



**INSTITUTO LATINO-AMERICANA
DE CIÊNCIA DA VIDA E DA
NATUREZA**

(ILACVN)

BIOTECNOLOGIA

**AVALIAÇÃO EM LARGA ESCALA DE UMA VACINA BIVALENTE CONTRA
INFECÇÃO POR *Aeromonas hydrophila* E *Streptococcus agalactiae* EM
TILÁPIAS-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*)**

ANGELO GABRIEL VIDAL DOS SANTOS

Foz do Iguaçu

2021



**INSTITUTO LATINO-AMERICANA
DE CIÊNCIA DA VIDA E DA
NATUREZA**

(ILACVN)

BIOTECNOLOGIA

**AVALIAÇÃO EM LARGA ESCALA DE UMA VACINA BIVALENTE CONTRA
INFECÇÃO POR *Aeromonas hydrophila* E *Streptococcus agalactiae* EM
TILÁPIAS-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*)**

ANGELO GABRIEL VIDAL DOS SANTOS

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto Latino-Americano
Da Ciência Da Vida e Da Natureza da
Universidade Federal da Integração
Latino-Americana, como requisito parcial à
obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia.

Orientador: Kelvinson Fernandes Viana

**Foz do Iguaçu
2021**



ATA DE DEFESA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Ao dia 29 do mês de setembro do ano de 2021, realizou-se a apresentação pública de defesa do Trabalho de Conclusão de Curso, intitulado “***AVALIAÇÃO EM LARGA ESCALA DE UMA VACINA BIVALENTE CONTRA INFECÇÃO POR *Aeromonas hydrophila* E *Streptococcus agalactiae* EM TILÁPIAS-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*)***”, apresentado pelo discente Angelo Gabriel Vidal dos Santos, do curso de Biotecnologia. Os trabalhos foram iniciados às 15:00, pelo docente orientador Kelvinson Fernandes Viana presidente da banca examinadora, juntamente com o docente Arcangelo Augusto Signor e o docente Flávio Luiz Tavares.

Observações da Banca Examinadora:

Atender as exigências feitas pela banca.

A Banca Examinadora, ao término da apresentação oral e da arguição do acadêmico, encerrou os trabalhos às 16:40. Os examinadores atribuíram as seguintes notas:

orientador(a)	nota final: 9,5	Média final: 9,5
docente	nota final: 9,3	
docente	nota final: 9,8	

Proclamado o resultado pelo presidente da banca examinadora, encerraram-se os trabalhos e, para constar, eu Kelvinson Fernandes Viana lavrei a presente Ata que assino juntamente com os demais membros da banca.

Foz do Iguaçu, 29 de setembro de 2021.

Assinaturas:

Dr. Kelvinson Fernandes Viana	Orientador	
Dr. Arcangelo Augusto Signor	Membro Externo	
Dr. Flávio Luiz Tavares	Membro Interno	

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha mãe por sempre estar presente para me apoiar durante toda a minha caminhada, sem você jamais teria chegado até aqui.

Ao meu avô que me ensinou a nunca desistir e a brigar pelo meu lugar no mundo. E a minha avó por todos ensinamentos e criação.

Ao meu orientador, Dr. Kelvinson Viana, pelos ensinamentos que me auxiliaram na minha formação.

A Adrieli Barboza de Souza e a Me. Açucena Veleh Rivas, companhias recorrentes no laboratório, presentes nos “perrengues” e acertos dos experimentos, e que sempre se dispuseram a me ajudar e apoiar.

Ao Sr. Estevão Martins de Souza e a Alquimia Pescados pelo apoio na realização dos testes. Ao Me. Gilson Bueno Junior que cedeu seu tempo e conhecimento para auxiliar no desenvolvimento do projeto.

Aos meus amigos e amigas que fiz durante esses anos na UNILA pelo companheirismo, amizade e risadas que tivemos e várias que virão.

Aos professores pela dedicação no ensino e pelos conhecimentos que se dispõem a repassar.

A Fundação Araucária pelo financiamento do projeto.

RESUMO

A tilapicultura brasileira se expandiu nas últimas décadas e se consolidou como principal atividade aquícola do país. Em 2020 a produção nacional foi de cerca de 500.000 toneladas de tilápia, sendo o Paraná o maior produtor desta espécie, com destaque para a região Oeste do estado. O crescimento da atividade exigiu a necessidade da incorporação de tecnologias para o aumento da produtividade e da qualidade do produto nacional. Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de uma vacina bivalente para o controle de *Streptococcus agalactiae* e *Aeromonas hydrophila* e avaliar a efetividade na produção de tilápias em tanques-rede. A vacina foi produzida utilizando cepas isoladas em cultivos no lago de Itaipu. Na formulação foram utilizados o antígeno bacteriano inativado por formalina na concentração de 1×10^7 células/dose para cada bactéria e o adjuvante oleoso MONTANIDE™ ISA. No teste em larga escala foram utilizados 12000 animais, com peso variando entre 80 e 120 g, divididos em dois grupos, controle e vacinado, alocados em 8 tanques-rede com densidade de 150 animais/m³ e alimentados 3 vezes por dia. Para a vacinação, os animais foram sedados em solução contendo eugenol na concentração de 100 mg/L. A vacina foi administrada via intraperitoneal no volume de 50 µL. O acompanhamento do peso dos animais foi feito mensalmente. Os resultados mostram a redução da mortalidade no grupo vacinado (3,72%) em relação ao controle (8,70%), além disso, os animais vacinados tiveram um ganho de massa de aproximadamente 21% a mais que o controle. Assim, a vacina bivalente oleosa desenvolvida neste trabalho foi capaz de reduzir a mortalidade, com uma eficácia de 57,17%, e melhorar a conversão alimentar dos animais.

RESUMEN

El cultivo de tilapia en Brasil se expandió en las últimas décadas y se consolidó como la principal actividad acuícola del país. En 2020, la producción nacional fue de alrededor de 500.000 toneladas de tilapia, siendo Paraná el mayor productor de esta especie, con énfasis en la región oeste del estado. El crecimiento de la actividad demandó la necesidad de incorporar tecnologías para incrementar la productividad y calidad del producto nacional. Este trabajo tuvo como objetivo desarrollar una vacuna bivalente para el control de *Streptococcus agalactiae* y *Aeromonas hydrophila* y la efectividad en cultivos de tilapia en tanques de red. La vacuna se produjo utilizando cepas aisladas de cultivos en el lago de Itaipu. En la formulación se utilizó el antígeno bacteriano inactivado por formalina a una concentración de 1×10^7 células/dosis para cada bacteria y el adyuvante oleoso MONTANIDE™ ISA. En la prueba a gran escala, se utilizaron 12.000 animales que pesaban entre 80 y 120 g, divididos en dos grupos, control y vacunados, alojados en 8 tanques de red a una densidad de 150 animales / m³ y alimentados 3 veces al día. Para la vacunación, los animales se sedaron en una solución que contenía 100 mg / L de eugenol. La vacuna se administró por vía intraperitoneal en un volumen de 50 µL. El seguimiento del peso de los animales se realizó mensualmente. Los resultados muestran una reducción de la mortalidad en el grupo vacunado (3,72%) en comparación con el control (8,70%), además, los animales vacunados tuvieron una ganancia de masa de aproximadamente un 21% más que el control. Así, la vacuna bivalente oleosa desarrollada en este trabajo logró reducir la mortalidad, con una eficacia del 57,17%, y mejorar la conversión alimenticia de los animales.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Principais produtores mundiais de tilápia-do-Nilo.

Figura 2. Principais estados produtores de tilápia-do-Nilo.

Figura 3. Isolamento das cepas bacterianas.

Figura 4. Cultivo de cepas isoladas de *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae*.

Figura 5. Formulação da vacina oleosa bivalente.

Figura 6. Área de produção no lago de Itaipu.

Figura 7. Vacinação intraperitoneal dos animais .

Figura 8. a. Mortalidade dos animais vacinados e controle. **b.** Comparação da mortalidade diária dos animais vacinados e controles.

Figura 9. Animais com sinais clínicos de infecção.

Figura 10. a. Evolução da média do peso dos animais do grupo vacinado e controle; **b.** Comparação entre peso médio final dos animais tanques vacinados e controles.

Figura 11. Animais após 118 dias da vacinação.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultado da identificação bioquímica da *Streptococcus agalactiae*.

Tabela 2. Resultado da identificação bioquímica da *Aeromonas hydrophila*.

Tabela 3. Mortalidade e taxa de sobrevivência.

