

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Imunização e inflamação por *Streptococcus agalactiae* em  
tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com ração  
suplementada com parede celular de *Saccharomyces  
cerevisiae*.**

**Rogério Salvador  
Médico Veterinário**

**Jaboticabal – SP – Brasil**

**2008**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP



**Imunização e inflamação por *Streptococcus agalactiae* em  
tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com ração  
suplementada com parede celular de *Saccharomyces  
cerevisiae*.**

**Rogério Salvador**

**Orientador: Prof. Dr. Flávio Ruas de Moraes**

Tese de Doutorado apresentada ao Centro de Aqüicultura da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Aqüicultura, na área de concentração em Aqüicultura.

**Jaboticabal – S P - Brasil**

**2008**

Salvador, Rogério  
S182i Imunização e inflamação por *Streptococcus agalactiae* em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com ração suplementada com parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* / Rogério Salvador.  
-- Jaboticabal, 2008  
xiv, 136 f. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2008

Orientador: Flávio Ruas de Moraes

Banca examinadora: Margarida Maria Barros, Júlio Hermann Leonhardt, Newton Castagnolli, Maria José Tavares Ranzani de Paiva  
Bibliografia

1. *Saccharomyces cerevisiae*. 2. Vacinação. 3. *Streptococcus agalactiae*. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3.09

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

## DEDICATÓRIA

Aos meus queridos avós:

**Francisca Lozano** (em memória)

**Alberto de Lima** (em memória)

Nem o tempo é capaz de apagar a saudade, o carinho e o respeito....

**Elmiro Salvador**

**Santina Sperandil Salvador**

Grandes “mestres” na minha vida.....

Aos meus pais, **Janir e Teresinha**. Esta tese não é o bastante para agradecer toda a vida dedicada a mim e aos meus queridos irmãos.

Com seus exemplos de pessoas íntegras, amorosas, solidárias e éticas, transmitiram o respeito, o amor, a confiança, a perseverança e a fé como valores fundamentais.

***Muito obrigado por tudo!***

À minha amiga, veterinária, empresária, orgulho, esposa e grande amor da minha vida, **Aline (Glorinha)**

Sem sua compreensão, apoio, carinho e entusiasmo, a realização deste sonho nunca seria possível.

***Te amo eternamente!!!***

*"O homem é um grão na imensidão da terra.  
E não erra quem diz que a terra inteira é um grão de poeira no universo e  
que meu verso é nada comparado a tais grandezas.  
Mas, digo com certeza, meu verso comparado à vida tem alto valor, pois  
há de ficar quando minha vida se for.  
E então! Me respondam, por favor: Qual o valor mais alto?  
O universo, a terra, a vida ou o verso?  
É verdade que o homem é um grão na imensidão da terra. Mas é um  
grão que guarda em si a vida, o amor e o verso. E então se dá o reverso, o  
grão ganha a grandeza. E nós ganhamos a certeza que a poesia indica:  
As eras do universo passam e o homem que ama fica."*

*Fabício Conde*

## Agradecimentos

À DEUS pelo dom da vida, pela força nesta jornada e em todos os momentos de minha vida;

Ao prof. Dr. Flávio Ruas de Moraes, pela confiança e oportunidade de poder realizar este grande sonho, e principalmente por suas constantes demonstrações de respeito, humildade e sabedoria;

Aos professores membros da banca examinadora, que gentilmente aceitaram o convite para colaborarem com este trabalho;

À Dra. Fabiana Pilasrki, por sua imensurável colaboração, sugestões, paciência e principalmente demonstrações de verdadeira amizade;

À todos os amigos do Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos e Caunesp, especialmente à Lara, Fernanda, Roberson e Ellis, que muito contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho;

À Dra. Fabiana Bozzo, pela amizade, dedicação e competência com que auxiliou nas análises e coletas de material;

À minha estagiária Caroline Silva Toazza, pela dedicação e colaboração;

Aos companheiros do Caunesp, bons amigos que eternamente serão lembrados: Veralice, Du, Dani, Léo Bacarin, Laurindo, Michele, Karina, Eduardo Makoto, Serginho, Cris, Fabiana Garcia, Roquinho, Jaime, Paraca, Luiz, Renato, Celso, Janessa, Camilo, e tantos outros .....

Aos meus amigos de república, que gentilmente me cederam “um canto” durante esta empreitada: Capi, Cajão, Siri, Ogrão, Paulado, Sapinho e Djalma;

Ao Prof. Dr. Luiz Edivaldo Pezzato, que gentilmente cedeu o Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos para a confecção das rações e à Profa. Dra. Margarida Maria Barros, pelas sugestões e auxílio que permitiram o aprimoramento deste trabalho;

Aos amigos Dario R. Falcon e Altevir Sigmor que contribuíram na confecção das rações;

À usina São Luiz, na pessoa do Sr. Marcos Zimak, que gentilmente cedeu a levedura utilizada neste trabalho;

Ao Prof. Dr. Euclides Braga Malheiros do Departamento de Ciências Exatas e Profa. Dra. Cida Valério, da Faculdades Luiz Meneghel, pela colaboração na análise estatística;

À estimada família de minha esposa (e agora também minha), pela torcida, orações e palavras de ajuda. Especialmente à Lilia, Alexandre, Henrique, tia Adelaide, e demais tios, tias, primos e avós que tive a felicidade de ganhar.

À todos da Faculdades Luiz Meneghel, especialmente “minha chefe” Laila, Jean, Gisele e demais professores e amigos que sempre souberam me apoiar nos momentos de ausência.

Ao amigo Prof. Dr. Wagner Loyola, pelas sugestões e auxílio nas correções.

Aos meus eternos, bons e “velhos” amigos de Presidente Prudente: Joãozinho, Saibi, Li, Ney (Claudiney), Marcio (Perereco), Kelly, João Vitor (Pererequinho), Bebão, Carla (e filhotinha), Juninho, Emersom (Bodão), Paulinho, Patrícia, Boca, Adriano (Gordão), Gutão, Carlos, Vera, e tantos outros que sempre estiveram ao meu lado.

À todos os professores e funcionários do Caunesp, pela contribuição na minha formação profissional

**Enfim, à todos que contribuíram diretamente ou indiretamente para a realização deste sonho (citados ou não), meu carinho, respeito, reconhecimento e gratidão.**

## SUMÁRIO

Página

**CAPÍTULO I**

Considerações Iniciais.....	1
1. Introdução .....	2
2. Revisão de Literatura .....	5
2.1. A relevância da piscicultura .....	5
2.2. Estreptococos em peixes.....	7
2.2.1. Características da bactéria.....	10
2.2.2. Fatores de virulência.....	12
2.2.3. Epidemiologia da estreptococose em peixes.....	15
2.2.4. Resposta imune em peixes.....	23
2.3. Levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como alimento funcional.....	30
3. Referências Bibliográficas.....	39

**CAPÍTULO II**

Desempenho produtivo e parâmetros fisiopatológicos de tilápia do Nilo vacinadas com <i>Streptococcus agalactiae</i> e submetidas à suplementação alimentar com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	59
Resumo.....	60
Abstract.....	61
Introdução.....	62
Material e Métodos.....	63
Resultados.....	71
Discussão.....	86
Referências Bibliográficas.....	93



### CAPÍTULO III

Suplementação alimentar com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e imunização contra <i>Streptococcus agalactiae</i> em tilápia do Nilo: inflamação e desafio.....	100
Resumo.....	101
Abstract.....	102
Introdução.....	103
Material e Métodos.....	105
Resultados.....	112
Discussão.....	118
Referências Bibliográficas.....	129

## LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II	Página
Tabela 1. Composição percentual e químico-bromatológica das dietas experimentais.....	66
Tabela 2. Médias de ganho de peso, comprimento final, fator de condição e taxa de crescimento específico (TCE) de tilápia do Nilo, submetidas à suplementação dietética com 0,3% de parede celular de levedura e vacinadas contra <i>Streptococcus agalactiae</i> .....	72
Tabela 3. Médias do número de eritrócitos, hematócrito (Htc), taxa de hemoglobina (Hb), volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) de tilápia do Nilo, submetidas à suplementação dietética com 0,3% de parede celular de levedura (PCL) e vacinadas contra <i>Streptococcus agalactiae</i> .....	73
Tabela 4. Efeito da interação entre os níveis de parede celular de levedura e vacinação sobre o número de eritrócitos de tilápia do Nilo.....	74
Tabela 5. Efeito da interação entre tempo e níveis de parede celular de levedura ou vacinação sobre o número de eritrócitos de tilápia do Nilo.....	74

Tabela 6. Efeito da interação entre os níveis de parede celular de levedura e vacinação sobre o valor do hematócrito de tilápia do Nilo.....	75
Tabela 7. Efeito da interação entre tempo e os níveis de parede celular de levedura ou vacinação sobre o valor do hematócrito de tilápia do Nilo.....	75
Tabela 8. Efeito da interação entre os níveis de vacinação e tempo sobre o valor da taxa de hemoglobina de tilápia do Nilo.....	76
Tabela 9. Efeito da interação entre os níveis de parede celular de levedura e vacinação sobre o valor do volume corpuscular médio de tilápia do Nilo.....	77
Tabela 10. Efeito da interação entre tempo e os níveis de parede celular de levedura ou vacinação sobre o valor do volume corpuscular médio de tilápia do Nilo.....	77
Tabela 11. Médias de leucócitos totais, trombócitos e concentração de proteína plasmática total (PPT) de tilápia do Nilo, submetidas à suplementação dietética com 0,3% de parede celular de levedura e vacinadas contra <i>Streptococcus agalactiae</i> .....	78
Tabela 12. Efeito da interação entre os níveis de parede celular de levedura e vacinação sobre o valor de leucócitos totais de tilápia do Nilo.....	79

- Tabela 13. Efeito da interação entre tempo e os níveis de parede celular de levedura ou vacinação sobre o valor de leucócitos totais de tilápia do Nilo..... 79
- Tabela 14. Efeito da interação entre os níveis de parede celular de levedura e tempo sobre o valor de trombócitos de tilápia do Nilo.....80
- Tabela 15. Efeito da interação entre os níveis de parede celular de levedura e vacinação sobre o valor da proteína plasmática total de tilápia do Nilo.....81
- Tabela 16. Efeito da interação entre tempo e os níveis de parede celular de levedura ou vacinação sobre o valor da proteína plasmática total de tilápia do Nilo.....81
- Tabela 17. Número total de linfócitos, neutrófilos e monócitos de tilápia do Nilo, submetidas à suplementação dietética com 0,3% de parede celular de levedura e vacinadas contra *Streptococcus agalactiae*..... 82
- Tabela 18. Efeito da interação entre os níveis de parede celular de levedura e vacinação sobre o valor de neutrófilos de tilápia do Nilo.....83
- Tabela 19. Efeito da interação entre os níveis de parede celular de levedura e vacinação sobre o valor de linfócitos de tilápia do Nilo.....83

Tabela 20. Efeito da interação entre tempo e os níveis de parede celular de levedura ou vacinação sobre o valor de neutrófilos de tilápia do Nilo.....	84
Tabela 21. Efeito da interação entre tempo e os níveis de parede celular de levedura ou vacinação sobre o valor de linfócitos de tilápia do Nilo.....	84
Tabela 22. Efeito da interação entre os níveis de parede celular de levedura e vacinação sobre o valor de monócitos de tilápia do Nilo.....	85
Tabela 23. Efeito da interação entre tempo e os níveis de parede celular de levedura ou vacinação sobre o valor de monócitos de tilápia do Nilo. ....	85

### CAPÍTULO III

Tabela 1. Composição percentual e químico-bromatológica das dietas experimentais.....	107
Tabela 2. Número médio de células totais e número médio percentual de células presentes no foco inflamado de tilápia do Nilo, alimentadas com dietas suplementadas com 0,3% de parede celular de levedura e vacinadas contra <i>Streptococcus agalactiae</i> .....	113

Tabela 3. Efeito da interação entre os níveis de parede celular de levedura e vacinação sobre o valor de células totais de tilápia do Nilo.....	114
Tabela 4. Efeito da interação entre tempo e níveis de parede celular de levedura ou vacinação sobre o valor de células totais de tilápia do Nilo.....	114
Tabela 5. Efeito da interação entre os níveis de parede celular de levedura e vacinação sobre o valor percentual de trombócitos de tilápia do Nilo.....	115
Tabela 6. Efeito da interação entre os níveis de parede celular de levedura e vacinação sobre o valor percentual de neutrófilos de tilápia do Nilo.....	115
Tabela 7. Efeito da interação entre tempo e níveis de parede celular de levedura ou vacinação sobre o valor percentual de neutrófilos de tilápia do Nilo.....	116
Tabela 8. Efeito da interação entre os níveis de parede celular de levedura e vacinação sobre o valor percentual de macrófagos de tilápia do Nilo.....	116
Tabela 9. Efeito da interação entre tempo e os níveis de parede celular de levedura ou vacinação sobre o valor percentual de macrófagos de tilápia do Nilo.....	117

Tabela 10. Efeito da interação entre os níveis de parede celular de levedura e vacinação sobre o valor percentual de linfócitos de tilápia do Nilo.....117

Tabela 11. Efeito da interação entre tempo e os níveis de parede celular de levedura ou vacinação sobre o valor percentual de linfócitos de tilápia do Nilo.....118

## RESUMO

O presente trabalho teve por objetivos avaliar a inter-relação entre a suplementação alimentar com 0,3% de parede celular de levedura e vacinação com extrato oleoso de *Streptococcus agalactiae* sobre o desempenho produtivo, parâmetros fisiopatológicos e componente celular inflamatório em tilápia do Nilo. Oitenta e quatro tilápia com peso médio inicial de  $125,0 \pm 1,5$ g foram distribuídas em 12 caixas de fibra, seguindo o esquema fatorial  $2 \times 2 \times 3$ , correspondente a dois níveis de parede celular de levedura (0,0 e 0,3% parede celular), dois tratamentos (solução salina e vacina) e três coletas após o desafio com a bactéria viva (seis, 24 e 48h) com sete repetições. Os peixes foram alimentados durante 77 dias. A vacinação foi realizada 60 dias após o início da alimentação, por meio da inoculação intraperitoneal de 0,5 mL da vacina contendo  $10^8$  UFC/mL. Após 15 dias da vacinação, todos os peixes foram submetidos ao desafio com *Streptococcus agalactiae* vivo, por meio da inoculação intraperitoneal de  $10^8$  UFC/mL, veiculadas em 0,5 mL de solução salina (0,85%). As análises do desempenho produtivo mostraram que a suplementação dietética com parede celular de levedura associada à vacinação não influenciou o desempenho produtivo da tilápia do Nilo e o melhor desempenho ocorreu na utilização da parede celular de levedura. Os parâmetros hematológicos mostraram que a suplementação com 0,3% de parede celular de levedura associada à vacinação contra *Streptococcus agalactiae* em tilápia do Nilo foi essencial para incrementar a hematopoiese. A suplementação alimentar com 0,3% de parede celular de levedura associada à vacinação melhorou a resposta de defesa dos peixes, no que se refere à inflamação aguda e destaca a importância da vacinação.

**Palavras Chave:** *Saccharomyces cerevisiae*, vacinação, *Streptococcus agalactiae*, nutrição e saúde, inflamação.



## ABSTRACT

The work evaluates the interrelation between supplementation diets with 0,3% of cellular wall of yeast and vaccination with oily extract of *Streptococcus agalactiae* in the growth performance, physiopathological parameters and inflammatory cellular component of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Eighty four tilapia with initial average weight of  $125,0 \pm 1,5$ g were distributed in 12 fiber aquaria, following the factorial design 2x2x3, corresponding to two levels of cellular wall of yeast (0,0 and 0,3% cellular wall), two treatments (saline solution and vaccine) and three collections, after challenge with bacteria (six, 24 and 48h) with seven repetitions. Fish were fed during 77 days. The vaccination was accomplished 60 days after the beginning of the feeding, through inoculation intraperitoneal of 0,5 mL of the vaccine containing  $10^8$  UFC/mL. After 15 days of the vaccination, all fishes were challenged with *Streptococcus agalactiae*, through inoculation intraperitoneal of  $10^8$  UFC/ml, diluted in 0,5 mL of saline solution (0,85%). The analyses of the pattern performance showed that supplementation diets with cellular wall of yeast associated to vaccination did not influence the growth performance of Nile tilapia and the best growth performance was obtained using cellular wall of yeast. The physiopathological parameters showed supplementation diets with 0,3% of cellular wall of yeast associated to the vaccination against *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia were essential to increase the hematopoiesis. The supplementation diets with 0,3% of cellular wall of yeast associated to the vaccination improved the immune response of fish, in relation to the sharp inflammation and it detaches the importance of the vaccination.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, vaccination, *Streptococcus agalactiae*, nutrition and health, inflammation.

# **CAPÍTULO I**

## **CONSIDERAÇÕES INICIAIS**

## 1. INTRODUÇÃO

A piscicultura mundial é o setor da produção de alimentos de maior expansão, com média anual de crescimento de 8,9% (BONDAD-REANTASO et al., 2005). A tilápia é o terceiro grupo de peixe mais cultivado no mundo, com perspectiva de se tornar um dos produtos aquícolas de comércio internacional mais importante do século 21 (DALTON et al., 2005).

O aumento da produção de tilápia caracteriza-se por altas densidades de estocagem e nível de arraçoamento, favorecendo enfermidades infecciosas e parasitárias. A septicemia causada por *Streptococcus* spp. é um importante problema sanitário em sistemas de criação intensiva de tilápia (*Oreochromis* spp.) (SURESH, 1998). Dentre as espécies de estreptococos, o *Streptococcus iniae* e o *Streptococcus agalactiae* são considerados os mais importantes patógenos de tilápia (SHOEMAKER e KLESIUS, 1997).

A resistência de bactérias frente ao uso irracional de antimicrobianos e o aumento na incidência de infecções microbianas impulsiona pesquisas com novos compostos que podem favorecer os mecanismos de defesa nos animais. Neste contexto, destaca-se a levedura seca (*Saccharomyces cerevisiae*), produto secundário oriundo do processo de produção de álcool

etílico, como importante alternativa para a composição de dietas, especialmente na região sudeste, em decorrência da atual tecnologia do setor sucro-alcooleiro. Além da alta disponibilidade e preço acessível, em comparação com ingredientes protéicos de origem animal, sabe-se que a levedura seca é ótima fonte de nutrientes e adicionalmente possui em sua composição glicanos e fosfomananos, responsáveis por aumentar a eficiência produtiva, melhorar a atividade do sistema de defesa não específico e a resistência do peixe contra patógenos (NIKL et al., 1991; ANDERSON, 1992; ROBERTSEN et al., 1990).

Nos últimos anos a vacinação tem se tornado importante ferramenta para a prevenção de doenças infecciosas em peixes marinhos e de água doce. Várias pesquisas com vacinas estreptocócicas, referem-se ao *Streptococcus iniae* (ELDAR et al., 1997; KLESIUS et al., 2000; EVANS et al., 2004), isolado com frequência de regiões com temperaturas entre 15°C e 16°C (BUNCH e BEJERANO, 1997).

