



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE  
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM BIOCÊNCIAS**

**VACINA BIVALENTE CONTRA INFECÇÃO POR *Aeromonas sobria* E *Streptococcus agalactiae* EM TILÁPIAS-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*) DO OESTE DO PARANÁ, BRASIL**

**AÇUCENA VELEH RIVAS**

Foz do Iguaçu  
2020



INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIAS  
DA VIDA E DA NATUREZA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM BIOCÊNCIAS

**VACINA BIVALENTE CONTRA INFECÇÃO POR *Aeromonas sobria* E *Streptococcus agalactiae* EM TILÁPIAS-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*) DO OESTE DO PARANÁ, BRASIL**

**AÇUCENA VELEH RIVAS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Kelvinson Fernandes Viana

Foz do Iguaçu  
2020

AÇUCENA VELEH RIVAS

**VACINA BIVALENTE CONTRA INFECÇÃO POR *Aeromonas sobria* E *Streptococcus agalactiae* EM TILÁPIAS-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*) DO OESTE DO PARANÁ, BRASIL**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração Biociências.

**BANCA EXAMINADORA**



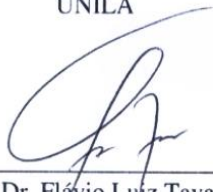
---

Orientador: Prof. Dr. Kelvinson Fernandes Viana  
UNILA



---

Prof. Dra. Sanely Lourenço da Costa  
UNILA



---

Prof. Dr. Flávio Lutz Tavares  
UNILA

Foz do Iguaçu, 04 de Março de 2020.

Catálogo elaborado pela Divisão de Apoio ao Usuário da Biblioteca Latino-Americana  
Catálogo de Publicação na Fonte. UNILA - BIBLIOTECA LATINO-AMERICANA

R618

Rivas, Açucena Veleh.

Vacina bivalente contra infecção por *Aeromonas sobria* e *Streptococcus agalactiae* em tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) do Oeste do Paraná, Brasil / Açucena Veleh Rivas. - Foz do Iguaçu-PR, 2020.  
57 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Integração Latino-Americana. Instituto Latino-americano de Ciências da Vida e da Natureza. Pós-graduação em Biociências. Foz do Iguaçu-PR, 2020.

Orientador: Kelvinson Fernandes Viana.

1. Aquicultura. 2. Imunoproteção. 3. Bacterioses. 4. Peixes. I. Viana, Kelvinson Fernandes. II. Universidade Federal da Integração Latino-Americana. III. Título.

CDU 639.2/.3

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de manifestar os meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para que este trabalho se tornasse uma realidade. Sem a colaboração e incentivo de diversas pessoas, a elaboração deste trabalho não teria sido possível.

Agradeço à minha família, principalmente aos meus pais, **Beloni Veleh Rivas** e **Paulo Rivas**, e à minha irmã, **Angélica Veleh Rivas**, pela formação, incentivo e apoio, que me proporcionaram a continuidade nos estudos até à chegada a este mestrado.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Kelvinson Fernandes Viana**, pelos conhecimentos transmitidos, confiança, incentivo e lições profissionais nesses anos de convívio.

Aos meus colegas de laboratório, que tornaram-se meus amigos, **Adrieli Barboza de Souza** e **Angelo Gabriel Vidal dos Santos**, e que mais do que ajuda técnica, assumiram e se dedicaram a este estudo de forma incondicional, aos quais não tenho palavras para agradecer e dizer quanto incentivo e confiança me proporcionaram, deixo essa singela menção com desejo de que continuemos trabalhando juntos. Só não deu tudo errado porque nossa união deu certo.

Ao **Me. Gilson Bueno Junior**, o qual nem saberia descrever tamanha importância que teve no presente estudo, pelo apoio e conhecimentos transmitidos que foram essenciais para a viabilidade do trabalho e os quais carregarei comigo. Ao **Dr. Fernando César dos Santos** pelo apoio técnico, incentivo e orientações prestadas nesse estudo.

À minha colega e amiga **Beatriz Mitidiero Stachissini Arcain**, pelo apoio e incentivo durante esses anos do mestrado, tanto durante as disciplinas como nas horas passadas nos laboratórios, sua amizade já me era esperada e foi muito bom desfrutá-la. Às minhas amigas, **Renata Defante Lopes** e **Isabela Maria Tinelo Lessa**, pelo apoio e incentivo nos momentos necessários, com os quais sei que posso contar para sempre.

À Associação dos Pescadores e Piscicultores do Lago de Itaipu de Foz do Iguaçu / PR, representada por **Estevão Martins de Souza**, pela confiança e apoio na realização desse estudo, agradeço e espero prolongar a parceria na busca pela melhora da saúde animal.

À professora **Dra. Louisiane de Carvalho Nunes** (PPGCV/UFES) pelo apoio técnico na análise dos resultados do presente estudo.

Aos professores do **Programa de Pós-Graduação em Biociências (PPG-BC)** da Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA) pelo amadurecimento acadêmico e conhecimento oferecido durante a realização do curso de mestrado.

Ao programa de **Demanda Social da UNILA** pela bolsa de estudos e auxílio financeiro que possibilitou a dedicação integral ao PPG-BC e a operacionalização do estudo.

*Todos nós sabemos alguma coisa.  
Todos nós ignoramos alguma coisa.  
Por isso, aprendemos sempre.  
- Paulo Freire*

RIVAS, Açucena Veleh. **Vacina bivalente contra infecção por *Aeromonas sobria* e *Streptococcus agalactiae* em tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) do Oeste do Paraná, Brasil.** 57f. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biociências – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2020.

## RESUMO

O Brasil é um dos maiores produtores de tilápia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1758) do mundo, entretanto, um dos principais fatores que limitam essa produção é a ocorrência de infecções causadas por *Aeromonas* spp. e *Streptococcus* spp. Este trabalho teve como objetivo avaliar uma vacina bivalente contra *Aeromonas sobria* e *Streptococcus agalactiae* por administração intraperitoneal (i.p.) em tilápias-do-Nilo provenientes de tanques de produção, sob condições experimentais. Foram selecionados 92 peixes (50g) de tanques comerciais para o experimento, as bactérias foram isoladas e identificadas a partir de peixes com sinais clínicos de bacterioses. Ambas culturas de bactérias foram inativadas e ajustadas para  $1 \times 10^7$  células / dose. Os grupos controle (46) e vacinado (46) receberam via i.p. 50 $\mu$ L de solução salina estéril (NaCl 0,9%) e 50 $\mu$ L da vacina, respectivamente. O teste de aglutinação foi realizado após 30 dias da imunização. A infecção experimental foi realizada com  $1 \times 10^8$  células / dose via i.p. de ambas as bactérias após 30 dias de vacinação. Na análise estatística foram realizados o teste de qui-quadrado (corrigido de Yates), o cálculo de Risco Relativo (RR), a Porcentagem Relativa de Sobrevivência (RPS), o teste de Mann-Whitney, o teste de Log-rank (Curvas de Sobrevivência) e o teste T de Student. Fragmentos de pele, fígado e baço foram coletados de peixes de cada grupo experimental, acondicionados em paraformaldeído e submetidos ao processamento típico para cortes histológicos e analisados quanto às alterações estruturais e celulares. Os testes de aglutinação mostraram atividade aglutinante com soros de peixes vacinados para os antígenos de ambas as bactérias nas três diluições testadas. Os resultados de eficácia foram  $p = 0,0042$ ,  $RR = 0,13$  (IC 95%: 0,02-0,75) e  $RPS = 91\%$ . A mortalidade no grupo vacinado foi de 01 (2,94%) e no grupo controle foi de 11 (32,35%). A vacina impediu sinais clínicos das doenças no grupo vacinado. O grupo controle mostrou sinais clínicos clássicos das doenças. As alterações histológicas dos órgãos analisados dos grupos vacinado e controle não apresentaram diferenças significativas. A vacina bivalente testada protegeu a tilápia contra infecções em condições experimentais.

**Palavras-chave:** Aquicultura; Imunoproteção; Bacterioses; Peixes.

RIVAS, Açucena Veleh. **Bivalent vaccine against infection by *Aeromonas sobria* and *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapias (*Oreochromis niloticus*) from west of Paraná, Brazil.** 57f. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biociências – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2020.

### ABSTRACT

Brazil is one of the largest tilapias (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1758) producers in the world, however, one of the main factors that limit this production is the occurrence of infections caused by *Aeromonas* spp. and *Streptococcus* spp. This work aimed to evaluate a bivalent vaccine against *Aeromonas sobria* and *Streptococcus agalactiae* by intraperitoneal (i.p.) administration in Nile tilapia from production tanks, under experimental conditions. 92 fish (50g) were selected from commercial tanks for the experiment, and the bacteria were isolated and identified from fish with clinical signs of bacteriosis. Both cultures of bacteria were inactivated and adjusted to  $1 \times 10^7$  cells / dose. The control (46) and vaccinated (46) groups received via i.p. 50 $\mu$ L of sterile saline solution (NaCl 0.9%) and 50 $\mu$ L of the vaccine, respectively. The agglutination test was performed 30 days after immunization. The experimental infection was performed with  $1 \times 10^8$  cells / dose via i.p. of both bacteria after 30 days of vaccination. In the statistical analysis, the chi-square test (corrected by Yates), the calculation of Relative Risk (RR), the Relative Percentage of Survival (RPS), the Mann-Whitney test, the Log-rank test (Survival Curves) and Student's t test were performed. Skin, liver and spleen fragments were collected from fish from each experimental group, stored in paraformaldehyde and subjected to typical processing for histological cuts and analyzed for structural and cellular changes. The agglutination tests showed agglutinating activity with vaccinated fish sera for the antigens of both bacteria in the three dilutions tested. The efficacy results were  $p = 0.0042$ ,  $RR = 0.13$  (95% CI: 0.02-0.75) and  $RPS = 91\%$ . Mortality in the vaccinated group was 01 (2.94%) and in the control group it was 11 (32.35%). The vaccine prevented clinical signs of disease in the vaccinated group. The control group showed classic clinical signs of the diseases. The histological changes in the organs analyzed in the vaccinated and control groups did not show significant differences. The tested bivalent vaccine protected tilapia against infections under experimental conditions.

**Key words:** Aquaculture; Immunoprotection; Bacterioses; Fish.



## FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Peixes de cultivo produzidos no Brasil em 2018.....	14
<b>Figura 2</b> - Propriedades produtoras de tilápia por região, Brasil, 2018.....	15
<b>Figura 3</b> - Participação do Estado do Paraná na produção total de tilápias no Brasil, 2018 e Participação regional na produção total de tilápias no Paraná, Brasil, 2018.....	15
<b>Figura 4</b> - Valor bruto da produção da aquicultura no Brasil, 2018.....	16
<b>Figura 5</b> - Sistema imunológico de peixes.....	21
<b>Figura 6</b> – Visualização do teste de aglutinação com os antígenos de <i>Aeromonas sobria</i> e <i>Streptococcus agalactiae</i> e soros de tilápias-do-Nilo dos grupos controle e vacinado, nas diluições 1:10, 1:100 e 1:1000.....	31
<b>Figura 7</b> – Sobrevivência de tilápias-do-Nilo vacinadas e não-vacinadas (controle) após infecção intraperitoneal com $1 \times 10^8$ células/dose de <i>Aeromonas sobria</i> e $1 \times 10^8$ células/dose de <i>Streptococcus agalactiae</i> durante o período experimental de 30 dias.....	32
<b>Figura 8</b> - Variação do peso dos peixes dos grupos controle e vacinado durante o experimento: dia da vacinação ( $p = 0,7133$ ), dia da infecção experimental ( $p = 0,0092$ ) e dia da eutanásia ( $p = 0,2197$ ).....	32
<b>Figura 9</b> – Peixes dos grupos controle (a) e vacinados (b) após administração via i.p. de 50 $\mu$ L de solução salina estéril (NaCl 0,9%) e dose da vacina, respectivamente.....	34
<b>Figura 10</b> - Região intraperitoneal dos peixes dos grupos controle (a) e vacinado (b) sem lesões no local de inoculação (LI).....	35
<b>Figura 11</b> – a) Peixes do grupo controle após infecção experimental por <i>A. sobria</i> e <i>S. agalactiae</i> apresentando hemorragias (HE) pelo corpo e nadadeiras, deterioração das nadadeiras (DN), lesões ulcerativas (LU), palidez cutânea (PC), líquido amarelado/sanguinolento na cavidade visceral (LCV),	

deterioração de órgãos (DO), excesso de muco nas brânquias (EMB), necrose (NB) e palidez das brânquias (PB), deterioração (DO) e hemorragia (HE) do fígado. b) Peixes do grupo vacinado com aparência saudável, sem sinais clínicos externos e internos.....36

**Figura 12** - Resultado da análise histopatológica de fígado e baço de tilápias-do-Nilo vacinadas e não-vacinadas (controle) após infecção intraperitoneal com  $1 \times 10^8$  células/dose de *Aeromonas sobria* e  $1 \times 10^8$  células/dose de *Streptococcus agalactiae* durante o período experimental de 30 dias. Os grupos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.....37

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Delineamento experimental da vacina de <i>Streptococcus agalactiae</i> e <i>Aeromonas sobria</i> aplicada por via intraperitoneal (i.p.) em tilápia-do-Nilo ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) em Foz do Iguaçu-PR.....	27
<b>Tabela 2</b> - Relatório de laboratório do equipamento Vitek2 Compact mostrando a identificação de <i>Aeromonas sobria</i> .....	29
<b>Tabela 3</b> - Relatório de laboratório do equipamento Vitek2 Compact mostrando a identificação de <i>Streptococcus agalactiae</i> .....	29
<b>Tabela 4</b> - Eficácia de uma vacina bivalente contra <i>Aeromonas sobria</i> e <i>Streptococcus agalactiae</i> inativados aplicada por via intraperitoneal em tilápia-do-Nilo ( <i>Oreochromis niloticus</i> ). *Qui-quadrado corrigido por Yates; RR = Risco Relativo; RPS = Porcentagem Relativa de Sobrevivência.....	30
<b>Tabela 5</b> – Ficha de análise das características físicas externas e internas e características de comportamento observadas nos períodos pós-vacinação e pós-infecção e na necropsia, nos grupos controle e vacinado. DPV = Dias Pós-Vacinação; C = Peixe(s) do grupo controle; V = Peixe(s) do grupo vacinado.....	33

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Revisão de Literatura	14
1.1.1 Aspectos da produção de tilápia-do-Nilo no Brasil	14
1.1.2 Principais bactérias que acometem tilápias em tanques de produção	17
1.1.2.1 <i>Aeromonas</i> spp. Stanier, 1943.	17
1.1.2.2 <i>Streptococcus</i> spp. Rosenbach, 1884	19
1.1.3 Mecanismos de defesa de peixes	20
1.1.4 Vacinas para peixes	22
1.2 Justificativa	23
2. OBJETIVOS	24
2.1 Geral	24
2.2 Específicos	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Peixes e período pré-experimental	25
3.2 Isolamento e cultivo das cepas bacterianas	25
3.3 Identificação bioquímica das cepas isoladas	26
3.4 Identificação do sorotipo da cepa isolada de <i>S. agalactiae</i>	26
3.5 Desenvolvimento da vacina bivalente	26
3.6 Delineamento e infecção experimental	27
3.7 Teste de aglutinação de antígenos	27
3.8 Avaliação clínico-patológica de peixes	27
3.9 Análises histopatológicas	28
3.10 Análise Estatística	28
4. RESULTADOS	29
4.1 Identificação bacteriana de <i>Aeromonas sobria</i> e <i>Streptococcus agalactiae</i>	29
4.2 Eficácia da vacina bivalente contra <i>Aeromonas sobria</i> e <i>Streptococcus agalactiae</i>	30
4.3 Aglutinação de antígenos pós vacina	30
4.4 Mortalidade de tilápias dos grupos controle e vacinado após desafio experimental	31
4.5 Proteção da vacina bivalente contra sinais clínicos de infecção por <i>Aeromonas sobria</i> e <i>Streptococcus agalactiae</i>	33
4.6 Análise Histopatológica	37
5. DISCUSSÃO	38
6. CONCLUSÕES	44
7. REFERÊNCIAS	44
ANEXO I – Aprovação da pesquisa pelo CEUA-UNILA	56
ANEXO II – Depósito da patente da vacina INPI	57

## 1. INTRODUÇÃO

A Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758) é uma das espécies de peixes mais cultivadas no mundo, devido às suas características biológicas, como o alto e rápido ganho de peso comercial, sua alta resistência à criação em altas densidades, doenças e variações de temperaturas, tendo menor índice de mortalidade e produção com menor custo operacional comparadas a outras espécies de cultivo (KUBITZA, 2010; FRANÇA, 2016).