Tabela 4. Conversão alimentar dos grupos controle e vacinado durante o período do estudo

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO	9
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	11
2.1 TILAPICULTURA	11
2.2 DOENÇAS BACTERIANAS DA PISCICULTURA	13
2.2.1 <i>Aeromonas hydrophila</i>	13
2.2.2 <i>Streptococcus agalactiae</i>	14
2.3 USO DE ANTIBIÓTICOS NA PISCICULTURA	15
2.4 SISTEMA IMUNE DE PEIXES	15
2.5 VACINAÇÃO DE PEIXES	17
3 OBJETIVOS	18
3.1 GERAL	18
3.2 ESPECÍFICOS	18
4 METODOLOGIA	19
ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS	19
IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS ISOLADAS	19
SOROTIPAGEM DA CEPA ISOLADA DE <i>Streptococcus agalactiae</i>	19
PRODUÇÃO DA VACINA BIVALENTE	20
DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	21
VACINAÇÃO	22
ANÁLISES DOS DADOS	23
5 RESULTADOS	24
5.1 IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DAS BACTÉRIAS <i>Aeromonas hydrophila</i> E <i>Streptococcus agalactiae</i>	24
5.2 EFICÁCIA DA VACINAÇÃO NA REDUÇÃO DA MORTALIDADE	26
5.3 EFEITO DA VACINAÇÃO SOBRE O GANHO DE PESO E A CONVERSÃO ALIMENTAR	27
6 DISCUSSÃO	29
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	33
REFERÊNCIAS	34
ANEXOS	39

1 INTRODUÇÃO

O cenário nacional da produção de pescado tem sido impulsionado com crescimento médio em torno de 5% ao ano. Fatores como regulamentação da produção em reservatórios de hidroelétricas e ampliação do mercado consumidor interno, somado a exportação criam um cenário ideal para a expansão da piscicultura nos próximos anos (PEIXEBR, 2021; VICENTE, 2014). O crescimento da atividade e a internacionalização da comercialização exige a modernização e o planejamento dos cultivos. A introdução de novas tecnologias e técnicas de manejo e o melhoramento genético dos animais são essenciais para garantir alto rendimento e a competitividade do pescado nacional.

A piscicultura comercial em alta densidade provoca alterações nos sistemas de produção e o surgimento de surtos de doenças virais e bacterianas devido a problemas como estresse, má nutrição e queda da qualidade da água. Na produção de tilápia as principais bactérias patogênicas são *Aeromonas spp.*, *Edwardsiella spp.*, *Flavobacterium columnare*, *Francisella spp.* e *Streptococcus spp.* (HUICAB-PECH et al., 2016; DELPHINO et al., 2018). O uso de medicamentos antibióticos para o controle dessas infecções tem criado problemas ambientais e sanitários, relacionados à contaminação de mananciais de águas, bioacumulação em organismos e surgimento de organismos de multirresistência (OSMAN et al., 2017; MIRANDA, 2013; RIGOS, 2005).

A vacinação já é uma tecnologia de manejo consolidado em sistemas produtivos em países da Europa e Estados Unidos desde a década de 70. Em cultivos de trutas e salmões, os animais são amplamente vacinados e mostraram a redução do uso de fármacos antibióticos e aumento da produção (HASTEIN et al., 2005). No Brasil, apesar da grande produção de tilápia, há o licenciamento de apenas um produto direcionado a vacinação contra a infecção por *Streptococcus agalactiae*.

As metodologias de vacinação e tecnologias de produção de imunizantes têm sido amplamente estudadas a fim de melhorar o estímulo ao sistema imunológico dos peixes (MUNANG'ANDU, 2016). Atualmente, a imunização dos animais é feita principalmente por injeção intraperitoneal (i.p.) e adição ao alimento introduzindo a

vacina no organismo via oral. A aplicação via i.p. é uma via laboriosa e de alto custo para a aplicação, no entanto, apesar das desvantagens, esta via tem dado melhores resultados na redução da mortalidade e na duração da resposta imune (EVANS et al, 2004). Os antígenos inativados são mais viáveis para a piscicultura, no entanto, diversos autores têm desenvolvido tecnologias recombinante e vacinas gênicas para uso em peixes (MA et al., 2017, BALLESTEROS et al., 2014).

Diante deste cenário, este trabalho teve como objetivo desenvolver uma vacina nacional para o controle de *Streptococcus agalactiae* e *Aeromonas hydrophila*, e realizar a avaliação em cultivo de tilápias em tanques-rede no lago de Itaipu, região Oeste do Paraná.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 TILAPICULTURA

A tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) pertence a um grupo de Ciclídeos com origem na África e Oriente Médio (DUNZ, 2013). Esta espécie é a segunda espécie mais cultivada no mundo, tendo presença em mais de 120 países. Em 2018, a produção mundial de tilápia-do-Nilo foi de cerca de 4,5 milhões de toneladas (FAO, 2020). A introdução no Brasil da tilápia ocorreu entre as décadas de 1970 e 1980, com o objetivo de povoamento de reservatórios de hidrelétricas e açudes, os estados do Nordeste e Sudeste receberam grande quantidade de alevinos (KUBITZA, 2003). A partir de 1990, a industrialização da produção e o aperfeiçoamento do cultivo impulsionam a tilapicultura, tornando o país um dos maiores produtores globais da espécie, ficando atrás apenas da China, Indonésia e Egito (Figura 1).

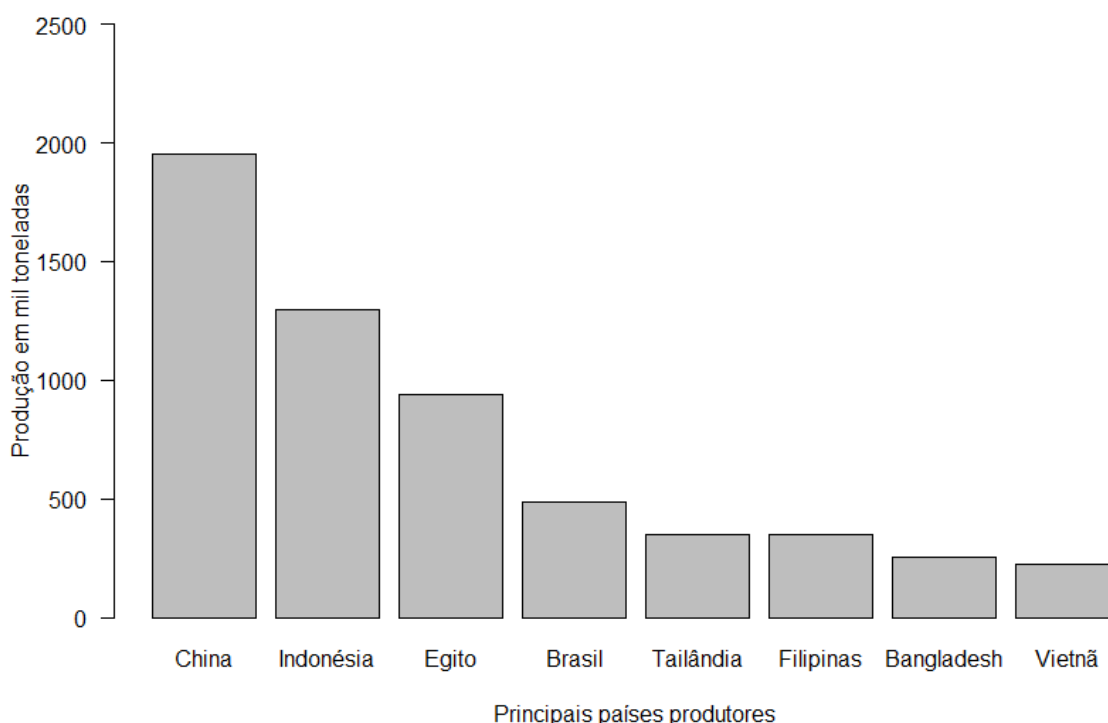


Figura 1. Principais produtores mundiais de Tilápia-do-Nilo.

Fonte: Adaptado PEIXEBR, 2021.

A piscicultura brasileira sofreu muitas transformações nos últimos anos, consolidando-se como importante atividade no agronegócio brasileiro, substituindo os peixes provenientes do extrativismo (FIRETTI et al., 2007; VICENTE, 2014). Em 2020, foram produzidas 802.930 toneladas do produto, representando a 3ª maior piscicultura do planeta (PEIXEBR, 2021). A tilápia tem uma atenção especial nesses números, 60,6% (486.155 toneladas) do pescado nacional são desta espécie. No entanto, os peixes nativos possuem papel importante representando cerca de 38% da produção total (PEIXEBR, 2021).

No cenário nacional, a produção de tilápia se concentra na região centro-sul, com liderança do Paraná que, em 2020, produziu cerca de 166 toneladas, o que equivale a 34% da tilápia nacional (Figura 2) (PEIXEBR, 2021). Fatores como a grande área territorial com extensa bacia hidrográfica, o clima tropical, amplo mercado interno e a produção nacional de grãos conferem um grande potencial para a piscicultura no país (SCHULTER, 2017). Apesar desse potencial, a produção de peixes no país ainda é abaixo do esperado.

A carne da tilápia possui ampla aceitação nos mais diferentes mercados, dentro e fora do país, com um amplo espaço para exportação de seu filé. Além disso, a carne de tilápia é saborosa, de cor branca e com baixo teor de gordura. A tilápia tem se destacado pela gama de produtos que fazem parte da sua linha de comercialização (VIDOTTI, 2006).