No norte do Paraná, Brasil, estreptococos isolados de tilápia cultivadas em sistema intensivo e com histórico de elevada mortalidade apresentaram características fenotípicas semelhantes ao *Streptococcus agalactiae*, sugerindo ser esta a espécie envolvida na limitação da tilapicultura brasileira (SALVADOR et al., 2005). Além disso, não se

encontra na literatura disponível artigos que considerem a eficácia do emprego da parede celular da levedura na dieta de peixes associada à vacinação contra este patógeno.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta de tilápia do Nilo à inter-relação entre a suplementação alimentar com 0,3% de parede celular de levedura e vacinação com extrato de *Streptococcus agalactiae*, sobre o desempenho produtivo, parâmetros hematológicos e componente celular inflamatório, após o desafio com o microrganismo.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. A relevância da piscicultura**

A piscicultura é um recurso alimentar importante, fonte protéica acessível pela exploração direta dos recursos naturais. Embora pareçam inesgotáveis, assim como os peixes, a ação do homem contribui para que se tornem escassos, daí a necessidade da criação artificial de peixes (PEREZ, 1999).

Dados da FAO (2006) indicam que a produção total de pescado (pesca extrativa e aqüicultura) em 2003 foi de 132 milhões de toneladas, sendo que a aqüicultura contribuiu com 32% desse total. Em 2004, a produção mundial, somente pela aqüicultura, foi de 59,4 milhões de toneladas, gerando US\$ 70,3 bilhões.

O Brasil é um dos países com grande potencial para a piscicultura, graças ao seu vasto território e condições climáticas que favorecem a criação de peixes de água doce. Mais de 80% do território brasileiro está na região inter-tropical drenada pelas bacias Amazônica e do Paraná-Paraguai. Nesta última e na bacia do rio São Francisco existem mais de 100 grandes reservatórios e barragens, para fins de geração de energia e armazenamento de água, compreendendo mais de 5 milhões de hectares de área alagada com potencial para piscicultura semi-intensiva ou intensiva (CASTAGNOLLI, 1995).

As tilápias compõem o grupo de peixes que mais cresce na comercialização mundial, especialmente pelo aumento de sua produção na China e outros países emergentes como o Brasil (HEMPEL, 2002). Das 70 espécies conhecidas, quatro ganharam destaque na aquicultura mundial, todas do gênero *Oreochromis*: a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), a tilápia de Moçambique (*Oreochromis mossambicus*), a tilápia azul ou áurea (*Oreochromis aureus*) e a tilápia de Zanzibar (*Oreochromis urolepis hornorum*). A tilápia do Nilo é a mais cultivada e será o mais importante produto da aquicultura no século XXI, por suas características zootécnicas, rusticidade, qualidade da carne, amplo conhecimento de fisiologia e biologia, bem como pela evolução da tecnologia de criação (FITZSIMMONS, 2000).

Dados do Ibama (2005) revelam que a produção brasileira da aquicultura continental, nos anos de 2002 a 2004, teve incremento de 18.065 toneladas, tendo aumentado de 162.665,5 para 180.730,5 toneladas. A produção de tilápia incrementou em 38,22% a produção total de pescado oriunda do cultivo. Entre os peixes cultivados, é a espécie que apresenta maior produção aquícola, seguida da carpa, *Cyprinus carpio* (24,99%), e do tambaqui, *Colossoma macropomum* (13,98%).

O sistema de criação intensiva praticado pelas pisciculturas industriais, caracteriza-se por elevada densidade de estocagem e nível de

arraçoamento (SHOEMAKER et al., 2000). Em decorrência deste panorama, é cada vez maior a ocorrência de situações que prejudicam o equilíbrio do sistema hospedeiro-parasito-ambiente, evidenciados por deficiências nutricionais, enfermidades infecciosas e parasitárias e má qualidade de água com perdas na produtividade. Outros fatores podem facilitar a ocorrência de doenças e a proliferação de patógenos oportunistas, entre eles a incorreta escolha da espécie a ser criada em função do sistema de produção empregado, programa nutricional e sanitário inadequados assim como negligências com o ambiente aquático (MARTINS, 2000).

## **2.2. Estreptococos em peixes**

Dentre as enfermidades de etiologia bacteriana em sistemas de criação intensiva de tilápia, destaca-se a septicemia por *Streptococcus* spp. (SURESH, 1998). Outras bacterioses de importância são causadas por *Aeromonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Vibrio* sp., *Flavobacterium columnare* e por *Edwardsiella* sp. (ROBERTS e SOMMERVILLE, 1982).

A infecção de peixes por estreptococos foi inicialmente descrita por HOSHIMA et al. (1958), em truta arco íris (*Oncorhynchus mykiss*), no Japão. O primeiro relato do isolamento de *Streptococcus* spp. em tilápia foi descrito por WU (1970) e desde então, este patógeno tem sido identificado como responsável por elevados prejuízos, particularmente no Japão



(KITAO et al., 1981), Taiwan (MING-CHEN et al., 1985), Israel (HUBERT, 1989), Arábia Saudita (AL-HARB, 1994) e recentemente nos Estados Unidos e América Central (PLUMB, 1997). Mundialmente, estima-se que as perdas anuais por estreptococose sejam de 150 milhões de dólares (SHOEMAKER e KLESIUS, 1997).

O *Streptococcus iniae* foi descrito pela primeira vez em 1976, por PÍER e MADIM (1976), que isolaram esta bactéria de abscessos subcutâneos de golfinhos (*Inia geoffrensis*) de água doce capturados na Amazônia. Desde então, este agente tem sido isolado de diversas espécies de peixes, de várias partes do mundo (KITAO et al., 1981; OHNISHI e JO, 1981; UGAJIN, 1981; KAWAHARA e KUSUDA, 1987; SAKAI et al., 1989), sendo considerado o mais importante patógeno na criação de tilápias pela AMERICAN TILAPIA ASSOCIATION (1998). Vários autores apontam o *S. iniae* como um dos agentes mais freqüentes do gênero em tilápia (PERERA e JOHNSON, 1994; ELDAR et al., 1995; BOWSER et al., 1998; EVANS et al., 2000), que pode colonizar a superfície corpórea do peixe ou causar doença invasiva com mortalidade de 30,0 a 50,0% (WHITTINGTON et al., 2005).

ELDAR et al. (1994) descreveram duas novas espécies de estreptococos, examinando tilápia e truta com meningoencefalite. Uma delas não hemolítica e a outra alfa hemolítica, denominadas,

respectivamente, *Streptococcus difficile* e *Streptococcus shiloi*. Posteriormente, ELDAR et al. (1995) determinaram homologia genotípica de 70,0% a 100,0% entre as cepas de *S. iniae* e *S. shiloi*, sugerindo que *S. shiloi* poderia ser considerado sinônimo do *S. iniae*.

O *S. difficile* é a espécie prevalente em criações intensivas de tilápia em Israel, responsável por mortalidade de aproximadamente 30,0% (ELDAR et al., 1995). BUNCH e BEJERANO (1997) observaram que em criações de tilápia do Nilo em baixas temperaturas (15,0°C a 16,0°C) predominava o *S. iniae* e em temperaturas mais altas (26,0°C a 28,0°C) o *S. difficile*.

VANDAMME et al. (1997) observaram que o *S. difficile* apresentava o antígeno capsular Ib e proteína celular indistinguível do *S. agalactiae*. BERRIDGE et al. (2001) também verificaram homologia significativa (97,7%) na seqüência de ácidos nucléicos, entre o 16S-23S rDNA, do *S. difficile* e *S. agalactiae*. KAWAMURA et al. (2005) por meio de técnicas de biologia molecular sugeriram que *S. difficile* é sinônimo de *S. agalactiae*.

No Brasil, o primeiro isolamento de estreptococos foi realizado por SALVADOR et al. (2005), a partir de tilápia do Nilo com sinais neurológicos, criadas em sistema intensivo. A classificação do isolado demonstrou homologia dos perfis bioquímicos com a cepa referência de *S.*

*difficile* (ND 2-22), sugerindo sua participação como agente da meningoencefalite em tilápia do Nilo na Região Norte do Estado do Paraná.

### **2.2.1. Características da bactéria**

As espécies de estreptococos do grupo B de Lancefield, assim como outras do gênero, são células esféricas ou ovóides Gram-positivas, catalase-negativas, que se apresentam aos pares ou em cadeias. São imóveis, não esporuladas e anaeróbias facultativas. Obtêm energia por meio da fermentação de carboidratos como a glicose, que resulta na maior parte em ácido láctico (HARDIE e WHILEY, 1997; KILLIAN, 1998).

O gênero *Streptococcus* sofreu várias alterações taxonômicas desde sua primeira descrição. Muitas modificações foram baseadas em técnicas moleculares após a publicação do segundo volume do “Bergey`s Manual of Systematic Bacteriology” em 1986 (LIU e NIZET, 2004).

As primeiras classificações foram baseadas unicamente na atividade hemolítica e nas reações sorológicas com anticorpos de Lancefield. A utilização de ágar sangue como meio de cultura, iniciada por SHOTTMULLER (1903), possibilitou a diferenciação do padrão de hemólise, com avanço na diferenciação dos estreptococos (FACKLAM, 2002).

LANCEFIELD (1933) classificou os estreptococos com base nas características antigênicas do carboidrato C da parede celular; em 1934 diferenciou, por sorologia, o estreptococo hemolítico bovino, classificando-o no Grupo b. SHERMAM (1937) classificou os estreptococos nos grupos piogênicos, viridans, láctico e enterococos.

KAWAMURA et al. (1995) determinaram seqüências de rRNA 16S de amostras de *Streptococcus* sp. com interessantes relações filogenéticas entre as espécies, sugerindo mudanças na classificação do gênero. Essa análise comparativa subdividiu o gênero nos grupos “bovis”, “salivarius”, “mutans”, “mitis”, “anginosus” ou “milleri” e o “piogênico”, que inclui, entre outras, as espécies *S. pyogenes* e *S. agalactiae*.

A especificidade dos estreptococos é conferida pelo polissacarídeo capsular e pelos antígenos protéicos. Os antígenos polissacarídicos capsulares são denominados, Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII e VIII, e o antígeno protéico é designado pela letra C (VON HUNOLSTEIN et al., 1993). Dois subtipos do antígeno protéico ( $\alpha$  e  $\beta$ ) são encontrados na totalidade ou em mais de 90,0% das cepas pertencentes aos sorotipos Ib, Ia e V, em cerca de 50,0% das cepas sorotipos II e em menos de 5,0% das cepas sorotipos III (STÁLHAMMAR-CARLEMALM et al., 1993).

Estreptococos do grupo B isolados de tilápias criadas em sistema intensivo no Brasil apresentaram o mesmo perfil bioquímico descrito para a

cepa referência de *S. difficile* (ND-2-22) (SALVADOR et al., 2005). São microrganismos piruvato, PAL (2-naftil fosfato), LAP (L-leucina-2-naftilamida) e ADH (arginina dihidrolase) positivos. Também são incapazes de fermentarem a arabinose, manitol, sorbitol, lactose, trealose, inulina, rafinose, amido e glicogênio (ELDAR et al., 1994; VANDAMME et al., 1997).

### **2.2.2. Fatores de virulência**

Os estreptococos patogênicos possuem várias características que contribuem para sua virulência. Assim, aderência às superfícies epiteliais, invasão celular do epitélio e endotélio e injúria direta a tecidos são algumas conseqüências da infecção (NIZET e RUBENS, 2000).

A cápsula promove a aderência às superfícies epiteliais para posterior invasão. Porém seu papel mais importante como fator de virulência é a capacidade de seus polissacarídeos inibir a fagocitose por macrófagos e neutrófilos do hospedeiro (NIZET, 2002). O ácido siálico é fator essencial para a patogenicidade, pois impede a deposição do componente C3b do sistema complemento, impedindo a fagocitose (JARVA et al., 2003).

A beta-hemolisina/citolisina produzida pelas cepas beta-hemolíticas é uma proteína extracelular, oxigênio-estável e não imunogênica. Sua

produção está associada à lise de células vermelhas e ampla variedade de tipos celulares eucarióticos (MARCHLEWICZ e DUNCAN, 1981), incluindo fibroblastos (TAPSALL e PHILIPS, 1991), células endoteliais pulmonares (NIZET et al., 1996; GIBSON et al., 1999) e macrófagos (RING et al., 2000). As células injuriadas demonstram perda da densidade citoplasmática, fragmentação das membranas citoplasmáticas e nucleares, dilatação das organelas e agrupamento da cromatina nuclear (NIZET et al., 1996). Adicionalmente, a beta-hemolisina/citolisina em ratos está associada com o aumento dos níveis de citocinas inflamatórias (IL6, IL1 $\alpha$ ) e lesão hepática (RING et al., 2000).

O “fator CAMP” (CHRISTIE et al., 1944) é uma proteína secretada por estreptococos do grupo B que interage com a  $\beta$ - hemolisina secretada por *Staphylococcus aureus*, que produz sinergia e aumento da hemólise. Amplamente explorada nos laboratórios de diagnóstico, o “fator CAMP” representa importante fator de virulência (LIU e NIZET, 2004), pois causa a morte de coelhos e ratos após a injeção (SKALKA e SMOLA, 1981; JURGENS et al., 1987).

A fração C5a do sistema complemento ativa neutrófilos por meio de ligação ao receptor Cr3 na superfície do fagócito. Estreptococos do grupo B produzem a enzima C5a peptidase, capaz de quebrar a fração C5a, reduzindo a atividade desta célula fagocítica. Além disso, é observada a

afinidade desta enzima para a fibronectina que facilita a invasão tecidual pelo microrganismo (KISHIMOTO et al., 1989).

A hialuronidase degrada o ácido hialurônico da matriz extracelular, facilitando a disseminação da bactéria através dos tecidos do hospedeiro. Um segundo substrato da hialuronidase é o sulfato de condroitina, envolvido na modificação de estruturas e macromoléculas de transporte, facilitando a penetração da bactéria em tecidos durante as infecções (QUI et al., 1996). A oligopeptidase degrada peptídeos, inclusive fatores protéicos de defesa do hospedeiro, como a bradicinina e neurotensina (LIN et al., 2000).

A toxina carboidrato CM 100 é um polissacarídeo não capsular, de alto peso molecular, obtido a partir de estreptococos do grupo B. É capaz de induzir quadro clínico semelhante à sepse quando injetado em animais, incluindo hipertensão pulmonar, aumento de permeabilidade vascular e neutrofilia (HELLERQVIST et al., 1987). Entretanto, o mecanismo de ação desta toxina é desconhecido (LIU e NIZET, 2004).

Os principais antígenos protéicos (C, R e X) expressos por alguns sorotipos de estreptococos, juntamente com os polissacarídeos capsulares tipo específicos, podem ser requeridos para a virulência (FERRIERI, 1988). O alfa antígeno, assim como a cápsula, protege a bactéria contra a fagocitose na ausência de anticorpo específico, e tanto o alfa, o beta, como

o polissacarídeo capsular, provocam resposta imune em camundongos (HAUGE et al., 1996).

O antígeno R é classificado em quatro tipos, R1 a R4, de acordo com suas reações de imunoprecipitação em gel de agarose. O antígeno R4 é predominante em amostras humanas e encontrado nos sorotipos II e III. As amostras que possuem a proteína C, não têm proteína R e vice-versa e produzem resposta imune em ratos, interferindo na fagocitose (FLORES e FERRIERI, 1989).

O antígeno X é pouco estudado como constituinte antigênico nas amostras de *S. agalactiae*. Anticorpos formados contra o antígeno X induzem à deposição do C3 pela via clássica e são capazes de estimular a morte bacteriana por opsonização na ausência do C3 (RAINARD et al., 1994).

### **2.2.3. Epidemiologia da estreptococose em peixes**

Os estreptococos são bactérias oportunistas amplamente distribuídas no ambiente aquático e sua patogenicidade está associada às condições de estresse do hospedeiro, tais como má qualidade da água, manejo inadequado e condições de criação intensiva (BUNCH e BEJERANO, 1997).



Os estreptococos podem sobreviver mesmo em condições ambientais adversas. KITAO et al. (1979) descreveram a presença de elevado número de estreptococos na água e em sedimentos de piscicultura durante os meses de verão, e que diminuiu durante o outono e inverno. PERERA et al. (1997) baseados no padrão de mortalidade observado em algumas pisciculturas de tilápia no Texas, sugeriram a existência de fonte permanente de estreptococos no meio aquático. Quando as condições são favoráveis, tais como grande quantidade de matéria orgânica, as bactérias presentes na água multiplicam-se e provocam surtos nos peixes.

EVANS et al. (2000) demonstraram que a mucosa do órgão olfativo e em menor proporção, receptores da mucosa ocular são pontos em que se pode processar o mecanismo de infecção com *S. iniae* em tilápia e robalo híbrido (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*) imersos em águas contendo o microrganismo. Além disso, podem invadir a pele lesada, nadadeiras e superfície corporal dos peixes (SANO e FUKUDA, 1987). No robalo híbrido, o *S. iniae* pode invadir o epitélio dos filamentos branquiais, penetrando na corrente sanguínea de modo a infectar o cérebro e a disseminar-se por todo o organismo (MCNULTY et al., 2003).

A estreptococose em peixes pode ocorrer após a ingestão de material contaminado (BROMAGE e OWENS, 2002). Os peixes doentes e mortos são as principais fontes de infecção (MINAMI et al., 1979; CLARK et al.,

2000). Golfinhos capturados no rio Amazonas e que apresentavam abscessos devido à infecção por *S. iniae*, provavelmente entraram em contato com o patógeno pela ingestão de alimento contaminado (BONAR e WAGNER, 2003).

Os surtos da enfermidade em peixes são importantes, devido à capacidade do patógeno em afetar outras espécies que coabitam o ambiente aquático. Assim, a infecção é intensificada entre predadores de peixes doentes ou mortos (ZLOTKIN et al., 1998).

A infecção por *Streptococcus* sp. introduzida diretamente no trato digestório, provavelmente não seja capaz de afetar populações de peixes saudáveis. O agente pode penetrar na parede do intestino ou estômago, se anteriormente nestes locais houver solução de continuidade produzida por outras bactérias ou poluentes (RASHEED e PLUMB, 1984).

Segundo SHOEMAKER et al. (2000) a morbidade e mortalidade de peixes por estreptococos são influenciadas pela densidade de estocagem. A ausência de muco sobre a pele constitui-se em porta de entrada para patógenos obrigatórios ou oportunistas (PLUMB, 1997). CHANG e PLUMB (1996) tiveram dificuldades em infectar tilápia com *Streptococcus* sp. antes que a pele sofresse injúria mecânica. Em tanques com altas densidades de estocagem, são observadas maiores taxas de mortalidade de tilápia por *S. iniae*, devido provavelmente, a carga

bacteriana mais elevada e maior contato direto entre os peixes. O aumento da densidade populacional determina maior ocorrência de abrasões de pele, indicando ser esta importante via de infecção (CLARK et al., 2000).

Em robalo híbrido submetidos ao desafio por *S. iniae* por imersão, foi constatada a capacidade do patógeno em atravessar a barreira hematoencefálica causando meningoencefalite e rapidamente disseminar-se para nadadeiras, coração, rim e olhos (EVANS et al., 2000). Os peixes infectados por estreptococos podem apresentar anorexia, natação errática com movimentos giratórios na superfície da água e escurecimento da pele. Macroscopicamente encontram-se endoftalmos ou exoftalmos. Podem ainda apresentar panoftalmite aguda com perda da visão. Hemorragias cutâneas difusas ou petéquias são frequentes e podem ser observadas em todo o corpo, inclusive na região cefálica e caudal. Outras consequências da infecção são as meningites e as septicemias. No abdômem observa-se ascite com líquido hemorrágico e esplenomegalia; no crânio verifica-se congestão difusa cerebral com líquido cefaloraquídeo hemorrágico (PLUMB, 1999). Histologicamente ocorre severa inflamação granulomatosa, panoftalmite, meningoencefalite, necrose e vacuolização de hepatócitos e congestão e necrose esplênica (EVANS et al., 2000).

