de Medicina Veterinária- Centro de Ciências Agrárias,
52 Ambientais e Biológicas - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz
53 das Almas, Bahia, Brasil – CCAAB – UFRB. Rua Rui Barbosa n710 – Centro
54 Cruz das Almas – 44380-000

55 **Introdução**

56

57 O nome Tilápia faz parte da família de peixes ciclídeos originários do continente
58 africano. A espécie *Oreochromis niloticus* conhecida popularmente por Tilápia-do-Nilo
59 é a mais utilizada na aquicultura devido ao seu alto potencial e rusticidade, podendo ser
60 aproveitada nos diversos sistemas de produção. Foi introduzida no Brasil na década de
61 70 e consagrou-se como uma das espécies de peixes mais cultivadas no país
62 (BOSCOLO et al ., 2001).

63 Dentre as enfermidades de origem bacteriana que acometem as Tilápias criadas
64 em sistema de produção destacam-se as infecções por *Streptococcus ssp.*,
65 *Flavobacterium columnare*, *Aeromonas sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Vibrio sp.* e
66 *Edwardsiella sp.* Dessas bactérias os estreptococos são considerados como um patógeno
67 emergente, identificado com o responsável por elevados prejuízos a tilapicultura
68 nacional (SALVADOR 2008). A estreptococose pode causar uma doença sistêmica com
69 disseminação no cérebro, levando a encefalite, natação errática, anorexia, exoftalmia,
70 opacidade da córnea, coloração escura do corpo, hemorragia difusa na pele,
71 distensão abdominal e ulceração na epiderme (MARCUSO et al., 2015).

72 Uma alternativa para o controle de bacterioses seria a aplicação de antibióticos,
73 porém o uso destes selecionaria bactérias resistentes e induziria a acumulação no
74 ambiente e na carne dos peixes. Com isso as vacinas estão se tornando uma alternativa,
75 e constitui preparações de antígenos derivados de organismos patogênicos que
76 estimulam o sistema imune de animais aumentando da resistência a doença (TIZARD,
77 2002).

78 O ELISA tem sido empregado como um método seguro e eficaz para o
79 diagnóstico sorológico precoce em humanos e animais (SANTURIO et al., 2001;
80 VANITTANAKOM *et al.*, 2004). Devido esta técnica apresentar um alto nível de
81 sensibilidade, reprodutibilidade além de permitir automação, tornou-se um método de
82 eleição para exame de um grande número de amostras. A técnica de ELISA indireto
83 ocorre quando o antígeno é adsorvido à placa, após a lavagem, adiciona-se o soro que
84 supostamente contem anticorpos específicos ao antígeno da reação. Depois do período
85 de incubação e lavagem, colocam-se anticorpos antiimunoglobulinas marcados com a
86 enzima.

87 Depois da nova incubação e lavagem adiciona o substrato. O desenvolvimento
88 da cor mostra a presença do anticorpo no soro—problema e a variação de cor está
89 relacionada á quantidade de anticorpo presentes no soro (CALICH et al., 2009). Dentre
90 as vantagens do ELISA estão a estabilidade, o pequeno volume de reagentes e os
91 resultados de natureza quantitativa, possibilitando a rápida execução diagnóstica. Além
92 de apresentar baixo nível de risco biológico, podendo também ser utilizado para estudos
93 epidemiológicos (SOARES et al.,2015). O objetivo do trabalho limitou-se a
94 acompanhar os parâmetros hematológicos e a resposta humoral de Tilápias-do-Nilo
95 (*Oreochromis niloticus*) inoculados com diferentes doses de vacina comercial contra

96 *Streptococcus agalactiae*, além de produzir um antígeno a partir de linhagens de *S.*
97 *agalactiae* para utilização em teste diagnóstico.

98 **2. Materiais e Método**

99 **2.1. Delineamento experimental**

100 O experimento foi realizado no Laboratório de Doenças Infecciosas localizado
101 no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Foram
102 coletados 124 peixes oriundos da piscicultura Bahia Pesca, com peso médio de 80g, os
103 quais passaram por um período de 20 dias de aclimação em tanques de 500 L e foram
104 divididos em dois grupos com 62 animais em cada: um grupo experimental o qual será
105 realizado a infecção com a bactéria *Streptococcus agalactiae* sp. (G.I.) e o outro grupo
106 controle não infectado, sendo o grupo controle (G.C.).