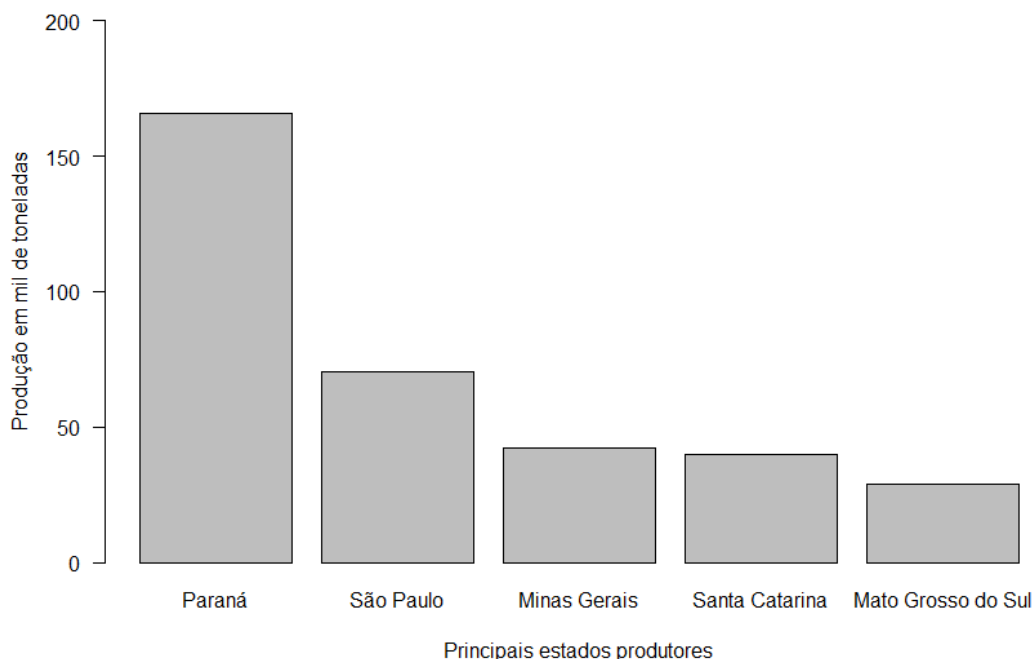


Figura 2. Principais estados produtores de Tilápia-do-Nilo.

Fonte: Adaptado PEIXEBR, 2021.

2.2 DOENÇAS BACTERIANAS DA PISCICULTURA

As doenças bacterianas são motivo de preocupação constante na piscicultura, pois são responsáveis por altas taxas de mortalidade (HUICAB-PECH et al., 2016). Além disso, podem causar lesões que inviabilizam a comercialização desses animais e consequentemente causam grandes perdas econômicas. O desenvolvimento da piscicultura no Brasil, são necessárias técnicas capazes de minimizar esses efeitos causados pelas bactérias.

As principais bactérias patogênicas em tilápias são: *Aeromonas spp.*, *Edwardsiella spp.*, *Flavobacterium columnare*, *Francisella spp.* e *Streptococcus spp.*, sendo comum a ocorrência de co-infecção (DELPHINO et al., 2018). Estas bactérias são comuns no ambiente de cultivo e afetam os animais de forma oportunista. Fatores como a redução da qualidade da água, estado nutricional débil, variações bruscas da temperatura da água e outras formas de estresse estão relacionados ao surgimento de doenças na piscicultura. As infecções costumam ocorrer

principalmente nos rins, coração, baço, intestino e fígado, com quadro clínico, de modo geral, caracterizado por anemia, ruptura de vasos internos, hipertrofia do baço, hemorragias e septicemia, causando perdas econômicas pela perda da atratividade do produto e morte dos animais (ABDEL-LATIF et al., 2020).

2.2.1 *Aeromonas hydrophila*

O gênero *Aeromonas* é responsável pela doença conhecida como "septicemia por *Aeromonas* móveis". Este grupo de bactérias não esporulantes e flageladas, é bioquimicamente caracterizado como catalase e oxidase positiva, gram-negativo e que fermenta glicose, com ou sem produção de gás (ALI, 2016). A *Aeromonas hydrophila* cresce em ambientes não salinos e com pH superiores a 6,0, com temperaturas em torno de 28°C, apesar de já ter sido relatado crescimento destas em temperaturas frias (JANDA, 2010).

Os sinais clínicos evoluem de acordo com o quadro da infecção. As lesões são comumente vistas nas brânquias, fígados, rins, baço, músculos, cérebros e olhos dos peixes infectados (ALYAHYA et al., 2018). Os tecidos afetados apresentam infiltração de células leucocitárias, congestão dos vasos sanguíneos e hemorragias. O fígado e os rins tendem a apresentar tons pálidos e esverdeados e os danos, em casos mais graves, levam à perda funcional (EL LATIF et al., 2019; MAHROUS et al., 2020). Nos intestinos as lesões comuns observadas são a infiltração neutrofílica, encurtamento e descamação das vilosidades, congestão e edema (NGAMKALA et al., 2020).

2.2.2 *Streptococcus agalactiae*

As estreptococoses são causadas em peixes principalmente por *Streptococcus agalactiae* (EVANS et al., 2002a; SHELBY et al., 2002), que possui como características, a forma cocos, gram positivas e catalase e oxidase negativas (AL-HALBI, 1994). A espécie possui dez sorotipos (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII) baseados na classificação da composição dos polissacarídeos capsulares. No

Brasil, este patógeno é descrito em cultivos de tilápia desde 2006 (Figueiredo et al., 2006). Nos últimos anos, tem-se observado uma elevação da ocorrência de casos clínicos associados a *S. agalactiae* em diferentes regiões geográficas, o que levou o mesmo a ser considerado patógeno emergente para peixes em ambientes de água doce ou marinho (EVANS et al., 2002b).

A patogenicidade alta dessas bactérias podem gerar grandes perdas na produção, induzindo morbidade e mortalidade elevada (PRETTO-GIORDANO et al., 2010a). Durante a infecção por *Streptococcus spp.* são comuns o surgimento de forma de abscessos multifocais na musculatura dos animais, denominada de "*gulf ball disease*" ou de maneira clássica (septicêmicos e meningoencefalites) (ELDAR et al., 1995). Somado a isso, os sinais clínicos também incluem natação errática e em rodopios, exoftalmia unilateral ou bilateral, perda de escamas, escurecimento do tegumento, anorexia, excitabilidade e morte dos animais (AMAL, 2011).

Como doença zoonótica, há o risco de infecção de humanos por linhagens de *S. agalactiae* em decorrência do contato ou ingestão de peixe cru infectado, podendo desenvolver quadros de celulite, artrite, endocardite, meningite neonatal e sepse (doença de início precoce e tardio) (CHU et al., 2016; NASCIMENTO et al., 2019).

2.3 USO DE ANTIBIÓTICOS NA PISCICULTURA

Há necessidade de práticas de manejo adequadas para o controle e prevenção das doenças bacterianas na piscicultura devido à crescente expansão da atividade no mundo. Atualmente o uso de antibióticos e a vacinação são as principais formas para conter as doenças bacterianas, em adição, novas abordagens têm sido estudadas. Os principais fármacos utilizados para o controle de bactérias em peixes, Florfenicol e Oxitetraciclina, são aplicados via incorporação em ração ou diretamente no sistema de cultivo. No entanto, os problemas gerados pela acumulação e persistência desses compostos no ambiente, a resistência bacteriana e os riscos à saúde humana têm preocupado os pesquisadores e autoridades sanitárias (RIGOS, 2005).

O crescimento da produção mundial e a baixa regulação do setor impulsionam o uso descontrolado de antibióticos, evidenciando os riscos ambientais e a saúde. Além disso, bactérias comumente encontradas em peixes já foram relatadas como resistentes a antibióticos de importância médica e de uso na aquicultura, como as tetraciclina, beta-lactâmicos e fenicol (OSMAN et al., 2017; MIRANDA, 2013). Somado a isso, a ampliação do número de cepas resistentes pode ser favorecida pelos mecanismos de transferência horizontal de genes de resistência, acentuando os riscos de novas “superbactérias” (HUDDLESTON, 2014).

2.4 SISTEMA IMUNE DE PEIXES

A resposta imune é constituída de dois tipos, inata e adaptativa, que trabalham em conjunto para a proteção dos animais. Muitos de seus elementos são compartilhados entre os vertebrados superiores, mostrando padrões conservados ao longo da evolução desde grupo (ZHU et al, 2014; SUNYER, 2012). Os peixes teleósteos possuem um sistema imune estruturado e dotado de células fagocíticas, moléculas de MHC classe I e II, vários tipos de receptores TLR, receptores de células T, receptores de células B e imunoglobulinas, assim como os mamíferos (PALTÍ, 2011; SHAO, 2015). Além disso, este grupo de animais carrega um tipo peculiar de células B, com habilidades fagocíticas e microbicidas, apresentação de antígenos, modulação de citocinas e produção de anticorpos destas células (LI et al., 2006; WU et al, 2020).

A resposta humoral tem como componente as imunoglobulinas (Ig), glicoproteínas secretadas por plasmócitos, constituídas por duas cadeias de aminoácidos leves e duas cadeias de aminoácidos pesadas, que juntas formam dois sítios de ligação desta molécula. Em peixes teleósteos há três principais classes de Ig já relatadas, IgM, IgD e IgT / IgZ, que realizam a detecção e neutralização de patógenos que invadem o organismo, além de atuar em vias fagocíticas responsáveis pela liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias que ativam células T (WU et al., 2020; MUNANG'ANDU, 2015). Shelby (2002) e Dong (2020) mostram o importante papel destes anticorpos na resposta imunológica contra as infecções bacterianas.

As moléculas de IgM são as mais abundantes e estão envolvidas em processos de imunidade adaptativa sistêmicos (Yu et al., 2020). Já IgT/IgZ são moléculas relacionadas à imunidade de mucosa, similar a IgA em mamíferos, sendo encontrada principalmente em nasofaringe, pele, intestinos e tecidos linfóides associado a mucosa, sua função está relacionada ao controle da homeostase da microbiota e patógenos nesses órgãos (HANSEN et al., 2005; DANILOVA et al., 2005; XU et al., 2020; ZHANG, 2010). Sabe-se pouco sobre o papel das moléculas de IgD na resposta imune, entretanto, estas parecem reagir com as microbiotas comensal das brânquias e intestino (YU et al., 2020).