SHOEMAKER e KLESIUS (1997) relataram dificuldades na utilização de antibióticos para o tratamento de infecções por *Streptococcus*

sp., pois o patógeno pode sobreviver no interior de macrófagos onde as drogas antimicrobianas não os alcançam; os antibióticos podem eliminar os sinais clínicos, mas não o agente; os peixes doentes não se alimentam da ração medicada e, portanto, determinam maior predisposição às linhagens do microrganismo resistentes. Somente a utilização de antibióticos não é eficiente, devendo estar associada às práticas adequadas de manejo. Além disso, existe a possibilidade de se desenvolverem estirpes bacterianas resistentes, pouca aceitação dos consumidores à animais tratados e impactos negativos no ambiente (NAKANISHI et al., 2002).

A vacinação em aquicultura surge como alternativa ao uso de antibióticos e outros produtos químicos, na prevenção de infecções (ROMANO e MEJÍA, 2003). A habilidade dos peixes em desenvolverem imunidade contra determinado microrganismo depende da idade do peixe, da temperatura da água, do agente de imunização e do método de vacinação (GUDDING et al., 1999).

A maioria das vacinas bacterianas é inativada e administrada por injeção ou imersão. A aplicação das vacinas pela via intraperitoneal é o método mais confiável e eficaz, quando comparada à via oral e imersão. As desvantagens desta via incluem estresse extra para os peixes, custos, segurança e tempo requerido para administração da vacina e para o desenvolvimento de imunidade. Vacinas injetáveis não são adequadas para

peixes jovens, pequenos e frágeis. Em contraste, a vacinação por imersão é prática para grande escala, principalmente para peixes pequenos, embora seja necessário maior volume de vacina e a proteção geralmente é menos eficaz quando comparada com as vacinas injetáveis (NAKANISHI e OTOTAKE, 1997).

Os produtos celulares são importantes fatores de virulência de patógenos e imunogênicos o suficiente para conferir proteção (PASNIK et al., 2005). ELDAR et al. (1995) desenvolveram duas vacinas contra *S. difficile*, uma com células de estreptococos inativadas por formalina e outra com concentrado de produtos extracelulares (CPE). Os peixes foram vacinados pela via intraperitoneal (i.p.), com duas doses da primeira com intervalo de quatro semanas e via intra-muscular (i.m.) com duas doses da CPE, com intervalo de duas semanas. Nos dois experimentos, os peixes foram desafiados com  $10^5$  UFC de *S. difficile*, i.p. Nos peixes não vacinados a mortalidade foi de 100,0%. Nos vacinados com células não ocorreram mortes por 75 dias após o desafio e nos vacinados com CPE a mortalidade foi de 8,0%.

ELDAR et al. (1997) avaliaram a eficácia da vacina com *S. iniae* inativado por formalina, administrada via i.p. em 150 truta arco-íris mantidas em laboratório e em outras 40.000, i.p., em criação com histórico de estreptococose e mortalidade de 60,0%. Nas condições experimentais,

os peixes foram desafiados com inóculo de  $10^5$  UFC, i.p., um, três e seis meses após a vacinação. Apresentaram 90,0% de sobrevivência mesmo após o segundo e terceiro desafio. Na propriedade, a mortalidade acumulada dos peixes vacinados foi de 4,5%, enquanto que nos peixes não vacinados a mortalidade foi de 53,0%, após quatro meses de avaliação.

KLESIUS et al. (1999) desenvolveram bacterina modificada contra *S. iniae* para tilápia, utilizando células inativadas adicionadas de ECP. Tilápia de 25,0g e de 100,0g foram vacinadas com  $4,0 \times 10^{10}$  UFC/mL, i.p. e desafiados 30 dias depois com inóculo de  $10^9$  UFC/mL. Demonstrou-se que a vacinação eliminou os sinais clínicos em animais vacinados e que o CPE de *S. iniae* poderia conter antígenos de superfície.

EVANS et al. (2004) pesquisaram duas vacinas elaboradas com *S. iniae* e *S. agalactiae* inativados ( $4,0 \times 10^9$  UFC/mL) e ECP. Um grupo de 80 tilápia de 30,0g cada foi vacinado com *S. agalactiae* na concentração de  $4,0 \times 10^9$  UFC/mL, i.p. e desafiado com cepa homóloga,  $1,5 \times 10^4$  UFC/peixe, i.p., 30 dias após. Os peixes foram acompanhados por 14 dias e a mortalidade foi de 15,0% no grupo vacinado e de 76,0% no controle. Para avaliar a eficácia da vacina de *S. agalactiae* aplicada por imersão foram utilizados dois grupos. Um grupo com 65 peixes de 5,0g foi desafiado com  $3,6 \times 10^5$  UFC/peixe e o outro com 23 peixes de 30,0g foi desafiado com  $1,7 \times 10^6$  UFC/peixe, ambos por imersão. Em um grupo vacinado com *S.*

*iniae*, i.p. e desafiado com *S. agalactiae* pela mesma via, a mortalidade foi 100,0%, sugerindo não existir imunidade cruzada entre *S. iniae* e *S. agalactiae*. A vacina contra *S. agalactiae* apresentou boa eficácia quando inoculada i.p. e a imersão pode ser alternativa para vacinar peixes pequenos.

SHOEMAKER et al. (2006) avaliaram a eficácia de vacina inativada e liofilizada de *S. iniae* na concentração de  $4,0 \times 10^9$  células/mL administrada via i.p. e via oral incorporada à ração utilizando a tecnologia Oralject<sup>™</sup> (vacina protegida) em tilápia. A porcentagem de sobrevivência relativa (PSR) dos peixes vacinados pela via oral foi de 63,1% e do grupo vacinado i.p. de 100,0%. Sugere-se que a vacinação oral é menos estressante, eficaz e econômica para grandes populações de peixes, embora a vacina injetável apresente a maior taxa de sobrevivência.

PASNIK et al. (2006) avaliaram a imunidade passiva de tilápia, por meio de soro hiperimune de *S. agalactiae* obtido de peixes vacinados e desafiados com *S. agalactiae*. Foi aplicado 0,1 mL do soro, i.p., em tilápia com peso médio de 3,3g, desafiadas 72 horas depois com  $1,5 \times 10^4$  UFC/peixe. A mortalidade acumulada foi de 10,0% no grupo vacinado e 72,7% no controle, demonstrando que a vacinação passiva poderia ser considerada como ferramenta profilática contra infecções por *S. agalactiae*.

#### **2.2.4. Resposta imune em peixes**

A imunidade específica é representada por reações mediadas pela produção de imunoglobulinas (Ig) com molécula tetramérica similar a IgM de mamíferos e necessita de sensibilização prévia (SCAPIGLIATI et al., 1999). Alguns relatos demonstraram a existência de mais três imunoglobulinas, sendo elas, a IgD (HIRONO et al., 2003), IgZ (DANILOVA et al., 2005) e a IgT (HANSEN et al., 2005). A IgM existe sob duas formas alternadas, uma como receptor de membrana para antígenos de superfície de células B e outra como proteína solúvel secretada como componente de fluídos corporais (LITMAN et al., 1999).

A imunidade inata ou não específica responde a vários tipos de estímulos químicos, físicos e biológicos por meio da inflamação da área agredida. O acúmulo de leucócitos no sítio lesado é uma das principais características do processo inflamatório (GARCIA- LEME, 1989).

A mobilização adequada e em tempo hábil de leucócitos da microcirculação para o foco inflamatório pelo mecanismo de quimiotaxia é uma das etapas fundamentais da reação e se traduz na primeira ação de defesa do organismo e na principal característica do fenômeno. Em mamíferos a resposta inflamatória é relativamente bem conhecida, claramente bifásica em relação aos tipos celulares que ocorrem no exsudato. A fase aguda é caracterizada por vasodilatação arteriolar, capilar



e venular; aumento de permeabilidade vascular em vênulas de médio calibre com formação de edema; marginação leucocitária, diapedese, quimiotaxia e acúmulo de leucócitos no foco lesado e fagocitose por células competentes. Inicialmente, nas primeiras 24 horas, predominam os polimorfonucleares neutrófilos, sendo o fenômeno de caráter exsudativo e agudo. Quando o agente persiste no sítio inflamado, a reação se cronifica e passa a apresentar caráter proliferativo, com o acúmulo de leucócitos mononucleares como os macrófagos e seus derivados epitelióides e policariontes, linfócitos, plasmócitos, fibroblastos, fibras colágenas, neovasos e, na dependência do agente causal, eosinófilos. Este quadro pode sofrer pequenas variações em função do tipo de tecido afetado, do agente causal e do nível de especificidade da resposta. Todavia, é estereotipado e altamente complexo em função dos seus mecanismos de regulação envolvendo mediadores químicos autacóides e moduladores (GARCIA-LEME, 1989).

O fenômeno tem como finalidade diluir, destruir ou circunscrever e isolar o agente lesivo (GARCIA-LEME, 1989). Fenômeno semelhante, mas com menor complexidade, ocorre em peixes teleósteos como fagocitose por células competentes, produção de peptídeos envolvidos no controle microbiano, atividade de lisozimas, sistema complemento e outras proteínas sanguíneas (COLONNA et al., 2006).

As proteínas de fase aguda incluem 30 tipos não relacionados bioquímica e funcionalmente, as quais sofrem aumento de sua concentração plasmática e regulam a função imune atuando por meio de efeitos supressivos ou estimuladores sobre o processo inflamatório ou como proteínas transportadoras (WHITE et al., 1981).

A injeção de endotoxina de bactérias gram-negativas em peixes induz a produção do fragmento C3 do sistema complemento e de proteína C reativa (PCR), a primeira a aparecer no plasma da maioria dos animais na vigência de inflamação com ou sem infecção e após lesões teciduais (YANO, 1996).

A ocorrência de infecção geralmente é favorecida pela participação de fatores genéticos do microrganismo e/ou fatores fisiológicos do próprio hospedeiro, que podem determinar a resistência ou suscetibilidade à doença. Desta forma, a predisposição do indivíduo a determinada doença, pode ser maior ou menor, dependendo da sua resposta à agressão. Esta capacidade resulta da união das respostas imunes específicas e não específicas, sendo influenciada pela frequência de determinados genes do próprio hospedeiro (CALICH et al., 1998).

A propagação do patógeno é freqüentemente contida pela resposta inflamatória que recruta moléculas e células efetoras do sistema imune inato dos compartimentos de reserva. As respostas não imunes duram

vários dias, enquanto a resposta imune adaptativa é iniciada em resposta a antígenos específicos. Este tipo de resposta pode ser direcionado para características próprias do patógeno e geralmente elimina a infecção e protege o hospedeiro contra a reinfecção (FEARON e LOCKSLEY, 1996).

Se o microrganismo atravessa a barreira epitelial e começa a se replicar nos tecidos do hospedeiro, ele é, na maioria dos casos, imediatamente reconhecido pelos macrófagos residentes, derivados de monócitos circulantes que abandonam a circulação para migrar pelos tecidos. Atuam como células de alarme e quando em contato com agentes injuriantes, desencadeiam mecanismos de defesa (FERREIRA, 1980), recrutando os neutrófilos para o sítio lesado (CUNHA e FERREIRA, 1986; SOUZA et al., 1988).

Os macrófagos são células multifuncionais, pois além de participarem da fase crônica da reação inflamatória desencadeiam e modulam vários eventos da fase aguda (JOHNSTON JR, 1988). Quando ativados por endotoxinas ou linfócitos T convertem a arginina em óxido nítrico que exerce ações bactericidas, tumoricida e fungicida e secretam mais de cem substâncias biologicamente ativas (SECOMBES et al., 2001).

A segunda maior família de fagócitos, os neutrófilos, são células abundantes no sangue, porém não estão presentes em tecidos saudáveis. São importantes na imunidade inata já que podem reconhecer, fagocitar e

destruir vários patógenos sem a ajuda da resposta adaptativa (KOLLNER et al., 2002).

Nos peixes os trombócitos também são referidos como células de defesa, pois contém arsenal próprio para fagocitose, como glicogênio associado ao fornecimento de energia devido ao aumento do metabolismo dos carboidratos pela glicólise (ZINKL et al., 1991; AFONSO et al., 2000; PASSANTINO et al., 2005; TAVARES-DIAS, 2006), fosfatase ácida (SCHÜTT et al., 1997) e alcalina (ZINKL et al., 1991; PASSANTINO et al., 2005) e fagocitam bactérias e outros antígenos (SLIERENDRECHT et al., 1995; KOLMAN et al., 2003). Em *Colossoma macropomum* não estimulados observou-se alteração da morfologia de trombócitos portadores de aglomerados de vacúolos de glicogênio e numerosas projeções da superfície celular na forma de pseudópodos ao redor de debris celulares. O mesmo tipo celular apresentava vesículas citoplasmáticas com a internalização daquele material que era constituído por heterocromatina, remanescente nuclear. Em outros, o mesmo material foi observado já degradado na forma de corpos eletron densos ou sem essa característica. Esses achados sugerem a endocitose ou fagocitose de células apoptóticas por trombócitos (TAVARES-DIAS et al., 2007).

A fagocitose de eritrócitos de cobaia e de *Bacillus anthracis* por mononucleares peritoneais foi o primeiro fenômeno inflamatório descrito

em peixes (METCHNIKOFF, 1893; 1905; MESNIL, 1895). Posteriormente, vários autores procuraram caracterizar as células presentes na inflamação induzida por vários tipos de flogógenos em diversas espécies de peixes, tempos de observação e modelos experimentais.

A injeção intraperitoneal de querosene em truta arco-íris, *Salmo gairdneri*, induziu acúmulo local de neutrófilos (WEINREB, 1958), enquanto que a inoculação intraperitoneal de *Yersinia ruckeri*, nessa mesma espécie, provocou acúmulo de 57,0% de linfócitos e 43,0% de células polimorfonucleares (GRIFFIN, 1983). A injeção intraperitoneal de glicogênio de ostra ou *Vibrio alginolyticus* em *Pleuronectes platessa* provocou acúmulo de fluido na cavidade com presença de neutrófilos e macrófagos (MACARTHUR et al., 1984), enquanto a injeção de parafina líquida na mesma cavidade de tilápias induziu a infiltração somente de neutrófilos (SUZUKI, 1986).

JENKINS e KLESIUS (1998) injetaram esqualene, adjuvante incompleto de Freund, soro de cabra, tioglicolato ou solução salina na cavidade peritoneal de bagre do canal, *Ictalurus punctatus*, identificando migração significativa de macrófagos após as injeções dos dois primeiros flogógenos. A injeção de carragenina na bexiga natatória de tilápia induziu congestão vascular, acúmulo predominante de trombócitos e macrófagos, raros granulócitos e edema. No exame de extensões do exsudato e

microscopia eletrônica, foram encontrados 63,0% de trombócitos e 17,0% de macrófagos, respectivamente, três horas após a injeção (MATUSHIMA e MARIANO, 1996). No mesmo modelo de estudo de inflamação em pacu, *Piaractus mesopotamicus*, seis horas após a injeção de carragenina, havia 79,0% de trombócitos e 31,0% de macrófagos acompanhados por número pouco expressivo de granulócitos e de linfócitos (MARTINS et al., 2006).

ENDO et al. (1997) observaram que após a injeção de lipopolissacarídeo (LPS) na bexiga natatória de tilápia, ocorreu a formação de exsudato constituído principalmente por neutrófilos (96,0%) vinte e quatro horas depois. A inoculação de *Escherichia coli* inativada com formalina na bexiga natatória de tilápia, demonstrou a degranulação de células eosinofílicas no ponto de injeção, com posterior acúmulo de neutrófilos. Os eosinófilos estão diretamente relacionados com os mecanismos de defesa, já que a degranulação dessas células ocorre após a inoculação de certos patógenos, além de estarem presentes em vasos sanguíneos de interfaces entre indivíduo e ambiente, tais como pele e intestino (MATSUYAMA e IIDA, 1999).

BOZZO et al. (2007) estudaram a composição celular do exsudato inflamatório na bexiga natatória de pacu após a injeção de tioglicolato, *Aeromonas hydrophila* inativada e endotoxina (LPS) de *E. coli*, seis, 24 e 48 horas após os estímulos. Os resultados demonstraram que as células

predominantes no foco inflamado foram os trombócitos, acompanhados de menor quantidade de linfócitos, e, em menor número, macrófagos e granulócitos desde as avaliações iniciais, independentemente do tipo de estímulo inflamatório.

### **2.3. Levedura *Saccharomyces cerevisiae* como alimento funcional**

As leveduras são fungos unicelulares pertencentes à classe Ascomycetos, tendo como maior destaque comercial a espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Possuem tamanhos variáveis, com reprodução sexuada ou assexuada por brotamento ou cissiparidade. São cosmopolitas e estão amplamente distribuídas, no solo, na superfície de folhas, frutos e no trato gastrointestinal de animais (FISHER e COOK, 2001).

A levedura desidratada *Saccharomyces cerevisiae* é o extrato seco, protéico e vitaminado, resultante da fermentação do caldo de cana de açúcar com secagem por pulverização à seco. Sua composição química depende da linhagem, natureza do substrato utilizado, concentração de sais no meio, condições da fermentação, processamento de secagem e armazenamento (BUTOLO, 2002).

A utilização da levedura *S. cerevisiae* na formulação de dietas para diferentes espécies animais, inclusive organismos aquáticos, ocorre mais frequentemente em função do seu alto valor nutritivo. Segundo HORI

(1997), as leveduras apresentam em sua composição química básica de 33,0 a 46,0% de carboidratos; 38,0 a 50,0% de proteínas; 3,0% de bases nitrogenadas; 1,0% de amônia; 2,0% de lipídeos e esteróis e 6,0 a 8,0% de nitrogênio. Apresentam ainda, teor de 5,0 a 10,0% de minerais, sendo o potássio e o fósforo seus principais componentes, além de cálcio, magnésio, sódio e enxofre na forma de sulfitos (COZZOLINO, 1982).

A levedura desidratada apresenta elevado nível protéico devido ao balanceamento de aminoácidos (GHIRALDINI e ROSSELL, 1997). Ainda que os níveis das vitaminas A e C sejam reduzidos (DESMONTS, 1968), são ricas em vitaminas do complexo B (KRONKA et al., 1991), destacando-se os níveis de tiamina, riboflavina, niacina e ácido pantotênico. Portanto, constitui-se em importante suplemento vitamínico, sendo que estudos têm demonstrado que as vitaminas das leveduras, em quantidade equivalente, possuem efeitos superiores aos obtidos com as vitaminas sintéticas (BUTOLO, 1997).

Segundo BUTOLO (2002) os pró-nutrientes são microingredientes utilizados na alimentação animal, administrados em pequenas quantidades, com a finalidade de incrementar o valor intrínseco da mistura de nutrientes. Este elemento pode ser uma substância orgânica ou inorgânica e/ou de origem vegetal ou animal em seu estado natural, fresco, conservado ou ainda, derivado de processo industrial.



Desta forma a levedura na sua forma inativa inclusa na dieta animal caracteriza um pró-nutriente, atuando de forma positiva no incremento da disponibilidade e da eficiência dos nutrientes da ração (HISANO et al., 2004). Sua utilização pode nutrir melhor pela suplementação de nutrientes essenciais ou não e de compostos como os oligossacarídeos, constituintes da parede celular e que possuem biofunções específicas.

A atuação das leveduras e seus derivados podem ocorrer devido à presença de alguns componentes como polímeros de manose ligados a peptídeos (mananoproteínas), polímeros de glicose (glicanas) e quitina. Estes compostos são encontrados na parede celular das leveduras (KOLLAR et al., 1992; SGARBIERI et al., 1999; SCAPINELLO et al., 2001 ab) e podem representar em sua composição aproximadamente 58,0% de glicanas, 40,0% mananoproteínas e 2,0% de quitina (RODRIGUEZ et al., 2003).