107 **2.2. Preparação do antígeno**

108 A partir da linhagem de *Streptococcus agalactiae* sp. disponibilizada pelo
109 Laboratório de Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.
110 Procedeu-se inicialmente o cultivo da cepa em 10 tubos de ensaio contendo 10mL
111 caldo Brain Heart Infusion (HIMEDIA®), sendo incubados em estufa bacteriológica a
112 37°C por 48 horas. Ao fim desse período, foi realizada uma avaliação microscópica
113 quanto a pureza. Seguidamente, centrifugou-se o inoculo a 12.000 rpm por 30 minutos,
114 resultando em duas fases uma coluna líquida e logo na base do tubo uma sedimentação
115 celular. Com a fase líquida desprezada a massa bacteriana foi extraída e pesada 1g a
116 qual foi resuspendida em 5mL de tampão fosfato salino 0,02M pH 7,4 (PBS) estéril.
117 Essa massa celular foi sonicada (23 watts com pulsos de 30 segundos durante 3
118 minutos) em banho de gelo. O material resultante da sonificação foi centrifugado a
119 7.000 rpm durante 15 minutos e o sobrenadante obtido foi coletado como antígeno
120 solúvel (SALVADOR *et al.*, 2005).

121 **2.2. Infecção**

122 Após o período de aclimação, os animais do grupo infectado (G.I.) foram
123 inoculados com a concentração de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL de *Streptococcus agalactiae* sp.
124 por via intraperitoneal 0,1 mL, já os animais do grupo controle (G.C) foram inoculados

125 com 0,1mL solução salina a 0,9% estéril, com seringas de 1mL descartáveis com
126 agulha 13mm x 4,5mm.

127 **2.3 Coleta de sangue**

128 Os animais foram acondicionados em recipiente com aeração de injeção de ar
129 com pedra porosa e solução anestésica Eugenol® a base de óleo de cravo para
130 realização da coleta de sangue. Colocados em decúbito lateral, procedeu-se a coleta na
131 veia caudal, utilizou-se uma seringa descartável com agulha 0,38mm x 13mm, a qual foi
132 inclinada em torno de 45° e realizada a punção venosa para coleta de sangue total.
133 Logo após, o sangue foi levado ao laboratório e centrifugado a 3.000 rpm por 15
134 minutos para obtenção do soro, o qual foi armazenado em eppendorfs e incubados sob
135 refrigeração a $-20\pm 1^{\circ}\text{C}$.

136 **2.4. Realização do teste (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) iELISA indireto**

137 Utilizou-se para o teste iELISA placas de poliestireno de 96 poços, fundo plano
138 (Corning Costar Corporation Cambridge, USA. Inicialmente as placas foram
139 sensibilizadas com antígeno solúvel na proporção de 1:100, diluído em tampão
140 carbonato bicarbonato 0,05M pH 9,6, do qual foi transferido 100 μl da diluição por
141 poço e incubadas “*overnight*” a 4°C por 16 horas. Após a incubação, as placas foram
142 lavadas uma vez com tampão fosfato salino pH 7,2, contendo 0,1% de Tween-20
143 (PBS-T), seguidamente as placas foram bloqueadas com 200 μl /poço de uma solução de
144 leite desnatado a 1% em PBS-T, a placa foi incubada em estufa a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ por um
145 período de duas horas. Utilizou-se soro do G.C e G.I, os quais foram diluídos em
146 solução de 0,5% de leite desnatado dissolvido em PBS-T (1:100), distribuídos nas
147 placas (50 μl /poço) e incubados por uma hora a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$. Cada amostra testada foi
148 submetida a 2 repetições por placa. Após a incubação com anticorpo primário as placas
149 foram lavadas cinco vezes com PBS-T e submetidas à incubação com anticorpo
150 secundário específico (Imunoglobulina IgM conjugado com peroxidase), na diluição
151 1:10.000 por incubação de uma hora a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$. A seguir, as placas foram lavadas cinco
152 vezes para receber, 50 μl /poço do substrato cromogênico (orthophenylene-diamine,
153 OPD) diluído em tampão citrato-fosfato 0,15M pH 5,1 acrescido de 30 μl peróxido de
154 hidrogênio a 3%, e incubada em câmara escura. Passados os 15 minutos, a reação foi

155 interrompida com 25µl de H2SO4 4N, e a leitura realizada em espectrofotômetro de
156 microplacas, com filtro de 490nm (MORAES et al., 2009).