2.5 VACINAÇÃO DE PEIXES

A vacinação é conhecida como um método seguro e eficaz para o controle de doenças em diferentes espécies de animais de produção. Este método imunoprolático tem ganhado espaço no setor aquícola. Várias metodologias de imunização têm sido testadas para o uso em peixes (GUDDING, 1999; VANDERBERG, 2004; AGNEW, 2007; TONHEIM et al., 2008). O uso comercial das vacinas no setor é datado da década de 70, em países produtores de salmonídeos, com sua aplicação tendo grande sucesso, proporcionando um aumento da produção e redução do uso de quimioterápicos e antibióticos (HASTEIN et al., 2005).

Os antígenos mais utilizados para a produção de imunizantes na aquicultura ainda são as bacterinas inativadas, isto ocorre pelo menor custo e os bons resultados obtidos nos últimos anos com estas vacinas. As bactérias vivas atenuadas e os antígenos recombinantes também têm sido aplicados em peixes (ADAMS, 2019, LI et al, 2019). Em adição, vacinas gênicas estão sendo estudadas para esses animais e alguns trabalhos obtiveram resultados positivos (MA et al., 2017, BALLESTEROS et al., 2014).

As formulações injetáveis têm obtido melhores resultados comparadas com as demais vias e dominam o mercado (EVANS et al., 2004), apesar da laboriosidade e a necessidade de estrutura e mão de obra especializada serem fatores que dificultam a administração por esta via. Trabalhos anteriores utilizando células

inativadas por formalina aplicada via i.p. mostraram ser capazes de gerar imunidade protetora e reduzir a mortalidade (RIVAS, 2018). Na imunização via mucosa, por imersão ou oral, a principal vantagem é a massificação da imunização, permitindo que milhares de animais sejam vacinados ao mesmo tempo, assim, é possível reduzir o impacto sobre o estresse animal e reduzir custos. No entanto, vários trabalhos têm tido dificuldades para a produção de uma resposta imunológica consistente e duradoura com as vacinas orais e por imersão (EVANS et al., 2004; MUNANG'ANDU, 2016). Dessa forma, se mostra necessário, para as vacinas de mucosas, o desenvolvimento de sistemas que garantam a entrega dos antígenos e de adjuvantes (MUTOLOKI, 2015). Além disso, os mecanismos de resposta imune desta via ainda precisam ser melhor compreendidos (MUNANG'ANDU, 2015; BOGWALD, 2019).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Desenvolver uma vacina oleosa bivalente contra a infecção por *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae* para tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) e realizar a avaliação em campo da eficácia em espécies criadas em tanques redes no lago de Itaipu no Oeste do Paraná, Brasil.

3.2 ESPECÍFICOS

- Isolar cepas bacterianas de *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae* em animais produzidos em tanques redes no lago de Itaipu;
- Produzir uma vacina oleosa bivalente contra *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae* em tilápias;
- Administrar por via intraperitoneal a vacina bivalente em tilápias criadas em tanques-rede no reservatório de Itaipu.
- Avaliar a capacidade de proteção da vacina bivalente oleosa contra aeromonas móveis e estreptococose;
- Avaliar os efeitos positivos da vacina no crescimento e no ganho de massa em tilápias-do-Nilo criadas em tanque-rede.

4 METODOLOGIA

ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS

Foram isoladas cepas de *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae* a partir de tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), com sinais clínicos de infecção, criadas em tanque-rede na Região Oeste do Paraná. Destes animais, foram coletados fragmentos de fígado, cérebro e cavidade ocular, que foram incubados em ágar sangue por 72h a 30°C. Os microrganismos presentes foram posteriormente replicados para isolamento das colônias (Figura 3).



Figura 3. Isolamento das cepas bacterianas.

IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS ISOLADAS

As colônias bacterianas encontradas foram analisadas por testes bioquímicos automatizados, para identificação utilizando a plataforma VITEK® (bioMérieux, Inc.) e seguindo as instruções do fabricante.

SOROTIPAGEM DA CEPA ISOLADA DE *Streptococcus agalactiae*

O sorotipo foi determinado a partir de reação de soroaglutinação utilizando o kit Strep B Latex (SSI Diagnostica), seguindo as recomendações do fabricante. Os ensaios foram realizados em parceria com Laboratório de Doenças de Animais Aquáticos (AQUAVET) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

PRODUÇÃO DA VACINA BIVALENTE

As cepas das bactérias obtidas do isolamento foram cultivadas em meio líquido extrato de levedura (Kasvi, Inc.) por 24h em incubadora *shaker* a 32°C e 100 rpm. Para a inativação dos microrganismos, estes foram submetidos a uma solução de formalina 3% por 24h, sob agitação em incubadora *shaker* (Figura 4). A validação do processo de inativação foi feita pelo plaqueamento de uma alíquota de 100 µL em ágar sangue e incubada por 72h. Os antígenos foram lavados 3 vezes com PBS 1X e centrifugados a 3000 RPM por 30 minutos.



Figura 4. Cultivo de cepas isoladas de *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae*.

Para a formulação, as bactérias inativadas foram ressuspensas em PBS 1X na concentração de 1×10^7 células/dose, a contagem das células foi feita com o auxílio da câmara de Neubauer. Para a emulsão, os antígenos foram incorporados ao adjuvante oleoso (MONTANIDE™ ISA), ajustando em pH 7, e armazenada a 2°C (Figura 5).



Figura 5. Formulação da vacina oleosa bivalente.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O teste em campo da vacina foi realizado em parceria com uma piscicultura local, em sistema de cultivo com tanques-redes instalados no lago de Itaipu, na Região Oeste do Paraná, de outubro de 2020 a fevereiro de 2021 (Figura 6).



Figura 6. Área de produção no lago de Itaipu.

Os animais foram divididos em dois grupos (vacinado e controle) com aproximadamente 6000 em cada grupo, somando cerca de 12000 animais no estudo, com peso variando de 80 a 120g. Estes foram alocados em 4 tanques-redes de 10 m³ com 1500 peixes por tanque. Foram realizadas quatro biometrias ao longo do procedimento experimental, sendo uma inicial e a demais com intervalo de cerca de 40 dias entre elas. Para estimar a biomassa, foram feitas a pesagem de 30 animais de cada tanque.

VACINAÇÃO

Para a vacinação os animais foram sedados utilizando eugenol na concentração de 100mg/L. A vacina foi administrada via injeção intraperitoneal aplicando 50µL por peixe (Figura 7). O grupo controle não recebeu nenhum tratamento.



Figura 7. Vacinação intraperitoneal dos animais .

ANÁLISES DOS DADOS

Os dados foram submetidos a teste de médias para comparação dos resultados do grupo tratado e controle utilizando o software GraphPad Prism 7. A eficácia da vacina foi calculada de acordo com Amend (1981):

$$\text{RPS} = (1 - (\text{taxa de mortalidade dos animais vacinados} / \text{taxa de mortalidade dos animais controle})) \times 100.$$

5 RESULTADOS

5.1 IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DAS BACTÉRIAS *Aeromonas hydrophila* E *Streptococcus agalactiae*

As cepas de *Streptococcus agalactiae* e *Aeromonas hydrophila* isoladas foram identificadas (tabelas 1 e 2) e os resultados tiveram probabilidade de certeza de 97% e 99%, respectivamente. A análise de sorotipagem mostrou que a cepa de *S. agalactiae* isolada refere-se ao sorotipo III.

Tabela 1. Resultado da identificação bioquímica da *Streptococcus agalactiae*. Fonte: Autor.

AMY	-	PIPLC	-	dXYL	-	ADH1	+	BGAL	-	AGLU	-
APPA	-	CDEX	-	AspA	-	BGAR	-	AMAN	-	PHOS	+
LeuA	+	ProA	-	BGURr	-	AGAL	-	PyrA	-	BGUR	-
AlaA	+	TyrA	-	dSOR	-	URE	-	POLYB	+	dGAL	+
dRIB	+	ILATk	-	LAC	-	NAG	+	dMAL	+	BACI	+
NOVO	+	NC6.5	+	dMAN	-	dMNE	+	MBdG	+	PUL	-
dRAF	-	O129R	-	SAL	-	SAC	+	dTRE	+	ADH2s	+
OPTO	+										

Descrição: Probabilidade 97%. - = negativo; + = positivo; ADH1 = arginine dihydrolase; ADH2S = arginine dihydrolase; AGAL = alpha-galactosidase; AGLU = alpha-glucosidase; AlaA = alanine arylamidase; AMAN = alpha-mannosidase; AMY = amygdalin; APPA = ala-phe-pro arylamidase; AspA = L-aspartic acid arylamidase; BACI = bacitracin resistance; BGAL = beta-galactosidase; BGAR = b-galactopurinosidase; BGUR = beta-glucorinidase; BGURr = beta-glucorinidase; CDEX = alpha-cyclodextrin; dGAL = galactose; dMAL = maltose; dMAN = mannitol; dMNE = mannose; dRAF = raffinose; dRIB = ribose; dSOR = sorbitol; dTRE = trehalose; dXYL = xylose; LAC = lactose; LeuA = L-leucine arylamidase; ILATK = lactate; MBDG = methyl-beta-D-glucopyranoside; NAG = N-acetyl-glucosamine; NC6.5 = growth in 6.5; NaCl; NOVO = novobiocin resistance; O129R = O/129 resistance; OPTO = optochin resistance; PHOS = alkaline phosphatase; PIPLC = phosphatidylinositol-Phospholipase C; POLYB = polymyxin B resistance; ProA = Pro arylamidase

beta-glucuronidase; PUL = pullulan; PyrA = L-pyrroglutamic acid arylamidase; SAC = sucrose; SAL = salicin; TyrA = tyrosine arylamidase; URE = urease.