Entretanto, a intensificação desses sistemas com altas estocagens pode alterar a qualidade da água e do estado nutricional dos peixes, contribuindo para um quadro de estresse crônico e para a imunossupressão dos sistemas de defesa dos peixes, favorecendo a disseminação de patógenos e resultando na perda parcial ou total da produção (HIRSCH et al., 2006; XU et al., 2012).

Dentre as principais bactérias que frequentemente acometem os peixes e apresentam maior impacto econômico na produção comercial estão: *Aeromonas* Staner, 1943 e *Streptococcus* Rosenbach, 1884 (KUBITZA, 2008; LEIRA et al., 2017). Com frequência, diagnósticos positivos para infecções por bactérias desses gêneros são realizados no mesmo peixe doente, evidenciando uma associação entre estas enfermidades (SCHERING-PLOUGH, 2007). O surgimento de infecções nos diferentes sistemas de cultivo de peixes representa um importante fator de impacto na sanidade, afetando o rendimento da produção e da qualidade do produto que chega à mesa do consumidor (MEIRELLES, 2010).

Atualmente, a principal medida terapêutica empregada em caso de surtos por bactérias é o uso de antibióticos, muitas vezes de forma indiscriminada e desnecessária, gerando problemas para as saúdes animal, humana e ambiental e demonstrando necessidade de formas de prevenção das doenças, através de imunoprofilaxia por meio de vacinação (PÁDUA & MENEZES FILHO, 2014).

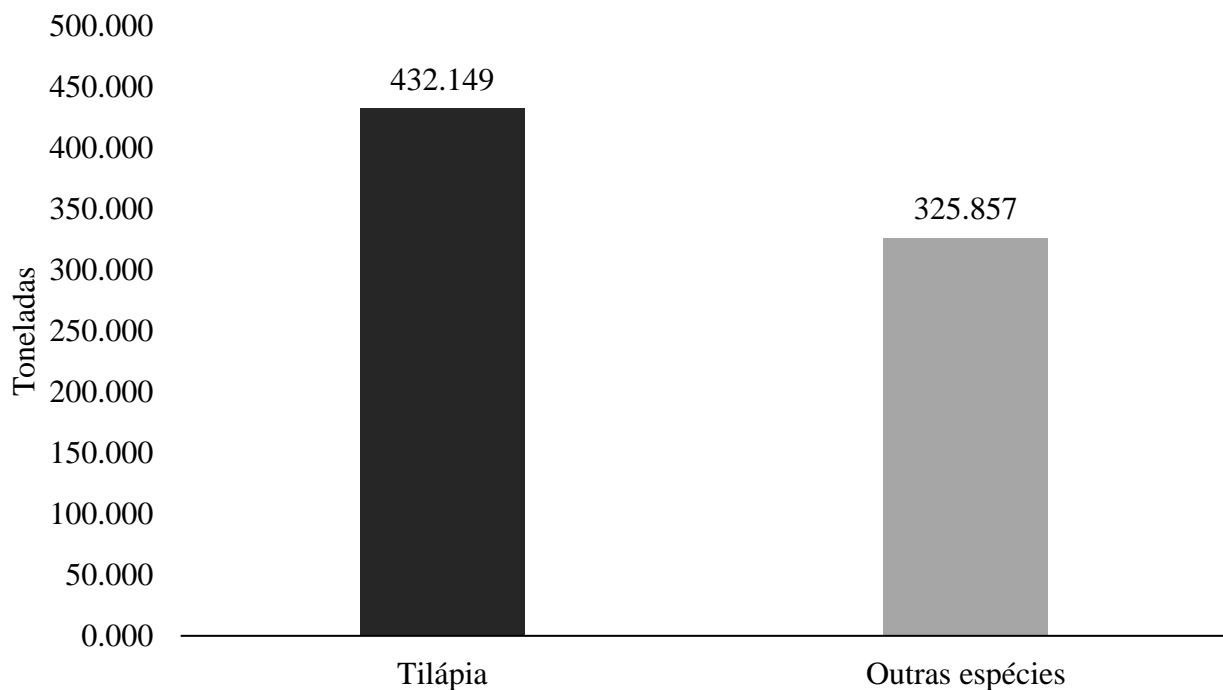
Amplamente utilizadas devido aos benefícios econômicos, as vacinas produzidas a partir de células inativadas são produzidas visando a proteção dos peixes contra diversas doenças bacterianas (DUMRONGPHOL et al., 2009). Diante disso, pretende-se avaliar a capacidade imunoprotetora de uma vacina bivalente contra *Aeromonas sobria* e *Streptococcus agalactiae* aplicada por via intraperitoneal em Tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) provenientes de tanques de produção do Oeste do Paraná, Brasil, sob condições experimentais.

## 1.1 Revisão de Literatura

### 1.1.1 Aspectos da produção de tilápia-do-Nilo no Brasil

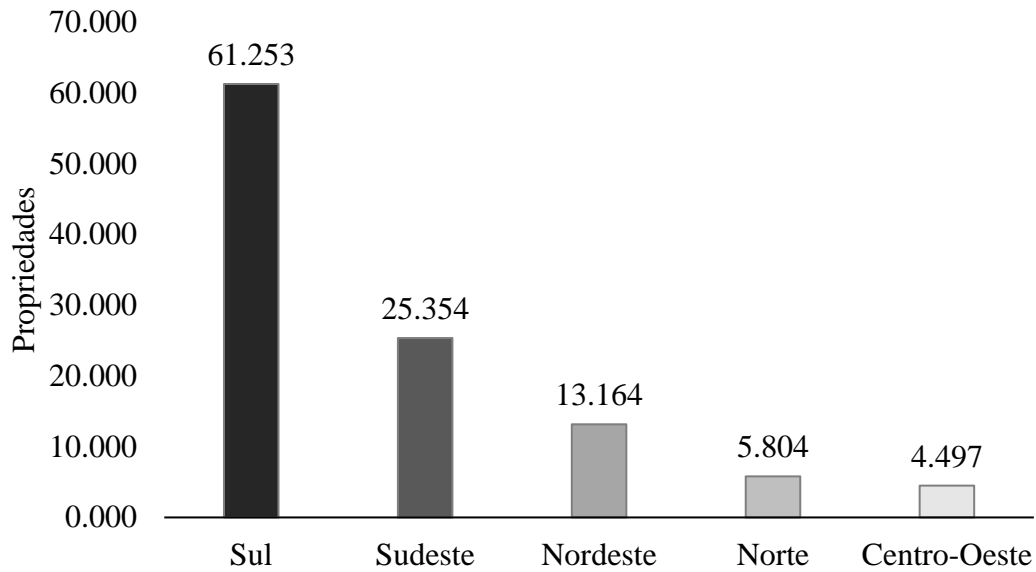
Segundo a Associação Brasileira da Piscicultura (PEIXE BR, 2020), a Tilápia-do-Nilo é a espécie mais importante de peixes cultivados do Brasil, representando 57% da produção total de peixes de cultivo, com 432.149 toneladas em 2019, consolidando a quarta posição entre os maiores produtores de tilápia mundiais (Figura 1).

**Figura 1** - Peixes de cultivo produzidos no Brasil em 2019.



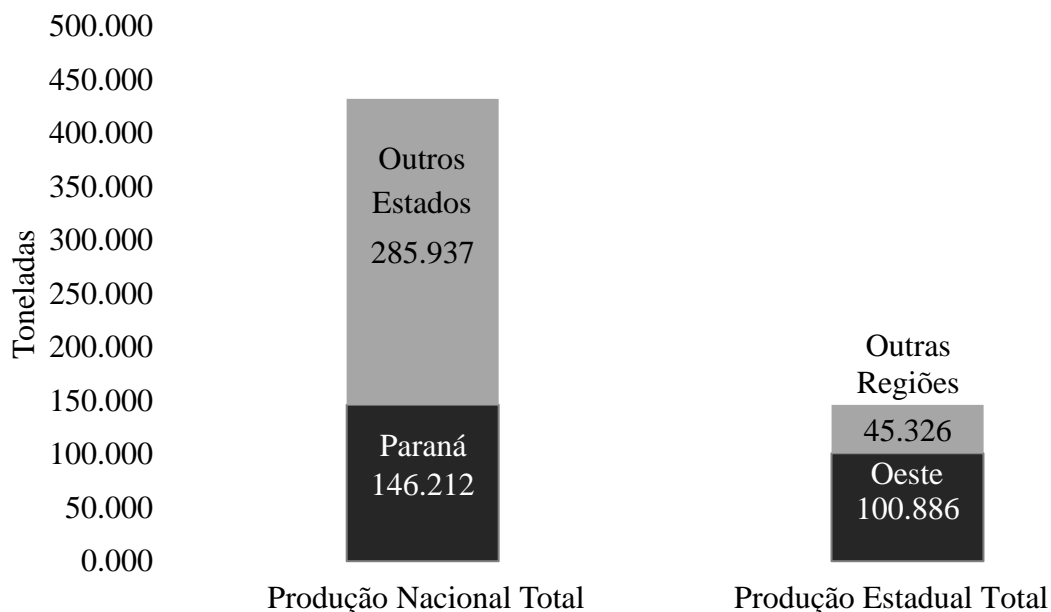
Fonte: PEIXE BR, IBGE, elaboração da autora.

A produção de Tilápia está presente em 110.072 propriedades por todo território brasileiro, 55,6% dessas propriedades estão localizadas na região Sul, 23% na região Sudeste, 12% na região Nordeste, 5,3% na região Norte e 4,1% na região Centro-Oeste do país (Figura 2) (IBGE, 2017).

**Figura 2** - Propriedades produtoras de tilápia por região, Brasil, 2018.

Fonte: PEIXE BR, IBGE, elaboração da autora.

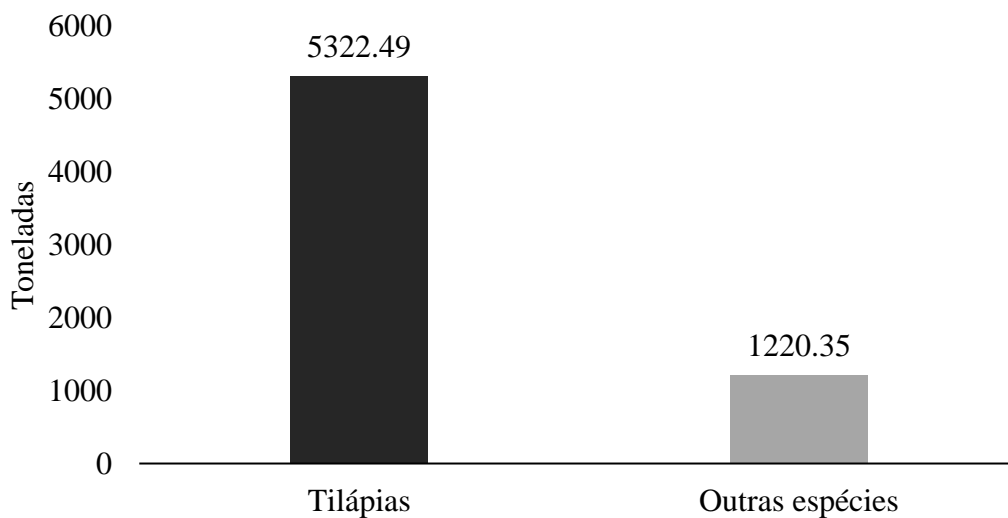
O estado que mais produz tilápias no Brasil é o Paraná, que em 2019 produziu cerca de 146.212 toneladas (33,8%) da produção nacional de tilápias (PEIXE BR, 2020). De acordo com o Departamento de Economia Rural (DERAL), a região Oeste do Paraná concentra 69% da produção de peixes do estado, seguida pelas regiões Leste com 14%, e Sul e Norte que somam 17% (PEIXE BR, 2020) (Figura 3).

**Figura 3** - Participação do Estado do Paraná na produção total de tilápias no Brasil, 2019 e Participação regional na produção total de tilápias no Paraná, Brasil, 2019.

Fonte: PEIXE BR, elaboração da autora.

Representando cerca de US\$ 12 milhões (4% do total), em 2019, a piscicultura é o segundo mais importante segmento de exportações de pescado do Brasil (que no todo obteve US\$ 275 milhões em exportações), sendo predominado pela exportação da tilápia, que representa 81,36% (US\$ 9.750.193) do volume total exportado (PEIXE BR, 2020) (Figura 4).

**Figura 4** – Exportações brasileiras da piscicultura em 2019 (toneladas).



Fonte: PEIXE BR, elaboração da autora.

A produção mundial de pescados tem um crescimento anual médio de cerca de 3% (GERVÁSIO, 2018). Devido a abundância de água, aproximadamente 12% dos recursos hídricos mundiais, e 70% do território em regiões de clima tropical, o Brasil é um dos países com maior potencial de produção de tilápia do mundo (LIMA, 2001). Igarashi (2018) concluiu que, com o adequado investimento e manejo, a tilapicultura poderá ter maior importância para o crescimento socioeconômico do Brasil, com potencial para aumentar a exportação para outros países.

Na produção comercial em água doce, os sistemas de cultivo mais utilizados são semi-intensivos e intensivos, tendo como meios produtivos mais comuns os viveiros escavados e os tanques-rede (SEBRAE, 2014). O cultivo de tilápias em tanques-rede apresenta vantagens em relação aos viveiros escavados, como a rápida implantação e retorno do investimento, alta produtividade, controle da população e maior facilidade de manejo e despesca (AYROZA, CARMO & AYROZA, 2011).

O sistema intensivo tem sido o mais vantajoso, possibilitando ao produtor obter uma maior produção e lucro com o cultivo de tilápias (IGARASHI, 2018). O sistema intensivo de



tanques-rede no Brasil consiste na utilização de águas públicas federais e estaduais oriundas de usinas hidroelétricas, para instalação dos tanques onde são confinados os peixes em altas densidades (80 a 250 kg/m<sup>3</sup>) e alimentados com ração (ROCHA, KUBITZA & COSTA, 2011; SCHULTER & VIEIRA FILHO, 2017).

Um dos principais fatores que limitam a produção da tilapicultura no Brasil são a ocorrência de doenças causadas por algumas bactérias presentes na água e na microbiota dos peixes que desencadeiam doenças quando o hospedeiro está debilitado, constituindo importantes patógenos na piscicultura intensiva, devido ao caráter oportunista que causam significativos impactos econômicos na produção comercial de tilápias (LEIRA et al., 2017).

A transmissão horizontal dessas bactérias ocorre de forma direta pelo contato com peixes e/ou alimentos contaminados, e indireta pelo contato com a água, o lodo ou substrato dos sistemas de criação e, até mesmo, em equipamentos como redes, roupas, tanques de transporte, onde podem permanecer durante um longo período (KUBITZA, 2001; LIM, WEBSTER, 2006). A transmissão vertical em peixes não foi confirmada até o momento (MARCUSO, 2017).

Além de sinais clínicos que comprometem a vida dos peixes, outros sinais, como por exemplo as lesões cutâneas, depreciam a qualidade do produto final, impossibilitando sua comercialização (FIGUEIREDO et al., 2008).

De acordo com a legislação sanitária para produtos de origem animal (BRASIL, 2017), as seguintes características devem ser observadas na inspeção de peixes a serem comercializados: superfície do corpo limpa, com relativo brilho metálico e reflexos multicores próprios da espécie, sem qualquer pigmentação estranha; olhos claros, vivos, brilhantes, luzentes, convexos, transparentes, ocupando toda a cavidade orbitária; brânquias ou guelras róseas ou vermelhas, úmidas e brilhantes com odor natural, próprio e suave; abdômen com forma normal, firme, não deixando impressão duradoura à pressão dos dedos; escamas brilhantes, bem aderentes à pele, e nadadeiras apresentando certa resistência aos movimentos provocados; carne firme, consistência elástica, da cor própria da espécie; vísceras íntegras, perfeitamente diferenciadas, peritônio aderente à parede da cavidade celomática; ânus fechado; e odor próprio, característico da espécie.

## **1.1.2 Principais bactérias que acometem tilápias em tanques de produção**

### **1.1.2.1 *Aeromonas* Stanier, 1943.**

As bactérias do gênero *Aeromonas* abrangem 36 espécies e 12 subespécies descritas, são bastonetes gram negativos, anaeróbios facultativos, podendo ser móveis ou imóveis

(JANDA & ABBOTT, 2010; EUZÉBY, 2020). *Aeromonas* crescem em ágar sangue formando colônias circulares de 1-3 mm de diâmetro, de coloração branca acinzentada, após 24-48 horas de incubação à 35°C e são melhor identificadas usando testes de cultura, coloração de Gram e testes bioquímicos (PARKER & SHAW, 2011; BATRA, et al., 2016).