157 2.5. Estudo Estatístico

158 O “*cut-off*” calculado através da média da Densidade Ótica dos animais não
159 reagentes + 3 desvio padrão (FREY *et al.*, 1998).

160 Determinação da sensibilidade e especificidade:

161 A fórmula utilizada foi baseada no estudo de Mathias *et al.* (1998) conforme
162 representação abaixo:

$$163 \text{ Sensibilidade} = \frac{\text{Total de doentes testados}}{\text{Doentes Detectados pelo teste}} \times 100$$

$$164 \text{ Especificidade} = \frac{\text{Total de sãos testados}}{\text{Sãos negativos ao teste}} \times 100$$

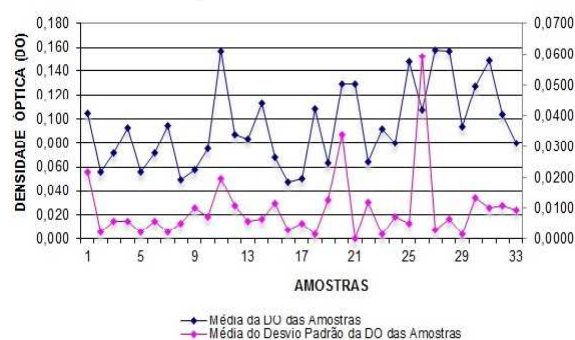
169 3.Resultado e discussão

170 Dos 124 animais utilizados no experimento 46 morreram durante o processo de
171 aclimação, sendo 29 do (G.C.) e 17 (G.I.). As 78 amostras remanescentes foram
172 submetidas ao teste ELISA indireto, sendo 33 amostras soro negativo (G.C.) e 45 soro
173 positivo (G.I.). A média da densidade ótica dos animais não reagente foi de 0,095 e o
174 desvio padrão 0,0096, determinado pelo *cut-off* de 0,124

FIGURA 01. AMOSTRAS DE SORO POSITIVO



FIGURA 02. AMOSTRAS DE SORO NEGATIVO



175

176 Para determinar a sensibilidade e especificidade relativa do teste ELISA indireto,
177 foram considerados doentes os animais positivos e sadios os animais negativos

178 respectivamente. A sensibilidade e a especificidade são parâmetros indispensáveis para
179 a definição de um teste diagnóstico, sendo que quanto maior a sensibilidade do teste,
180 maior a capacidade de o teste negativo afastar a doença, pois ocorre uma diminuição da
181 probabilidade de falso negativo. Por outro lado, quanto maior a especificidade de um
182 teste, maior a capacidade de o teste positivo indicar a doença, pois diminui a
183 probabilidade de falso positivo (GREINER & GARDNER, 2000).

184 Sensibilidade = $45/45 \times 100 = 100\%$

185 Especificidade = $25/33 \times 100 = 76\%$

186 Um aumento da sensibilidade decorre de uma diminuição da especificidade e
187 vice-versa. Sendo assim, um ponto de corte muito alto pode implicar em 100% de
188 especificidade, uma vez que todos os testes positivos implicarão na existência da
189 doença. No entanto, alguns indivíduos com a doença podem obter resultados negativos,
190 o que implica em baixa sensibilidade (CARMINATI, 2003).

191 Dessa forma, o teste de sensibilidade mostra que foi capaz de identificar todos os
192 indivíduos que foram expostos ao micro-organismo *Streptococcus agalactiae*, ou seja,
193 os animais que apresentaram valores acima do ponto de corte 0,124 são positivos para o
194 quesito sensibilidade. O teste de especificidade mostra que a partir do valor 0,124
195 (ponto de corte) 25 animais são negativos ao teste pois apresentaram valores abaixo
196 desse ponto, ou seja, 76% apresentam especificidade ao ELISA indireto, obtendo então
197 23% de capacidade de identificar indivíduos que são considerados negativos, mas na
198 realidade são positivos para o teste. O gráfico está representado na figura 1.