Os  $\beta$  glicanos são polissacarídeos estruturais presentes na parede celular, relacionados à numerosos benefícios à saúde humana e animal (FREIMUND et al., 2003). Esta molécula é um complexo de glicose unido por ligações  $\beta$ -1-3 e  $\beta$ -1-6, constituindo respectivamente, 50,0 e 10,0% da massa da parede celular (ROMERO e GOMEZ-BASUARI, 2003). Estes compostos melhoram a resposta inflamatória e, pela ausência de efeitos

adversos, é utilizado na aquicultura para aumentar o patamar de saúde das populações criadas em cativeiro (FIGUERAS et al., 1998).

A ação do glicano de levedura ocorre por meio da estimulação de células responsáveis pela proteção do organismo. Algumas das respostas são o aumento da atividade fagocítica, elevação da quantidade e ativação de linfócitos, imunoglobulina plasmática e de lisozimas e aumento da produção de anticorpos (GANNAM, 2005).

SAKAI (1999) relata que os imunoestimulantes podem proteger os organismos aquáticos de diversas doenças infecciosas e desta forma, reduzir a mortalidade. Neste contexto, os beta glicanos de levedura podem incrementar a efetividade da resposta inflamatória de diversas espécies de peixes pela produção de proteínas antimicrobianas (ENGSTAD et al., 1992; ORTUNO et al., 2002) e estimulação da atividade fagocítica de macrófagos (ROBERTSEN et al., 1990; JØRGENSEN et al., 1993a).

O aumento da resistência às doenças pela ação do  $\beta$ -glicanos ocorre por meio da resposta inflamatória inespecífica (WHITTINGTON et al., 2005). Tilápia do Nilo que não receberam  $\beta$  glicano de levedura e foram imunizadas contra *S. iniae* apresentaram aumento na resposta humoral e portanto, aumento na proteção contra a infecção (KLESIUS et al., 2000; SHELBY et al., 2000).

Segundo BAGNI et al. (2005) os efeitos imunomoduladores dos glicanos podem variar conforme a espécie de peixe, vias de administração, doses, associação com outros imunoestimulantes e tempo de administração. Por curto período, a resposta inflamatória pode ser favorecida após a administração de beta glicano de levedura. Porém, quando administrado por longos períodos, provoca redução na resposta imune de truta arco-íris (MATZUO e MIYAZONO, 1993) e bagre do canal (YOSHIDA et al., 1995), sugerindo efeito retrógrado.

A injeção intraperitoneal de  $\beta$ -1-3 e  $\beta$ -1-6 glicano de parede da *Saccharomyces cerevisiae* no salmão do Atlântico (*Salmo salar L.*), resulta em aumento da resistência contra o *V. anguillarum*, *V. salmonicida* e *Yersinia ruckeri* (ROBERTSEN et al., 1990). CHEN e AINSWORTH (1992) observaram que a inoculação intraperitoneal de parede celular de levedura em bagre do canal aumentou a resistência contra *E. ictaluri*. Entretanto, THOMPSON et al. (1995) não observaram esse efeito na infecção por *V. anguillarum*.

O comportamento da parede celular da levedura como adjuvante foi demonstrado nos peixes. A vacinação contra *Aeromonas salmonicida* associada à administração de levedura ao salmão do Atlântico aumentou a resposta imune humoral e protegeu os peixes contra a furunculose, em comparação com os peixes que receberam somente a vacina (RØRSTAD et

al., 1993; AAKRE et al., 1994). BAULNY et al. (1996) observaram melhora nos mecanismos de defesa em turbot (*Scophthalmus maximus*) imersos em vacina contra *V. anguillarum* e submetidos à suplementação dietética com glicano de levedura pela via oral. Somente a administração oral de glicano de levedura não foi capaz de protegê-los contra a infecção pelo *V. anguillarum*.

Em concordância, a administração de glicano de levedura aumentou a atividade da lisozima no salmão do atlântico, truta arco-iris e turbot (ENGSTAD et al., 1992; THOMPSON et al., 1995; BAULNY et al., 1996), a atividade bactericida de macrófagos em truta arco-iris, salmão do Atlântico e bagre do canal (CHEN e AINSWORTH, 1992) e a produção de superóxido por macrófagos em truta arco-iris, bagre do canal e salmão do Atlântico (SONG e HSIEH, 1994; YOSHIDA et al., 1995).

ORTUÑO et al. (2002) elaboraram rações contendo 1,5 a 10,0g de levedura íntegra liofilizada/kg de dieta, tendo como objetivo definir a influência da administração da levedura para *Sparus aurata L* como estimulador de respostas de defesa celulares (número de fagócitos, surto respiratório de leucócitos, mieloperoxidase, e atividade citotóxica de leucócitos) e humoral (soro). Os resultados obtidos com as doses de 5,0 e 10,0 gramas, administradas por quatro semanas, com taxa de alimentação equivalente a 1,0% do peso vivo ao dia, indicaram maior porcentagem de

células fagocíticas e aumento da quantidade de bactérias (*Vibrio anguillarum*) eliminadas.

Segundo SIWICKI et al. (1994) em condições de criação intensiva, a via oral é a eleita para a administração de beta glicanos em peixes. Entretanto, pela via intraperitoneal ocorre maior resposta de proteínas da fase aguda e atividade de macrófagos (CUESTA et al., 2007).

ROBERTSEN et al. (1990) observaram que a injeção intraperitoneal de  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,6 glicanos no salmão do Atlântico, resultou no aumento da resistência contra infecções. Na tentativa de esclarecer os mecanismos envolvidos no estudo anterior, ENGSTAD et al. (1992) concluíram que os glicanos de levedura foram responsáveis pelo aumento de lisozimas e atividade hemolítica mediada pelo sistema complemento.

JORGENSEN et al. (1993b), avaliaram a atividade bactericida de macrófagos e produção de ânion superóxido por macrófagos coletados do rim cranial de trutas arco íris após injeção intraperitoneal de  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,6 glicanos e observaram aumento na produção dos íons superóxido e da atividade dos macrófagos.

Segundo ROBERTSEN et al. (1994), o aumento da resistência contra bactérias patogênicas em peixes alimentados com  $\beta$ -glicanos é explicado, em parte, pelo aumento da atividade fagocítica dos macrófagos. O aumento na produção de intermediários reativos do oxigênio pelos

monócitos/macrófagos e neutrófilos é considerado um dos indicadores da ativação do sistema imune não específico em peixes (JENEY e ANDERSON, 1993; JORGENSEN e ROBERTSEN, 1995).

Os efeitos do  $\beta$  glicano de levedura a curto e longo prazo sobre a resposta imune inata e específica dos peixes foram avaliados. Pesquisas demonstraram que o período de 30 dias (0,1% de  $\beta$ -glicano na dieta) foi suficiente para melhor resistência para truta arco-íris submetidas a estresse (JENEY et al., 1997; VOLPATTI et al., 1998). No entanto, o tempo de 42 dias de alimentação (250,0 mg  $\beta$ -glicano /kg dieta) foi necessário para a carpa indiana apresentar maior atividade do macrófago, lisozima e sistema complemento quando desafiadas com *A. hydrophila* e *Edwardsiella tarda* (MISRA et al., 2006).

BAGNI et al. (2005) observaram no *Dicentrarchus labrax* que após 15 dias da administração do  $\beta$  glicano, a atividade do sistema complemento e lisozimas melhorou, não havendo influência após 30 e 45 dias de tratamento. Resultados semelhantes foram observados por VERLHAC et al. (1996) em truta arco-íris, uma vez que os efeitos ocorreram após duas semanas da administração do  $\beta$ -glicano e não após quatro semanas. Ainda em concordância, ENGSTAD et al. (1992) observaram o aumento da atividade do sistema complemento e lisozimas após sete e 28 dias da aplicação intraperitoneal de  $\beta$ -glicano de levedura em salmonídeos.

A alimentação com 0,1% de  $\beta$ -glucano e 600,0 mg de vitamina C/kg da dieta durante 15 dias, ou mais, proporcionou aumento da resistência orgânica de tilápia do Nilo frente ao estímulo pelo frio, estresse por transporte e desafio com *Aeromonas hydrophila*. A administração dessa dieta durante sete dias não foi suficiente para manter e/ou proporcionar adequada resposta após juvenis de tilápia do Nilo serem submetidos a situações adversas (FALCON, 2007).

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAKRE, R., WERGELAND, H.I., AASJORD, P.M., ENDERSEN, C. Enhanced antibody response in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) to *Aeromonas salmonicida* cell wall antigens using a bacterin containing b-1, 3-M-glucan as adjuvant. **Fish Shellfish Immunol.** v.4, p.47–61, 1994.

AFONSO, A.; MACEDO, P.M.; ELLIS, A. E.; SILVA, M.T. Glycogen granules in resting and inflammatory rainbow trout phagocytes – an ultrastructural study. **Disease of Aquatic Organisms**, v.42, p.101-110, 2000.

AL-HARB, A. H. First isolation of *Streptococcus* sp from hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) in Saudi Arabia. **Aquaculture**, v.128, p.263-271, 1994.

AMERICAN TILAPIA ASSOCIATION. Tilapia situation and outlook report: 1997. California, 1998. 7p.

ANDERSON, D. P. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. **Annual Review of Fish Disease**, v.2, p.281-307, 1992.

BAGNI, M.; ROMANO, N.; FINOIA, M, G.; ABELLI, L.; SCAPIGLIATI, G.; TISCAR, P. G.; SARTI, M.; MARINO, G. Short- and long-term effects of a dietary yeast b-glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Fish e Shellfish Immunology**, n.18, p.311-325, 2005.

BAULNY, M.O.D., QUENTEL, C., FOURNIER, V., LAMOUR, F., GOUVELLO, R.L. Effect of long-term oral administration of b-glucan as an immunostimulant or an adjuvant on some non-specific parameters of the immune response of turbot (*Scophthalmus maximus*). **Diseases of Aquatic Organisms**, v.26, p.139–147, 1996.

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



BONAR, C. J.; WAGNER, R. A. A third report of “golf ball disease” in an Amazon River dolphin (*Inia geoffrensis*) associated with *Streptococcus iniae*. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.34, p.296–301, 2003.

BONDAD-REANTASO, M. G.; SUBASINGHE, R. P.; ARTHUR, J. R.; OGAWA, K.; CHINABUT, S.; ADLARD, R.; TAN, Z.; SHARIFF, M. Disease and health management in Asian aquaculture. **Veterinary Parasitology**, v.132, p.249-272, 2005.

BOWSER, P. R.; WOOSTER, G. A.; GETCHELL, R. G. *Streptococcus iniae* infection of *Oreochromis niloticus* in a recirculation production facility. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.29, n.3, p.335-339, 1998.

BOZZO, F. R., MORAES, J. R. E., MORAES, F. R., PEREIRA, G., TAVARES-DIAS, M., ONAKA, E. M. Kinetics of cellular component in inflammatory response induced by different stimuli in the swim bladder of pacu *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Characidae). **Journal of the World Aquaculture Society**, v.38, p.302 - 308, 2007.

BROMAGE, E. S.; OWENS, L. Infection of barramundi *Lates calcarifer* with *Streptococcus iniae*: Effects of different routes of exposure. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.52, p.199–205, 2002.

BUNCH, E. C.; BEJERANO, I. The effect of environmental factors on the susceptibility of hibrid tilapia *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus* to streptococcosis. **The Israeli Journal of Aquaculture**, v.49, n.2, p.67-76, 1997.

BUTOLO, J.E. Uso da levedura desidratada na alimentação de aves. In: Simpósio sobre tecnologia da produção e utilização da levedura desidratada na alimentação animal, 1997, Campinas. Anais... Campinas, CBNA, p.51-83, 1997.

BUTOLO, J.E. **Qualidade de ingredientes na alimentação animal**, Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2002, 429p.

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

CASTAGNOLLI, N. Situação atual e perspectivas da aquicultura no Brasil. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE PEIXES E CRUSTÁCIOS, Campos do Jordão, 1995. Anais. Campinas: CBNA, 1995.p.1-8.

CHANG, P. H.; PLUMB, J. A. Histopathology of experimental *Streptococcus* sp. Infection in tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) and channel catfish, *Ictalurus punctatus*, (Rafinesque). **Journal of Fish Diseases**, v.19, p.235-241, 1996.

CHEN, D., AINSWORTH, A.J., Glucan administration potentiates immune defense mechanisms of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafineque. **Journal of Fish Diseases**, v. 15, p. 295–304. 1992.

CHRISTIE, R.; ATKINS, N.E.; MUNCH-PETERSEN, E. A note on a lytic phenomenon shown by group B streptococci. **Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science**, v.22, p.197-200, 1944.

CLARK, J. S.; PALLER, B.; SMITH, P. D. Prevention of streptococcosis in tilapia by vaccination: the Philippine experience. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TILAPIA AQUACULTURE, 5., 2000, Rio de Janeiro. Proceedings... Rio de Janeiro, v.2, p.545-551, 2000.

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

COZZOLINO, S.M.E. **Valor nutritivo da biomassa de *Saccharomyces cerevisiae*. Estudo em gerações sucessivas de ratos:** São Paulo, SP. USP, 1982, p.147. (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, 1982.

CUESTA, A.; RODRÍGUEZ, A.; SALINAS, I.; MESEGUER, J.; ESTEBAN, M.A. Early local and systemic innate immune responses in the teleost gilthead seabream after intraperitoneal injection of whole yeast cells. **Fish e Shellfish Immunology**, v.22, (3), p.242-251, 2007.

CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. The release of a neutrophil chomotactic factor from peritoneal macrophages by endotoxins: inhibitions by glucocorticoids. **European Journal of Parmacology**, v.129, p.65-76, 1986.

DANILOVA, N.; BUSSMANN, J.; JEKOSCH, K.; STEINER, L.A. The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin. **Nature Immunology**, v.6 (3), p.295-302, 2005.

DALTON, S. S.; CASEIRO, A.; FIRETTI, R.; WAKATSUKI, A. O desenvolvimento recente da aquicultura brasileira. **Anuário da Pecuária Brasileira**, p.252-256, 2005.

DESMONTS, R. Utilização da levedura na alimentação de crianças. **Pediatria Prática**, v.39, n. 7, p.7-18, 1968.

ELDAR, A.; BEJERANO, Y.; BERCOVIER, H. *Streptococcus shiloi* and *Streptococcus diffcile*: two new streptococcal species causing a meningoencephalitis in fish. **Current Microbiology**, v.28, p.139-143, 1994.

ELDAR, A.; FRELIER, P. F., ASSENTA, L., VARNER, P. W., LAWHON, S., BERCOVIER, H. *Streptococcus shiloi*, the name for an agent causing septicemic infection in fish, is a junior synonym of *Streptococcus iniae*. **International Journal Systematic Bacteriology**, v.45, p.840-842, 1995.

ELDAR, A., HOROVITCZ, A., BERCOVIER, H. Development and efficacy of a vaccine against *Streptococcus iniae* infection in farmed rainbow trout. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.56, p.175-183, 1997.

ENDO, M.; YOSHIDA, T.; SAKAI, M.; IIDA, T. Swim bladder as a site for administration of chemical agents: application to fish immunology. **Fish e Shellfish Immunology**, v.5, p.85-88, 1997.

ENGSTAD RE, ROBERTSEN B, FRIVOLD E. Yeast glucan induces increase in lysozime and complement mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. **Fish e Shellfish Immunology**, v.2, p.287-297, 1992.

EVANS, J. J.; SHOEMAKER, C. A.; KLESIUS, P. H. Experimental *Streptococcus iniae* infection of hybrid striped bass (*Morone chrysops* X *Morone saxatilis*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*) by nares inoculation. **Aquaculture**, v.189, p.197-210, 2000.

EVANS, J.J.; WIEDENMAYER, A.A.; KLESIOUS, P.H.; SHOEMAKER, C.A. Survival of *Streptococcus agalactiae* from fish following natural and experimental infections. **Aquaculture**, v.233, p.15-21, 2004.

FACKLAM, R. What happened to the Streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. **Clinical Microbiology Reviews**, v.15, n.4, p.613-630, 2002.

FALCON, D.R.  **$\beta$ -glucano e vitamina C no desempenho produtivo e parâmetros fisiopatológicos em juvenil de tilápia do Nilo: nível de suplementação e tempo de administração. 2007.** 146 f. Tese (Doutorado em Aqüicultura) – Centro de Aqüicultura da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, State of world aquaculture 2006. Rome, 2006. 134p. **FAO fisheries technical paper**, n. 500.

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

FERREIRA, S.H. Are macrophages the body's alarm cells? **Agents and Actions**, v.10, p.227-230, 1980.

FERRIERI, P. Surface-localized protein antigens of group B Streptococci. **Reviews of Infectious Diseases**, v.10, n.2, p.S363-S366, 1988.

FIGUERAS, A.; SANTARÉM, M.M.; NOVOA, B. Influence of the sequence of administration of  $\beta$ -glucans and a *Vibrio damsela* vaccine on the immune response of turbot (*Scophthalmus maximus L.*). **Veterinary Immunology and Immunopathology, Amsterdam**, v.64, n.1, p.59-68, 1998.

FISHER, F.; COOK, N. B. *Micologia: Fundamentos e Diagnóstico*. Rio de Janeiro: Revinter, 2001.

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

FLORES, A.; FERRIERI, P. Molecular species of R-protein antigens produced by clinical isolates of group B streptococci. **Journal Clinical Microbiology**, v.27, n.5, p.1050-1054, 1989.

FREIMUND, S.; SAUTER, M.; KAPPELI, O.; DUTLER H. A new non-degrading isolation process for 1,3-b-D-glucan of high purity from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Carbohydrate Polymers**, v.54, n.2, p. 159-171, 2003.

GANNAM, A. Immunostimulants in fish diets. In: SIMPÓSIO DE NUTRIÇÃO E SAÚDE DE PEIXES, 1., 2005, Botucatu. Anais... Botucatu: 2005, p.93 -102.

GARCIA - LEME, J. **Hormones and Inflammation**, p.1-238, CRC Press, Boca Raton, 1989.

GHIRALDINI, J.A.; ROSSELI, C.E.V. Caracterização e qualidade de levedura desidratada para a alimentação animal. In: SIMPÓSIO SOBRE TECNOLOGIA DA PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DA LEVEDURA DESIDRATADA NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL. Anais... CBNA, Campinas. p.27-49. 1997.

GIBSON R. L., NIZET, V.; RUBENS, C. E. Group B streptococcal beta-hemolysin promotes injury of lung microvascular endothelial cells. **Pediatric Research**, v.45, p.626-634, 1999.

GRIFFIN, B.R. Opsonic effect of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) antibody on phagocytosis of *Yersinia ruckeri* by trout leukocytes. **Devel. Comp. Immunol**, v. 7, p. 253-259, 1983.

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

HANSEN, J.D.; LANDIS, E,D,; PHILLIPS, R.B. Discovery of a unique Ig heavy chain isotype (IgT) in rainbow trout: implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. **National Academy Science**, v.102, n.19, p.6919-6924, 2005.

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

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

HELLERQVIST C. G., SUNDELL, H.; GETTINS, P. Molecular basis for group B beta-hemolytic streptococcal disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.84, p. 51-55, 1987.

HEMPEL, E. Tilapia, the new whitefish. Seafood International, **AGRA Europe, London**, v.17, n.10, p.16-20, 2002.

HIRONO, I.; NAM, B.H.; ENOMOTO, J.; UCHINO, K.; AOKI, T. Cloning and characterization of a cDNA encoding Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* IgD. **Fish e Shellfish Immunology**, v. 15(1), p.63-70, 2003.