As principais espécies patogênicas do gênero *Aeromonas* são: *A. hydrophila* (Chester 1901) Stanier 1943, *A. caviae* (ex Eddy 1962) Popoff 1984 e *A. sobria* Popoff e Veron, 1981 (TOMÁS, 2012). A incidência global exata de infecções por *Aeromonas* é desconhecida, sendo as diversas espécies desse gênero encontradas em ambientes aquáticos, solo, alimentos, animais invertebrados, répteis, anfíbios, peixes, aves e mamíferos, incluindo humanos e animais domésticos (JANDA & ABBOTT, 2010; PEIXOTO et al., 2012). Nos últimos anos, vários estudos indicaram presença de *Aeromonas* spp. em produtos de consumo humano obtidos em supermercados (JANDA & ABBOTT, 2010). Em peixes, são considerados invasoras secundárias, pois se instalam ao mesmo tempo que outros organismos patológicos (PAVANELLI et al., 2008).

A patogenicidade de *Aeromonas* spp. está associada a diversos fatores de virulência que auxiliam no estabelecimento da infecção, permitindo a invasão e colonização da bactéria, evitando o sistema de defesa do hospedeiro e causando danos (BATRA et al., 2016). Alguns desses fatores como fímbria (adesinas filamentosas), flagelo, cápsula polissacarídica e cápsula-S, ajudam a proteger a bactéria da fagocitose e do sistema complemento, e facilitam a sua adesão ao hospedeiro (SALYERS & WHITT, 2002).

A produção de várias exotoxinas e enzimas como as hemolisinas, proteases, lipases e elastases causam danos celulares e teciduais (BATRA et al., 2016). Os sistemas de secreção facilitam a translocação de proteínas, os tipos II e III (T2SS e T3SS), presentes em *Aeromonas*, permitem escapar da resposta imune do hospedeiro (TAVARES et al., 2015; BATRA et al., 2016). Outra característica desse gênero é a formação de biofilmes, que permitem sua persistência em sistemas de distribuição de água ou locais de processamento de alimentos (TAVARES et al., 2015).

As infecções em seres humanos ocorrem por via oral, através de água e alimentos contaminados, e por via cutânea, em piscicultores e manipuladores de alimentos, sendo caracterizadas por quadros de gastroenterite, septicemia, infecção respiratória, síndrome urêmica hemolítica, peritonite e feridas cutâneas (FIGUEIREDO et al., 2008; PARKER & SHAW, 2011; ABD-EL-MALEK, 2017).

Em peixes, *Aeromonas* spp. acometem principalmente fígado, baço, rins, cérebro, brânquias e musculatura esquelética, apresentando lesões hemorrágicas em diferentes regiões do corpo, lesões ulcerativas, falta de apetite (anorexia), letargia, hemorragias, alteração na coloração das brânquias, sintomatologia nervosa, septicemia, degeneração das células hepáticas e do epitélio dos

tubos renais, necrose das nadadeiras e morte (SCHERING-PLOUGH, 2007; FIGUEIREDO et al., 2008, GRAF, 2015).

No Brasil, não há dados sobre as perdas econômicas referentes à esta bacteriose, mas sabe-se de seu grande impacto econômico nas criações de tilápias (SCHERING-PLOUGH, 2007).

#### 1.1.2.2 *Streptococcus* Rosenbach, 1884

O gênero *Streptococcus* abrange atualmente 129 espécies e 23 subespécies descritas (EUZÉBY, 2020). Dentre essas, destaca-se a espécie *Streptococcus agalactiae* Lehmann e Neumann, 1896, que causa grandes prejuízos na aquicultura no Brasil (BOTREL et al., 2010), sendo considerada o principal risco sanitário para criações comerciais de tilápia-do-Nilo no país (LEIRA et al., 2017).

*Streptococcus agalactiae* pertence ao grupo B de Lancefield (GBS), são células esféricas ou ovóides, imóveis, não esporuladas, anaeróbicas facultativas, gram-positivas, catalase negativa, formam pares ou cadeias,  $\beta$ -hemolíticas (hemólise completa), sendo caracterizadas por suas cápsulas polissacarídicas e apresentando 9 sorotipos conhecidos (sorotipos I a IX) (FIGUEIREDO, 2017). Os sorotipos mais comuns em peixes no mundo são Ia, Ib e III (KAWASAKI et al., 2018) e o no Brasil, o sorotipo Ib é o mais prevalente (BARONY et al., 2017).

*S. agalactiae* apresenta fatores de virulência, como as toxinas formadoras de poros, que são a  $\beta$ -hemolisina/citolisina ( $\beta$ -H/C, CylE) e o fator CAMP (Cfb) que desencadeiam a lise das células do hospedeiro; fatores de evasão imune como o polissacarídeo capsular rico em ácido siálico (CPS), que previne o reconhecimento da bactéria, o superóxido dismutase (SodA) e o pigmento (renopolieno) que desintoxicam o oxigênio singlete e superóxido, a C5a peptidase (ScpB) e a protease serina (CspA) que promovem aderência da bactéria e previnem o recrutamento de neutrófilos e a morte das bactérias por fagocitose; os fatores de resistência aos peptídeos antimicrobianos (AMPs) como a alanilação do ácido lipoteicóico, proteína de ligação à penicilina (PBP) e pili; e fatores de adesão e invasão da célula hospedeira como as Proteína A (FbsA) e B (FbsB) de ligação ao fibrinogênio, proteína de ligação à laminina (Lmb), proteínas repetidas ricas em serina (Srr) 1 e 2, adesina bacteriana imunogênica (BibA), proteína  $\alpha$ C e gene associado a invasão (IagA) (FACKLAM, 2002; RAJAGOPAL, 2010).

A espécie *S. agalactiae* tem sido isolada de animais homeotérmicos terrestres ou heterotérmicos aquáticos, indicando ampla diversidade de hospedeiros (EVANS et al., 2002). Romano e Mejía (2003) relataram infecções por *Streptococcus* em manipuladores de tilápias infectadas, mais frequentes em mulheres, por terem maior contato com o preparo dos alimentos.

Em humanos, *S. agalactiae* é a causa mais comum de infecção bacteriana fatal em recém-nascidos, por septicemia e meningite, e em adultos pode causar, bacteremia, pneumonia, endocardite, artrite, infecções de tecidos, pele e trato urinário (EVANS et al., 2006; RAJAGOPAL, 2010; DELANNOY et al., 2013).

Os sinais clínicos clássicos de infecção por *S. agalactiae* em peixes são anorexia, escurecimento da pele, sintomas nervosos associados à natação errática, letargia, exoftalmia, opacidade de córnea, hemorragias difusas pelo corpo, na base das nadadeiras e nos opérculos, ulceração da epiderme, congestão branquial, hepatomegalia, esplenomegalia, e morte (SALVADOR et al., 2005; SCHERING-PLOUGH, 2007; MARCUSSO et al., 2015). Há também a ocorrência de estreptococose clínica atípica, onde observa-se peixes letárgicos e surto de mortes sem sinais clínicos externos (LEAL & FIGUEIREDO, 2018).

A estreptococose geralmente se manifesta na fase de engorda das tilápias, quando o produtor já investiu muito em alimento e manejo desses animais (FACIMOTO, 2018). São estimadas perdas anuais acima de 150 milhões de dólares associadas ao gênero *Streptococcus* na piscicultura mundial, e no Brasil, apesar de não existirem dados estatísticos associados às perdas econômicas por esta patologia, estimam-se enormes prejuízos econômicos (SHOEMAKER et al., 2000; SCHERING-PLOGH, 2007).

### **1.1.3 Mecanismos de defesa de peixes**

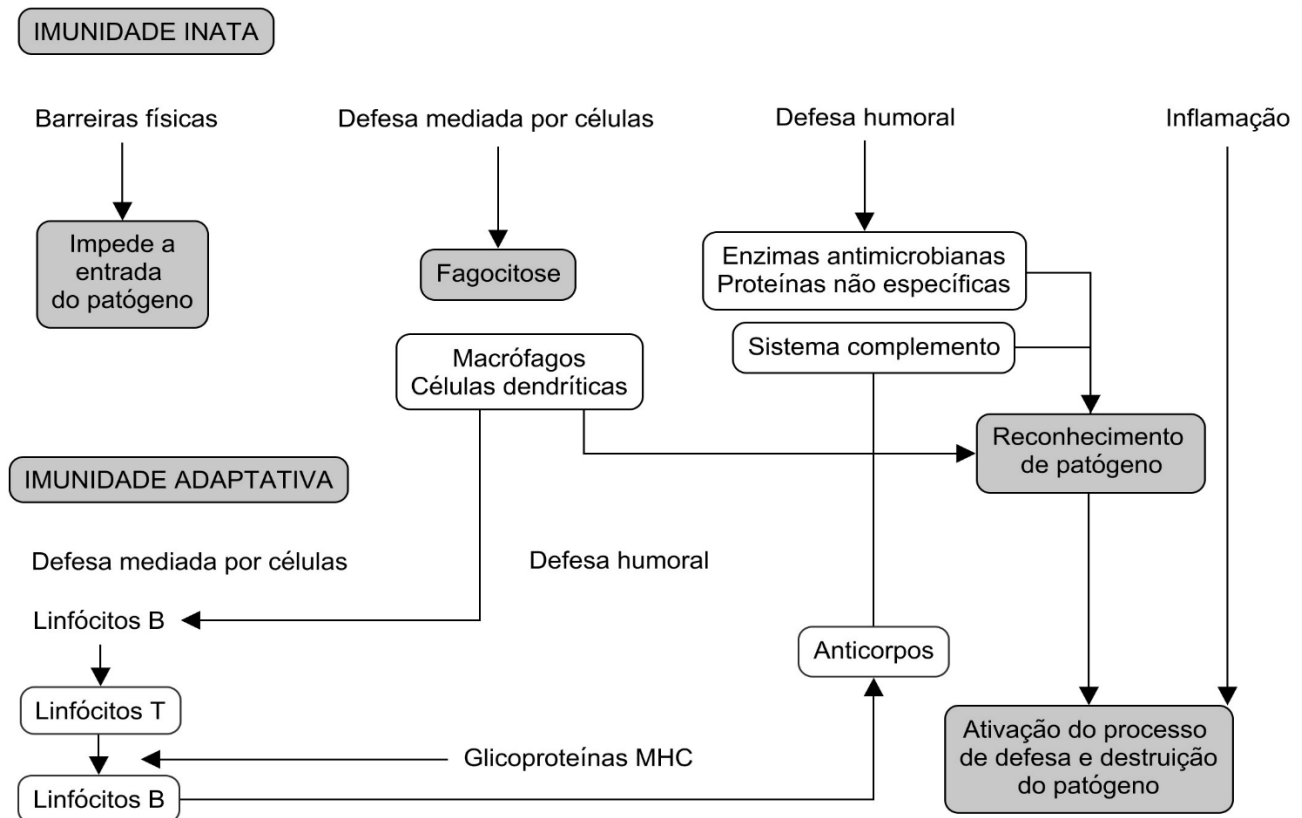
O sistema imune dos peixes é responsável pela destruição de microrganismos através de dois mecanismos de defesa que atuam na prevenção de surto de doenças: os mecanismos de defesa inatos (não específico) e os mecanismos de defesa adaptativos (específico), ambos divididos em fatores de defesa mediada por células e fatores humorais (BILLER-TAKAHASHI, 2014).

A imunidade inata é composta por barreiras físicas de defesa (como o muco, as escamas e a pele) que atuam para impedir a entrada de patógenos; por células de defesa que são responsáveis pela destruição de patógenos (inflamação, fagocitose, fagocitose com células acessórias e citotoxicidade não específica); e substâncias encontradas no muco, soro e ovos dos peixes que inibem o crescimento de microrganismos infecciosos (lisozima, sistema complemento, proteína C reativa, interferon, lectina e transferrina) (YANO, 1996; KUBITZA & KUBITZA, 2013).

Na imunidade adaptativa, a defesa mediada por células acontece após a fagocitose da bactéria pelas células do sistema inato, onde fragmentos da fagocitose ligam-se a marcadores superficiais das células apresentadoras de antígenos (macrófagos, células dendríticas e linfócitos B) e são apresentados aos linfócitos T com ajuda do complexo principal de histocompatibilidade de

classe II (MHC II), ativando os linfócitos B; e na defesa humoral, os linfócitos B se dividem e formam células que sofrem diferenciação, originando os plasmócitos (linfócitos B ativados) que produzem anticorpos específicos para cada antígeno, e as células de memória, que ficam inativas, mas prontas para responder a um posterior contato com o antígeno (KUBITZA & KUBITZA, 2013; BILLER-TAKAHASHI & URBINATI, 2014; ABBAS et al., 2015) (Figura 5).

**Figura 5** - Sistema imunológico de peixes.



Fonte: Traduzido de Biller-Takahashi & Urbinati, 2014.

As moléculas de anticorpos possuem uma estrutura simétrica do núcleo composta de duas cadeias leves idênticas e duas cadeias pesadas idênticas, que consistem em regiões variáveis de aminoterminal (V) (reconhecimento do antígeno) e regiões carboxiterminais constantes (C); as regiões C das cadeias pesadas medeiam as funções efetoras e com base nas suas diferenças estruturais dividem-se as moléculas de anticorpos em classes (isotipos) (ABBAS, 2015). Em peixes teleósteos, três diferentes isotipos de cadeia pesada de Ig foram identificados: IgM, IgD e IgT/Z, sendo encontrados na pele, no intestino, no muco branquial, na bÍlis e sistemicamente no plasma (MASHOOF & CRISCITIELLO, 2016).

A imunidade adaptativa produz respostas mais efetivas a exposições repetidas ao mesmo antígeno, que são mais capazes de eliminar o antígeno do que as respostas primárias, devido

a sua memória imunológica, proporcionada pela ativação dos linfócitos da memória que foi induzida durante a resposta imune primária, sendo uma das razões pelas quais as vacinas conferem proteção duradoura contra infecções (ABBAS et al., 2015).

#### 1.1.4 Vacinas para peixes

Atualmente, a principal medida terapêutica empregada em surtos de bacterioses é o uso de antibióticos, que utilizados de forma indiscriminada podem afetar a biodiversidade das comunidades de fitoplâncton e zooplâncton, pela poluição e degradação do meio ambiente, além da possibilidade de ocorrência de seleção e disseminação de estirpes bacterianas resistentes, e a presença de resíduos de antimicrobianos nos peixes e meio ambiente que podem afetar os humanos através da cadeia alimentar (SMITH et al., 1994; ABUTBUL et al., 2004; BURRIDGE et al., 2010).

Existem dois antimicrobianos aprovados para uso na aquicultura no Brasil, a oxitetraciclina (OTC) e o florfenicol (FFC), sendo apenas esse último autorizado para tratamento de doenças em tilápia-do-Nilo (SINDAN, 2018). Além desses, outros aprovados para uso em outras espécies ou mesmo não aprovados, são ilegalmente utilizados (ASSANE, 2018).

Uma alternativa ao uso de antibióticos na prevenção de infecções é a vacinação dos peixes, que induz a formação de anticorpos específicos, conferindo proteção e segurança para o hospedeiro imunizado (CHAKRAVARTI et al., 2001). A proteção vacinal contra *Streptococcus agalactiae* é sorotipo-específica, pois cada sorotipo possui uma estrutura química diferente, e portanto os anticorpos produzidos contra um deles não são capazes de reagir com os demais e neutralizá-los, dessa forma, a eficácia da vacina pode variar devido à existência de diferentes sorotipos e ao perfil genético das cepas circulantes (FIGUEIREDO, 2017).

Os sistemas de entrega de antígenos utilizados nas vacinas em tilápias podem ser classificados em vacinas replicativas e não replicativas (MUNANG'ANDU et al., 2014). O sistema replicativo compreende vacinas vivas atenuadas, usando passagem serial e tratamento químico para atenuar cepas virulentas em cepas avirulentas; vacinas de vetores vivos heterólogos, que codificam a proteína antigênica de um patógeno virulento inserido em outros organismos replicativos que não causam doença no hospedeiro vacinado; e vacinas de DNA que são feitas usando diferentes proteínas de superfície de bactérias codificadas em plasmídeos de vetores (MUNANG'ANDU et al., 2016).