199 Comparando-se a testes sorológicos realizados por Carminati et al. (2003) e
200 Dercksen et al. (2000), que resultaram em 93,5% e 79% de sensibilidade
201 respectivamente, com caprinos soropositivos para linfadenite caseosa, o presente
202 trabalho mostrou-se mais sensível.

203 Molnar et al. (2000) afirmam, após utilizar 3.338 amostras de soro, que o teste
204 ELISA indireto apresentou superioridade pois no total de 626 soros positivos, somente o
205 ELISA indireto confirmou a positividade em 249 amostras. Putini et al. utilizando
206 como antígeno *Brucella abortus* o Ensaio Imunoenzimático Indireto apresentou
207 sensibilidade de 77,8% e especificidade de 100%.

208

209

210 **REFERÊNCIAS**

- 211 BOSCOLO, W.R. et al. Desempenho e Características de Carcaça de Machos
212 Revertidos de Tilápias do Nilo(*Oreochromis niloticus*), linhagens Tailandesa e Comum,
213 nas Fases Inicial e de Crescimento, **Revista brasileira zootecnia**, v. 30, n.5,1391-1396,
214 2001.
- 215 CALICH, V. et al. **Imunologia** . 2ºed. São Paulo,SP, p. 303-304. 2009
- 216 CARMINATI, R. et al. Determinação da sensibilidade e da especificidade de um teste
217 ELISA indireto para o diagnóstico de linfadenite caseosa em caprinos, **Revista**
218 **Ciências Médicas Biológicas**. Salvador, v. 2, n. 1, p. 88-93, jan./jun. 2003.
- 219 DERCKSEN, D. P. et al. A comparison of four serological tests for the diagnosis of
220 caseous lymphadenitis in sheep and goats. **Veterinary Microbiology**. v. 75, p. 167-
221 175, 2000.
- 222 FREY, A.; DI CANZIO, J.; ZURAKOWSKI, D. A. Statistically defined endpoint titer
223 determination method for immunoassays. **Journal of Immunology Methods.**, v. 221,
224 n. 1-2, p. 35-41, 1998.
- 225 GREINER, M.; GARDNER, I. A. Epidemiologic issues in the validation of veterinary
226 diagnostic tests. **Preventive Veterinary Medicine.**, n.45, p.3-22, 2000
- 227 HARDIE, T.; WHILLEY, R.; KILLIAN, O. Bacterial vaccines for fish-an update of the
228 current situation worldwide. **Developments in Biologicals, Basel**, v. 121, p. 55-74,
229 1998.
- 230 HOLT, J.G. et al., **Bergey's manual of determinative bacteriology** , 9 ed. Baltimore:
231 Williams & Williks, 1994. 532 p.
- 232 KUBITZA, F. **Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial. Jundiaí:**
233 F. Kubitza, 2000. 285p.
- 234 MATHIAS, L. A. et al. Avaliação de um teste imunoenzimático competitivo na
235 diferenciação de anticorpos induzidos pela vacina B19, no diagnóstico sorológico da
236 brucelose bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira.**, v. 14, n. 1, p. 19-23, 1998.
- 237 MARCUSO, P. F.; ETO, S. F.; CLAUDIANO, G. S.; VIEIRA, F. C. F.;SALVADOR,
238 S.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R. Isolamento de *Streptococcus agalactiae* em
239 diferentes órgãos de Tilápias-do-Nilo(*Oreochromis niloticus*) criadas em tanques rede,
240 **Bioscience Journal**, v.31, n.2, p. 549-554, mar/apr, Uberlândia, 2015.
- 241 MENDOZA L., KAUFMAN L. & MANDY W.G.R. 1997. Serodiagnosis of human
242 and animal pythiosis using an enzyme – linked immunosorbent assay. **Clinical**
243 **Diagnostic Laboratory Immunology**. 4(6) : 715-718.
- 244 MORAES, C. M. et al. **Padronização de ELISA utilizando como antígeno proteína**
245 **SeM recombinante de *Streptococcus equi***. Pelotas, RS, 2009.