HISANO, H.; PEZZATO, L.E.; BARROS, M.M.; SOUZA, E. Zinco e levedura desidratada de álcool como pró-nutrientes para alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.). **Acta Scientiarum, Maringá**, v. 26, n.2, p. 171-179, 2004.

HORI, J. Tecnologia da produção de levedura desidratada visando a qualidade do produto final. In: SIMPÓSIO SOBRE TECNOLOGIA DA PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DA LEVEDURA DESIDRATADA NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL. Anais... CBNA, Campinas, p.7-25. 1997.

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

HUBERT, R. M. Bacterial diseases in warm water aquaculture. In SHILO, M.; SARIG, S. (Ed.) *Fish Culture in Warm Water Systems. Problems and Trends*. Boca Raton: CRC, p. 194-197, 1989.

IBAMA. Estatística da pesca 2004: Brasil: grandes regiões e unidades da federação. Brasília: Coordenação Geral de Gestão de Recursos Pesqueiros, 2005. 136p. Disponível em: <[http://www.ibama.gov.br/rec\\_pesqueiros/index.php?id\\_menu=93](http://www.ibama.gov.br/rec_pesqueiros/index.php?id_menu=93)>. Acesso em: 21 mar. 2007.

JARVA, H., JOKIRANTA, T.S.; WURZNER, R.; MERI, S. Complement resistance of Streptococci. **Molecular immunology**, v.40, p.95-107, 2003.

JENEY, G.; ANDERSON, D.P. Glucan injection or bath exposure given alone or in combination with a bacterin enhance the non-specific defence mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v.116, p.315-329, 1993.

JENEY, G.; GALEOTTI, M.; VOLPATTI, D.; JENEY, Z.; ANDERSON, D.P. Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. **Aquaculture**, v.154, p.1-15, 1997.

JENKINS, J.A.; KLESZIUS, P.H. Elicitation of macrophages from the peritoneal cavity of channel catfish. **Journal of Aquatic Animal Health**, v.10, p.69-74, 1998.

JOHNSTON JR, R.B. Monocytes and macrophages. **New England Journal of Medicine**, v.318, p747-52, 1988.

JØRGENSEN JB, LUNDE H, ROBERTS B. Peritoneal and head kidney cell response intraperitoneally injected yeast glucan in Atlantic salmon, (*Salmo salar L.*) **Journal of Fish Disease**, v.16, p.313-325, 1993a.

JØRGENSEN JB, SHARP GJE, SECOMBES CJ, Effect of a yeast-cell-wall glucan on the bactericidal activity of rainbow trout macrophages. **Fish and Shellfish Immunology**, v.3, n.4, p.267-277, 1993b.

JØRGENSEN, J.B., ROBERTSEN, B. Yeast  $\beta$ -glucan stimulates respiratory burst activity of Atlantic salmon *Salmo salar L.* macrophages. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 19, p.43–57, 1995.

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

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

KAWAMURA, Y.; HOU, X. G.; SULTANA, F.; MIURA, H.; EZAKI, T. Determination of 16s RNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationship among members of the genus *Streptococcus*. **International Journal Systematic Bacteriology**, v. 45, p.406-408, 1995.

KAWAMURA, Y.; ITOH, Y.; MISHIMA, N.; OHKUSU, K.; KASAI, H.; EZAKI, T. High genetic similarity of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus difficile*: *S. difficile* Eldar et al.; 1995 is a later synonym of *S. agalactiae* Lehmann and Neumann 1896. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, v.55, p.961-965, 2005.

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

KISHIMOTO T. K.; JUTILA M. A.; BERG, E. L.; BUTCHER, E. C. Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. **Science**, v. 245, p.1238-1241, 1989.

KITAO, T., AOKI, T. IWATA, K. Epidemiological study on streptococcosis of cultured yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). Distribution of *Streptococcus* sp. in seawater and muds round yellowtail farms. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, v.45 (5), p. 67-572, 1979.

KITAO, T.; AOKI, T.; SAKOH, R. Epizootic caused by beta-haemolytic *Streptococcus* species in cultured freshwater fish. **Fish Pathology**, v.15, p.301-307, 1981.



KLESIUS, P.H.; SHOEMAKER, C.A.; EVANS, J.J. Efficacy of a killed *Streptococcus iniae* vaccine in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Bulletin European Association of Fish Pathology**, v.19, p.39-41, 1999.

KLESIUS, P.H., C.A. SHOEMAKER, J.J. EVANS. Efficacy of a single and combined *Streptococcus iniae* isolate vaccine administered by intraperitoneal and intramuscular routes in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v.188, p.237-246, 2000.

KOLLAR, R.; STURDIK, E.; SAJBIDOR, J. Complete Fractionation of *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Biotechnology**, v.6, n.3, p.225-237, 1992.

KOLLNER, B.; WASSERRAB, B.; KOTTERBA, G.; FISHER, U. Evaluation of immune functions of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) – how can environmental influences be detected? **Toxicology Letters**, v.131, p.83-95, 2002.

KOLMAN, H.; TERECH-MAJWWASKA, E.; KOLMAN, R.; SZAREK, J.; SWIATECKI, A. The ingestion of *Aeromonas salmonicida* by fish blood phagocytes in vitro under influence of herbicides. **Acta Piscaria**, v.2, p.123-130, 2003.

KRONKA, R.N., ARCADEPANI, D., RAMOS, L.A., et al. Utilização da levedura seca (*Saccharomyces cerevisiae*) de destilarias de álcool de cana-de-açúcar e farelo de arroz na alimentação de suínos nas fases inicial, crescimento e terminação (experimento 2). **Arquivos de Veterinária**, v.7, n.1, p.64-77, 1991.

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

LANCEFIELD, R.C. A serological differentiation of specific types of bovine hemolytic streptococci (Group B). **Journal of Experimental Medicine**, v.59, p.441-458, 1934.

LIN, F.Y.C.; AZIMI, P.H.; WEISMAN, L.E.; PHILIPS III, J.B.; REGAN, J.; CLARK, P.; RHOADS, G.G.; CLEMENS, J.; TROENDLE, J.; PRATT, E.; BRENNER, R.A.; GILL, V. Antibiotic susceptibility profiles for group B streptococci isolated from neonates, 1995-1998. **Clinical Infectious Diseases**, v.31, p.76-79, 2000.

LITMAN, G.W.; ANDERON, M.K.; RAST, J.P. Evolution of antigen binding receptors. **Annual Review of Immunology**, v.17, p.109-147, 1999.

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

MACARTHUR, J.I.; FLETCHER, T.C.; PIRIE, B.J.S.; DAVISON, R.J.L.; THOMSON, A.W. Peritoneal inflammatory cells in plaice, *Pleuronectes platessa* L.: effects of stress and endotoxin. **Journal of Fish Biology**, v.25, p.69-81, 1984.

MARCHLEWICZ B. A.; DUNCAN, J. L. Lysis of erythrocytes by a hemolysin produced by a group B *Streptococcus* sp. **Infect Immun.**, v.34, p.787-794, 1981.

MARTINS, M.L. **Efeito da suplementação com vitamina C sobre a reação inflamatória em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg,1887.** Dissertação (Doutorado em Aqüicultura). CAUNESP-Unesp-2000.

MARTINS, M. L., MORAES, F. R., FUJIMOTO, R. Y., ONAKA, E. M., BOZZO, F. R., MORAES, J. R. E. Carrageenin induced inflammation in *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthues: Characidae) cultured in Brazil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.32, p.31 - 39, 2006.

MATSUYAMA, T.; IIDA, T. Degranulation of eosinophilic granular cells with possible involvement in neutrophil migration to site of inflammation in tilapia. **Developmental and Comparative Immunology**, v.23, n.6, p.451-457, 1999.

MATUSHIMA, E.R.; MARIANO, M. Kinetics of the inflammatory reaction induced by carrageenin in the swimbladder of *Oreochromis niloticus*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.33, n.1, p.5-10, 1996.

MATZUO K, MIYAZONO I. The influence of long-term administration of peptidoglycan on disease resistance and growth of juvenile rainbow trout. **Bulletin of Japanese Society Scientific Fish**, v.59, p.1377- 1379, 1993.

MCNULTY, S. T., KLESIUS P. H., SHOEMAKER, C. A., EVANS, J. J. *Streptococcus Iniae* infection and tissue distribution in hybrid striped bass (*Morone Chrysops* X *Morone Saxatilis*) following inoculation of the gills. **Aquaculture**, v.220, p.165-173, 2003.

MESNIL, F. Sur le mode des resistance des vertebrades inferieures aux invasions microfiennes. **Annales de l' Institut Pasteur**, v.2, p.301-11, 1985.

METCHNIKOFF, E. Lectures on the comparative pathology of inflammation delivered at the Pasteur Institute in 1891. London: Kegan, Paul, Trench, Trübner e Co. 1893.

METCHNIKOFF, E., Immunity in Infective Diseases. Cambridge, University Press. 1905.

MINAMI, T.; NAKAMURA, M.; IKEDA, Y.; OZAKI, H. A beta-hemolytic Streptococcus isolated from cultured yellowtail. **Fish Pathology**, v.14, p.15-19, 1979.

MING-CHEN, T.; CHEN, S. C.; TSAI, S. S. General septicemia of streptococcal infection in cage cultured tilapia in southern Taiwan. **Fisheries Series**, n. 4, Fish Disease Research (VII), 1985.

MISRA, C.K.; DAS, B.K.; MUKHERJEE, S.C.; PATTNAIK, P. Effect of long term administration of dietary  $\beta$ -glucan on immunity, growth and survival of *Labeo rohita* fingerlings. **Aquaculture**, v.255, p.82-94, 2006.

NAKANISH, T.; OTOTAKE, M. Antigen uptake and immune responses after immersion vaccination. In:GUDDING R. et al. **Fish Vaccinology**, p.59-68, 1997.

NAKANISHI T, KIRYU I, OTOTAKE M. Development of a new vaccine delivery method for fish: percutaneous administration by immersion with application of a multiple puncture instrument. **Vaccine**, v.20, p.3764-3769, 2002.

NIKL, L.; ALBRIGHT, L. J.; EVELYN, T. P. T. Influence of seven immunostimulants on the immune response of coho samon to *Aeromonas salmonicida*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.12, p.7-12, 1991.

NIZET V., GIBSON, R.L.; CHI, E. Y.; FRAMSON, P.E.; HULSE, M.; RUBENS, C.;E. Group B streptococcal betahemolysin expression is associated with injury of lung epithelial cells. **Infect Immun** v.64, p.3818-3826, 1996.

NIZET, V.; RUBENS, C. Pathogenic mechanisms and virulence factors of Group B Streptococci. In: GRAM-POSITIVE PATHOGENS, edited by Vincent Fischetti, Richard Novick, Joseph Ferretti, Daniel Portnoy, Julian Rood, American Society for Microbiology, Washington, D.C., 2000. p.125 - 135.

NIZET, V. Streptococcal  $\alpha$ -hemolysins: Genetic and Role in Diseases Pathogenesis. **Trends in Microbiology**, n.10, p.575-580, 2002.

OHNISHI, K.; JO, Y. Studies of streptococcal infection in pond-cultured fishes. I. Characteristics of a beta-hemolytic Streptococcus isolated from cultured ayu and amago in 1977-1978. **Fish Pathology**, v.16, p.63-67, 1981.

ORTUÑO, J.; CUESTA, A.; RODRÍGUEZ, A.; ESTEBAN, M.A.; MESEGUER, J., Oral administration of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the cellular innate immune responses of gilthead seabream (*Spaurus aurata* L.). **Veterinary Immunology and Immunopathology, Amsterdam**, v.85 (1-2). p.41-50, 2002.

PASNIK, D.J.; EVANS, J.J.; PANANGALA, V.S.; KLESIUS, P.H.; SHELBY, R.A.; SHOEMAKER, C.A. Antigenicity of *Streptococcus agalactiae* extracellular products and vaccine efficacy. **Journal of fish diseases**, v.28, p.205-212, 2005.

PASNIK, D.J.; EVANS, J.J.; KLESIUS, P.H. Passive immunization of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) provides significant protection against *Streptococcus agalactiae*. **Fish e Shellfish Immunology**, v.21, p.365-371, 2006.

PASSANTINO, L.; CIANCOTTA, A.; PATRUNO, R.; RIBAUD, M.R.; JIRILLO, E.; PASSANTINO, G.F. Do fish thrombocyte play an immunological role? Their cytoenzymatic profiles and function during an accidental piscine candidiasis in aquarium. **Immunopharmacology Immunotoxicology**, v. 27, p. 345-356, 2005.

PERERA, R. P.; JOHNSON, S. K. *Streptococcus iniae* associated with mortality of *Tilapia nilotica* x *Tilapia aurea* hybrids. **Journal of Aquatic Animal Health**, v.6, p.335-340, 1994.

PERERA, R.P., JOHNSON, S.K.; LEWIS, D.H. Epizootiological aspects of *Streptococcus iniae* affecting tilapia in Texas. **Aquaculture**, v.152, p.25-33, 1997.

PEREZ, A. C. Empreendimentos piscícolas e o médico veterinário. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP, São Paulo**, v.2, n.2, p.43-65, 1999.

PIER, G. B.; MADIN, S. H. *Streptococcus inae* sp. nov. a beta hemolytic streptococcus isolated from a Amazon freshwater dolphin, *Inia geoffrensis*. **International Journal Systematic Bacteriology**, v.26, p.545-553, 1976.

PLUMB, J. A. Infections diseases of tilapia. In: **TILAPIA AQUACULTURE IN THE AMERICAS**, edited by Costa-pierre, B. A. Rakocy, J. E; v.1, World Aquaculture Society, Baton Rouge, L. A, USA, 1997. v.1. p.212-218.

PLUMB, J. A. Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes. **Ames, Iowa: Iowa State University Press**, v.328, p.1-64, 1999.

QUI G. N., TOIDA, T. H. T.; KOSHIISHI, I. Compositional analysis of hyaluronan, chondroitin sulfate and dermatan sulfate: HPLC of disaccharides produced from the glycosaminoglycans by solvolysis. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 44, p.1017-1020, 1996.

RAINARD, P.; SARRADIN, P.; POUTREL, B. Phenotypic variability of X-protein expression by mastitis causing *Streptococcus agalactiae* of serotype NT/X and opsonic activities of specific antibodies. **Microbial Pathogenesis**, v.16, n.5, p.359-372, 1994.

RASHEED, V.; PLUMB, J. A. Pathogenicity of a non-hemolytic group B *Streptococcus* sp. in gulf killifish. **Aquaculture**, v.37, p.97-105, 1984.

RING A., BRAUN, J.S.; NIZET, V.; STREMMEL, W.; SHENEP, J. L. Group B streptococcal beta-hemolysin induces nitric oxide production in murine macrophages. **Journal of Infectious Diseases**, v.182, p.150-157, 2000.

ROBERTS, R. J; SOMMERVILLE, C. Disease of tilapias. In: PULLIN, S. V.; LOWE-MAC CONNEL, R. H. (Eds.) *Biology and Culture of Tilapias*. Manila: International Center for Living Aquatic Resources Management, 1982. p.247-263.

ROBERTSEN B, ROERSTAD G, ENGSTAD RE, Enhancement of non specific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar L.*, by glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. **Journal of Fish Disease**, v.13, p.391-400, 1990.

ROBERTSEN, B.; ENGSTAD, R.; JORGENSEN, J.B.  $\beta$ -glucans as immunostimulants in fish. In: STOLEN, J.; FLETCHER, T.C. (Eds.) *Modulators of fish immune responses*. Fair Haven: SOS Publications, p.83-99, 1994.

RODRÍGUEZ, A.; CUESTA, A.; ORTUÑO, J.; ESTEBAN, M.A.; MESEGUER, J. Immunostimulant properties of a cell wall-modified whole *Saccharomyces cerevisiae* strain administered by diet to seabream (*Sparus aurata L.*). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 96, n.3-4, p.183–192, 2003.

ROMANO LA, MEJÍA J. Infección por *Streptococcus iniae*: Una enfermedad emergente que afecta a peces de cultivo y a humanos. **Revista Aquatic**, n. 18, Enero-Junio, 2003.

ROMERO, R.; GOMEZ-BASUARI, J. Yeast and yeast products, past present and future: from flavors to nutrition and health. Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries. In: PROCEEDINGS OF ALLTECH'S NINETEENTH SYMPOSIUM. England: Nottingham University Press, 2003, p. 365-371.

RØRSTAD, G., AASJORD, P.M., ROBERTSEN, B. Adjuvant effect of a yeast glucan in vaccines against furunculosis in Atlantic salmon *Salmo salar L.* **Fish e Shellfish Immunology**, v.3, p.179–190, 1993.

SAKAI, M.; ATSUTA, S.; KOBAYASHI, M. Protective immune response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, vaccinated with beta-hemolytic streptococcal bacterin. **Fish Pathology**, v.24, p.169-173, 1989.

SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulants. **Aquaculture**, v. 172, n.1-2, p. 63-92, 1999.

SALVADOR, R.; MULLER, E. E.; FREITAS, J. C., LEONHARDT, J. H., PRETTO-GIORDANO, L.G.; DIAS, J. A. Isolation and characterization of group B *Streptococcus* spp from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) breeding in hapas nets and in earth nurseries in the north region of Parana State, Brazil. **Ciência Rural**, v.35, n. 6, p.1374-1378, 2005.

SANO, T.; FUKUDA, H. Principal microbial diseases of marineculture in Japan. **Aquaculture**, v.67, p.59-69, 1987.

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

SCAPINELLO, C.; FARIA, H.G.; FURLAN, A.C.; MICHELAN, A.C. Efeito da utilização de oligossacarídeo manose e acidificantes sobre o desempenho de coelhos em crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia, Viçosa**, v. 30, n. 4, p. 1272-1277, 2001a.

SCAPINELLO, C.; FARIA, H.G.; FURLAN, A.C.; MICHELAN, A.C. Efeito do uso de oligossacarídeo manose e acidificantes em rações com alto teor de amido, para coelhos em crescimento. **Acta Scientiarum, Maringá**, v. 23, n. 4, p. 1039-1043, 2001b.

SCHÜTT, D.A.; LEHMAN, J.; GOERLICH, R.; HAMMERS, R. Haematology of swordtail, *Xiphophorus helleri*. I. blood parameters and light microscopy of blood cells. **Journal of Applied Ichthyology**, v.13, p.83-89, 1997.

SECOMBES, C. J.; WANG, T.; HONG, S.; PEDDIE, S.; CRAMPE, M.; LAING, K.J. Cytokines and innate immunity of fish. **Developmental and comparative immunology**, v.25, p.713 – 723, 2001.

SGARBIERI, V.C.; ALVIM, I.D.; VILELA, I.S.D.; BALDINI, V.L.S.; BRAGAGNOLO, N. Produção piloto de derivados de levedura (*Saccharomyces* sp.) para uso como ingrediente na formulação de alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology, Campinas** v. 2, n. 1-2, p. 119-125, 1999.

SHELBY, R.A., KLESIUS, P.H., SHOEMAKER, C.A., EVANS, J.J. Passive immunization of tilapia, *Oreochromis niloticus* LL., with anti-*Streptococcus iniae* whole sera. **Journal of Fish Disease**, v.25, p.1-6, 2000.

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

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

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

SHOEMAKER, C.A.; VANDENBERG, G.W.; DESORMEAUX, A.; KLESIUS, P.H.; EVANS, J.J. Efficacy of a *Streptococcus iniae* modified bacterin delivered using Oralject™ technology in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v.255, p.151-156, 2006.