O sistema não replicativo inclui as vacinas inativadas de células inteiras, aplicadas com adjuvantes que aumentam sua imunogenicidade e que são consideradas seguras por não apresentarem perigo de reversão para virulência; as vacinas de subunidades, desenvolvidas para codificar proteínas antigênicas específicas; e vacinas extracelulares, que utilizam proteínas

extracelulares de bactérias para produção de imunidade protetora contra diferentes doenças de peixes (PASNIK et al., 2005; MUNANG'ANDU et al., 2014; MUNANG'ANDU et al., 2016; STRATEV & ODEYEME, 2016).

Os sistemas de administração usados para administrar vacinas em tilápias podem ser divididos em vacinação parenteral (injeção intraperitoneal e intramuscular) e mucosa (vacinação por imersão, spray e oral) (MUNANG'ANDU et al., 2016, STRATEV & ODEYEME, 2016). A administração de adjuvantes com antígenos manifesta respostas de anticorpos significativamente superiores em peixes, os adjuvantes à base de óleo são os mais eficazes quando injetados intraperitonealmente (MORRISON & NOWAK, 2002).

Algumas variáveis podem afetar a resposta de anticorpos em peixes: a temperatura da água, a concentração do antígeno (dose e/ou reforço), o antígeno e os diluentes adjuvantes, a via de administração, a idade e o tamanho do peixe, o histórico genético, entre outros (MORRISON & NOWAK, 2002).

Os peixes são animais heterotermos, tendo sua temperatura variada em função da temperatura da água, as tilápias são peixes tropicais que apresentam conforto térmico entre 27 a 32°C (KUBTIZA, 2000). Dessa forma, esse fator é fundamental para eficiência da resposta imune, que varia conforme a zona de conforto térmico do animal, levando a um retardo ou até ineficiência na montagem da resposta imunológica (FIGUEIREDO, 2009).

A escolha do microrganismo para o preparo da vacina deve levar em conta a virulência da amostra, para que haja uma indução eficiente da resposta imune, e a incorporação de substâncias (adjuvantes) que potencializem a indução e tempo da resposta imune, mas que não provoquem lesões nos tecidos dos animais que podem acarretar em descarte da carcaça (FIGUEIREDO, 2009).

A idade mínima para a administração de vacinas é após a maturação dos órgãos imunes, quando o sistema imune dos peixes está completamente desenvolvido, para que as vacinas sejam eficientes, porém ainda são necessários estudos específicos para cada espécie para determinação da idade ideal (FIGUEIREDO, 2009).

## **1.2 Justificativa**

O consumo de peixes têm aumentado mundialmente nos últimos anos, e o Brasil se insere nesse contexto, atendendo uma demanda de 14,4 kg por habitante/ano, acima do recomendado pela Organização Mundial de Saúde e com grande potencial de ampliação de produção, para que além

da demanda nacional atenda também a exportação para outros países, sendo esse um segmento de grande relevância para a economia nacional. A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura estima que, em 2025, o Brasil registre um crescimento de 104% na produção de pesca e aquicultura.

Para que essa ampliação seja realizada de forma consciente e sustentável, tendo em vista a necessidade da produção em altas densidades de estocagem, deve-se investir em pesquisas e produtos que, juntamente com o adequado manejo, proporcionem a redução de perdas por patógenos e melhorem a qualidade do produto.

Além da importância econômica, o investimento na prevenção de doenças de peixes atua também na prevenção da contaminação de seres humanos, visto que tratam-se de zoonoses, que por vezes podem ser resistentes aos antibióticos mais comumente utilizados, sendo capazes de trazer sérias consequências nos casos mais graves de infecção, principalmente para os grupos de risco. A antibioticoterapia como medida de controle dessas doenças também pode acarretar em resíduos de antibióticos na carne dos peixes e no meio ambiente.

Dessa forma, a indústria necessita de estratégias para a minimização desses efeitos negativos, sendo a vacinação dos peixes de produção uma ferramenta já utilizada em países produtores de pescados em tanques artificiais, e que tem se expandido nos últimos anos. Entretanto, ainda há escassez no mercado de uma vacina comercial de alta eficácia para as produções brasileiras.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Avaliar a capacidade imunoprotetora de uma vacina bivalente contra *Aeromonas sobria* e *Streptococcus agalactiae* em tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) provenientes de tanques de produção do Oeste do Paraná, Brasil, sob condições experimentais.

### 2.2 Específicos

- Desenvolver e administrar por via intraperitoneal (i.p.) uma vacina bivalente com cepas de *A. sobria* e *S. agalactiae* em tilápias-do-Nilo;
- Avaliar a atividade aglutinante do soro das tilápias-do-Nilo após aplicação da vacina bivalente;



- Infectar os indivíduos vacinados e não-vacinados com *A. sobria* e *S. agalactiae* 30 dias após a vacinação;
- Analisar a vacina através de medidas de eficácia de vacinas até 30 dias após a infecção experimental;
- Verificar a ocorrência de alterações histológicas em pele, fígado e baço das tilápias-do-Nilo após a vacinação e após a infecção experimental.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Peixes e período pré-experimental**

O experimento foi conduzido no Laboratório de Tecnologia de Produção de Vacinas da Universidade Federal da Integração Latino-Americana - UNILA - Brasil. Para as análises foram utilizadas um total de 92 tilápias (*Oreochromis niloticus*), com peso médio de 50g, de origem comercial das cidades de Toledo e Foz do Iguaçu, no oeste do Paraná. Os peixes foram distribuídos em dois aquários com 200L de água desclorada, com fluxo de 1000 litros/hora, aeração contínua e temperatura controlada a 30°C. A alimentação era fornecida duas vezes ao dia com ração comercial (36% de proteína bruta) na proporção de 1% de peso vivo por dia e a limpeza era realizada diariamente por sucção. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da UNILA, protocolo 001/2018 (Anexo I).

#### **3.2 Isolamento e cultivo das cepas bacterianas**

Foram isoladas *Aeromonas sobria* e *Streptococcus agalactiae* de tilápias com sinais clínicos de bacterioses de tanques de produção de Foz do Iguaçu e Toledo. Para os isolamentos das cepas vacinais e das cepas de infecção experimental foram coletadas amostras de fragmentos de rim, fígado, baço, coração e cérebro. As amostras foram inoculadas em meio de ágar sangue e acondicionadas em estufa a 28°C por 48h. Após o crescimento das colônias, estas foram previamente identificadas através dos testes de catalase e coloração de Gram.

### 3.3 Identificação bioquímica das cepas isoladas

A identificação bacteriana automatizada foi realizada utilizando o equipamento VITEK® 2 Compact (bioMérieux, Inc.), de acordo com as instruções do fabricante. Para a identificação das estirpes foi empregado o cartão GN (cartão para identificação de bactérias gram-negativas) e o cartão GP (cartão para identificação de bactérias gram positivas). Colônias de culturas com 24 horas foram suspensas em solução de NaCl 0,45%. Após a identificação, as cepas foram cultivadas em meio líquido de infusão de cérebro e coração (BHI) e incubadas em incubadora shaker à 30°C por 48h. As análises foram feitas pelo Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Ministro Costa Cavalcanti.

### 3.4 Identificação do sorotipo da cepa isolada de *S. agalactiae*

Após a identificação bioquímica de *Streptococcus agalactiae*, as cepas foram submetidas a análise de soroaglutinação para determinação do sorotipo com os kits comerciais Strep B Latex Ib (Statens Serum Institute, Dinamarca) lote LBib-P1 e Strep B Latex III (Statens Serum Institute, Dinamarca) lote LSBIII-1-8, de acordo com as recomendações do fabricante. As análises foram feitas pelo Laboratório de Doenças de Animais Aquáticos (AQUAVET) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

### 3.5 Desenvolvimento da vacina bivalente

Para o preparo da vacina, as culturas foram inativadas por adição de formalina tamponada a 10%, concentração final de 3%, em incubadora *Shaker*, em temperatura ambiente por 24h. Uma alíquota de cada cultura foi semeada em ágar sangue para confirmação da inativação das células. As culturas inativadas foram centrifugadas a 6000 RPM por 30 minutos, a 4°C. Os pellets das culturas foram lavados e ressuspensos em solução salina estéril a 0,9%. A concentração bacteriana foi determinada por contagem em câmara Neubauer, obtendo uma concentração final de  $2 \times 10^8$  células/mL para *S. agalactiae* e  $9 \times 10^8$  células/mL para *A. sobria*. Para a dose da vacina, a concentração de cada cepa foi ajustada para  $1 \times 10^7$  células/dose e misturadas a um adjuvante (MONTANIDE™ ISA). Após a homogeneização da vacina, a mesma teve o pH ajustado e foi refrigerada durante 48h para análise da estabilidade.

### 3.6 Delineamento e infecção experimental

Para a vacinação e infecção experimental, os peixes foram anestesiados com eugenol e pesados individualmente. No grupo tratamento, 46 indivíduos receberam uma dose de 50µL da vacina por via intraperitoneal (i.p.) e no grupo controle, 46 indivíduos receberam 50µL de solução salina estéril (NaCl 0,9%) por via i.p. A indução da infecção experimental foi realizada 30 dias após a vacinação, onde a concentração das cepas isoladas de ambas bactérias foi ajustada para  $1 \times 10^8$  células/dose e foram aplicadas doses de 50µL por via i.p em todos os indivíduos de cada grupo (Tabela 1).

**Tabela 1** – Delineamento experimental da vacina de *Streptococcus agalactiae* e *Aeromonas sobria* aplicada por via intraperitoneal (i.p.) em tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) em Foz do Iguaçu-PR.

Grupo	Tipo de tratamento	Nº de tilápias	Vacinação	Desafio	Eutanásia
			Dia 0	Dia 30	Dia 60
1	Controle	46	Não	i.p.	Sim
2	Vacinado	46	i.p.	i.p.	Sim

Fonte: a autora, 2019.

### 3.7 Teste de aglutinação de antígenos

O teste de aglutinação foi conduzido 30 dias após a vacinação. Foram coletados soros de 2 peixes de cada grupo experimental. O teste foi realizado com o antígeno de ambas bactérias, *S. agalactiae* e *A. sobria*, separadamente. Foram adicionados 20 µL do antígeno da bactéria e 20 µL dos soros de peixes do grupo controle e do grupo vacinado nas diluições 1:10, 1:100 e 1:1000. Os soros foram diluídos em solução salina estéril (NaCl 0,9%).

### 3.8 Avaliação clínico-patológica de peixes

A avaliação dos sinais clínicos foi realizada diariamente nos períodos de pós-vacina e pós-desafio onde as mudanças externas macroscópicas e as mudanças comportamentais que foram observadas foram anotadas em uma ficha de análise. Foram anotadas a primeira aparição de uma alteração em um peixe em cada grupo separadamente.

As alterações foram analisadas com base nas alterações comuns para aeromonose e estreptococose, como: anorexia, exoftalmia, distensão do abdômen, natação errática, lesão da pele, olhos opacos, escurecimento da pele, letargia, hemorragia, lesões hemorrágicas, erosão das nadadeiras, ulceração, descamação, baixa alimentação, fluido na cavidade visceral, necrose das brânquias, alteração na coloração e/ou tamanho dos órgãos, deterioração dos órgãos e morte.

### **3.9 Análises histopatológicas**

Foram coletados fragmentos de pele da região intracelomática de 5 peixes de cada grupo experimental, uma semana após a vacinação (T1), de 3 peixes de cada grupo, duas semanas após a vacinação (T2) e de 2 peixes de cada grupo, três semanas após a vacinação (T3). Ao fim do experimento, todos os peixes sobreviventes foram submetidos à eutanásia por aprofundamento do plano anestésico, necropsiados e foram coletados fragmentos de fígado e baço de 4 peixes de cada grupo experimental. As amostras foram acondicionadas em paraformaldeído e refrigeradas até o momento da análise histopatológica. As amostras foram encaminhadas para a Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) e foram submetidas ao processamento para a realização de cortes histológicos de 5µm, corados com hematoxilina e eosina. As lâminas foram analisadas, quanto às alterações estruturais e celulares, e classificadas pela intensidade da lesão: (0) Ausente, (1) Discreta, (2) Moderada e (3) intensa ou severa.

### **3.10 Análise Estatística**

Para verificar a significância estatística entre os grupos vacinados e controle, foi utilizado o teste de Qui-quadrado corrigido por Yates (nível de significância de 5%). O cálculo do Risco Relativo (RR) (IC=95%) foi realizado para verificar a força de associação entre a exposição à vacina e o seu efeito protetor. Para avaliar os pesos dos grupos controle e vacinado, foi aplicado o teste de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ). Para comparação das Curvas de Sobrevivência foi aplicado o teste Log-rank (Mantel-Cox) ( $p < 0,05$ ). A análise dos resultados histológicos foi realizada através do teste T de Student. Para os cálculos mencionados, foi utilizado o pacote estatístico GraphPad Prism. A eficácia da vacina foi calculada como porcentagem de sobrevivência relativa (RPS), segundo Amend

(1981):  $RPS = 1 - (\% \text{ mortalidade dos animais vacinados} / \% \text{ mortalidade dos animais controle}) \times 100$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Identificação bacteriana de *Aeromonas sobria* e *Streptococcus agalactiae*

A identificação bacteriana obteve 99% de probabilidade para *Aeromonas sobria* e 98% de probabilidade para *Streptococcus agalactiae*, conforme Tabelas 2 e 3.

**Tabela 2** - Relatório de Laboratório do equipamento Vitek2 Compact mostrando a identificação de *Aeromonas sobria*

APPA	-	ADO	-	PyrA	-	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	-		

Cartão: GN (Gram-negativo); 99% Probabilidade. Confiança: Excelente identificação. - = 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.

Fonte: a autora, Vitek2, 2019.

**Tabela 3** - Relatório de Laboratório do equipamento Vitek2 Compact mostrando a identificação de *Streptococcus agalactiae*.

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	+										

Cartão: GP (Gram-positivo); 98% Probabilidade. Confiança: Excelente identificação. - = negativo; + = positivo; (-) or (+) = reações fracas perto do limiar de teste. 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 = polymixin B resistance; ProA = Pro arylamidase beta-glucuronidase; PUL = pullulan; PyrA = L-pyroglytamic acid arylamidase; SAC = sucrose; SAL = salicin; TyrA = tyrosine arylamidase; URE = urease.

Fonte: a autora, Vitek2, 2019.

O resultado da sorotipagem específica para as amostras de *Streptococcus agalactiae* apresentou serem do sorotipo III.

#### 4.2. Eficácia da vacina bivalente contra *Aeromonas sobria* e *Streptococcus agalactiae*

Os resultados da eficácia da vacina contra *A. sobria* e *S. agalactiae* inoculada via i.p em tilápias foram  $P=0,0042$ , indicando significância estatística entre os grupos, RR=0,13 (IC 95%: 0,02 - 0,75), indicando que há um risco diminuído de que os indivíduos expostos (vacinados) desenvolvam a doença, e RPS=91% (Tabela 4).

**Tabela 4** - Eficácia de uma vacina bivalente contra *Aeromonas sobria* e *Streptococcus agalactiae* inativados aplicada por via intraperitoneal em tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). \* Qui-quadrado corrigido por Yates; RR = Risco Relativo; RPS = Porcentagem Relativa de Sobrevivência.