- 246 NOGUEIRA, A.C.; RODRIGUES, T. **Criação de tilápias em tanques-rede**. Salvador:
247 Sebrae Bahia, 2007.
- 248 OLIVARES-FUSTER, O. et al., Molecular typing of *Streptococcus agalactiae* isolates
249 from fish. **Journal of fish Diseases**, Oxford, v.31,n 4, p 277-283. Apr.2008
- 250 PLUMB, J.A. Tilapia bacterial diseases. In:_____ HEALTH: maintenance and
251 principal microbial diseases of cultured fishes. Ames: **Iowa State University**, p. 297-
252 305. 1999
- 253 RASHEED, V.; PLUMB, J. A. Pathogenicity of a nonhemolytic group B *Streptococcus*
254 sp. in gulf killifish (*Fundulus Grandis* Baird and Girard). **Aquaculture**, Amsterdam,
255 v.37, p.97-105,1984
- 256 RIBEIRO, R.P. Espécies exóticas. In:_____ MOREIRA, H.L.M. et al. (Org.).
257 **Fundamentos da moderna aqüicultura**. Canoas: Ulbra, cap. 11, p. 91-121.2001
- 258 SALVADOR, R. et al. Isolation and characterization of group B *Streptococcus* spp from
259 Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) breeding in hapas nets and in earth nurseries in the
260 north region of Parana State, Brazil. **Ciência Rural**, v.35, n. 6, p.1374-1378, 2005.
- 261 SALVADOR, R. **Imunização e inflamação por *Streptococcus agalactiae* em Tilápia**
262 **do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com ração suplementada com parede**
263 **celular de *Saccharomyces Cerevisiae*** .129f. Tese (Doutorado), Universidade Estadual
264 Paulista, Jaboticabal, 2008.
- 265 SANTURIO J. M. et al. Teste Elisa para diagnóstico de Pitiose. **III Congresso**
266 **Brasileiro de Micologia**. Águas de Lindóia,SP, p.126. 2001
- 267 TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária**. 6.ed. São Paulo: Roca, 2002
- 268 VANITTANAKO, M. N. et al. Identification of emerging human – pathogenic
269 *Pithium insidiosum* by serological and molecular assay-based methods. **Journal**
270 **Clinical Microbiology**. 42(9):3970-3974. 2004
- 271 SOARES, P. M. et al. ELISA Indireto para a Brucelose bovina utilizando vacina B19 e
272 EPS como antígenos, **Ciência & Tecnologia: Fatec-JB**, Jaboticabal, v. 7, Número
273 especial, 2

CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou que o ELISA indireto pode ser utilizado como teste para diagnóstico da *Streptococcus agalactiae*, uma vez que se consegue detectar animais que em algum momento obtiveram contato com a bactéria, contribuindo como diagnóstico rápido e eficaz. O teste também se destaca na detecção da sensibilidade frente à especificidade. Obter o teste sensível mostra que, se ele tem 100%, a capacidade de detectar a prevalência da doença será significativo, pois todo indivíduo que for exposto à bactéria será detectado através do teste, supondo então a presença do micro-organismo em uma determinada região, e que o animal teve contato.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUSELIANA, A. et al. **Streptococcus agalactiae the etiological agent of mass mortality in farmed red tilapia (*Oreochromis sp.*)**. Journal Animal Veterinary. v. 9, n. 20, p. 2640-2646, 2010.

NAKANISHI, T. et al. **Specific cell-mediated immunity in fish**. Veterinary immunology and immunopathology, v. 72, n. 1, p. 101-109, 1999.

BERRIDGE, Brian R.; BERCOVIER, Herve; FRELIER, Paul F. **Streptococcus agalactiae and Streptococcus difficile 16S–23S intergenic rDNA: genetic homogeneity and species-specific PCR**. Veterinary Microbiology, v. 78, n. 2, p. 165-173, 2001.

BONDAD-REANTASO, Melba G. et al. **Disease and health management in Asian aquaculture**. Veterinary parasitology, v. 132, n. 3, p. 249-272, 2005.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AQUICULTURA E DA PESCA – MPA. **Boletim estatístico da pesca e da aquicultura 2010**. Brasília: MPA, 2012.

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, n.2, p.67-76, 1997.

CALICH, V. L. G.; VAZ, C. A. C.; BURGER, E. **Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection**. Research in immunology, v. 149, n. 4, p. 407-417, 1998.

CAMARGO, S. G. O.; POUHEY, J. L. O. F. **Aquicultura - Um mercado em expansão**. Revista Brasileira de Agrociência, v. 11, n. 4, p. 393-396, 2005.