Tabela 2. Resultado da identificação bioquímica da *Aeromonas hydrophila*. Fonte: Autor.

APPA	+	ADO	-	PryA	-	IARL	-	dCEL	-	BGAL	+
H2S	+	BNAG	+	AGLTp	-	dGLU	+	GGT	-	OFF	+
BGLU	+	dMAL	+	dMAN	+	dMNE	+	BXYL	-	BAlap	-
ProA	+	LIP	+	PLE	+	TyrA	+	URE	-	dSOR	-
SAC	-	dTAG	-	dTRE	+	CIT	-	MNT	-	5KG	-
ILATk	+	AGLU	-	SUCT	+	NAGA	-	AGAL	-	PHOS	-
GlyA	-	ODC	-	LDC	-	IHISa	-	CMT	+	BGUR	-
O129R	+	GGAA	-	IMLTa	-	ELLM	+	ILATa	-		

Descrição: Probabilidade: 99%. - = negativo; + = positivo; (-) or (+) = reações fracas perto do limiar de teste. 5KG = 5-Keto-D-gluconate; ADO = Adonitol; AGAL = Alpha-galactosidase; AGLTp = Glutamyl Arylamidase pNA; AGLU = Alpha-glucosidase; APPA = Ala-Phe-arylamidase; BAlap = Beta-alanine arylamidase pNA; BGAL = Beta-galactosidase; BGLU = Beta-glucosidase; BGUR = Beta-glucuronidase; BNAG = Beta-N-acetyl-glucosaminidase; BXYL = Beta-xylosidase; CIT = Citrate (Sodium); CMT = Coumarate; dCEL = D-cellobiose; dGLU = D-glucose; dMAL = D-maltose; dMAN = D-manitol; dMNE = D-mannose; dSOR = D-sorbitol; dTAG = D-tagatose; dTRE = D-trelose; ELLM = Ellman; GGAA = Glu-Gly-Arg-arylamidase; GGT = Gamma-glutamyl-transferase; GlyA = Glycine arylamidase; H2S = H2S production; IARL = L-arabitol; IHISa = L-histidine assimilation; ILATa = L-lactate assimilation; ILATk = L-lactate alkalisation; IMLTa = L-malate assimilation; LDC = Lysine decarboxylase; LIP = Lipase; MNT = Malonate; NAGA = Beta-N-acetyl-galactosaminidase; O129R = O/129 Resistance; ODC = Ornithine decarboxylase; OFF = Fermentation/Glucose; PHOS = Phosphatase; PLE = Palatinose; ProA = L-proline arylamidase; PyrA = L-pyrrolydonyl-arylamidase; SAC = Saccharose/Sucrose; SUCT = Succinate alkalisation; TryA = Tyrosine arylamidase; URE = Urease.

5.2 EFICÁCIA DA VACINAÇÃO NA REDUÇÃO DA MORTALIDADE

A vacina se mostrou eficaz na redução da mortalidade. Os tanques do grupo controle e do grupo vacinado tiveram taxa de mortalidade de 7,78% e 3,33%, respectivamente. A porcentagem relativa de sobrevivência (RPS) foi de 57,17 (Tabela 3). Além disso, a taxa de mortalidade diária foi reduzida a menos da metade nos tanques vacinados (Figura 8).

Tabela 3. Mortalidade e taxa de sobrevivência.

	Taxa de mortalidade	RPS	P < 0,05*
Grupo Vacinado	3,33% (200/6000)	57,17%	<0,0001
Grupo Controle	7,78% (467/6000)		

* Calculado utilizando o teste t para comparação da mortalidade entre os tanques vacinados e os tanques controles.

Com relação à taxa de mortalidade, houve significativa diferença nos primeiros 30 dias após a vacinação. Nos períodos subsequentes à aplicação do imunizante a diferença entre os grupos se acentuou. Já a média diária de mortes também foi menor nos tanques vacinados, com este possuindo cerca de 2 mortes por dia, já o grupo controle encerrou com de cerca de 4 mortes diárias (Figura 8).

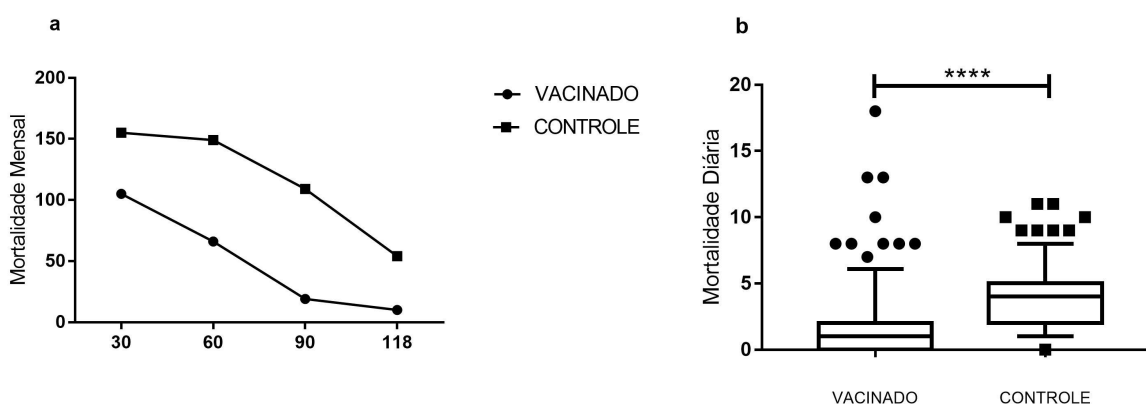


Figura 8. a. Mortalidade dos animais vacinados e controle. **b.** Comparação da mortalidade diária dos animais vacinados e controles. **** A diferença estatística entre a mortalidade foi avaliada com teste de Mann Whitney e mostrou em um nível de significância de $p < 0,05$ um valor de $< 0,0001$.

Ao longo dos cerca de 120 dias de experimento foi detectada a presença de infecções bacterianas nos animais do grupo controle. A avaliação de sinais clínicos mostrou sintomas característicos de estreptococoses e septicemia por aeromonas móveis. No entanto, o estudo não utilizou nenhuma metodologia microbiológica, bioquímica ou molecular para confirmação do diagnóstico clínico dos animais. Os principais sintomas visualizados foram a lesões nas nadadeiras e na pele, distensão do abdômen, exoftalmia, presença de cataratas e natação erradica (Figura 9).



Figura 9. Animais com sinais clínicos de infecção.

5.3 EFEITO DA VACINAÇÃO SOBRE O GANHO DE PESO E A CONVERSÃO ALIMENTAR

Também foi avaliado o ganho de massa nos animais a fim de mensurar o efeito da vacinação sobre a engorda e a conversão alimentar das tilápias (Tabela 4).

Os animais vacinados tiveram maior crescimento do que os animais controle (figuras 10 e 11). Os dois grupos apresentaram padrão similar de engorda durante os primeiros meses, no entanto, ao final observou-se que o grupo vacinado apresentou ganho de massa corpórea por animal próximo a 21% superior ao grupo controle. Somado a isso, também foi observado uma maior homogeneidade no peso médio final dos animais dos tanques vacinados (Figura 11b).

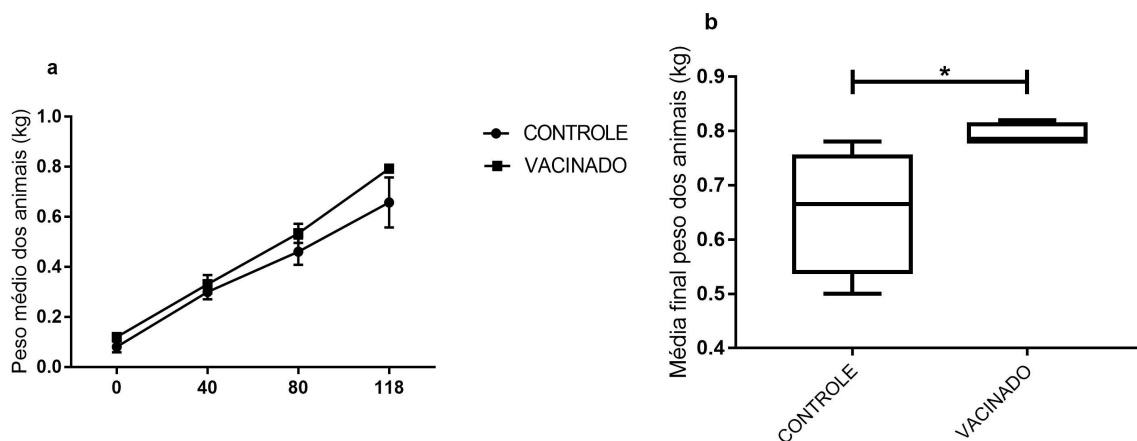


Figura 10. a. Evolução da média do peso dos animais do grupo vacinado e controle; **b.** Comparação entre peso médio final dos animais tanques vacinados e controles. * A diferença estatística entre a média final de peso foi avaliada com teste de Welch's e mostrou em um nível de significância de $p < 0,05$ um valor de $< 0,0459$.



Figura 11. Animais após 118 dias da vacinação.