Tratamento	Óbitos/Total (%)	$P^*(<0,05)$	RR (IC 95%)	RPS%
Vacinado	1/34 (2,94)	0,0042	0,13	91
Controle	11/34 (32,34)			

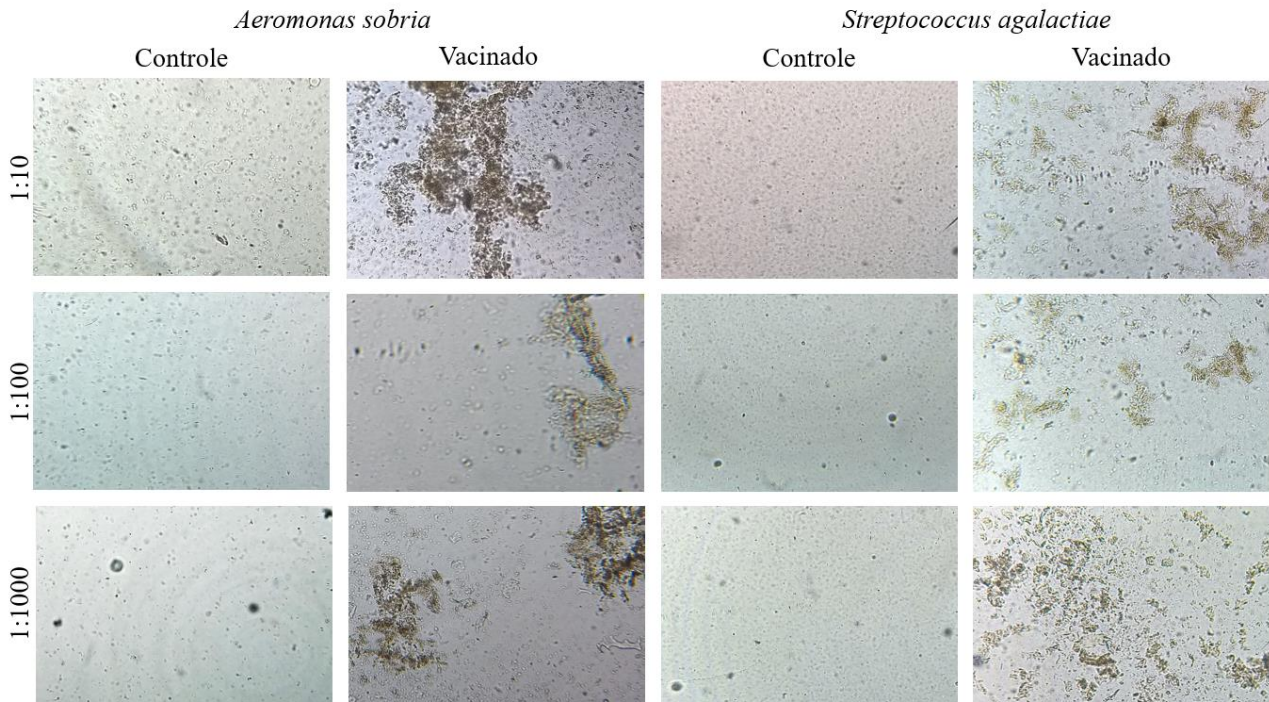
Fonte: a autora, 2019.

#### 4.3. Aglutinação de antígenos pós vacina

Os testes de aglutinação apresentaram alta atividade aglutinante com os soros de peixes vacinados para os antígenos de ambas bactérias nas três diluições testadas (1:10, 1:100 e

1:1000) após 30 dias da aplicação da vacina por via i.p. Os soros dos peixes do grupo controle não apresentaram aglutinação para os antígenos de ambas bactérias (Figura 6).

**Figura 6** - Visualização do teste de aglutinação com os antígenos de *Aeromonas sobria* e *Streptococcus agalactiae* e soros de tilápias-do-Nilo dos grupos controle e vacinado, nas diluições 1:10, 1:100 e 1:1000. Objetiva 40x.



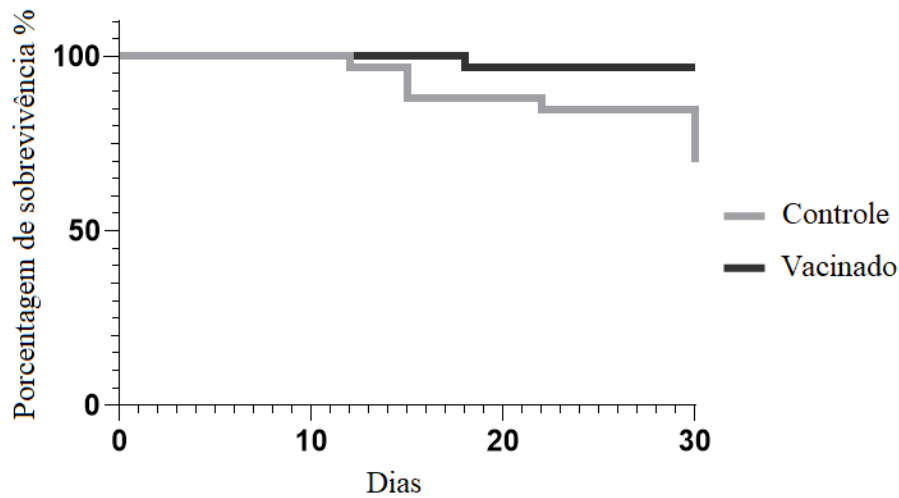
Fonte: autora, 2019.

#### 4.4. Mortalidade de tilápias dos grupos controle e vacinado após desafio experimental

A mortalidade do grupo vacinado foi de 01 (2,94%) e do grupo controle de 11 (32,34%). No grupo vacinado, o peixe morreu no 18º dia pós infecção experimental, porém não apresentou sinais clínicos das doenças.

No grupo controle, os 11 peixes morreram nos dias 12, 15, 21, 22 e 30 após a infecção experimental. As curvas de sobrevivência dos grupos controle e vacinados apresentaram diferenças significativas ( $P = 0,0035$ ) (Figura 7).

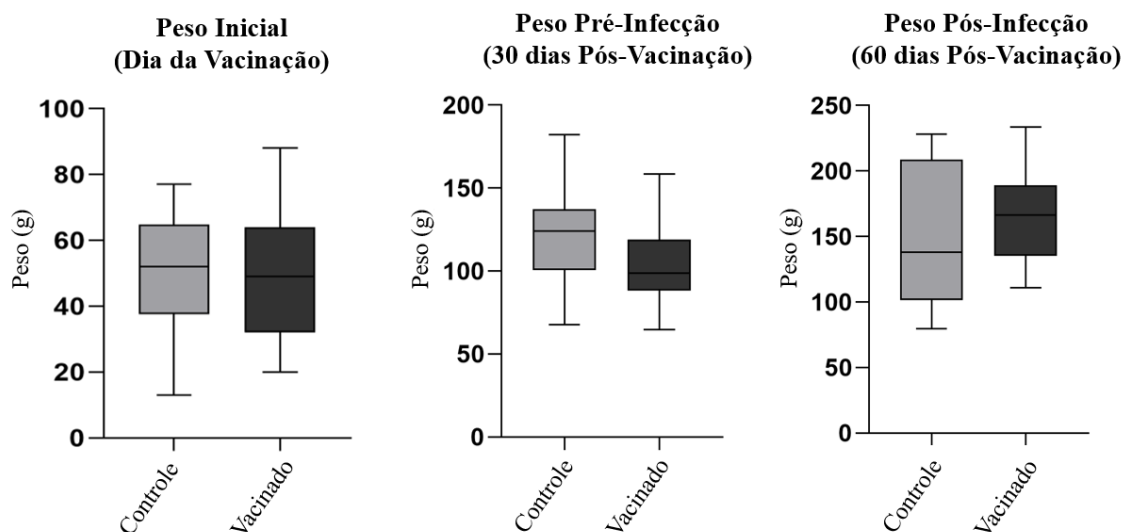
**Figura 7** - Sobrevivência de tilápias-do-Nilo vacinadas e não-vacinadas (controle) após infecção intraperitoneal com  $1 \times 10^8$  células/dose de *Aeromonas sobria* e  $1 \times 10^8$  células/dose de *Streptococcus agalactiae* durante o período experimental de 30 dias.  $P = 0,0035$ .



Fonte: a autora, 2019.

No dia da vacinação, os peixes dos grupos controle e vacinados apresentaram um peso médio de  $50,2 \pm 17,2$  g e  $50,0 \pm 19,2$  g, respectivamente, sem diferença significativa ( $P = 0,7133$ ). Trinta dias após a vacinação e antes da infecção experimental, os peixes dos grupos controle e vacinado apresentaram peso médio de  $119,3 \pm 27,9$  g e  $103,3 \pm 23,7$  g, com diferença significativa ( $P = 0,0092$ ). Sessenta dias após a vacinação e trinta dias após a infecção experimental, os peixes controle e vacinados apresentaram peso médio de  $150,0 \pm 50,3$  g e  $164,2 \pm 33,7$  g, respectivamente, não apresentando diferença significativa ( $P = 0,2197$ ) (Figura 8).

**Figura 8** - Variação do peso dos peixes dos grupos controle e vacinado durante o experimento: dia da vacinação ( $P = 0,7133$ ), dia da infecção experimental ( $P = 0,0092$ ) e dia da eutanásia ( $P = 0,2197$ ).



Fonte: a autora, 2019.



#### 4.5. Proteção da vacina bivalente contra sinais clínicos de infecção por *Aeromonas sobria* e *Streptococcus agalactiae*

Os peixes de ambos os grupos apresentaram baixa ingestão alimentar após a inoculação de solução salina e vacina, que retornou ao normal no dia seguinte (Figura 9). Os peixes dos grupos controle e vacinado não apresentaram lesão na região de inoculação (Figura 10). Ao final do experimento, os peixes do grupo vacinado não apresentaram sinais clínicos macroscópicos.

Os sinais clínicos dos peixes do grupo controle foram: hemorragias; deterioração e hemorragia das nadadeiras; lesões ulcerativas; líquido amarelo ou com sangue presente na cavidade visceral; brânquias com excesso de muco e presença de áreas necróticas (amareladas ou marrons); fígado deteriorado e hemorrágico; vesícula biliar escura e cor pálida dos órgãos; anorexia; cor da pele alterada; letargia; natação irregular (indicando envolvimento do sistema nervoso central) e olhos opacos (Tabela 5) (Figura 11).

**Tabela 5** – Ficha de análise das características físicas externas e internas e características de comportamento observadas nos períodos pós-vacinação e pós-infecção e na necropsia, nos grupos controle e vacinado. DPV = Dias Pós-Vacinação; C = Peixe(s) do grupo controle; V = Peixe(s) do grupo vacinado.

Sinais Clínicos	1 DPV	Dias Pós-Infecção											Necropsia				
		1	4	5	6	7	12	15	17	18	20	21		22	29	30	
Anorexia																	C
Exoftalmia																	
Distensão do Abdômen																C	C
Natação Errática									C								
Lesão da pele				C	C	C	C										C
Olhos opacos									C								C
Escurecimento da pele									C								
Letargia											C						C
Hemorragia						C	C										C
Lesões hemorrágicas																	C
Erosão das nadadeiras									C								C
Ulceração																	
Descamação																	C
Baixa alimentação	VC	VC															C
Fluido na cavidade visceral																	
Necrose das brânquias																	
Alteração na coloração dos órgãos																	
Alteração no tamanho dos órgãos																	
Deterioração dos órgãos																	
Morte									C	C	V	C	C	C			

Fonte: a autora, 2019.

**Figura 9** – Peixes dos grupos controle (a) e vacinados (b) após administração via i.p. de 50  $\mu$ L de solução salina estéril (NaCl 0,9%) e dose da vacina, respectivamente.

a)



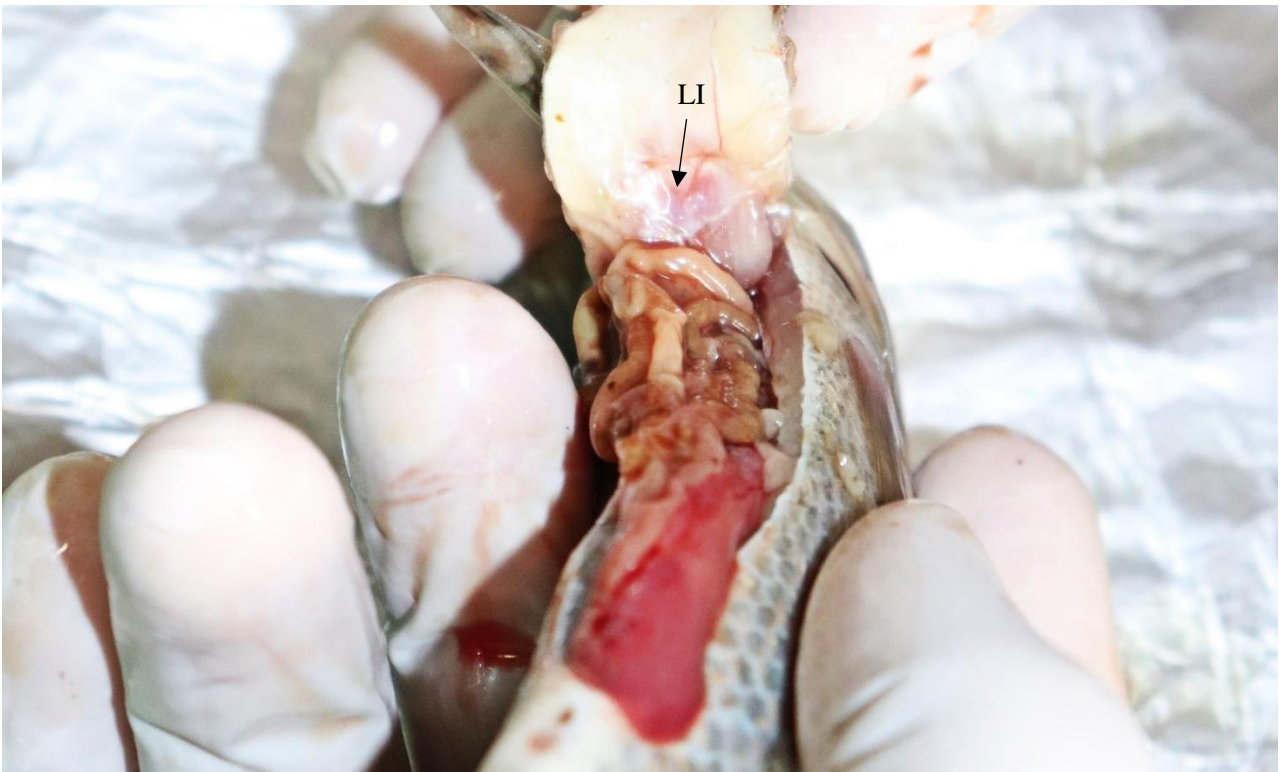
b)



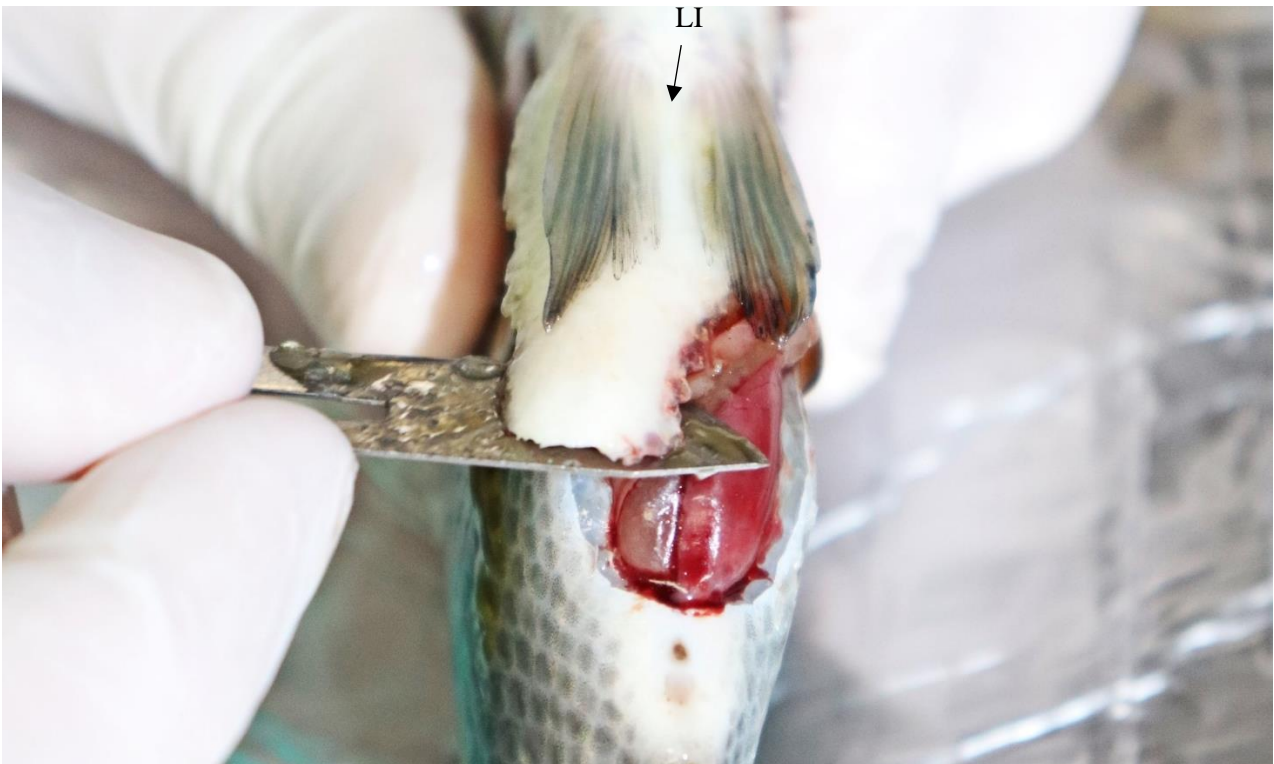
Fonte: Adrieli Barboza de Souza, 2019.