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

COLONNA M, PULENDRAN B, IWASAKI A. Dendritic cells at the hostpathogen interface. **Nature Immunology**, v.7, n. 2, p.117-120, 2006.

CHRISTIE, R.; ATKINS, N. E.; MUNCH-PETERSEN, E. **A note on a lytic phenomenon shown by group B streptococci**. Australian Journal of Experimental Biology & Medical Science, v. 22, n. 3, 1944.

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

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 Shellfish Immunology**, Tokyo, v. 26, n.1, p. 197-200, 2009.

ELDAR, Avi; BEJERANO, Yitzhak; BERCOVIER, Herve. **Streptococcus shiloi and Streptococcus difficile: Two new streptococcal species causing a meningoencephalitis in fish**. Current Microbiology, v. 28, n. 3, p.139-143, 1994.

EVANS, Joyce J.; SHOEMAKER, Craig A.; KLESIOUS, Phillip H. Experimental *Streptococcus iniae* infection of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*) by nares inoculation. **Aquaculture**, v. 189, n. 3, p. 197-210, 2000.

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

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

_____. Fisheries and Aquaculture Department. Environmental impact assessment and monitoring in aquaculture: requirements, practices, effectiveness and improvements. Rome, 648p. **Fisheries and Aquaculture Technical Paper**, 527, 2009.

_____. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2010**. Roma, 2012.

FASOLA, ELIZABETH.; LIVDAHL, CAROL.; FERRIERI, PATRICIA. Molecular analysis of multiple isolates of the major serotypes of group B

streptococci. **Journal of clinical microbiology**, v. 31, n. 10, p. 2616-2620, 1993.

FEARON, D.T.; LOCKSLEY, R.M. The instructive role of innate immunity in the acquired immune responses, **Science**, v.273, p.50-53, 1996.

FERRIERI, P. Surface-localized protein antigens of group B Streptococci. **Reviews of Infectious Diseases**, v.10, n.2, p.363-366, 1988.

FIGUEIREDO, H. C. P. et al. ***Streptococcus agalactiae* associado à meningoencefalite e infecção sistêmica em tilápia do Nilo (*O. niloticus*)**. Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, 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, Viçosa**, v. 37, p. 8-14, Suplemento Especial, 2008

FILHO C.I. et al. Histological finding of experimental *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapias (*Oreochromis niloticus*). **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 2, n. 1, p.12-12, 2009

FITZSIMMONS, K. Tilapia: the most important aquaculture species of the 21 st century. In: INTERNATIONAL SIMPOSIUM ON TILAPIA AQUACULTURE, 5., 3-7sept. *Proceedings...* Rio de Janeiro: American Tilapia Association, ICLARM, V.1, P.3-8, 2000.

FORATTINI, O.P. Ecologia, epidemiologia e sociedade. São Paulo: **Editora da Universidade de São Paulo-EDUSP**, 529p, 1992.

GARCIA, Julio C. et al. Non-infectivity of cattle *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* and channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **Aquaculture**, v. 281, n. 1, 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, Lisboa, v. 101, p. 25-35, 2006.

GOMES, M. J. P. Gênero *Streptococcus* spp. 2013. FAVET-UFRGS Disponível em: <http://www.ufrgs.br/labacvet/files/G%C3%AAnero%20Streptococcus%204-2013-1.pdf>. Acesso em junho de 2014.

GRIMHOLT, Unni .et al. Molecular cloning of major histocompatibility complex class I cDNAs from Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Immunogenetics**, v. 37, n. 6, p. 469-473, 1993.

GRISEZ, L.; OLLEVIER, F. *Vibrio Listonella anguillarum* infections in marine fish larviculture. In: LAVENS, P., JASPERS, E., ROELANDS, I. (Ed.) *Larvi'91: fish and crustacean larviculture symposium*. **European Aquaculture Society**, Gent, n. 24, special publication, p.497. 1995.

GUDDING, R.; LILLEHAUG, A.; EVENSEN, Ø. Recent developments in fish vaccinology. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 72, n. 1, p. 203-212, 1999.

HAUGE, M. et al. Population structure of *Streptococcus agalactiae* reveals an association between specific evolutionary lineages and putative virulence factors but not disease. **Infect and Immunity**, v.64, n.3, p.919-925, 1996.