A conversão alimentar aparente leva em conta a quantidade de ração consumida pelo ganho de biomassa dos animais. A análise deste parâmetro mostrou que os animais imunizados tiveram um melhor aproveitamento da ração em comparação aos não imunizados, sendo capaz de transformar de maneira mais eficiente o alimento em massa corporal, gerando ganhos de 17,04% (Tabela 4).

Tabela 4. Conversão alimentar dos grupos controle e vacinado durante o período do estudo.

	Peso médio final (kg)	Fator de Conversão Alimentar	Ganho (%)
Grupo Controle	0,657 ($\pm$ 0,10)	1,54	17,04
Grupo Vacinado	0,792 ($\pm$ 0,016)	1,27	

6 DISCUSSÃO

O Brasil tem vivido a modernização da piscicultura desde a década de 1990. As mudanças no setor de piscicultura no país, como o aprimoramento das técnicas de cultivo e a inserção de novas tecnologias, impulsionaram a expansão da produção nacional e a internacionalização da comercialização. O Paraná, especialmente a região Oeste, se destaca no cenário nacional, sendo responsável por 34% da tilápia produzida no país (PEIXEBR, 2021). No entanto, apesar das condições favoráveis para o desenvolvimento da atividade, o potencial ainda é subutilizado. Limitações como o custo de produção e dificuldades econômicas e regulatórias dificultam o desenvolvimento do setor (KUBITZA, 2015). Políticas públicas voltadas para ampliação do crédito, a desburocratização e a qualificação da mão de obra é necessário para manutenção da expansão da atividade. Além disso, investimentos na modernização e tecnificação do setor ampliaria a rentabilidade da produção nacional.

A vacinação como método de controle de infecções já é consolidada em outros países com tradição na produção de peixes em cativeiro. As vacinas têm papel importante no aumento da produtividade na piscicultura e são uma forma efetiva de proteção contra infecções (HASTEIN et al., 2005; DELPHINO et al., 2019). Vários estudos têm trabalhado com o desenvolvimento de formulações utilizando diferentes antígenos e formas de administração para a vacinação de peixes (LIU et al., 2016). No entanto, os imunizantes injetáveis de células inteiras inativadas, mesmo com suas limitações, dominam o mercado devido ao seu menor custo e boa efetividade (MZULA et al., 2019). Este tipo de antígeno estimula resposta imune protetora e tem se mostrado seguro e incapaz de reversão à virulência (MUNANG'ANDU et al., 2016; MA et al., 2019).

O uso da vacina bivalente se mostrou eficaz para a redução da mortalidade em tilápias com porcentagem relativa de sobrevivência (RPS) de 57,17%, confirmando a capacidade protetora da vacina inativada. Evans e colaboradores (2004) aplicou antígenos de células inativadas de *S. agalactiae*, via intraperitoneal, em animais com 80g na dose de 1×10^5 células/mL, e reduziu a mortalidade em tilápias com RPS de 80%. Para *A. hydrophila*, de maneira similar, o uso de bacterinas inativadas por formalina também conseguiu produzir resposta imune

duradoura, quando aplicada via intraperitoneal (MONIR et al., 2020). Bailone e colaboradores (2010) avaliaram a resposta imunológica de tilápias vacinadas contra *A. hydrophila* e ressaltaram o aumento da concentração de células de defesa, como linfócitos e monócitos. Bharadwaj (2013) imunizou *Labeo rohita* com antígenos inativados por formalina de *A. hydrophila*, onde estes tiveram RPS de 69% e elevados parâmetros imunológicos, 15 depois do desafio.

A manutenção da proteção por longo período é um dos desafios da vacinologia. A taxa de mortalidade das tilápias se manteve reduzida ao longo dos 118 dias (Figura 1a), mostrando que a vacinação com uma dose protege os animais durante todo período de criação. Pasnik (2005) apontou que a resposta imune gerada é eficaz 180 dias após a vacinação, podendo proteger os animais ao longo do período de cultivo com uma única dose. Cabe ressaltar que os testes de vacinas supracitados foram conduzidos com a infecção experimental dos animais, não realizou-se a infecção experimental para o desafio da vacina. Os animais utilizados no estudo foram submetidos a condições de produção em alta densidade para intensificar a taxa de infecção natural nos tanques redes.

A diversidade de sorotipos dificulta a imunização contra infecções por *S. agalactiae*. No Brasil temos a prevalência do sorotipo Ib, no entanto, o sorotipo III tem grande potencial patogênico, sendo isolado em surtos recentes no nordeste do país (CHIDEROLI et al., 2017). A baixa imunidade cruzada entre sorotipos heterólogos pode reduzir a eficácia das vacinas (SUWANNASANG et al., 2017). Chen e colaboradores (2012) mostraram que a imunidade cruzada das vacinas é reduzida em infecções de sorotipos heterólogos e, também, entre genótipos de PFGE distintos. Diante deste problema, as vacinas autóctones se mostram importantes, pois o isolamento de cepas regionais têm melhor chance de geração de imunidade protetora nas formulações com antígenos inativados.

Os custos de produção são uma das dificuldades enfrentadas pelos criadores de peixes. A vacinação comercial em uma dose com uso de antígenos inativados tem gerado um bom custo-benefício. Pretto-Giordano e colaboradores (2010b) testaram animais de 30 gramas imunizando-os via i.p. com bactérias inativadas por formalina, com uma e duas doses com intervalo de 21 dias, obtendo RPS de 83,6% e 96,6%, respectivamente. Apesar de autores mostrarem que há um aumento de

anticorpos específicos quando são aplicadas duas doses de imunizante (ELDAR, 1997), os problemas logísticos e os custos dificultam o booster vacinal em produções comerciais.

Os adjuvantes são essenciais para melhorar a estimulação imunológica nas vacinas de células inativadas e de subunidades. As emulsões de Montanide ISA demonstram melhores resposta humoral comparado com o hidróxido de alumínio, apesar de gerar uma maior inflamação no sítio de aplicação (HOARE et al., 2017). Zhang e colaboradores (2017) mostraram que os adjuvantes Montanide e o Freund tem resultados semelhantes em *O. niloticus* vacinadas via i.p. com antígenos inativados de *S. agalactiae*, com RPS 74,4 e 76,7, respectivamente, além disso, ambos tiveram titulação de anticorpos e expressão de interleucinas e TNF aumentada nos grupos vacinados. Além disso, o adjuvante Montanide ISA se confirmou seguro ao longo do estudo para a vacinação de *O. niloticus*.

Os peixes imunizados, após os 118 dias de experimento, estavam com cerca de 0,792 kg ($\pm 0,016$) versus 0,657 kg ($\pm 0,10$) dos peixes controle, mostrando um incremento na biomassa e maior homogeneidade quando aplicada a vacina. Estes dados evidenciam que a vacinação auxilia no aumento da produtividade e melhora na conversão alimentar. A otimização do aproveitamento do alimento tem forte impacto econômico na piscicultura, com a ração correspondendo à grande parte dos custos de produção (DELPHINO et al., 2019).

Esta melhora no aproveitamento da ração pode estar relacionado à redução do estresse inerente à presença de infecções. É conhecido o papel do estresse na modificação da fisiologia e metabolismo animal gerando impacto sobre o crescimento, taxa metabólica e resistência a doenças. Além disso, a íntima relação entre o metabolismo e os mecanismos do processo de inflamação tem sido amplamente estudada em animais (SHEPARD, 2021). Hormônios relacionados ao estresse, como as catecolaminas e o cortisol, modificam a via de glicogenólise nos músculos e fígado, aumentando a taxa de glicose sanguínea (BARTON, 1991). Evans e colaboradores (2005) observaram a redução do estresse em animais vacinados quando submetidos a infecção, demonstrando que estes têm menor aumento na concentração de glicose sanguínea comparado com os animais não imunizados. Assim, os mecanismos de proteção desenvolvidos com a vacinação

reduziram nos animais o impacto dos danos e, conseqüentemente, o estresse causados pelas infecções bacterianas.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A vacina inativada contra *A. hydrophila* e *S. agalactiae* se mostrou segura e eficaz na redução da mortalidade em tilápias produzidas em tanques-rede. Em adição, os benefícios da vacinação acarretaram uma melhora na conversão alimentar dos animais e no ganho de massa resultando em maior produtividade da tilapicultura.