SHOTTMULLER, H. Die Artunterscheidung der für den menschen pathogen streptokokken durch Blutagar. Munch. **Med. Wochenschr**, v.50, p.849-853, 1903.

SIWICKI, A.K.; ANDERSON, D. P. ; RUMSEY, G. L. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. **Veterinary Immunology and immunopathology**, v. 41, p. 123-139, 1994.

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



SLIERENDRECHT, W.J. LORENZEN, N., SONG, Y.-L., HSIEH, Y.-T. Immunostimulation of tiger shrimp *Penaeus monodon*. hemocytes for generation of microbicidal substances: analysis of reactive oxygen species. **Development in Comparative Immunology**, v.18, p.201–209, 1995.

STÁLHAMMAR-CARLEMALM, M.; STENBERG, L.; LINDAHL, G. Ptrotein Rib: A novel group B Streptococcal cell surface protein that confers protective immunity and is expressed by most strains causing invasive infections. **Journal of Experimental Medicine**, v.177, p.1593-1603, 1993.

SONG, Y.L.; HSIEH, Y.T. Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: analysis of reactive oxygen species. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 18, p. 201–209. 1994.

SOUZA, G.E.P.; CUNHA, F.Q.; MELLO, R.; FERREIRA, S.H. Neutrophil migration induced by inflammatory stimuli is reduced by macrophage depletion. **Agents and Actions**, v. 24, p. 97-103, 1988.

SURESH, A. V. Tilapia Update 1998. **World Aquaculture**, v.30, n.4, p.8-68. 1998.

SUZUKI, K. Morphological and phagocytic characteristics of peritoneal exudate cells in tilapia, *Oreochromis niloticus* (Trewavas), and carp, *Cyprinus carpio* L. **Journal of Fish Biology**, v. 29, p. 349-364, 1986.

TAPSALL J. W.; PHILLIPS, E. A. The hemolytic and cytolytic activity of group B streptococcal hemolysin and its possible role in early onset group B streptococcal disease. **Pathology**, v.23, p.139-144, 1991.

TAVARES-DIAS, M. A morphological and cytochemical study of erythrocytes, thrombocytes and leukocytes in four freshwater teleosts. **Journal of Fish Biology**, v.68, p.1822-1833, 2006.

TAVARES-DIAS, M.; ONO, E.A.; PILARSKI, F.; MORAES, F. R. Can thrombocytes participate in the removal of cellular debris in the blood circulation of teleost fish? A cytochemical study and ultrastructural analysis. **Journal of Applied Ichthyology**, 2007.

THOMPSON, K.D., CACHOS, A., INGLIS, V. Immunomodulating effects of glucans and oxytetracycline in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, on serum lysozyme and protection. In: SHARIFF, M., SUBASIGHE, R.P., ARTHUR, J.R. EDS., Diseases in Asian Aquaculture, v. 11. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, p. 433–439. 1995.

UGAJIN, M. Studies on *Streptococcus* sp as a causative agent of an epizootic among the cultured ayu (*Plecoglossus altivelis*) in Tochigi Prefecture, Japan, 1980. **Fish Pathology**, v.16, p.119-127, 1981.

VANDAMME, P.; DEVRIESE, L.A.; POT, B.; KERSTERS, K.; MELIN, P. *Streptococcus difficile* is a nonhemolytic Group B, tipe Ib Streptococcus. **International Journal Systematic Bacteriology**, v.47, n.1, p.81-85, 1997.

VERLHAC, V., GABAUDAN, J., OBACH, A., SCHU"EP, W., HOLE, R. Influence of dietary glucan and vitamin C on non-specific and specific immune responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v.143, p.123–133, 1996.

VOLPATTI, D.; D'ANGELO, L.; JENEY, G.; JENEY, Z.; ANDERSON, D.P.; GALEOTTI, M. Non specific immune response in fish fed glucan diets prior to induced transportation stress. **Journal of Applied Ichthyology**, v.14, p.201-206, 1998.

VON HUNOLSTEIN, C.; D' ASCENSI, S.; WAGNER, B. Immunochemistry of capsular type polysaccharide and virulence properties of type VI *Streptococcus agalactiae* (group B streptococci). **Infect immune**, v. 61, p. 1272-1280, 1993.

YANO, T. The nonspecific immune system humoral defense. **Physiology Review**, v.56, p.778-789, 1996.

YOSHIDA T, KRUGER R, INGLIS V. Augmentation of non-specific protection in African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell), by the long-term oral administration of immunostimulants. **Journal of Fish Disease**, v.18, p.195-198, 1995.

WEINREB, E.L. Studies on the histology and histopathology of the rainbow trout, *Salmo gairdneri irideus*. I. Hematology: Under normal and experimental conditions of inflammation. **Zoologica**, v. 43, p.145-154, 1958.

WHITE, A.; FLETCHER, T.; PEPYS, M; BALDO, B. The effect of inflammatory agents on C reactive protein and serum amyloid P component levels in plaice (*Pleuronectes platessa L.*) serum. **Comparative biochemistry and physiology**, v.69, p.325-329, 1981.

WHITTINGTON, R.; LIM, C.; KLESIUS, P.H. Effect of dietary  $\beta$ - glucan levels on the growth response and efficacy of *Streptococcus iniae* vaccine in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, v.248, p.217-225, 2005.

WU, S. Y. New bacterial disease of tilapia. **Fish Culture Bulletin**, v.23, p.3-40. 1970.

ZINKL, J.G.; COX, W.T.; KONO, C.S. Morphology and cytochemistry of leucocytes and thrombocytes of six species of fish. **Comparative Haematology International**, v.1; p. 187-195, 1991.

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

## **CAPÍTULO II**

**DESEMPENHO PRODUTIVO E PARÂMETROS  
FISIOPATOLÓGICOS DE TILÁPIA DO NILO VACINADAS COM  
*Streptococcus agalactiae* E SUBMETIDAS À SUPLEMENTAÇÃO  
ALIMENTAR COM *Saccharomyces cerevisiae*.**

**DESEMPENHO PRODUTIVO E PARÂMETROS  
FISIOPATOLÓGICOS DE TILÁPIA DO NILO VACINADAS COM  
*Streptococcus agalactiae* E SUBMETIDAS À SUPLEMENTAÇÃO  
ALIMENTAR COM *Saccharomyces cerevisiae***

**Resumo:** O presente trabalho teve por objetivos avaliar a inter-relação entre a suplementação alimentar com 0,3% de parede celular de levedura e vacinação com extrato oleoso de *Streptococcus agalactiae* sobre o ganho de peso, taxa de crescimento específico, fator de condição, parâmetros hematológicos e concentração de proteína plasmática total de tilápia do Nilo. Oitenta e quatro tilápias com peso médio inicial de  $125,0 \pm 1,5$ g foram distribuídas em 12 caixas de fibra, com capacidade para 310L de água, seguindo o esquema fatorial 2x2x3, correspondente a dois níveis de parede celular de levedura (0,0 e 0,3% parede celular), dois tratamentos (solução salina e vacina) e três coletas após o desafio com a bactéria viva (seis, 24 e 48h) com sete repetições. Os peixes foram alimentados durante 77 dias. A vacinação dos peixes foi realizada 60 dias após o início da alimentação, por meio da inoculação intraperitoneal de 0,5 mL da vacina contendo  $10^8$  UFC/mL. Após 15 dias da vacinação, todos os peixes foram submetidos ao desafio com cepa viva de *Streptococcus agalactiae*, por meio da inoculação intraperitoneal de  $10^8$  UFC/mL, veiculadas em 0,5 mL de solução salina (0,85%). As maiores médias de ganho de peso ocorreram nos peixes alimentados com dieta contendo levedura ou vacinados. Nestes, ocorreu aumento significativo do hematócrito, do volume corpuscular médio e das proteínas plasmáticas totais. A interação entre os efeitos dieta e vacinação determinou aumento no número de eritrócitos e leucócitos. Na contagem diferencial de leucócitos, os peixes alimentados com dietas contendo levedura apresentaram linfocitose e neutrofilia, enquanto que os vacinados, linfócitose, neutrofilia e monocitose. A suplementação com parede celular de levedura associada à vacinação não influenciou o desempenho produtivo da tilápia do Nilo, embora tenha sido importante por incrementar a hematopoiese e leucopoiese.

**Palavras Chave:** *Saccharomyces cerevisiae*, *Streptococcus agalactiae*, tilápia do Nilo, desempenho produtivo, parâmetros fisiopatológicos

**GROWTH PERFORMANCE AND PHISIOPATHOLOGICAL  
PARAMETERS OF NILE TILAPIA VACCINATED WITH  
*Streptococcus agalactiae* AND DIETS SUPPLEMENTED WITH  
*Saccharomyces cerevisiae***

This work evaluate the effects of supplementation diets with 0,3% of cellular wall of yeast and vaccination with oily extract of *Streptococcus agalactiae* on the individual weight gain, specific growth rate, condition factor, survival, hemathological parameters and concentration of total plasmatic protein of Nile tilapia. Eighty four fish with initial average weight of 125,0 + 1,5g were distributed in 12 fiber aquaria, with capacity for 310L of water, following the factorial design 2x2x3, corresponding to two levels of cellular wall of yeast (0,0 and 0,3% cellular wall), two treatments (saline solution and vaccine) and three collections after challenge with the bacteria (six, 24 and 48h) with seven replicates. Fish were fed during 77 days. The vaccination of fish was done 60 days after the beginning of feeding, through intraperitoneal inoculation of 0,5 mL of the vaccine containing  $10^8$  UFC/mL. After 15 days of vaccination, all fish were challenged with *Streptococcus agalactiae*, through the intraperitoneal inoculation of  $10^8$  UFC/mL, diluted in 0,5 mL of saline solution (0,85%). The largest averages of weight gain were observed in fish fed diet containing yeast or vaccinated. The vaccination enhanced significant hematocrit levels increase and also higher increments in the corpuscular volume and total plasmatic protein. The interaction between the effects diet and vaccination determined increase in the erythrocytes number and leucocytes number. In the differential countis of leucocytes, fish fed with diets containing yeast showed increments of lymphocyte and neutrophils, while the vaccinated ones, showed increments of lymphocyte, neutrophils and decrease of macrophages number. The supplementation diets with 0,3% of cellular wall of yeast associated to the vaccination do not influence the growth performance of Nile tilapia, although it is important to increase fish hematopoiesis and leucopoiesis.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, *Streptococcus agalactiae*, Nile tilapia, growth performance, phisiopathological parameters

## Introdução

A septicemia por *Streptococcus* sp. é enfermidade grave na criação de tilápia (SURESH, 1998) e as principais espécies envolvidas são *Streptococcus iniae* e o *S. agalactiae* (EVANS et al., 2002; SHELBY et al., 2002). Este último foi isolado de tilápia do Nilo criadas em sistemas intensivos no Paraná, Brasil, sugerindo seu envolvimento em perdas na tilapicultura brasileira (SALVADOR et al., 2005).

O controle de infecções com antibióticos é pouco eficiente e favorece a seleção de microrganismos resistentes, com a possibilidade de transferência de genes de resistência às bactérias nunca expostas ao antibiótico (VERSCHUERE et al., 2000).

Alternativas ao uso de antibióticos têm sido propostas com sucesso na aquicultura, entre elas, o uso de alimentos funcionais e vacina (GILDBERG et al., 1997; GRAM et al., 1999; NIKOSKELAINEN et al., 2001).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* destaca-se na composição de dietas animais (WATANABE, 2006), pois melhora a resposta imune e o crescimento de várias espécies de peixes (SPRING, 2000). CARVALHO et al. (2002) verificaram que o uso da *S. cerevisiae* íntegra e seus derivados

autolisado ou parede celular em dietas para tilápia do Nilo favorecem o ganho de peso, consumo de ração e taxa de crescimento específico.

LI e GATLIN III (2003) verificaram efeitos positivos da adição de 1,0 a 2,0% de levedura autolisada sobre o crescimento, resposta imune e resistência do “striped bass” (*Morone saxatilis*) à infecção por *Streptococcus iniae*. A resposta imune melhorou com tendência de aumento na atividade de macrófagos, resultando em maior sobrevivência (73,0 – 90,0%), em relação ao grupo controle (53,3%).

Tilápia do Nilo vacinadas contra *S. agalactiae* e desafiadas após 30 dias com cepa homóloga, apresentaram 15% de mortalidade contra 70% do grupo controle após 14 dias (EVANS et al., 2004).

Considerando o exposto acima, este trabalho teve como objetivos avaliar o desempenho produtivo e os parâmetros hematológicos de tilápia do Nilo submetidas à dieta contendo 0,3% de parede celular de levedura, vacinadas e desafiadas com cepa homóloga de *Streptococcus agalactiae*.

## **Material e Métodos**

### **Local e Acondicionamento dos peixes**

O experimento foi conduzido na Universidade Estadual Paulista – Unesp, Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos (Lapoa) do Centro de Aqüicultura da Unesp (Caunesp), Jaboticabal, SP. Oitenta e



quatro tilápia com peso médio inicial de  $125,0 \pm 1,5\text{g}$  foram distribuídas em caixas de fibra de 310 L, abastecidas com água de poço artesiano, vazão de 1L/min e aeração contínua. Diariamente, a temperatura ( $28,0 \pm 1,7^\circ\text{C}$ ) da água foi aferida e, semanalmente, o potencial hidrogeniônico ( $7,3 \pm 0,3$ ) e o oxigênio dissolvido ( $5,54 \pm 0,82\text{mg/L}$ ), permanecendo dentro dos valores recomendados para o bem estar (SIPAÚBA-TAVARES, 1994). Em dias alternados, foi realizada a limpeza das caixas por meio de sifonagens.

### **Grupos**

Para a constituição dos grupos, foram utilizadas 12 caixas de fibra, sendo três por tratamento ( $n=7$ ). O grupo 1 (G1) recebeu ração básica não suplementada com ingrediente teste (controle) e foi vacinado; grupo 2 (G2), dieta controle e não vacinado; grupo 3 (G3) ração suplementada com 0,3% de parede celular e não vacinado e grupo 4 (G4) ração suplementada com 0,3% de parede celular e vacinado.

Cada caixa dos grupos de tratamento representou o tempo de avaliação das variáveis estudadas após seis, 24 e 48 horas o desafio.

### **Confecção e formulação das rações e manejo alimentar**

As dietas foram confeccionadas no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos – AquaNutri, da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Câmpus de Botucatu.

As rações foram formuladas conforme o NRC (1993), sendo isoprotéicas (32,0% PD), isoenergéticas (3200 kcal de ED/kg), isofosfóricas (0,6 Pdisp.) e com mesmo nível de fibra bruta (5,0%) (BACCARIN e PEZZATO, 2001). O percentual de ingredientes e a composição químico-bromatológica das dietas estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Composição percentual e químico-bromatológica das dietas experimentais.

<b>INGREDIENTES</b>	<b>%</b>
Farelo de Soja	45,00
Glúten de milho	9,50
Farinha de Peixe	5,50
Fubá Milho	15,00
Farelo Trigo	8,00
Quirera Arroz	7,60
Alginato	0,30
Celulose	1,84
DL - Metionina	0,45
Treonina	0,40
Óleo de soja	0,50
Fosfato Bicalcico	3,00
Calcáreo	2,00
Vit. C <sup>1</sup>	0,08
Sal Comum	0,10
Suplemento vitam/min <sup>2</sup>	0,4
BHT <sup>3</sup>	0,02
Levedura autolisada <sup>4</sup>	0,30
Energia digestível (Kcal/kg)	3240,00
Proteína digestível (%)	28,00
Fibra Bruta (%)	5,00
Extrato Etéreo (%)	3,00
Relação Ca: P	2,95

<sup>1</sup> Vitamina C 35,0% ativa<sup>2</sup> Suplemento vitamínico e mineral (Supremais)/ kg de ração: vitA 1200000 UI; vitD3 200000 UI; vitE 12000 mg; vitK3 2400 mg; vitB1 4800 mg; vitB2 4800 mg; vitB6 48000 mg; B12 4800 mg; ác. fólico 1200 mg; ác. pantotênico 12000 mg; vitC 56 mg; biotina 48 mg; colina 65 mg; niacina 24000 mg; Fe 10000 mg; Cu 600 mg; Mn 4000 mg; Zn 6000 mg; I 20 mg; Co 2 mg e Se 20 mg.<sup>3</sup> Antioxidante ( $\beta$ -hidroxi-tolueno)<sup>4</sup> Ausente na ração controle

Os ingredientes foram moídos e homogeneizados em misturador automático. Essa mistura foi submetida ao processo de peletização. As dietas foram secas em estufa de circulação de ar forçada a 55,0°C, durante 24 horas. Os peletes foram fracionados em diâmetros compatíveis com o tamanho dos peixes e armazenados a 20,0°C negativos. Os peixes foram alimentados *ad libitum*, três vezes ao dia (9h00, 14h00 e 18h00), com fornecimento de 3,0% da biomassa, durante os 77 dias.

### **Padronização do inóculo vacinal e desafio**

Amostras de *Streptococcus agalactiae* foram isoladas de tilápias infectadas naturalmente com sinais de meningoencefalite e identificadas segundo as características culturais, morfológicas, tintoriais e bioquímicas (VANDAMME et al., 1997; SALVADOR et al., 2005).

Para a determinação da concentração bacteriana letal para 50,0% dos peixes (CL<sub>50</sub>) e determinação do inóculo do desafio, foram utilizadas três caixas de fibra, contendo 10 peixes em cada, com peso médio inicial de 120,0 ± 0,5g. Os peixes das caixas 1, 2 e 3 foram inoculados com as concentrações 10<sup>4</sup>; 10<sup>6</sup> e 10<sup>8</sup> UFC/mL de *S. agalactiae*, respectivamente. Após 15 dias os resultados da mortalidade diária foram submetidos à análise estatística pelo programa estatístico Spearman-Kärber, e a CL<sub>50</sub> determinada foi de 10<sup>8</sup> UFC/mL.

Para a confecção da vacina, o microrganismo foi semeado em 500 mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion – DIFCO®). Após cinco dias de incubação a 29,0°C, em aerofilia, o meio foi centrifugado à 4000G (4,0°C), durante 20 minutos. O sobrenadante foi desprezado, a massa bacteriana foi ressuspendida em 500 mL de PBS (tampão fosfato) e novamente centrifugada. Repetiu-se essa operação por mais três vezes.

A massa bacteriana foi diluída em 100 mL de PBS de modo a conter  $10^8$  UFC/mL, correspondente ao grau oito da escala de MacFarland. A solução foi incubada em banho-maria, por 30 minutos, a 40,0°C. Para a confirmação da inativação do microrganismo, realizou-se a semeadura em meio BHI, incubado à 29,0°C, por sete dias. Em ausência de crescimento bacteriano, o adjuvante incompleto de Freund, na diluição 1:1 foi incorporado à vacina e emulsionada em misturador elétrico. Com a solução mantida em gelo, realizou-se o teste de emulação e preparação das doses. Aliquotas de 0,5 mL foram transferidas para seringas de 1,0 mL e mantidas em gelo até o momento da vacinação.

A vacinação (G1 e G4) foi realizada 60 dias após o início da alimentação dos peixes. Para isso, 0,5 mL da solução oleosa de *S. agalactiae*, contendo  $10^8$  UFC, foi inoculada intraperitonealmente (i.p.). Nos peixes não vacinados (G2 e G3), 0,5 ml de solução salina foi injetado i.p. Após 15 dias, todos os peixes foram desafiados com cepa homóloga de

*S. agalactiae*, por inoculação i.p.  $10^8$  UFC, veiculadas em 0,5 mL de solução salina (0,85%).