HASTEIN, T.; GUDDING, R.; EVENSEN, O. Bacterial vaccines for fish-an update of the current situation worldwide. **Developments in Biologicals**, Basel, v. 121, p. 55-74, 2005.

HERNANDEZ, E.; FIGUEROA, J.; IREGUI, C. Streptococcosis on a red tilapia, *Oreochromis sp.*, farm: acase study. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 32, p. 247-252, 2009.

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

JARVA, H. et al. Complement resistance of Streptococci. **Molecular immunology**, v.40, p.95-107, 2003.

JIMÉNEZ, A. et al. Evaluating a nested-PCR assay for detecting *Streptococcus agalactiae* in red tilapia (*Oreochromis sp.*) tissue. **Aquaculture**, v. 321, n. 3, p. 203-206, 2011.

JONES. D. Composition and differentiation of the genus *Streptococcus* IN: F.A. SKINNER AND L.B. QUESNEL (EDITORS). *Streptococci*. Society for Applied Bacteriology Symposiums, Series n. 7. Academic Press, London. p. 149. 1978.

JÜRGENS, D.; STERZIK, B.; FEHRENBACH, F. J. Unspecific binding of group B streptococcal cocytolysin (CAMP factor) to immunoglobulins and its possible role in pathogenicity. **The Journal of experimental medicine**, v. 165, n. 3, p. 720-732, 1987.

MOLINARO, E. M. et al. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde, v. 4. 2009.

HARDIE, J.M.; WHILEY, R.A. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**, v.83, n. S1, p.1–11, 1997.

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

KLESIOUS, P. H.; EVANS, J. J.; SHOEMAKER, C. A. Warmwater fish vaccinology in catfish production. **Animal Health Research Reviews**, v. 5, n. 02, p. 305-311, 2004.

KILLIAN M. *Streptococcus* and *Lactobacillus*. In: TOPLEY E WILSON'S MICROBIOLOGY AND MICROBIAL INFECTIONS. Collier, L., Balows, A and Sussman, M (eds). Volume 2: Systematic Bacteriology. Balows, A; Duerden B.I. (vol Eds), Arnold (Hodder Headline Group), 635- 658, 1998.

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

LANCEFIELD, R.C. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. **Journal of Experimental Medicine**, v.57, p.571-595, 1933.

LIU, G.Y,H.; NIZET, V. Extracelular Virulence factors of group B Streptococci. **Frontiers of Bioscience**, v.9, p.1794-1802, 2004.

MAIONE, D. et al. Identification of a universal Group B streptococcus vaccine by multiple genome screen. **Science**, v. 309, n. 5731, p. 148-150, 2005.

MARTINS, E. R. et al. Analysis of group B streptococcal isolates from infants and pregnant women in Portugal revealing two lineages with enhanced invasiveness. **Journal of clinical microbiology**, v. 45, n. 10, p. 3224-3229, 2007.

MINAMI, T. et al. A beta-hemolytic Streptococcus isolated from cultured yellowtail. **Fish pathology**, 1979.

MOLINARO, E.; CAPUTO, L.; AMENDOEIRA, R. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratório de saúde**, Fundação Osvaldo Cruz, volume 1, 156 p. 2009.

MORAES, C. M. et al. Recombinant protein M detects antibodies induced by Streptococcus equi strains isolated from cases of strangles. In: INTERNATIONAL VETERINARY IMMUNOLOGY SYMPOSIUM, Ouro Preto, MG. Anais do 8th International Veterinary Immunology Symposium: Brazilian Society for immunology, . p.74. 2007

MSD SAÚDE ANIMAL. **AQUAVAC® STREP Sa: resumo da bula. 2015.**
Disponível em: <http://www.msd-saude-animal.com.br/products/AQUAVAC_/020_Resumo_da_Bula.aspx>. Acesso em: 2 maio. 2015.

NAKANISH, T.; OTOTAKE, M. Antigen uptake and immune responses after immersion vaccination. In:GUDDING R. et al. **Fish Vaccinology**, v. 90 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, n. 31, p. 3764-3769, 2002.