**Figura 10** - Região intraperitoneal dos peixes dos grupos controle (a) e vacinado (b) sem lesões no local de inoculação (LI).

a)



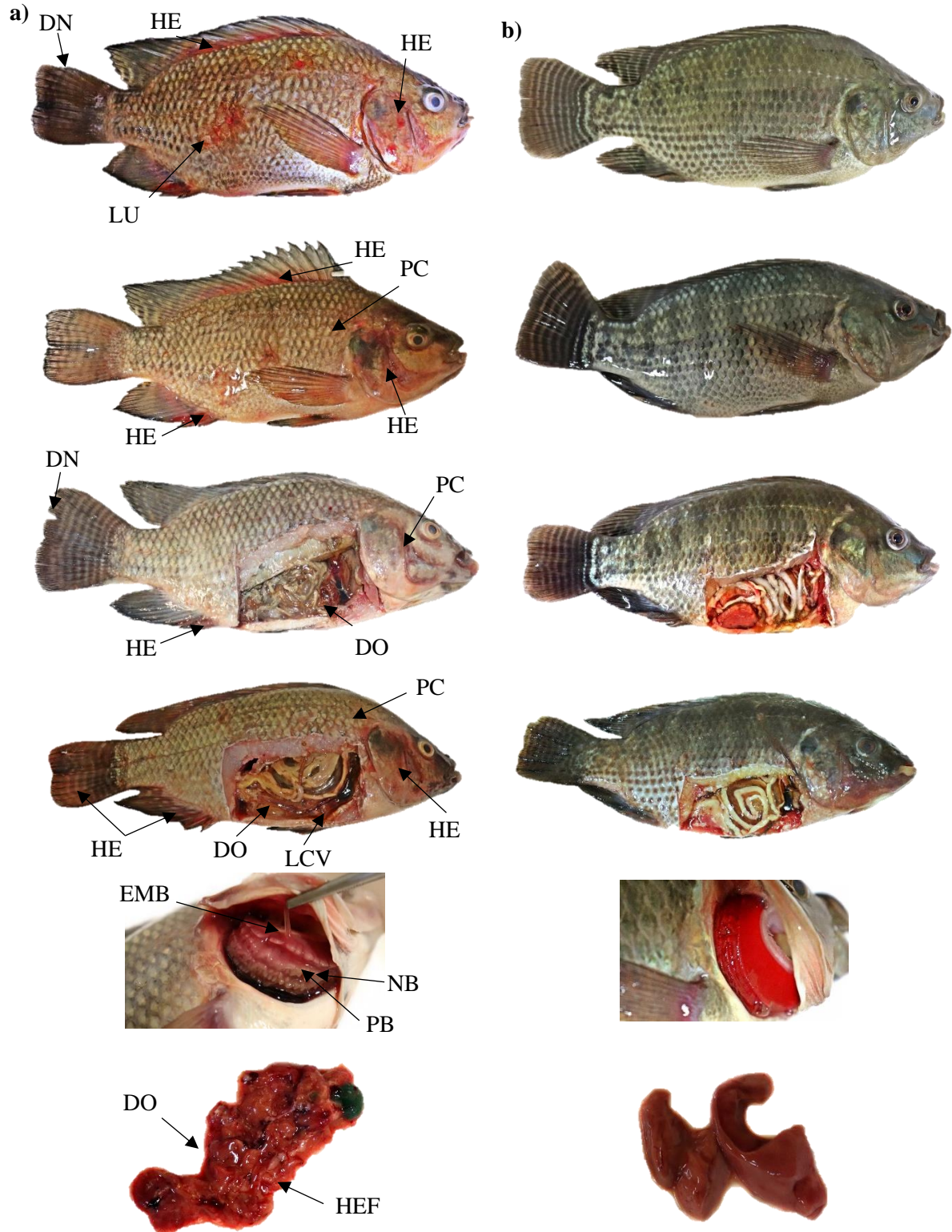
b)



Fonte: Adrieli Barboza de Souza, 2019.



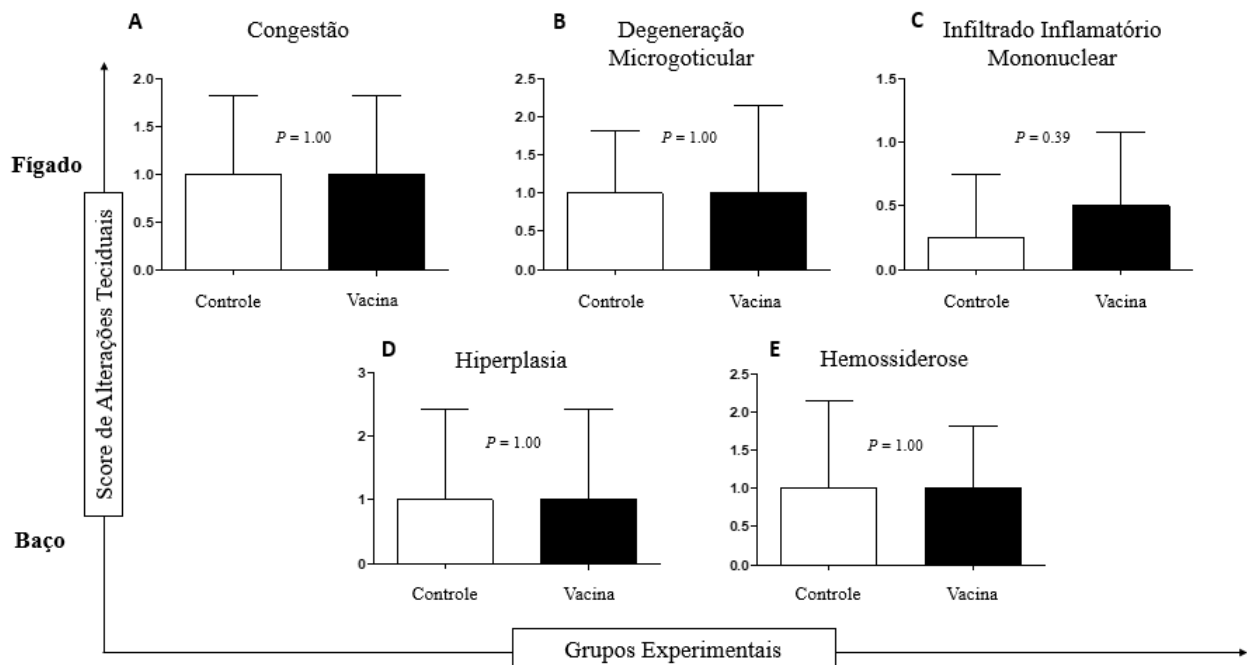
**Figura 11** – a) Peixes do grupo controle após infecção experimental por *A. sobria* e *S. agalactiae* apresentando hemorragias (HE) pelo corpo e nadadeiras, deterioração das nadadeiras (DN), lesões ulcerativas (LU), palidez cutânea (PC), líquido amarelado/sanguinolento na cavidade visceral (LCV), deterioração de órgãos (DO), excesso de muco nas brânquias (EMB), necrose (NB) e palidez das brânquias (PB), deterioração (DO) e hemorragia (HE) do fígado. b) Peixes do grupo vacinado com aparência saudável, sem sinais clínicos externos e internos.



#### 4.6. Análise Histopatológica

A análise histopatológica de fígado das tilápias de ambos os grupos apresentaram: congestão, degeneração microgoticular difusa ou multifocal e infiltrado inflamatório mononuclear difuso ou multifocal. As análises de baço das tilápias de ambos os grupos apresentaram: hiperplasia de polpa branca (grupo vacinado) e de poupa vermelha (grupo controle) e hemossiderose. Não houve diferença estatística entre os grupos vacinado e controle (Figura 12).

**Figura 12** – Resultado da análise histopatológica de fígado e baço de tilápias-do-Nilo vacinadas e não-vacinadas (controle) após infecção intraperitoneal com  $1 \times 10^8$  células/dose de *Aeromonas sobria* e  $1 \times 10^8$  células/dose de *Streptococcus agalactiae* durante o período experimental de 30 dias. Os grupos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.



Fonte: autora, 2020.

As análises histológicas teciduais da região intraperitoneal das tilápias do grupo vacinado apresentaram: deposição de colágeno perpendicular à musculatura, áreas focais de formação de cartilagem, hiperqueratose e hiperplasia no T2 e melanócitos subepiteliais no T3. O grupo controle apresentou: infiltrado inflamatório no T1, hiperplasia, degeneração microgoticular do músculo e autólise no T3.

## 5. DISCUSSÃO

Nas duas últimas décadas, o consumo per capita de peixes aumentou em mais de 100%, atingindo um recorde de 20 kg ano<sup>-1</sup> em 2014 (FAO, 2016). No Brasil, a piscicultura movimenta cerca de R\$ 4 bilhões/ano e gera 1 milhão de empregos diretos, com produção estimada em 722.560 mil toneladas anuais, sendo 400.280 mil/ton/ano de tilápia, 287.910 mil/ton/ano de “Peixes Nativos” e 34.370 mil/ton/ano de outras espécies (PEIXE BR, 2020). A preferência de piscicultores e empresários pela tilápia se dá por fatores como: a facilidade de criação, resistência às doenças, sabor da carne, bem como a utilização de sua pele, na medicina, indústria farmacêutica e em artefatos de couro (CAMOLEZE, 2019).

No Brasil, a criação da tilápia para fins comerciais e econômicos teve início em 1990, no estado do Paraná, sendo a região oeste do estado pioneira na implementação de frigoríficos dedicados exclusivamente ao processamento de tilápias, e em pouco tempo tornando o estado no maior produtor nacional e mantendo essa posição através de investimentos na produção (KUBTIZA, 2003; PEIXE BR, 2020).

Segundo Gentry (2017), existem condições para a produção mundial anual de peixes ser cada vez maior. Entretanto, um dos problemas que dificulta o aproveitamento do potencial de expansão da piscicultura é o volume de perdas causadas por doenças bacterianas associado ao surgimento de várias cepas resistentes aos poucos antimicrobianos disponíveis para uso legal no setor (ASSANE, 2018).

Vacinação, quimioterapia e uso de estimulantes são as estratégias comprovadas mais utilizadas mundialmente na piscicultura, visando alternativas para a eficiência e otimização da criação de peixes, com redução do estresse, fortalecimento do sistema imunológico e da saúde dos animais, bem como o combate às doenças (BALDISSEROTTO et al., 2014). O sucesso na piscicultura não depende de apenas um fator, mas sim de um conjunto de ações, e dessa forma a imunização dos peixes atua como um complemento importante na obtenção de produtos de qualidade e conseqüentemente maior rendimento na produção.

Estudos (MELO et al., 2015; MUNANG'ANDU et al., 2016; LIU et al., 2016) que analisaram diversos protocolos vacinais em tilápias demonstram que as vacinas inativadas de células inteiras correspondem ao sistema de entrega de antígeno mais utilizado, por não representarem risco de reversão à virulência. O sistema de administração intraperitoneal é comumente o mais utilizado e apresenta melhores resultados comparado a outros sistemas, como por banho de imersão, via spray ou via oral (adicionados à ração), visto que esses sistemas, apesar de serem de mais fácil manejo, não

estimulam a produção de anticorpos de forma eficaz (LAMERS et al., 1985; EVANS et al. 2004; LONGHI et al., 2012; MUNANG'ANDU et al., 2016; LIU et al., 2016).

A aglutinação é função dos anticorpos, que possuem uma ação mais específica entre os antígenos, sendo produzidos pelos plasmócitos (ELLIS, 1999; BARBUIO, 2013). No estudo de Klesius et al. (2000), tilápias-do-Nilo apresentaram maior aglutinação após vacina i.p. contra *Streptococcus iniae*. Carpas (SELVARAJ et al., 2004) e esturjões (KHOSHBAVAR-ROSTAMI et al., 2007) imunizados com *A. hydrophila* também apresentaram maior título de aglutinação após a vacinação. Tilápias-do-Nilo vacinadas por via i.p. com vacina polivalente, incluindo *A. hydrophila* na composição, apresentaram título de aglutinação do soro superior nos dois períodos de avaliação para todas as bactérias (SILVA et al., 2009). Corroborando com esses resultados, no presente estudo a aglutinação se mostrou aumentada para *A. sobria* e *S. agalactiae* nas 3 diluições testadas após 30 dias da vacinação, confirmando que a vacina induziu a produção de anticorpos para ambas bactérias.

Além da escolha dos melhores sistemas de entrega de antígeno e de administração da vacina, a sua eficácia em condições naturais é um fator de grande relevância. Kozinska e Antychowicz (2001) imunizaram carpas (18-220g) por via i.p. com  $5 \times 10^8$  células de *A. sobria* inativadas por formalina e relataram uma RPS de 100% após o desafio (28 dias após imunização) por injeção subcutânea com  $3 \times 10^7$  células, mas apenas quando mantiveram a temperatura a 12°C, no grupo com temperatura a 23°C, a RPS foi de 17%, não sendo viável para a realidade dos tanques de produção, onde a temperatura costuma ser elevada, principalmente na estação de verão, onde ocorrem a maior parte dos surtos de doenças. Nosso estudo apresentou uma vacina eficaz em ambiente a 30°C, mimetizando a condição de estresse térmico durante 30 dias pós desafio.

Em alguns estudos vacinais para tilápias, as concentrações bacterianas nas doses dos desafios experimentais foram menores do que as concentrações bacterianas da vacina testada. Evans et al. (2004), (2005) e Pasnik (2006) utilizando uma vacina com  $4 \times 10^9$  de *S. agalactiae* administrada por via i.p. em tilápias (30g) proporcionou proteção, com RPS de 0 a 83,4% após desafios com concentrações menores, de  $2.6 \times 10^3$  e  $1.5 \times 10^4$  UFC/peixe. Resultados desta natureza devem ser analisados com amplo cuidado, pois um desafio experimental muito baixo pode gerar resultados que talvez não condizem com a realidade; é uma prática em estudos vacinais que a dose infectante seja maior que a dose vacinal. Neste sentido, visando mimetizar a ocorrência de surtos bacterianos em tanques de produção, onde as bactérias se replicariam em grandes quantidades, sobretudo em períodos de forte calor, a infecção experimental do presente estudo testou uma dose ( $1 \times 10^8$  células/dose) com concentração bacteriana maior que da dose vacinal ( $1 \times 10^7$  células/dose), demonstrando que mesmo sob essas condições a vacina foi capaz de proteger o grupo vacinado.

Outro fator importante na utilização de vacinas intraperitoneais é a relação custo-benefício, onde a eficácia da vacina seja alta o suficiente em relação aos custos com a vacina e a mão-de-obra necessária para a vacinação individual dos peixes. Pretto-Giordano et al. (2010) analisaram uma vacina inativada com  $2.0 \times 10^8$  UFC/mL<sup>-1</sup> de *S. agalactiae* administradas via i.p. em uma dose (RR 0,16 [0,10 - 0,27]) e duas doses (RR 0,03 [0,01 - 0,11]) com intervalo de 21 dias, onde os RPS foram de 83,6% e 96,6%, respectivamente, demonstrando que a aplicação de mais de uma dose vacinal aumenta a proteção das tilápias. Entretanto, o investimento necessário para a repetição da dose vacinal pode não representar a realidade na produção em larga escala, tornando a vacinação um método menos atrativo para os produtores. A vacina bivalente apresentada no presente estudo foi capaz de conferir alta proteção às tilápias vacinadas com apenas uma dose, durante o período analisado de 30 dias e em condições de alta estocagem e estresse térmico.

Outro desafio da vacinação de tilápias é a capacidade de proteger contra diversos patógenos e seus sorotipos e genótipos. No Brasil, há apenas uma vacina comercial disponível para a prevenção da estreptococose, sendo composta por uma amostra inativada de *S. agalactiae* sorotipo Ib, a qual está sendo comercializada desde 2012 e que em ensaios experimentais por via i.p., demonstrou ser capaz de induzir proteção em Tilápias-do-Nilo desafiadas com *S. agalactiae* sorotipo Ib (SALVADOR, 2012). Em 2016, surtos atípicos de mortalidade em tilápias foram observados em lotes vacinados contra *S. agalactiae* sorotipo Ib na região nordeste do Brasil, onde peixes doentes foram coletados durante esses casos e foi realizado o primeiro relato científico de *S. agalactiae* do sorotipo III no Brasil (CHIDEROLLI et al., 2017).