### **Avaliações biométricas**

Os peixes que vieram a óbito durante o período de observação foram encaminhados para tentativa de reisolamento do *S. agalactiae*. Foram coletadas assepticamente amostras de rim e encéfalo. A semeadura foi realizada em placas contendo ágar Columbia (DIFCO<sup>®</sup>), suplementado com 1,0% de extrato de levedura (BUNCH e BEJERANO, 1997) e 5,0% de sangue de ovino desfibrinado, incubadas a 29,0°C, em aerofilia por cinco dias. A identificação dos microrganismos foi efetuada segundo as características culturais, morfológicas, tintoriais e bioquímicas (HARMON et al., 1990; KRIEG e HOLT, 1984).

Seis, 24 e 48 horas após o desafio, foi realizada a biometria dos peixes. Para tal utilizou-se balança digital com sensibilidade mínima de 0,01 g e máxima de 1000g. De posse destes dados, determinou-se:

1) Ganho de peso (GP):  $\text{Peso final} - \text{Peso inicial}$

2) Taxa de crescimento específico (TCE):

$$100 \times (\text{In peso final} - \text{In peso inicial}) / \text{dias de experimento.}$$

3) Fator de condição (K):  $[\text{Peso} / (\text{Comprimento})^3] \times 100$

### **Análises de parâmetros hematológicos e bioquímicos**

Alíquotas de sangue foram colhidas por punção do vaso caudal para a confecção de extensões coradas pancromicamente com May-Grünwald-Giemsa-Wright (TAVARES DIAS e MORAES, 2003). A contagem de eritrócitos, a taxa de hemoglobina e os índices hematimétricos foram determinados em contador automático de células sanguíneas (Modelo CC510, Celm<sup>®</sup>). Sob microscopia de luz os leucócitos totais e trombócitos foram quantificados indiretamente nas extensões contando-se o número destas células para cada 2000 células. Para a contagem diferencial de leucócitos, nas mesmas extensões foram contadas até 200 células. Proteínas totais foram determinadas pelo método colorimétrico a partir do plasma (Sistema de Proteínas Totais - Labtest<sup>®</sup>).

### **Distribuição dos grupos e análise estatística**

Os dados foram analisados pelo teste F, segundo PIMENTEL GOMES (2000) e BARBIN (2003), ao nível de 5,0% de probabilidade. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), no esquema fatorial 2x2x3, correspondente a dois níveis de parede celular de levedura (0,0 e 0,3% parede celular), dois tratamentos (solução salina e vacina oleosa de *S. agalactae*) e três coletas após o desafio com *S. agalactie* (6h, 24h e 48h), com sete repetições.

## **Resultados**

Pela análise da Tabela 2 observa-se que as maiores médias de ganho de peso ocorreram nos peixes submetidos à dieta com levedura ou vacinados. Nos alimentados com a dieta suplementada, a média foi significativamente maior em relação aos que receberam a dieta controle.

As médias da taxa de crescimento específico (TCE) apresentaram diferenças significativas no efeito dieta, sendo maior nos peixes alimentados com dieta suplementada. O comprimento final e o fator de condição não sofreram interferência significativa dos efeitos dieta, vacinação ou tempo.



Tabela 02. Médias de ganho de peso, comprimento final, fator de condição e taxa de crescimento específico (TCE) de tilápia do Nilo, submetidas à suplementação dietética com 0,3% de parede celular de levedura e vacinadas contra *Streptococcus agalactiae*.

Tratamentos	Ganho de Peso (g)	Comprimento Final (cm)	Fator de Condição	TCE
Com Levedura	142,83 a	26,71	37,04	190,44 a
Sem Levedura	129,09 b	26,05	33,70	172,12 b
Com Vacina	137,70	26,17	31,35	183,59
Sem Vacina	136,99	26,70	29,70	182,66
6 horas	139,57	26,82	30,92	186,10
24 horas	135,20	25,67	30,92	180,27
48 horas	137,23	26,82	29,70	182,98
<b>F para:</b>				
Levedura (L)	21,0472 *	0,6926 ns	5,0104 ns	21,0472 *
Vacina (V)	0,0573 ns	0,4571 ns	0,0126 ns	0,0573 ns
Tempo (T)	0,7280 ns	0,9633 ns	0,0031 ns	0,7280 ns
L X V	0,0534 ns	1,7361 ns	0,0786 ns	0,0534 ns
L X T	0,3505 ns	1,0847 ns	0,0188 ns	0,3505 ns
V X T	0,9065 ns	1,3277 ns	0,0036 ns	0,9065 ns
L X V X T	0,3060 ns	2,9736 ns	0,0277 ns	0,3060 ns
C.V. (%)	8,94	12,30	20,20	8,94

Para cada variável aferida, em cada fator de variação, médias seguidas de letras distintas diferem entre si (P<0,05).

Com relação à avaliação hematológica e concentração de proteína plasmática total (PPT), as tabelas seguintes trazem os resultados das análises estatísticas com os desdobramentos que se fizeram necessários em função da significância ou não das interações, para as variáveis estudadas.

O número de eritrócitos, hematócrito (Htc), volume corpuscular médio (VCM) e taxa de hemoglobina (Hb) apresentaram diferença significativa entre os efeitos dieta ou vacinação. Os peixes alimentados

com dietas suplementadas com levedura ou vacinados apresentaram médias significativamente maiores de número de eritrócitos, Hct e Hb. A maior média de VCM ocorreu nos vacinados (Tabela 3).

Tabela 3. Médias do número de eritrócitos, hematócrito (Hct), taxa de hemoglobina (Hb), volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) de tilápia do Nilo, submetidas à suplementação dietética com 0,3% de parede celular de levedura (PCL) e vacinadas contra *Streptococcus agalactiae*.

Tratamentos	Variáveis				
	Número de Eritrócitos ( $10^6/\text{mm}^3$ )	Hct (%)	Hb (g / dL)	VCM (fL)	CHCM (%)
0,3 % PCL	2,04 a	36,80 a	11,92 a	162,95 a	32,76
0,0% PCL	1,96 b	35,08 b	11,31 b	169,91 b	33,54
Com Vacina	2,04 a	37,56 a	12,01 a	168,57 a	32,62
Sem Vacina	1,98 b	34,75 b	11,36 b	163,08 b	33,50
6 horas	2,04	34,47 a	11,44 a	173,29 a	34,41 a
24 horas	2,00	36,00 b	11,68 ab	149,22 b	32,76 b
48 horas	1,99	37,80 c	11,90 b	174,32 a	32,09 c
<b>F para:</b>					
Levedura (L)	5,65 *	8,71 *	17,50 *	23,16 *	1,19 ns
Vacina (V)	4,52 *	24,46 *	20,45 *	14,79 *	1,59 ns
Tempo (T)	0,95 ns	11,49 *	3,44 *	132,93 *	3,94 *
L X V	4,32 *	223,89 *	1,25 ns	54,40 *	11,69 ns
L X T	6,94 *	10,92 *	2,15 ns	62,11 *	1,93 ns
V X T	5,09 *	6,83 *	17,50 *	73,06 *	2,07 ns
CV	6,28	6,60	5,15	3,58	8,8

Para cada variável aferida, em cada fator de variação, médias seguidas de letras distintas diferem entre si, no nível de 5% de probabilidade

A interação dieta x vacinação provocou diferenças significativas nos valores do número de eritrócitos (Tabela 4). Os peixes alimentados com dietas suplementadas e vacinados apresentaram maior número. Entre os alimentados com ração controle a vacinação não influenciou os valores.

Durante as coletas (Tabela 5) o número de eritrócitos aumentou nos peixes alimentados com dietas suplementadas ou vacinados. Nestes casos, ocorreu discreta diminuição na segunda coleta (24h), seguida por aumento acentuado na terceira coleta (48h). Nos alimentados com ração controle ou não vacinados, ocorreu significativa diminuição ao longo do tempo.

Tabela 4. Efeito da interação entre os níveis de parede celular de levedura e vacinação sobre o número de eritrócitos de tilápia do Nilo.

<b>Número de Eritrócitos (<math>10^6/\text{mm}^3</math>)</b>	Com Vacina	Sem Vacina
0,3 % parede celular de levedura	2,09 Aa	1,98 b
0,0% parede celular de levedura	1,95 B	1,97

Médias seguidas de letras distintas, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, diferem no nível de 5%

Tabela 5. Efeito da interação entre tempo e níveis de parede celular de levedura ou vacinação sobre o número de eritrócitos de tilápia do Nilo.

<b>Número de Eritrócitos (<math>10^6/\text{mm}^3</math>)</b>	6 horas	24 horas	48 horas
0,3 % parede celular de levedura	2,03	1,99	2,09 A
0,0% parede celular de levedura	2,05 a	2,00 a	1,86 Bb
Com Vacinação	2,02	2,01	2,09 A
Sem Vacinação	2,05 a	1,98 b	1,89 Bc

Para cada fator, médias seguidas de letras distintas, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, diferem no nível de 5%

Na interação dieta x vacinação (Tabela 6), a maior média de Hct ocorreu nos peixes alimentados com ração controle e vacinados. Entre os suplementados, a média do Hct foi significativamente maior nos não vacinados. Nos alimentados com ração controle e vacinados, houve aumento significativo em relação aos não vacinados.

No decorrer das coletas (Tabela 7), a utilização de dietas suplementadas ou a vacinação determinaram aumento significativo nos valores do Hct. Considerando o efeito dieta, as diferenças ocorreram a partir da segunda coleta (24h). Com relação ao efeito vacinação, a diferença foi significativa somente na terceira coleta (48h).

Tabela 6. Efeito da interação entre os níveis de parede celular de levedura e vacinação sobre o valor do hematócrito de tilápia do Nilo.

<b>Hematócrito (%)</b>	Com Vacina	Sem Vacina
0,3 % parede celular de levedura	34,70 Aa	38,90 Ab
0,0% parede celular de levedura	42,19 Ba	28,93 Bb

Médias seguidas de letras distintas, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, diferem no nível de 5%

Tabela 7. Efeito da interação entre tempo e os níveis de parede celular de levedura ou vacinação sobre o valor do hematócrito de tilápia do Nilo.

<b>Hematócrito (%)</b>	6 horas	24 horas	48 horas
0,3 % parede celular de levedura	33,75 a	36,93 Ab	39,72 Ac
0,0% parede celular de levedura	35,60	34,54 B	35,12 B
Com Vacinação	35,48 a	36,30 b	40,64 Ac
Sem Vacinação	35,55	35,72	34,96 B

Para cada fator, médias seguidas de letras distintas, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, diferem no nível de 5%

A interação vacinação x tempo interferiu significativamente na taxa de Hb (Tabela 8). Os peixes vacinados apresentaram aumento significativo em relação aos não vacinados, em que ocorreu diminuição destes valores. As diferenças na taxa de Hb dos peixes vacinados e não vacinados foram significativas, a partir da segunda coleta (24h) e acentuaram-se na terceira (48h).

Tabela 8. Efeito da interação entre os níveis de vacinação e tempo sobre o valor da taxa de hemoglobina de tilápia do Nilo.

<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	6 horas	24 horas	48 horas
Com Vacinação	11,24 a	11,98 Ab	12,75 Ac
Sem Vacinação	11,63	11,40 B	11,05 B

Médias seguidas de letras distintas, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, diferem no nível de 5%

A interação dieta x vacinação determinou diferença significativa nos valores de VCM (Tabela 9). A vacinação interferiu nos valores desta variável entre os peixes que receberam a dieta controle, sendo maior nos peixes não vacinados (179,76).

Os efeitos dieta e vacinação sofreram interferência significativa do tempo e apresentaram comportamentos semelhantes (Tabela 10). A utilização da suplementação ou vacinação determinou diminuição no valor desta variável, observada na segunda coleta (24h). Os peixes alimentados

com ração controle ou não vacinados, apresentaram aumento na terceira coleta (48h).

Os valores de VCM ao longo das coletas apresentaram diferenças significativas nos efeitos dieta ou vacinação durante a primeira (6h) e segunda coletas (24h). Na primeira, os maiores valores ocorreram nos peixes alimentados com dietas suplementadas e nos vacinados. Na segunda coleta, os maiores valores ocorreram nos peixes alimentados com ração controle e não vacinados.

Tabela 9. Efeito da interação entre os níveis de parede celular de levedura e vacinação sobre o valor do volume corpuscular médio de tilápia do Nilo.

<b>Volume Corpuscular Médio (fL)</b>	Com Vacina	Sem Vacina
0,3 % parede celular de levedura	164,59 A	161,30
0,0% parede celular de levedura	161,37 Ba	179,76 b

Médias seguidas de letras distintas, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, diferem no nível de 5%

Tabela 10. Efeito da interação entre tempo e os níveis de parede celular de levedura ou vacinação sobre o valor do volume corpuscular médio de tilápia do Nilo.

<b>Volume Corpuscular Médio (fL)</b>	6 horas	24 horas	48 horas
0,3 % parede celular de levedura	178,12 Aa	138,35 Ab	172,37 c
0,0% parede celular de levedura	165,77 Ba	166,12 Bb	177,05 c
Com Vacinação	188,11 Aa	142,25 Ab	174,69 c
Sem Vacinação	159,7 Ba	159,80 Bb	173,95 c

Para cada fator, médias seguidas de letras distintas, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, diferem no nível de 5%

O número de leucócitos totais, trombócitos e PPT total podem ser observados na Tabela 11.

Tabela 11. Médias de leucócitos totais, trombócitos e concentração de proteína plasmática total (PPT) de tilápia do Nilo, submetidas à suplementação dietética com 0,3% de parede celular de levedura e vacinadas contra *Streptococcus agalactiae*.

Tratamentos	Variáveis		
	Leucócitos totais ( $10^6/\text{mm}^3$ )	Trombócitos ( $10^6/\text{mm}^3$ )	PPT (g/dL)
0,3 % parede celular	0,21 a	0,028 a	4,94
0,0% parede celular	0,13 b	0,026 b	4,90
Com Vacina	0,20 a	0,027 a	4,99
Sem Vacina	0,15 b	0,025 b	4,87
6 horas	0,14 a	0,027	4,71 a
24 horas	0,21 b	0,027	5,04 b
48 horas	0,18 c	0,027	5,06 c
<b>F para:</b>			
Levedura (L)	99,29 *	16,50 *	0,18 ns
Vacina (V)	40,58 *	7,49 *	1,58 ns
Tempo (T)	35,05 *	0,88 ns	5,04 *
L X V	72,31 *	-0,75 ns	13,27 *
L X T	32,51 *	10,13 *	4,11 *
V X T	18,08 *	2,92 ns	5,37 *
CV	16,27	6,43	7,92

Para cada variável aferida, em cada fator de variação, médias seguidas de letras distintas diferem entre si, no nível de 5% de probabilidade

O maior número de leucócitos totais ocorreu nos peixes alimentados com dietas suplementadas com levedura e vacinados. O menor ocorreu nos

peixes com dieta controle e não vacinados (Tabela 12). Entre os peixes alimentados com dietas suplementadas, a vacinação não provocou diferenças significativas. Entre os peixes alimentados com ração controle, o número de leucócitos totais foi significativamente maior nos peixes vacinados em comparação aos não vacinados.

No decorrer das coletas, o comportamento desta variável foi semelhante entre os peixes alimentados com dietas suplementadas ou vacinados. Nestes, ocorreu expressivo aumento na segunda (24h), e redução na terceira coleta (48h). Nos alimentados com ração controle houve redução na terceira coleta (48h). Nos não vacinados ocorreu aumento na segunda coleta, e manutenção destes valores (Tabela 13).

Tabela 12. Efeito da interação entre os níveis de parede celular de levedura e vacinação sobre o valor de leucócitos totais de tilápia do Nilo.

<b>Leucócitos totais (<math>10^6/\text{mm}^3</math>)</b>	Com Vacina	Sem Vacina
0,3 % parede celular de levedura	0,21	0,20 A
0,0% parede celular de levedura	0,20 a	0,08 Bb

Médias seguidas de letras distintas, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, diferem no nível de 5%

Tabela 13. Efeito da interação entre tempo e os níveis de parede celular de levedura ou vacinação sobre o valor de leucócitos totais de tilápia do Nilo.

<b>Leucócitos totais (<math>10^6/\text{mm}^3</math>)</b>	6 horas	24 horas	48 horas
0,3 % parede celular de levedura	0,13 a	0,25 Ab	0,22 Ab
0,0% parede celular de levedura	0,15 a	0,15 Ba	0,11 Bb
Com Vacinação	0,15 a	0,27 Ab	0,18 a
Sem Vacinação	0,13 a	0,16 Bb	0,16 b

Para cada fator, médias seguidas de letras distintas, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, diferem no nível de 5%



Não houve interação significativa entre dieta x vacinação e vacinação x tempo, em relação ao número de trombócitos. Ao longo das coletas, os peixes alimentados com dietas suplementadas apresentaram aumento significativo. Comportamento oposto foi observado nos alimentados com ração controle. As diferenças no número de trombócitos durante as coletas foram significativas somente na terceira coleta (48h). Neste caso, o maior número ocorreu nos peixes alimentados com dietas suplementadas (Tabela 14).

Tabela 14. Efeito da interação entre os níveis de parede celular de levedura e tempo sobre o valor de trombócitos de tilápia do Nilo.

<b>Trombócitos (<math>10^6/\text{mm}^3</math>)</b>	6 horas	24 horas	48 horas
0,3 % parede celular de levedura	0,026 a	0,027 b	0,028 Ac
0,0% parede celular de levedura	0,026 a	0,025 b	0,024 Bc

Médias seguidas de letras distintas, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, diferem no nível de 5%

A análise da concentração de PPT demonstrou que a vacinação foi capaz de interferir significativamente no grupo de peixes alimentados com ração controle (Tabela 15). Entre os vacinados, as maiores concentrações de PPT ocorreram nos alimentados com ração controle. Entre os não vacinados, os maiores valores ocorreram nos peixes alimentados com dietas suplementadas.

As concentrações de PPT durante as coletas aumentaram nos peixes alimentados com dietas suplementadas ou vacinados, entretanto, com

diferenças significativas somente nos vacinados. Nos peixes alimentados com ração controle ou não vacinados, houve discreto aumento (Tabela 16).

Tabela 15. Efeito da interação entre os níveis de parede celular de levedura e vacinação sobre o valor da proteína plasmática total de tilápia do Nilo.

<b>Proteína Plasmática Total (g/dL)</b>	Com Vacina	Sem Vacina
0,3 % parede celular de levedura	4,86 A	5,02 A
0,0% parede celular de levedura	5,19 Ba	4,65 Bb

Médias seguidas de letras distintas, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, diferem no nível de 5%

Tabela 16. Efeito da interação entre tempo e os níveis de parede celular de levedura ou vacinação sobre o valor da proteína plasmática total de tilápia do Nilo.

<b>Proteína Plasmática Total (g/dL)</b>	6 horas	24 horas	48 horas
0,3 % parede celular de levedura	4,87 A	4,93	5,03
0,0% parede celular de levedura	4,48 Ba	4,80 b	5,00 c
Com Vacinação	4,55 a	5,16 b	5,22 Ac
Sem Vacinação	4,86	4,93	4,97 B

Para cada fator, médias seguidas de letras distintas, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, diferem no nível de 5%

A contagem diferencial de leucócitos sanguíneos revelou significativa diferença no número de linfócitos, neutrófilos e monócitos, nas interações dieta x vacinação, dieta x tempo e vacinação x tempo (Tabela 17).

Tabela 17. Número total de linfócitos, neutrófilos e monócitos de tilápia do Nilo, submetidas à suplementação dietética com 0,3% de parede celular de levedura e vacinadas contra *Streptococcus agalactiae*.