NGUYEN HT, KANAI K, YOSHIKOSHI K. Immunohistochemical examination of experimental *Streptococcus iniae* infection in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. **Fish Pathology**. v. 36, n. 3, p.169-178, 2001

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

PASNIK, D. J., EVANS, J. J., KLESIUS, P. H. **Duration of protective antibodies and correlation with survival in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* following *Streptococcus agalactiae* vaccination.** Diseases Aquatic Organisms. v. 66, n. 2, p. 129-134, 2005.

PARK, Y. K. et al. **Antibiotic susceptibility and resistance of *Streptococcus iniae* and *Streptococcus parauberis* isolated from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*).** Veterinary Microbiology, Amsterdam, v. 136, n. 1-2, p. 76-81, 2009.

PAVANELLI, G.C.; EIRAS, J.C.; TAKEMOTO, R.M.; **Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento.** Maringá: Eduem, 311p., 3ed., 2008.

PEREIRA, U. P. et al. **Genotyping of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from fish, human and cattle and their virulence potential in Nile tilapia.** Veterinary Microbiology., v. 140, n. 1-2, p.186-192, 2010.

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

PRETTO-GIORDANO, L.G. et al. Efficacy of na experimentally inactivated *Streptococcus agalactiae* vaccine in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in Brazil. **Aquaculture Research**, v. 41, n. 10, p. 1539-1544, 2010.

RODRIGUES, E. Pesquisa de Aeromonas spp. em tilapia (*Oreochromis niloticus*), cultivada no Estado do Rio de Janeiro – Brasil: Isolamento, identificação de espécies e avaliação da sensibilidade antimicrobiana. 210f. **Tese** – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói. 2007

ROMANO, L. A.; MEJÍA, J. **Infección por *Streptococcus iniae*: Una enfermedad emergente que afecta a peces de cultivo ya humanos.** Revista AquaTIC, v. 18, p. 25-32, 2003.

RUBIO-GODOY, M. **Inmunología de los peces óseos: Revisión.** Revista Mexicana Ciencias Pecuária, v. 1, p. 47-57. 2010.

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

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**, Londrina, v. 24, n. 1, p. 35-42, 2003.

SHERMAN, J.M. The Streptococci. **Bacteriological Reviews**, v.1, p.3 - 97, 1937.

SHOEMAKER, C.; KLESIOUS, P. Streptococcal disease problems and control: a review. **Tilapia Aquaculture**, v.2, p.671-680, 1997.

SHOEMAKER, C. A. et al. Protection against heterologous *Streptococcus iniae* isolates using a modified bacterin vaccine in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). **Journal of fish diseases**, v. 33, n. 7, p. 537-544, 2010.

SCAPIGLIATI, G.; ROMANO, N.; ABELLI, L. Monoclonal antibodies in fish immunology: identification, ontogeny and activity of T and B – lymphocytes. **Aquaculture**, v.172, p.3-28, 1999.

SKALKA B.; SMOLA, J. Lethal effect of CAMP-factor and UBERISfactor-- a new finding about diffusible exosubstances of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus uberis*. **Zentralbl Bakteriol A** v.249, p.190- 194, 1981.

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 and Shellfish Immunology**, London, 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**, Amsterdam, v. 246, n. 1-4, p. 37- 61, 2005.

WONGSATHEIN, D. Factors affecting experimental *Streptococcus agalactiae* infection in tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Dissertation**, Institute of Aquaculture, University of Stirling. 2012.

VANDAMME, P. et al. *Streptococcus difficile* is a nonhemolytic Group B, tipe Ib *Streptococcus*. **International Journal Systematic Bacteriology**, v.47, n.1, p.81-85, 1997.

VANDENBERG, Grant W. Oral vaccines for finfish: academic theory or commercial reality?. **Animal Health Research Reviews**, v. 5, n. 02, p. 301-304, 2004.

WATTS, M; MUNDAY, B.L; BURKE, C.M. cDNA sequences and organization of IgM heavy chain genes in two holostean fish. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 19, p. 153-164, 2001.

ZAPATA, A.G.; CHIBA, A.; VARAS, A. Cells and Tissues of the Immune System of Fish. In: IWAMA, G., NAKANISHI, T. The fish immune system. London: **Academic Press**, p.1-62. 1996.

ZLOTKIN, A.; HERSHKO, H.; ELDAR, A. Possible transmission of *Streptococcus iniae* from wild fish to cultured marine fish. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 10, p. 4065-4067, 1998.