Chen et al. (2012) relataram uma vacina i.p. com  $2.5 \times 10^9$  células/mL de *S. agalactiae* e demonstraram que a imunidade protetora não foi associada apenas aos sorotipos de *S. agalactiae*, mas também relacionada a seus genótipos de PFGE (eletroforese em gel de campo pulsado), concluindo ser difícil adquirir uma única cepa que possa proteger contra todas as cepas genotípicas do mesmo sorotipo. O estudo de Barony (2017) também demonstrou que o *S. agalactiae* sofre mutações genéticas em pequena escala em cada local onde é isolado e com intervalo de poucos anos.

Dessa forma, ainda faltam informações a respeito da proteção múltipla para os vários sorotipos de *S. agalactiae*, sendo importante desenvolver uma vacina para os produtores de uma região que utilize a mesma variante isolada na região (FACIMOTO, 2018). Tendo em vista a importância da região oeste do Paraná para a tilapicultura nacional, uma vacina autóctone que proteja contra os principais patógenos que circulam na região torna-se essencial para um melhor desempenho na produção de tilápias.



Estudos (FIRDAUS-NAWI, 2013; HE et al., 2014; LIU et al., 2016) demonstram que a incorporação de adjuvante na vacina confere maior proteção para as tilápias inoculadas com a vacina que possui adjuvante do que as tilápias imunizadas com vacina sem adjuvante. O adjuvante utilizado na vacina bivalente do presente estudo, MONTANIDE™ ISA (emulsões de água em óleo), é indicado para injeções intraperitoneais em peixes, contra infecções por: *Streptococcus*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Yersinia* e *Pasteurella* (SEPPIC, 2019). A vacina bivalente incorporada com esse adjuvante demonstrou não ser tóxica para peixes do grupo vacinado, com a quantidade utilizada, não apresentando lesão no local do inóculo. Este fator é de suma importância, uma vez que um candidato vacinal não deve deixar lesões na região de inóculo, a não ser nos primeiros dias após a vacinação, em decorrência do processo inflamatório previsto. No entanto, com o passar dos dias a inflamação regride por completo. Sendo assim, no atual estudo a vacina bivalente demonstrou ser atóxica e inócua para os animais, comprovando sua segurança.

Além de proteger contra a mortalidade das tilápias, a vacina evitou sinais clínicos de aeromonose e estreptococose no grupo vacinado. Após a imunização, os grupos controle e vacinado apresentaram baixa ingestão de alimento apenas no dia posterior, indicando estresse pelo manejo aplicado. O grupo controle apresentou sinais clínicos de ambas as doenças: hemorragias; deterioração e hemorragia das nadadeiras; lesões ulcerativas; líquido amarelo ou com sangue presente na cavidade visceral; brânquias com excesso de muco e presença de áreas necróticas; fígado deteriorado e hemorrágico; vesícula biliar escura e cor pálida dos órgãos; anorexia; cor da pele alterada; letargia; natação irregular e olhos opacos. Esses sinais foram semelhantes aos sinais clínicos descritos por vários pesquisadores: lesões hemorrágicas em diferentes regiões do corpo, hemorragias na base das nadadeiras e nos opérculos, lesões ulcerativas, falta de apetite (anorexia), letargia, alteração na coloração das brânquias, sintomatologia nervosa, septicemia, degeneração das células hepáticas e do epitélio dos tubos renais, necrose das nadadeiras, escurecimento da pele, alterações no sistema nervoso associados à natação errática, exoftalmia, opacidade de córnea, ulceração da epiderme, congestão branquial, hepatomegalia, esplenomegalia e morte (SALVADOR et al., 2005; SCHERING-PLOUGH, 2007; FIGUEIREDO et al., 2008; MARCUSSO et al., 2015; GRAF, 2015).

Após o desafio experimental, os sinais clínicos foram analisados até 30 dias depois, tempo que não foi prolongado devido à viabilidade de manutenção dos tanques com os peixes sobreviventes, e uma vez que muitos peixes do grupo controle, embora não estivessem mortos, apresentavam considerável degradação tecidual nas escamas, hemorragias nas nadadeiras e por diferentes regiões do corpo, além de letargia. Diante disto, levando em consideração as questões éticas, o experimento foi encerrado com 30 dias pós-desafio experimental.

Antes do desafio experimental, os peixes do grupo vacinado apresentavam pesos significativamente menores que o grupo controle e, após a infecção experimental, o grupo vacinado apresentava pesos mais altos, enquanto os peixes sobreviventes do grupo controle apresentavam maior variabilidade de pesos. A diferença entre os grupos no período pós-infecção não foi significativa, os peixes sobreviventes do grupo controle apresentaram pesos altos, mas a grande perda de biomassa desse grupo em relação ao grupo vacinado deve ser considerada. Além disto, deve ser levado em consideração que, a maior parte dos peixes do grupo controle apresentavam diversas lesões nas escamas, e ao analisarmos questões práticas e legais, em condições de produção, peixes com lesões na pele não podem ser comercializados, de acordo com a legislação sanitária para produtos de origem animal (BRASIL, 2017). Diante disto, é possível inferir que praticamente nenhum peixe do grupo controle estaria apto para comercialização *in natura*.

A análise histopatológica de pele, fígado e baço de ambos os grupos vacinado e controle não apresentou diferenças estatisticamente significativas. A pele dos peixes do grupo controle apresentaram infiltrado inflamatório mononuclear, caracterizado por uma grande quantidade de leucócitos acumulados em um local de resposta inflamatória, na primeira semana após inoculação de solução salina estéril, hiperplasia e degeneração macro e microgoticular, após três semanas. Os achados histológicos de pele da tilápias do grupo vacinado demonstraram que 2 a 3 semanas após a imunização, o local de inoculação da vacina passou por processo cicatricial, este fator é importante, porque o local de vacinação deve ser regenerado normalmente, sem apresentar lesões no momento do abate do pescado. A lesão tecidual (perfuração da agulha) coloca elementos sanguíneos em contato com o colágeno e outras substâncias da matriz extracelular, provocando degranulação de trombócitos e ativação das cascatas de coagulação e do complemento (CAMPOS et al., 2007). Steckert et al. (2018) concluíram que alterações como hiperplasia podem estar presentes em animais não doentes, sugerindo uma adaptação dos peixes ao ambiente de confinamento.

Ambos grupos apresentaram indivíduos com congestão do fígado, que ocorre devido à insuficiência cardíaca direta, que aumenta a pressão do sangue na veia cava inferior, veias supra-hepáticas e veias centroglobulares em sequência, levando à dilatação destas e dos sinusóides da porção central dos lóbulos hepáticos (BURITY et al., 2019). Um estudo histopatológico (STECKERT et al., 2018) realizado com tilápias em confinamento demonstrou que 98,3% dos animais analisados apresentaram congestão no fígado, entretanto não foram observadas mortalidade e sinais clínicos de doenças nos animais, que apresentavam boas condições de saúde, sem interferências no crescimento, concluindo ser uma característica comum em peixes cultivados, não sendo indicador de processo patológico

O fígado de tilápias de ambos os grupos apresentaram infiltrados inflamatórios e degeneração microgoticular, caracterizada por um acúmulo excessivo de triglicerídeos nas células, onde os vacúolos coalescem e ocupam grande parte do citoplasma, que pode ser causada por agentes tóxicos, hipóxia (baixo teor de oxigênio), alterações na dieta e distúrbios metabólicos de origem genética (BURITY et al., 2019). Os mesmos achados histopatológicos de fígado de tilápia em confinamento foram encontrados por Steckert et al. (2018), entretanto, essas lesões podem ser causadas por diversos fatores, como exemplo, os alimentos comerciais que causam acúmulo de gordura, degeneração da membrana das células hepáticas e vacuolização de hepatócitos, que podem causar distúrbios circulatórios, concluindo ser difícil estabelecer um limiar do que é saudável e patológico no fígado de peixes de cultivo (COZ-RAKOVAC et al., 2005; BILEN E BILEN, 2013).

O baço de tilápias possui uma estrutura septada dividindo-o histologicamente em polpa branca (menor porção), formada por vasos sanguíneos e linfócitos; e polpa vermelha (predominante) com a presença de grande quantidade de células sanguíneas, canais sinusóides que contêm células de defesa e os centros de melanomacrófagos, que são agregados pigmentados de macrófagos (BARBUIO, 2013). Os pigmentos que constituem os centros de melanomacrófagos são lipofusina, melanina, ceróide e hemossiderina (BALAMURUGAN et al., 2012). A hemossiderina é um pigmento resultante da degradação da hemoglobina e que contém ferro, seu acúmulo excessivo é chamado hemossiderose, (BURITY et al., 2019) e foi observado em peixes de ambos grupos do presente estudo.

A hemossiderose geralmente ocorre como resultado da quebra excessiva ou acelerada de eritrócitos e a quebra de hemossiderina pode ser encontrada no tecido hematopoiético do baço (THIVAGARAJAH et al., 1998). Um estudo (LEDIC NETO et al., 2013) com tilápias saudáveis sobre a suplementação de ração de peixes com própolis relatou que ambos grupos de peixes (ração não suplementada e ração suplementada) apresentaram hemossiderose no baço sem diferenças significativas, apesar de também apresentarem contagem alta de eritrócitos no sangue, portanto sem indicação de anemia por destruição de eritrócitos. Em outro estudo (STECKERET et al., 2018), 100% das tilápias de cultivo analisadas apresentaram alterações com centros de melanomacrófagos no baço, sugerindo que sejam devido ao estresse crônico em que os peixes são expostos no ambiente de cultivo.

Lesões celulares ocorrem quando a célula falha em manter homeostase diante de estímulos e estressores, que podem ser alterações na qualidade da água, alta densidade de estocagem, nutrição desequilibrada ou manejo inadequado, que favorecem o surgimento de infecções e alterações teciduais (MCGAVIN E ZACHARY, 2013). Peixes saudáveis não são caracterizados pela ausência

total de alterações histológicas, podendo apresentar normalmente reações inflamatórias e distúrbios estruturais moderados (BERNET et al., 2004; STECKERT et al., 2018).

Devido aos diversos fatores que podem causar alterações histológicas e aos grupos estudados não apresentarem diferenças significativas nos achados histológicos, não se pode afirmar que as lesões teciduais dos órgãos analisados, tanto do grupo controle como grupo vacinado, tenham sido causadas pelas bactérias utilizadas na infecção experimental. Portanto, reforça-se a ideia de que, apesar de grande importância para a sanidade na produção do pescado, a vacinação sozinha não garante o melhor proveito da produção de tilápias, além da imunização, são necessárias estratégias para a correta densidade de estocagem, água e alimentação de qualidade e boas práticas de manejo.

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo mostraram que uma vacina bivalente inativada de *A. sobria* e *S. agalactiae*, produzida a partir de cepas obtidas da região oeste do Paraná - Brasil e administrada por via i.p., estimulou o sistema imune e protegeu tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) contra as infecções por essas bactérias, obtendo uma RPS de 91%, sob condições experimentais.

As alterações histológicas dos órgãos analisados dos grupos vacinado e controle não obtiveram diferenças significativas, apresentando lesões celulares comuns a peixes de cultivo, não sendo possível definir as causas das alterações.

A efetividade da vacina bivalente apresentada poderá ser confirmada através de estudos em larga escala, com a imunização de peixes de tanques de produção sob as condições normais de cultivo.

## 7. REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 8ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

ABD-EL-MALEK, A. M. Incidence and virulence characteristics of *Aeromonas* spp. in fish. **Veterinary world**, India, 10(1), 34–37, 2017.

ABUTBUL, S. et al. Use of *Rosmarinus officinalis* as a treatment against *Streptococcus iniae* in tilapia (*Oreochromis* sp.). **Aquaculture**, United States of America, v.238, n.1-4, p.97-105, 2004.

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

ASSANE, I. M. **Atividade antimicrobiana do tianfenicol sobre bactérias patogênicas de peixes**. 2018. 79f. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Aquicultura). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2018.

AYROZA, D. M. M. R.; CARMO, F. J.; AYROZA, L. M. S. Panorama da Piscicultura no Brasil - Destaque para o Potencial do Estado de São Paulo. **Casa da Agricultura**, São Paulo, Ano 14, n3, p. 9-10, 2011.

BALAMURUGAN, S. et al. Melanomacrophage centers aggregation in *P. lineatus* spleen as bioindicator of environmental change. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v.2, p.S635-S638, 2012.

BALDISSEROTTO, B.; CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C. **Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce**. Jaboticabal: FUNEP; UNESP, 2014.

BARBUIO, R. **Hematologia e histopatologia de tilápias (*Oreochromis niloticus*) vacinadas e desafiadas com *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae***. 2013. 46f. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2013.

BARONY, G.M., et al. Large-scale genomic analyses reveal the population structure and evolutionary trends of *Streptococcus agalactiae* strains in Brazilian fish farms. **Scientific Reports**, United Kingdom, v.7, n.1, p.13538, 2017.

BATRA, P.; MATHUR, P.; MISRA, M. C. *Aeromonas* spp.: An Emerging Nosocomial Pathogen. **Journal of Laboratory Physicians**, India, v.8, n.1, p.1-4, 2016.

BERNET, D. et al. Evaluation of two monitoring approaches to assess effects of waste water disposal

on histological alterations in fish. **Hydrobiologia**, v.524, n.1, p.53-66, 2004.

BILEN, A. M.; BILEN, S. Effect of diet on the fatty acids composition of cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) liver tissues and histology compared with wild sea bass caught in Eagean Sea. **Marine Science and Technology Bulletin**, v.2, n.1, p.15-21, 2013.

BILLER-TAKAHASHI, J. D.; URBINATI, E. C. **Fish Immunology**. The modification and manipulation of the innate immune system: Brazilian studies. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.86, n.3, p.1484-1506, Sept. 2014.

BOTREL, M. A. et al. Distribution and antimicrobial resistance of clinical and subclinical mastitis pathogens in dairy cows in Rhône- Alpes, France. **Foodborne Pathogens and Diseases**, Tennessee, v.7, p.479– 487, 2010.

BRASIL. Decreto Nº 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 30 mar. 2017. Seção 1, p.2.

BURITY, C. H. F. et al. **Atlas de Morfologia Comparada Digital: Abordagem Normal e Patológica - Morfologia Microscópica: Principais patologias**. Universidade do Grande Rio, Rio de Janeiro, RJ. Disponível em: <<http://www.unigranrio.br/atlas-mofologia-comparada/index.html#>> Acesso em 19 nov 2019.

BURRIDGED, L. et al. Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects. **Aquaculture**, United States of America, v.306, n.1-4, p.7–23, 2010.

CAMPOS, A. C. L., BORGES-BRANCO, A., GROTH, A. K. Cicatrização de feridas. **ABCD – Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, São Paulo, v.20, n.1, p.51-58, 2007.

CAMOLEZE, E. **Tilápia: O segundo peixe mais consumido do mundo**. Sociedade Nacional de Agricultura. 12 fev 2019. Disponível em: <<https://animalbusiness.com.br/producao-animal/criacao-animal/tilapia-o-segundo-peixe-mais-consumido-do-mundo/>> Acesso em: 12 jan 2020.

CHAKRAVARTI, D. N. et al. Application of genomics and proteomics for identification of bacterial gene products as potential vaccine candidates. **Vaccine**, London, v.19, p.601-612, 2001.

CHEN, M. et al. Screening vaccine candidate strains against *Streptococcus agalactiae* of tilapia based on PFGE genotype. **Vaccine**, London, v.30, p.6088–6092, 2012.

CHIDEROLLI, R.T. et al. Emergence of a new multidrug-resistant and highly virulent serotype of *Streptococcus agalactiae* in fish farms from Brazil. **Aquaculture**, United States of America, v.479, p.45-51, 2017.

COZ-RAKOVAC, R. et al. Blood chemistry and histological properties of wild and cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in the North Adriatic Sea. **Veterinary research communications**, v.29, n.8, p.677-687, 2005.

DELANNOY, C.M. et al. Human *Streptococcus agalactiae* strains in aquatic mammals and fish. **BMC Microbiology**, United Kingdom, v.13, n.41, 2013.

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, p.197-200, 2009.

ELLIS, A. E. Immunity to bacteria in fish. **Fish and Shellfish Immunology**, Tokyo, v.9, p.291–308, 1999

EUZÉBY, J. P. M. **List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature**. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/streptococcus.html>> Acesso em: 03 mar 2020.