REFERÊNCIAS

1. ABDEL-LATIF, Hany MR et al. The nature and consequences of co-infections in tilapia: A review. **Journal of Fish Diseases**, v. 43, n. 6, p. 651-664, 2020. doi:10.1111/jfd.13164.
2. ADAMS, Alexandra. Progress, challenges and opportunities in fish vaccine development. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 90, p. 210-214, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.04.066>.
3. AL-HARBI, Ahmed H. First isolation of *Streptococcus* sp. from hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) in Saudi Arabia. **Aquaculture**, v. 128, n. 3-4, p. 195-201, 1994. doi:10.1016/0044-8486(94)90308-5
4. ALI, Shahzad et al. Identification, characterization and antibiotic sensitivity of *aeromonas hydrophila*, a causative agent of epizootic ulcerative syndrome in wild and farmed fish from potohar, Pakistan. **Pakistan J. Zool**, v. 48, n. 3, p. 899-901, 2016.
5. ALYAHYA, Sami A. et al. Histopathological studies of experimental *Aeromonas hydrophila* infection in blue tilapia, *Oreochromis aureus*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 25, n. 1, p. 182-185, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.10.019>.
6. AMAL, M. N. A. et al. Streptococcosis in tilapia (*Oreochromis niloticus*): a review. **Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science**, v. 34, n. 2, p. 195-206, 2011.
7. BAILONE, R. L. et al. Hematology and agglutination titer after polyvalent immunization and subsequent challenge with *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 42, n. 3, p. 221-227, 2010.
8. BALLESTEROS, Natalia A.; SAINT-JEAN, Sylvia Rodriguez; PEREZ-PRIETO, Sara I.. Food pellets as an effective delivery method for a DNA vaccine against infectious pancreatic necrosis virus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 37, p. 220-228, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2014.02.003>
9. BARTON, Bruce A.; IWAMA, George K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. **Annual Review of fish diseases**, v. 1, p. 3-26, 1991. [https://doi.org/10.1016/0959-8030\(91\)90019-G](https://doi.org/10.1016/0959-8030(91)90019-G).
10. BHARADWAJ, Anshuman; ABRAHAM, T. Jawahar; JOARDAR, Siddhartha N. Immune effector activities in challenged rohu, *Labeo rohita* after vaccinating with *Aeromonas* bacterin. **Aquaculture**, v. 392, p. 16-22, 2013.. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.01.016>.
11. BØGWALD, J.; DALMO, R. Review on immersion vaccines for fish: An update 2019. **Microorganisms**, v. 7, n. 12, p. 627, 2019. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120627>.
12. CHEN, Ming et al. Screening vaccine candidate strains against *Streptococcus agalactiae* of tilapia based on PFGE genotype. **Vaccine**, v. 30, n. 42, p. 6088-6092, 2012.
13. CHIDEROLI, Roberta T. et al. Emergence of a new multidrug-resistant and highly virulent serotype of *Streptococcus agalactiae* in fish farms from Brazil. **Aquaculture**, v. 479, p. 45-51, 2017. doi:10.1016/j.aquaculture.2017.05.013.
14. CHU, Chishih et al. Genetic and pathogenic difference between *Streptococcus agalactiae* serotype Ia fish and human isolates. **BMC microbiology**, v. 16, n. 1, p. 1-9, 2016. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0794-4>.
15. DANILOVA, Nadia et al. The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin Z. **Nature immunology**, v. 6, n. 3, p. 295-302, 2005. <https://doi.org/10.1038/ni1166>.
16. DELPHINO, Marina KVC et al. Seasonal dynamics of bacterial pathogens of Nile tilapia farmed in a Brazilian reservoir. **Aquaculture**, v. 498, p. 100-108, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.023>.

17. DELPHINO, Marina KVC et al. Economic appraisal of vaccination against *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia farms in Brazil. **Preventive veterinary medicine**, v. 162, p. 131-135, 2019. doi:10.1016/j.prevetmed.2018.12.003.
18. DONG, Fen et al. IgT plays a predominant role in the antibacterial immunity of rainbow trout olfactory organs. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 2942, 2020. doi: 10.3389/fimmu.2020.583740.
19. DUNZ, Andreas R.; SCHLIEWEN, Ulrich K. Molecular phylogeny and revised classification of the haplotilapiine cichlid fishes formerly referred to as "Tilapia". **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 68, n. 1, p. 64-80, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2013.03.015>.
20. DUREMDEZ, R. et al. Isolation of *Streptococcus agalactiae* from cultured silver pomfret, *Pampus argenteus* (Euphrasen), in Kuwait. **Journal of fish diseases**, v. 27, n. 5, p. 307-310, 2004.
21. ELDAR, Avi et al. Experimental streptococcal meningo-encephalitis in cultured fish. **Veterinary microbiology**, v. 43, n. 1, p. 33-40, 1995. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(94\)00052-X](https://doi.org/10.1016/0378-1135(94)00052-X).
22. ELDAR, A.; HOROVITCZ, A.; BERCOVIER, H. Development and efficacy of a vaccine against *Streptococcus iniae* infection in farmed rainbow trout. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 56, n. 1-2, p. 175-183, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(96\)05738-8](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(96)05738-8).
23. EL LATIF, A. M. et al. High mortalities caused by *Aeromonas veronii*: identification, pathogenicity, and histopathological studies in *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture International**, v. 27, n. 6, p. 1725-1737, 2019. doi:10.1007/s10499-019-00429-8.
24. EVANS, Joyce J. et al. Characterization of β -haemolytic Group B *Streptococcus agalactiae* in cultured seabream, *Sparus auratus* L., and wild mullet, *Liza klunzingeri* (Day), in Kuwait. **Journal of fish diseases**, v. 25, n. 9, p. 505-513, 2002. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2002.00392.x>
25. EVANS, J. J.; WIEDENMAYER, A. A.; KLESIUS, P. H. A transport system for maintenance of viability of *Acinetobacter calcoaceticus*, *Streptococcus iniae*, and *Streptococcus agalactiae* over varying time periods. **Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.**, v.22, p. 238-246, 2002b.
26. EVANS, Joyce J.; KLESIUS, Phillip H.; SHOEMAKER, Craig A. Efficacy of *Streptococcus agalactiae* (group B) vaccine in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by intraperitoneal and bath immersion administration. **Vaccine**, v. 22, n. 27-28, p. 3769-3773, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.03.012>.
27. EVANS, Joyce J. et al. *Streptococcus agalactiae* vaccination and infection stress in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Journal of Applied Aquaculture**, v. 16, n. 3-4, p. 105-115, 2005. doi:10.1300/j028v16n03_07
28. FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome, 2020.
29. FIGUEIREDO, H.C.P et al.. *Streptococcus agalactiae* associado à meningoencefalite e infecção sistêmica em tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia [online]**. 2006, v. 58, n. 4, pp. 678-680. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352006000400036>.
30. GUDDING, R.; LILLEHAUG, A.; EVENSEN, Ø. Recent developments in fish vaccinology. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 72, n. 1-2, p. 203-212, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(99\)00133-6](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(99)00133-6).
31. HANSEN, JOHN D.; LANDIS, ERIC D.; PHILLIPS, RUTH B. Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: Implications for a distinctive B cell developmental

- pathway in teleost fish. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 19, p. 6919-6924, 2005. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500027102>.
32. HÅSTEIN, T., GUDDING, R., EVENSEN, O.. Bacterial vaccines for fish--an update of the current situation worldwide. **Developments in biologicals**, v. 121, p. 55-74, 2005.
 33. HOARE, Rowena et al. Efficacy and safety of a non-mineral oil adjuvanted injectable vaccine for the protection of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against *Flavobacterium psychrophilum*. **Fish & shellfish immunology**, v. 85, p. 44-51, 2019. doi:10.1016/j.fsi.2017.10.005.
 34. HUDDLESTON, Jennifer R. Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: potential spread of antibiotic resistance genes. **Infection and drug resistance**, v. 7, p. 167, 2014. doi:10.2147/IDR.S48820.
 35. HUICAB-PECH, Z. G. et al. Current state of bacteria pathogenicity and their relationship with host and environment in tilapia *Oreochromis niloticus*. **Journal of aquaculture research and development**, v. 7, n. 5, p. 1-10, 2016. <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9546.1000428>.
 36. JANDA, J. Michael; ABBOTT, Sharon L. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. **Clinical microbiology reviews**, v. 23, n. 1, p. 35-73, 2010. <https://doi.org/10.1128/CMR.00039-09>.
 37. KUBITZA, F. A evolução da tilapicultura no Brasil: produção e mercado. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 76, mar./abr. 2003.
 38. KUBITZA, F. Aquicultura no Brasil: principais espécies, áreas de cultivo, rações, fatores limitantes e desafios. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 150, jul./ago. 2015.
 39. LI, Jun et al. B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities. **Nature immunology**, v. 7, n. 10, p. 1116-1124, 2006. <https://doi.org/10.1038/ni1389>.
 40. LI, Liping et al. Development of an attenuated oral vaccine strain of tilapia Group B Streptococci serotype Ia by gene knockout technology. **Fish & shellfish immunology**, v. 93, p. 924-933, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.07.081>.
 41. LIU, Guangjin et al. Development of *Streptococcus agalactiae* vaccines for tilapia. **Diseases of aquatic organisms**, v. 122, n. 2, p. 163-170, 2016. doi:10.3354/dao03084.
 42. MA, Jie et al. A review of fish vaccine development strategies: Conventional methods and modern biotechnological approaches. **Microorganisms**, v. 7, n. 11, p. 569, 2019. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7110569>.
 43. MAGNADOTTIR, Bergljot. Immunological control of fish diseases. **Marine biotechnology**, v. 12, n. 4, p. 361-379, 2010. <https://doi.org/10.1007/s10126-010-9279-x>.
 44. MAHROUS, Karima F. et al. Molecular characterization and immunohistochemical localization of tilapia piscidin 3 in response to *Aeromonas hydrophila* infection in Nile tilapia. **Journal of Peptide Science**, v. 26, n. 11, p. e3280, 2020. <https://doi.org/10.1002/psc.3280>
 45. MIRANDA, C. D., TELLO, A.; KEEN, P. L.. Mechanisms of antimicrobial resistance in finfish aquaculture environments. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 233, 2013. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00233>.
 46. MONIR, S. M. et al.. Vaccination of Tilapia against Motile Aeromonas Septicemia: A Review. **Journal of aquatic animal health**, v. 32, n. 2, p. 65-76, 2020. <https://doi.org/10.1002/aah.10099>.
 47. MUTOLOKI, S., MUNANG'ANDU, H. M., EVENSEN, Ø.. Oral Vaccination of Fish - Antigen Preparations, Uptake, and Immune Induction. **Frontiers in Immunology**, v. 6, p. 519, 2015. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00519>