EVANS, J. J. et al. Characterization of beta-haemolytic Group B *Streptococcus agalactiae* in cultured seabream, *Sparus auratus* (L.) and wild mullet, *Liza klunzingeri* (Day), in Kuwait. **Journal of Fish Disease**, Oxford, v.25, p.505 - 513, 2002.

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

EVANS, J. J. et al. *Streptococcus agalactiae* Vaccination and Infection Stress in Nile Tilapia,

*Oreochromis niloticus*. **Journal of Applied Aquaculture**, Malaysia, v.16, p.105–114, 2005.

EVANS, J. J. et al. First report of *Streptococcus agalactiae* and *Lactococcus garvieae* from a wild bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*). **Journal of Wildlife Diseases**, v.42, n.3, p.561–569, 2006.

FACIMOTO, C. T. et al. *Streptococcus agalactiae*: um velho e indesejável conhecido ressurgiu com novidades. **Aquaculture Brasil**, Santa Catarina, v.10, p.48-53, fev. 2018.

FACKLAM, R. What Happened to the Streptococci: Overview of taxonomic and nomenclature changes. **Clinical Microbiology Reviews**, Minnesota, v.15, n.4, p.613–630, 2002.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. **Fisheries and Aquaculture Department**, p. 192, 2016.

FIGUEIREDO, H. C. P. et al. Uso de vacinas na piscicultura: verdades, mitos e perspectivas. **Panorama da Aquicultura**, v. 19, n. 115, p. 22-31, 2009.

FIGUEIREDO, H. C. P. *Streptococcus agalactiae* e o controle pela vacinação: o que sabemos e que desafios temos pela frente - Parte 3. **Panorama da Aquicultura**, Laranjeiras, ed.164, dez. 2017.

FIRDAUS-NAWI, M. et al. Efficacy of feed-based adjuvant vaccine against *Streptococcus agalactiae* in *Oreochromis* spp. in Malaysia. **Aquaculture Research**, v.45, n.1, p.87-96, 2013.

FRANÇA, E. D. **Custo e rentabilidade da produção de tilápias em áreas não onerosas, período 2001 a 2015**. 2016. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP. 2016.

GENTRY, R. R. et al. Mapping the global potential for marine aquaculture. **Nature Ecology & Evolution**, v. 1, n. September, 2017.

GERVÁSIO, E. W. **Piscicultura: Análise da conjuntura**. Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento (SEAB), Departamento de Economia Rural (DERAL), 2018. Disponível em: <<http://www.agricultura.pr.gov.br>> Acesso em: 11 jun. 2019.



GRAF, J. *Aeromonas*. United States of America: Caister Academic Press, 2015.

HE, Y. et al. A recombinant truncated surface immunogenic protein (tSip) plus adjuvant FIA confers active protection against Group B streptococcus infection in tilapia. **Vaccine**, v.32, n.51, p.7025-7032, 2014.

HIRSCH, D. et al. Identificação e resistência a antimicrobianos de espécies de *Aeromonas* Móveis isoladas de peixes e ambientes aquáticos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.30, n.6, p.1211-1217, 2006.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Agropecuário**. Curitiba, PR. 2017. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/21814-2017-censo-agropecuaria.html?>> Acesso em: 21 abr. 2019.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa da Pecuária Municipal**. Brasília, DF. 2019. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3940>> Acesso em: 10 dez. 2019.

IGARASHI, M. A. Aspectos tecnológicos e perspectivas de desenvolvimento do cultivo de tilápia no Brasil. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, Umuarama, v.21, n.3, p.123-130, jul./set. 2018.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v.23, n.1, p.35-73, 2010.

KAWASAKI, M. et al. Microevolution of *Streptococcus agalactiae* ST-261 from Australia indicates dissemination via imported tilapia and ongoing adaptation to marine hosts or environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v.84, n.16, p.e00859-18, 2018.

KHOSHBAVAR-ROSTAMI, H. A.; SOLTANI, M.; HASSAN, H. M. D. Immune responses of great sturgeon *Huso huso* to *Aeromonas hydrophila* bacterin. **Journal of Fish Biology**, v.70, n.6, p.1931-1938, 2007.

KLESZIUS, P. H.; SHOEMAKER, C. A.; EVANS, J. J. Efficacy of single and combined *Streptococcus iniae* isolate vaccine administered by intraperitoneal and intramuscular routes in tilapia (*Oreochromis*

*niloticus*). **Aquaculture**, United States of America , v.188, n.3-4, p.237-246, 2000.

KOZINSKA, A.; ANTYCHOWICZ, J. Immune cross reactions in carp (*Cyprinus carpio* L.) after single or double immunisation with *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* antigens. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy, Poland**, v.45, n. 1, p. 43-48, 2001.

KUBITZA, F. Tilápias: Qualidade da água, sistemas de cultivo, planejamento da produção, manejo nutricional e alimentar e sanidade - Parte I. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v.10, n.59, jun, 2000.

KUBITZA, F. A evolução da tilapicultura no Brasil: produção e mercados. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v.13, n.76, p.25-35, mar/abr, 2003.

KUBITZA, F. Os caminhos para uma Piscicultura Sustentável. **Panorama da Aquicultura**, Laranjeiras, v.20, n.119, mai./jun. 2010.

KUBITZA, F. Tilápias na mira dos patógenos. **Panorama da Aquicultura**, Laranjeiras, v.18, n.107, p.28-37, mai./jun. 2008.

KUBITZA, F.; KUBITZA, L. M. M. **Saúde e manejo sanitário na criação de tilápias em tanques-rede**, 1 ed., Jundiaí: Kubitza, 2013.

KUBITZA, L. M. M. *Streptococcus* Versus tilápia. **Panorama da Aquicultura**, Laranjeiras, v.11, n.66, p.33-36, 2001.

LAMERS, C. H. J.; DE HASS, M. J. H.; VAN MUISWINKEL, W. B. Humoral response and memory formation in carp after injection of *Aeromonas hydrophila* bacterin. **Developmental & Comparative Immunology**, v.9, n.1, p.65-75, 1985.

LEAL, C. A. G. Estreptococose clínica em tilápia: passado e presente. **Panorama da Aquicultura**, Laranjeiras, ed. 169, nov. 2018.

LEDIC NETO, J. et al. **Hematologia e histologia de tilápia do Nilo alimentada com própolis na dieta**. 2013. 58f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Aquicultura) - Universidade Federal

de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Florianópolis, 2013.

LEIRA, M. H. et al. As principais doenças na criação de tilápias no Brasil: revisão de literatura. **Nutri Time**, Viçosa, v.14, n.02, p.4982-4996, mar./abr. 2017.

LIM, C.; WEBSTER, C. D. **Tilapia: biology, culture and nutrition**. New York: Haworth Press, 678 p. 2006.

LIMA, A. O. Cadeia produtiva: elos ainda fracos. **Revista Brasileira Agropecuária**, Brasília, Ano I, n.12, p.34-39, 2001.

LIU, G. et al. Development of *Streptococcus agalactiae* vaccines for tilapia. **Diseases of aquatic organisms**, v.122, n.2, p.163-170, 2016.

LONGHI, E. L.; PRETTO-GIORDANO, L. G.; MULLER, E. E. Effectiveness of homologous inactivated *Streptococcus agalactiae* vaccine by immersion bath in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.33, suplemento 2, p.3191-3200, 2012.

MARCUSSO, P. F.; SALVADOR, R.; DE ALMEIDA MARINHO-NETO, F. Infecção por *Streptococcus agalactiae* em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista de Ciências Agroveterinárias**, São Paulo, v.16, n.2, p.165-169, 2017.

MARCUSSO, P. F. et al. Isolamento de *Streptococcus agalactiae* em diferentes órgãos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) criadas em tanques-rede. **Bioscience Journal**, Índia, v.31, p.549-554, 2015.

MASHOOF, S.; CRISCITIELLO, M. Fish immunoglobulins. **Biology**, United Kingdom, v.5, n.4, p.45, 2016.

MCGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. **Bases da patologia em veterinária**, 5 ed. Mosby, Elsevier, Rio de Janeiro (1324pp.).

MEIRELLES, F. S. de. **Estudo epidemiológico das infecções bacterianas em tilápias *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758), cultivadas em Pernambuco**. 2010. 54f. Tese (Programa de Pós-

Graduação em Ciência Veterinária) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2010.

MELO, C. C. V. et al. A eficácia das vacinas contra *Streptococcus agalactiae* em tilápias: uma revisão sistemática. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, São Paulo, v.14, p.1-15, 2015.

MORRISON, R. N.; NOWAK, B. F. The antibody response of teleost fish. In: **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**. WB Saunders, v.11, n01, p. 46-54, 2002.

MUNANG'ANDU, H. M.; MUTOLOKI, S.; EVENSEN, Ø. Non-replicating vaccines. **Fish Vaccination**, p. 22-32, 2014.

MUNANG'ANDU, H. M.; PAUL, J.; EVENSEN, Ø. An Overview of Vaccination Strategies and Antigen Delivery Systems for *Streptococcus agalactiae* Vaccines in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Vaccines**, Basel,; v.4, n.4, p.48, 2016.

PÁDUA, S. B.; MENEZES FILHO, R. N. Antibióticos na aquicultura e os critérios para o uso racional. **Panorama da Aquicultura**, Laranjeiras, v.145, n.31, out. 2014.

PARKER, J. L.; SHAW, J. G. *Aeromonas* spp. clinical microbiology and disease. **Journal of Infection**, United Kingdom, v.62, n.2, p.109-118, 2011.

PASNIK, D. J.; EVANS, J. J.; KLESZIUS, P. H. Passive immunization of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) provides significant protection against *Streptococcus agalactiae*. **Fish & shellfish immunology**, Tokyo, v.21, n.4, p.365-371, 2006.

PASNIK, D. J. et al. Antigenicity of *Streptococcus agalactiae* extracellular products and vaccine efficacy. **Journal of fish diseases**, Canada, v.28, n.4, p.205-212, 2005.

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

PEIXE BR. **Anuário Brasileiro da Piscicultura**, PEIXE BR 2020. São Paulo: Associação Brasileira da Piscicultura, 2020.

PEIXOTO, L. J. S. et al. *Aeromonas* spp.: Fatores de virulência e perfis de resistência a antimicrobianos e metais pesados. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.79, n.3, p.453-461, 2012.

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

RAJAGOPAL, Lakshmi. Understanding the regulation of Group B Streptococcal virulence factors. **Future microbiology**, London, v.4,2, p.201-21, 2009.

ROCHA, I. P.; KUBITZA, F.; COSTA, S. W. Aquaculture in Brazil Domestic Markets Rise as Industry Looks to Future. **Global Aquaculture Advocate**, Saint Louis, v.14 n.3, p. 48-51, 2011.

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

SALVADOR, R. et al. Isolation and characterization of Streptococcus spp. group B in Nile tilapias (*Oreochromis niloticus*) reared in hapas nets and earth nurseries in the northern region of Parana State, Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.6, p.1374-1378, 2005.

SALVADOR, R. **Impact of Streptococcosis on Tilapia in Brazil, Aquavac Strep Sa for Management**, The Fish Site, 2012. Disponível em: <<https://thefishsite.com/articles/impact-of-streptococcosis-on-tilapia-in-brazil-aquavac-strep-sa-for-management>> Acesso em: 17 jun 2018.

SALYERS, A. A.; WHITT, D. D. **Bacterial pathogenesis**. A molecular approach. 2.ed. Washington: ASM Press, 2002.

SCHERING-PLOUGH. **Principais doenças bacterianas em criações comerciais de peixes no Brasil**. Boletim Técnico, Cotia, SP, 2007. 8p. Disponível em: <<https://www.snatural.com.br/wp-content/uploads/2017/05/Doencas-Peixes-Tratamento.pdf>>. Acesso em: 10 jun. 2018.

SCHULTER, E. P.; VIEIRA FILHO, J. E. R. **Evolução da Piscicultura no Brasil: diagnóstico e desenvolvimento da cadeia produtiva de tilápia**. Texto para Discussão, Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada, Rio de Janeiro: Ipea, ago. 2017. Disponível em:

<[http://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/8043/1/td\\_2328.pdf](http://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/8043/1/td_2328.pdf)> Acesso em: 02 fev. 2019.

SEBRAE. Serviço de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Criação de tilápias em tanques escavados**. Natal: Sebrae, 2014.

SEPPIC. **Fish MONTANIDE™, adjuvant range for fish vaccination**. São Paulo: SEPPIC. Disponível em: <<https://www.seppic.com/fish-vaccines>> Acesso em: 13 ago. 2019.

SEVARAJ, V.; SAMPATH, K.; SEKAR, V. Extraction and characterization of lipopolysaccharide from *Aeromonas hydrophila* and its effects on survival and hematology of the carp, *Cyprinus carpio*. **Asian Fisheries Science**, Malaysia, v.17, n.1/2, p.163-173, 2004.

SHOEMAKER, C. A.; EVANS, J. J.; KLESIUS, P. H. Density and dose: factors affecting mortality of *Streptococcus iniae* infected tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, United States of America, v.188, n.3-4, p.229-235, 2000.

SILVA, B. C. et al. Resposta hematológica e imunológica de tilápia do Nilo após administração de vacina polivalente por diferentes vias. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.29, n.11, pp.874-880, 2009.

SINDAN. **Compêndio de Produtos Veterinários**, 2018. Disponível em: <https://sistemas.sindan.org.br/cpvs/> Acesso em: 12 dez 2019.

SMITH, P.; HINEY, M.P.; SAMUELESEN, O.B. Bacterial resistance to antimicrobial agent used in fish farming: a critical evaluation of method and meaning. **Annual Review of Fish Diseases**, United States of America, v.4, p.273-313, 1994.

STECKERT, L. D. et al. Investigation of farmed Nile tilapia health through histopathology. **Aquaculture**, v.486, p.161-169, 2018.

STRATEV, D.; ODEYEMI, O. A. An overview of motile *Aeromonas* septicemia management. **Aquaculture international**, Ireland, v.25, n.3, p.1095-1105, 2017.

TAVARES, A. B.; CERESER, N. D.; TIMM, C. D. Ocorrência de *Aeromonas* spp. em alimentos de

origem animal e sua importância em saúde pública. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.82, p.1-8, 2015.

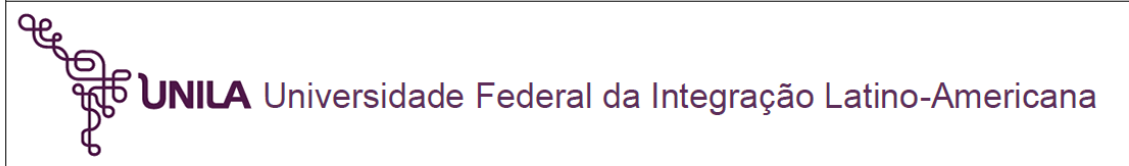
THIYAGARAJAH, A.; HARTLEY, W.R.; ABDELGHANI, A. Hepatic hemossiderosis in bufallo fish (*Ictiobus* Spp.). **Marine Environmental Research**, v.46, n.1-5, p.203-207, 1998.

TOMÁS, J. M. The main *Aeromonas* pathogenic factors. **ISRN microbiology**, v.2012, 2012.

XU, D. et al. Enhanced susceptibility of channel catfish to the bacterium *Edwardsiella ictaluri* after parasitism by *Ichthyophthirius multifiliis*. **Veterinary Microbiology**, Australia, v.158, p.216-219, 2012.

YANO, T. The nonspecific immune system: Humoral defense. In: IWANA G. & NAKANISHI T. **The Fish Immune System**, San Diego: Academic Press, 1996, p.207–243.

**ANEXO I**  
**Aprovação da pesquisa pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)**



**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – UNILA**

O projeto intitulado “Bioprospecção de Imunobiológicos Destinados à Saúde Animal e Humana”, processo de número 001/2018, sob responsabilidade do professor Kelvinson Fernandes Viana, está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Lei de Procedimentos para o Uso Científico de Animais (Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008), sendo portanto aprovado pela CEUA desta universidade, em reunião realizada em 19 de abril do corrente ano.

Foz do Iguaçu, 21 de abril de 2019


A handwritten signature in black ink, appearing to be "Flávio", is positioned above the printed name of the coordinator.

Prof. Dr. Flávio Luiz Tavares  
Coordenador  
Comissão de Ética no Uso de Animais - UNILA



**ANEXO II**  
**Depósito de Patente no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI)**



12/12/2019 870190132092  
10:22  
  
29409161913261033

**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