48. MUNANG'ANDU, H. M., MUTOLOKI, S., & EVENSEN, Ø.. A Review of the Immunological Mechanisms Following Mucosal Vaccination of Finfish. *Frontiers in immunology*, v. 6, p. 427, 2015. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00427>.
49. MUNANG'ANDU, H., PAUL, J., EVENSEN, Ø.. An Overview of Vaccination Strategies and Antigen Delivery Systems for *Streptococcus agalactiae* Vaccines in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Vaccines*, v. 4, n. 4, p. 48, 2016. doi:10.3390/vaccines4040048
50. MZULA, Alexandra et al. Current state of modern biotechnological-based *Aeromonas hydrophila* vaccines for aquaculture: a systematic review. *BioMed research international*, v. 2019, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/3768948>.
51. NASCIMENTO, C. S. et al.. Streptococcus agalactiae in pregnant women in Brazil: prevalence, serotypes, and antibiotic resistance. *Brazilian journal of microbiology*, v. 50, n. 4, p. 943–952, 2019. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00129-8>.
52. NGAMKALA, S. et al.. Histopathological study and intestinal mucous cell responses against *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia administered with *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Veterinary world*, v. 13, n. 5, p. 967–974, 2020. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.967-974>.
53. NOMOTO, R. et al. Lancefield group C *Streptococcus dysgalactiae* infection responsible for fish mortalities in Japan. *J. Fish Dis.*, v.27, p.679-686, 2004. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2004.00591.x>.
54. OSMAN, K. M. et al.. Characterization and susceptibility of streptococci and enterococci isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) showing septicaemia in aquaculture and wild sites in Egypt. *BMC veterinary research*, v. 13, n. 1, p. 357, 2017. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1289-8>.
55. PALTI, Yniv. Toll-like receptors in bony fish: from genomics to function. *Developmental & Comparative Immunology*, v. 35, n. 12, p. 1263-1272, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.03.006>.
56. PASNIK, David J.; EVANS, Joyce J.; KLESIUS, Phillip H. Duration of protective antibodies and correlation with survival in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* following *Streptococcus agalactiae* vaccination. *Diseases of aquatic organisms*, v. 66, n. 2, p. 129-134, 2005. <https://doi.org/10.3354/dao066129>.
57. PEIXEIR. Anuário Brasileiro da Piscicultura, PEIXE BR 2020. São Paulo: Associação Brasileira da Piscicultura, 2020.
58. PLUMB, J.A. et al *Streptococcus* sp. from marine fishes along Alabama and Northwest Florida coast of the Gulf of Mexico. *Trans. Am. Fisher Soc.*, v. 103, p. 358-361, 1974. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1974\)103%3C358:SSFMFA%3E2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1974)103%3C358:SSFMFA%3E2.0.CO;2).
59. PRETTO-GIORDANO, Lucienne Garcia et al. Evaluation on the Pathogenesis of *Streptococcus agalactiae* in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 53, p. 87-92, 2010a. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132010000100011>.
60. PRETTO-GIORDANO, Lucienne Garcia et al. Efficacy of an experimentally inactivated *Streptococcus agalactiae* vaccine in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in Brazil. *Aquaculture Research*, v. 41, n. 10, p. 1539-1544, 2010b. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02449.x>.
61. RASHEED, V.; PLUMB, J. Pathogenicity of non haemolytic group B Streptococcus sp. in Gulf killifish, *Fundulus grandis* Baird & Girard. *Aquaculture*, v.37, p.97-105, 1984. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(84\)90067-X](https://doi.org/10.1016/0044-8486(84)90067-X).
62. RIGOS, G., TROISI, G. M. (2005). Antibacterial agents in Mediterranean finfish farming: a synopsis of drug pharmacokinetics in important euryhaline fish species and possible

- environmental implications. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 15, n. 1, p. 53-73. <https://doi.org/10.1007/s11160-005-7850-8>.
63. RIVAS, Açucena Veleh. Vacina bivalente contra infecção por *Aeromonas sobria* e *Streptococcus agalactiae* em tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) do Oeste do Paraná, Brasil. 2020. 57 p. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-Graduação em Biociências) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2020
 64. SCHULTER, Eduardo Pickler; VIEIRA FILHO, José Eustáquio Ribeiro. Evolução da piscicultura no Brasil: diagnóstico e desenvolvimento da cadeia produtiva de tilápia. Texto para Discussão, 2017.
 65. SHAO, Tong et al. Characterization of surface phenotypic molecules of teleost dendritic cells. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 49, n. 1, p. 38-43, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.11.010>.
 66. SHELBY, R. A. et al.. Passive immunization of tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), with anti-*Streptococcus iniae* whole sera. **Journal of fish diseases**, v. 25, n. 1, p. 1-6, 2002. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2002.00327.x>.
 67. SHEPARD, C. R. (2021). TLR9 in MAFLD and NASH: At the Intersection of Inflammation and Metabolism. **Frontiers in endocrinology**, v. 11, p. 613639. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.613639>.
 68. SUWANNASANG, Atchariya et al. Growth, immune responses and protection in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* immunized with formalin-killed *Streptococcus agalactiae* serotypes Ia 2 and III vaccines. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, p. 15-38, 2017.
 69. SUNYER, J. Evolutionary and functional relationships of B cells from fish and mammals: insights into their novel roles in phagocytosis and presentation of particulate antigen. **Infectious Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Infectious Disorders)**, v. 12, n. 3, p. 200-212, 2012.
 70. VICENTE, Igor S. T.; ELIAS, Fabiana; FONSECA-ALVES, Carlos E.. Perspectivas da produção de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 37, n. 4, p. 392-398, dez. 2014.
 71. VIDOTTI, R. M., GONÇALVES, G. S.. Produção e caracterização de silagem, farinha e óleo de tilápia e sua utilização na alimentação animal. Instituto de Pesca, 2006.
 72. WU, Liting et al. Recent advances on phagocytic B cells in teleost fish. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 824, 2020. doi:10.3389/fimmu.2020.00824.
 73. XU, Zhen et al. Specialization of mucosal immunoglobulins in pathogen control and microbiota homeostasis occurred early in vertebrate evolution. **Science immunology**, v. 5, n. 44, 2020. doi: 10.1126/sciimmunol.aay3254.
 74. YU, Yongyao et al. Immunoglobulins, mucosal immunity and vaccination in teleost fish. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 2597, 2020. <https://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2020.567941>.
 75. ZHANG, Z. et al.. GapA, a potential vaccine candidate antigen against *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 63, p. 255–260, 2017. doi:10.1016/j.fsi.2017.02.019.
 76. ZHU, Lv-yun et al. B cells in teleost fish act as pivotal initiating APCs in priming adaptive immunity: an evolutionary perspective on the origin of the B-1 cell subset and B7 molecules. **The Journal of Immunology**, v. 192, n. 6, p. 2699-2714, 2014.

ANEXOS

Aquaculture

Vaccination against *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus agalactiae* infection reduced mortality and improved feed conversion in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	AQUACULTURE-D-21-02194
Article Type:	Research Paper
Section/Category:	Diseases
Keywords:	<i>Oreochromis niloticus</i> ; immunization; inactivated antigen; Field test
Corresponding Author:	Kelvinson Viana Universidade Federal da Integração Latino-Americana BRAZIL
First Author:	Angelo Gabriel Vidal dos Santos
Order of Authors:	Angelo Gabriel Vidal dos Santos Adrieli Barboza de Souza Açucena Veleh Rivas Gilson Bueno Junior Aline Cristiane Cechinel Assing Batista Gabriela Fernandes de Souza Estevam Martins de Souza Robson Delai Louisiane de Carvalho Nunes Kelvinson Viana
Abstract:	The growth of tilaculture creates the need for infection control measures. Bacterial diseases have the potential to generate losses in commercial systems. Factors such as high density cultivation and poor water quality lead to the emergence of opportunistic infectious outbreaks. The bacteria <i>Aeromonas hydrophila</i> and <i>Streptococcus agalactiae</i> are two of the main pathogens of Nile Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>). This work evaluated the large-scale efficacy of a bivalent, oily and inactivated vaccine, containing antigens from <i>A. hydrophila</i> and <i>S. agalactiae</i> , and administered intraperitoneally. The work was carried out with 12,000 heads of fish. The results showed that the immunizing agent was able to reduce animal mortality and improve the feed conversion indicator. The animals in the control group had a mortality of 7.78%, and those vaccinated 3.33%. In addition, the relative survival percentage was 57.17%, feed conversion had an impact of 22%, and the average final weight was higher in the immunized fish. Thus, the vaccine proved to be effective in high-density production, generating greater productivity for the fish producer.

Anexo A. Submissão de artigo referente a este trabalho à revista *Aquaculture*.



**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2019 026364 4

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DA INTEGRAÇÃO LATINO-
AMERICANA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 11806275000133

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Órgão Público

Endereço: Av. Silvio Américo Sasdelli, 1842 - Vila A - Sala 107

Cidade: Foz do Iguaçu

Estado: PR

CEP: 85869-580

País: Brasil

Telefone: (45) 35292828

Fax: (45) 35767306

Email: ditefa@unila.edu.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 12/12/2019 às
10:22, Petição 870190132092

ANEXO B. Depósito junto ao INPI da patente referente a formulação da vacina bivalente oleosa.