Tratamentos	Variáveis		
	Linfócitos (10 <sup>4</sup> /mm <sup>3</sup> )	Neutrófilos (10 <sup>4</sup> /mm <sup>3</sup> )	Monócitos (10 <sup>4</sup> /mm <sup>3</sup> )
0,3 % parede celular	14,39 a	11,05 a	1,19 b
0,0% parede celular	8,00 b	7,27 b	2,60 a
Com Vacina	12,85 a	10,75 a	2,02 a
Sem Vacina	10,87 b	8,39 b	1,51 b
6 horas	7,93 c	7,62 c	1,99 a
24 horas	14,60 a	11,45 a	1,62 c
48 horas	12,93 b	9,54 b	1,66 b
<b>F para:</b>			
Levedura (L)	142,77 *	99,29 *	111,71 *
Vacina (V)	14,23 *	40,58 *	15,47 *
Tempo (T)	57,82 *	35,05 *	3,07 ns
L X V	54,02 *	72,31 *	373,27 *
L X T	58,35 *	32,51 *	9,86 *
V X T	10,53 *	18,08 *	12,37 *
CV	8,75	21,48	22,01

Para cada variável aferida, em cada fator de variação, médias seguidas de letras distintas diferem entre si, no nível de 5% de probabilidade

Os peixes alimentados com dietas suplementadas e não vacinados apresentaram maior número de neutrófilos e linfócitos. Os menores números de neutrófilos e linfócitos ocorreram nos alimentados com ração controle e não vacinados. Entre os não vacinados o oferecimento da suplementação quase triplicou o número de linfócitos e neutrófilos em relação aos alimentados com ração controle (Tabelas 18 e 19).

Tabela 18. Efeito da interação entre os níveis de parede celular de levedura e vacinação sobre o valor de neutrófilos de tilápia do Nilo.

<b>Neutrófilos (<math>10^4/\text{mm}^3</math>)</b>	Com Vacina	Sem Vacina
0,3 % parede celular de levedura	10,84	11,25 A
0,0% parede celular de levedura	10,61 a	4,38 Bb

Médias seguidas de letras distintas, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, diferem no nível de 5%

Tabela 19. Efeito da interação entre os níveis de parede celular de levedura e vacinação sobre o valor de linfócitos de tilápia do Nilo.

<b>Linfócitos (<math>10^4/\text{mm}^3</math>)</b>	Com Vacina	Sem Vacina
0,3 % parede celular de levedura	13,66 Aa	15,12 Ab
0,0% parede celular de levedura	11,55 Ba	4,92 Bb

Médias seguidas de letras distintas, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, diferem no nível de 5%

O número de neutrófilos no decorrer das coletas aumentou significativamente nos peixes alimentados com dietas suplementadas ou vacinados (Tabela 20). O maior aumento foi verificado na segunda coleta (24h), nos peixes vacinados. Nos alimentados com ração controle, ocorreu aumento na segunda coleta e diminuição na terceira. Nos não vacinados, ocorreu aumento significativo na segunda coleta. Considerando o efeito vacinação, diferenças significativas no número de neutrófilos ocorreram na segunda coleta.

Tabela 20. Efeito da interação entre tempo e os níveis de parede celular de levedura ou vacinação sobre o valor de neutrófilos de tilápia do Nilo.

<b>Neutrófilos (<math>10^4/\text{mm}^3</math>)</b>	6 horas	24 horas	48 horas
0,3 % parede celular de levedura	7,39 a	13,62 A b	12,13 A b
0,0% parede celular de levedura	7,98 a	8,08 B b	5,91 B a
Com Vacinação	8,10 a	14,35 A b	9,89 a
Sem Vacinação	7,18 a	8,79 B b	9,19 b

Para cada fator, médias seguidas de letras distintas, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, diferem no nível de 5%

O número de linfócitos nos peixes alimentados com dietas suplementadas ou vacinados aumentou significativamente na segunda coleta (24h). Na terceira (48h) houve discreta diminuição nos alimentados com dietas suplementadas, enquanto que nos vacinados, esta redução foi significativa. Nos alimentados com ração controle, ocorreu diminuição, inclusive com diferenças significativas em relação aos alimentados com dietas suplementadas a partir da segunda coleta (24h). Nos não vacinados, ocorreu aumento significativo entre a primeira (6h) e segunda coletas (24h) (Tabela 21).

Tabela 21. Efeito da interação entre tempo e os níveis de parede celular de levedura ou vacinação sobre o valor de linfócitos de tilápia do Nilo.

<b>Linfócitos (<math>10^4/\text{mm}^3</math>)</b>	6 horas	24 horas	48 horas
0,3 % parede celular de levedura	7,22 a	18,63 A b	17,33 Ab
0,0% parede celular de levedura	9,02	8,33 B	6,78 B
Com Vacinação	8,13 a	17,43 Ac	12,98 b
Sem Vacinação	7,74 a	12,01 Bb	12,88 b

Para cada fator, médias seguidas de letras distintas, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, diferem no nível de 5%

Entre os peixes alimentados com dietas suplementadas, a vacinação esteve associada ao menor número de monócitos. Entre os alimentados com ração controle, a vacinação determinou o maior número desta célula (Tabela 22).

Os peixes alimentados com dietas suplementadas apresentaram discreta diminuição entre a primeira (6h) e segunda (24h) coletas, seguida

por aumento na terceira (48h). Nos alimentados com ração controle, ocorreu redução significativa no número de monócitos; mesmo comportamento observado na interação vacinação x tempo (Tabela 23).

Tabela 22. Efeito da interação entre os níveis de parede celular de levedura e vacinação sobre o valor de monócitos de tilápia do Nilo.

<b>Monócitos (<math>10^4/\text{mm}^3</math>)</b>	Com Vacina	Sem Vacina
0,3 % parede celular de levedura	0,45 A a	1,94 A b
0,0% parede celular de levedura	4,56 B a	0,91 B b

Médias seguidas de letras distintas, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, diferem no nível de 5%

Tabela 23. Efeito da interação entre tempo e os níveis de parede celular de levedura ou vacinação sobre o valor de monócitos de tilápia do Nilo.

<b>Monócitos (<math>10^4/\text{mm}^3</math>)</b>	6 horas	24 horas	48 horas
0,3 % parede celular de levedura	1,38 Aa	0,82 Ab	1,39 Aa
0,0% parede celular de levedura	2,94 Ba	2,88 Ba	2,05 Bb
Com Vacinação	2,55 Aa	2,08 Ab	1,48 c
Sem Vacinação	1,47 Ba	1,20 Bb	1,15 b

Para cada fator, médias seguidas de letras distintas, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, diferem no nível de 5%

## Discussão

De modo geral o emprego da levedura e seus derivados melhoram a produtividade da tilápia, devido a maior eficiência alimentar e incremento dos mecanismos de defesa. Entretanto, a resposta dos peixes é variada (BURRELS et al., 2001; SAHHO e MUKHERJEE, 2002; BRIDLE et al., 2005).

No presente estudo, as maiores médias de ganho de peso e TCE observadas nos peixes submetidos à suplementação dietética com levedura podem ser parcialmente justificadas pelo conteúdo de glicanos e manano proteínas (SGARBIERI et al., 1999; SCAPINELLO et al., 2001ab), preconizados para aumentar o desempenho produtivo (ROMERO e GOMEZ-BASAURI, 2003; GRIESHOP, 2003; FLICKINGER, 2003). Resultados semelhantes foram verificados por CARVALHO et al. (2002), que constataram maiores ganho de peso e TCE em modelo similar.

No presente trabalho, durante a alimentação dos peixes alimentados com ração suplementada, observou-se maior apetite e consumo da ração, embora não quantificados. O ácido glutâmico presente em altas concentrações na parede celular de levedura, juntamente com nucleotídeos, deve ser o principal responsável pela palatabilidade da dieta. Portanto, a parede celular utilizada como ingrediente da dieta neste estudo pode ter melhorado o sabor e incrementado o consumo e conseqüentemente, promovido o melhor desempenho dos peixes. Provavelmente esta seja a razão do melhor resultado da suplementação com parede celular em relação à levedura íntegra e autolizada, observado por REQUE (2005).

O aumento das taxas de hematócrito e hemoglobina nos peixes alimentados com dietas suplementadas e vacinados, reforça a idéia de que o polissacarídeo, juntamente com a vacina contribua para o equilíbrio

orgânico da tilápia, por meio de provável estimulação eritropoiética. Nos peixes alimentados com a ração controle, o desafio esteve associado à diminuição nos valores destas variáveis.

TAVARES-DIAS et al. (2001) relataram significativa redução no valor do hematócrito de tambaquis (*Colossoma macropomum*) submetidos à agentes estressores, como a captura e o manejo. No presente trabalho, o estresse representado pelo desafio com a bactéria *S. agalactiae*, provocou redução significativa no hematócrito nos peixes alimentados com ração controle e não vacinados. Isto sugere que o fornecimento de dietas suplementadas com levedura ou a vacinação sejam capazes de minimizar, em parte, os efeitos nocivos do estresse em relação ao hematócrito.

O maior valor de VCM e o menor hematócrito observado nos peixes alimentados com a ração controle e não vacinados corroboram o fato de que quanto maior o número de eritrócitos, maior a taxa de hemoglobina, porém, menor o VCM (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004).

O valor do VCM ao longo das coletas dos peixes alimentados com a ração controle ou não vacinados aumentou significativamente, embora o valor do hematócrito não tenha apresentado diferença significativa. Portanto, nos peixes submetidos a agentes incapazes de estimular o aumento da população eritrocitária, é possível que a presença de eritrócitos macrocíticos represente importante mecanismo de compensação em



condições adversas para aumentar a eficiência do transporte de oxigênio e manter a demanda energética (PULSFORD et al., 1994).

Vários estudos demonstraram que em teleósteos, os níveis de PPT podem variar com a espécie e idade dos peixes (HRUBEC et al., 2000). BAGNI et al. (2000) não encontraram variação na concentração de PPT em robalos submetidos à suplementação com  $\beta$ -glicano. Resultados semelhantes foram observados neste estudo, pois os efeitos da dieta ou vacinação separadamente não foram capazes de influenciar a concentração de PPT. Os maiores valores foram observados nos peixes alimentados com ração controle e vacinados. Além disso, ao longo das coletas, foi observado aumento significativo nos vacinados. Segundo JENEY et al. (1997), a baixa quantidade de proteínas plasmáticas pode ser relacionada à atividade não específica do sistema imune. Portanto, resultados do presente trabalho sugerem que o aumento na concentração de PPT seria uma resposta das proteínas de fase aguda própria do fenômeno inflamatório (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004). Além disso, poderia estar relacionado com o aumento de atividade de linfócitos, em resposta à administração da vacina, que pode aumentar a resposta proliferativa desta célula (SIWICKI et al., 1994).

Os níveis de PPT no plasma podem ser modificados poucas horas após o início da reação inflamatória por vários dias, dependendo da

intensidade do estímulo (WHITE et al., 1981; QUINTANA, 2002). Foi observado e esperado o aumento no valor desta variável ao longo das coletas, devido a provável acentuação das respostas de defesa pela vacinação.

Nos peixes, a composição sanguínea é dependente de fatores fisiológicos e ecológicos, tais como o sexo, estágio de desenvolvimento gonadal, estresse, infecções e desequilíbrios ambientais (MARINO et al., 2001; TAVARES-DIAS et al., 2002). Neste contexto, o número de leucócitos varia entre famílias, gêneros e espécies, e de acordo com o ambiente (RANZANI – PAIVA, 1995).

A análise dos parâmetros hematológicos demonstrou que os peixes alimentados com dietas suplementadas ou vacinados demonstraram médias de leucócitos e trombócitos superiores aos peixes alimentados com a ração controle ou não vacinados, respectivamente. Estes dados reforçam as observações de KOLLNER et al. (2002), de que quando ocorre a invasão de microrganismos, o sistema imune inicia a ativação e proliferação de leucócitos e trombócitos. Estas últimas também envolvidas na defesa do organismo (JORGENSEN et al., 1993; HILL e ROWLEY 1996; BOZZO et al., 2007).

O maior aumento do número de leucócitos foi observado nos peixes alimentados com dietas suplementadas e vacinados. Estes resultados

suportam a hipótese de que a parede celular da levedura favoreça a inflamação melhorando as ações de defesa do organismo (GANNAN, 2005; REQUE, 2005).

A avaliação do leucograma nos peixes alimentados com dietas suplementadas mostrou que após o desafio por *S. agalactiae*, ocorreu aumento no número de linfócitos a partir da segunda coleta, seguida por discreta redução na terceira.

Os monócitos e macrófagos são as células primárias responsáveis pela captura, processamento e apresentação dos antígenos aos linfócitos, resultando na sua proliferação e ativação (ANDERSON, 1992). Portanto, o aumento no número de linfócitos observados a partir da segunda coleta, pode ter sido consequência do período que é requerido até que esse mecanismo se complete.

A demanda energética durante o processo de ativação linfocitária é decisiva na resposta imune dos peixes (SPRINGER, 1990). Neste ensaio, os alimentados com a ração controle não apresentaram alterações nestes valores. Assim, os efeitos da levedura contida na dieta sugere que ela seja capaz de incrementar o nível nutricional e portanto, melhorar o patamar de saúde dos peixes.

Segundo MANNING (1994) os neutrófilos são células de defesa sensíveis à desnutrição protéica energética e seus valores podem variar

conforme a composição da dieta do peixe. O presente trabalho confirmou essa observação, pois os maiores valores de neutrófilos foram observados nos peixes alimentados com dietas suplementadas.

Os monócitos além de produzirem citocinas, são células primárias na apresentação do antígeno em teleósteos (VALLEJO et al., 1992). Inúmeros autores comprovaram o aumento da população e atividade de fagócitos, quando o glicano ou a vacinação foi utilizada (JØRGENSEN e ROBERTSEN, 1995; BAULNY et al., 1996; DUNCAN e KLESIUS, 1996a, b). Neste trabalho, o maior número de monócitos ocorreu nos peixes submetidos exclusivamente à vacinação. Este resultado corrobora os de ROITT et al. (1998), pois pode estar relacionado à ativação de linfócitos determinada pela vacinação e conseqüentemente produção de citocinas tais como GM-CSF (fator estimulatório de colônias de granulócitos e monócitos), que resultaria no aumento de resposta por meio de monócitos.

Segundo LORENZI (1999) os monócitos são células de defesa em trânsito no sangue periférico. O seu número durante as coletas revelou diminuição na segunda, seguido de aumento na terceira coleta, nos peixes alimentados com dietas suplementadas com levedura. Estes resultados sugerem que estas células poderiam estar sendo recrutadas para a cavidade abdominal, devido a inflamação local (PILARSKI, 2006). O aumento no número de monócitos observado nos peixes alimentados com dietas

suplementadas sugere que a parede celular auxiliou no desenvolvimento de respostas de defesa. Entretanto, ocorreria em fase tardia da infecção. Por outro lado, a vacinação foi eficiente em tempo mais curto.

A partir dos resultados obtidos neste estudo, conclui-se que a suplementação da dieta com parede celular de levedura associada à vacinação contribuiu para a manutenção de parâmetros hematológicos, embora, não tenha sido capaz de melhorar o desempenho produtivo.

Portanto, essas evidências apontam no sentido de que a suplementação com levedura favoreça patamares mais elevados de equilíbrio orgânico, favorecendo as respostas de defesa não específicas. Por outro lado, a vacinação contribui para a estimulação da resposta imune específica. Como as moléculas de glicano e manano proteínas são quebradas no processo de digestão, é improvável que estimulem receptores de leucócitos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, D. P. Immunostimulants, adjuvants and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. **Annual Review of Fish Disease**, v.2, p. 281-307, 1992.

BACCARIN, A. E.; PEZZATO, L. E. Efeito da utilização da levedura desidratada de álcool em dietas para tilápia do Nilo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36 (3), p. 549-556, 2001.

BAGNI, M., ARCHETTI, L., AMADORI, M., MARINO, G. Effect of Long-term Oral Administration of an Immunostimulant Diet on Innate Immunity in Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). **Journal of Veterinary Medicine**. Serie B, Berlin, v.47, n.10, p. 745-751, 2000.

BAULNY, M.O.D.; QUENTEL, C.; FOURNIER, V.; LAMOUR, F.; GOUVELLO, R.L. Effect of long-term oral administration of b-glucan as an immunostimulant or an adjuvant on some non-specific parameters of the immune response of turbot *Scophthalmus maximus*. **Diseases of Aquatic Organism**, v. 26, p. 139–147. 1996.

BARBIN, D. Planejamento e análise de experimentos agrônômicos. Arapongas: Midas, 2003. 208 p.

BOZZO, F. R., MORAES, J. R. E., MORAES, F. R., PEREIRA, G., TAVARES-DIAS, M., ONAKA, E. M. Kinetics of cellular component in inflammatory response induced by different stimuli in the swim bladder of pacu *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Characidae). **Journal of the World Aquaculture Society**, v.38, p.302 - 308, 2007.

BRIDLE, A.R., CARTER, C.G., MORRISON, R.N., NOWAK, B.F. The effect of b-glucan administration on macrophage respiratory burst activity and Atlantic salmon, *Salmo salar* L., challenged with amoebic gill disease – evidence of inherent resistance. **Journal of Fish Diseases**, v. 28, n. 6, p.347–376, 2005.

BUNCH, E. C.; BEJERANO, I. The effect of environmental factors on the susceptibility of hibrid tilapia *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus* to streptococcosis. **The Israeli Journal of Aquaculture**, v.49, n.2, p.67-76, 1997.

BURRELS, C.; WILLIAMS, P. D.; FORNO, P. F. Dietary nucleotides: a novel supplement in fish feeds, effects on resistance to disease in salmonids. **Aquaculture**, v.199, p.159-169, 2001.

CARVALHO, M.; MACEDO-VIEGAS, E.M.; RIBEIRO, M.A. Utilização de células íntegras de levedura e seus derivados em dietas de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 12., 2002, Goiânia. **Anais...** Goiânia: SIMBRAQ, 2002. p. 142.

DUNCAN, P.L.; KLESIUS, P.H. Dietary immunostimulants enhance nonspecific immune responses in channel catfish but not resistance to *Edwardsiella ictaluri*. **Journal of Aquatic Animals Health**, v. 8, p.241–248. 1996a.

DUNCAN, P.L.; KLESIUS, P.H. Effects of feeding Spirulina on specific and nonspecific immune responses of channel catfish. **Journal of Aquatic Animals Health**, v. 8, p. 308–313. 1996b.

EVANS, J.J.; KLESIUS, P.H.; GILBERT, P.M., SHOEMAKER, C.A., AL SARAWI, M.A., LANDSBERG, J., DUREMDEZ, R., AL MARZOUK, A., AL ZENKI, S. Characterization of b-haemolytic group B *Streptococcus agalactiae* in cultured seabream, *Sparus auratus L.*, and wild mullet, *Liza klunzingeri* in Kuwait. **Journal of Fish Disease**, v.25, p.505-513, 2002.

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

FLICKINGER, E.A. Oligosaccharides as functional foods: can we improve gut health? Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries. In: PROCEEDINGS OF ALLTECH'S NINETEENTH SYMPOSIUM. England: Nottingham University Press, 2003, p.345-353.

GANNAM, A. Immunostimulants in fish diets. In: SIMPÓSIO DE NUTRIÇÃO E SAÚDE DE PEIXES, 1., 2005, Botucatu. **Anais...** Botucatu: 2005, p.93 -102.

GILDBERG, A.; MIKKELSEN, H.; SANDAKER, E., RINGO, E. Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of bacalhau do atlântico (*Gadus morhua*). **Hydrobiologia**, v.352, p.279-285, 1997.

GRAM, L.; MELCHIORSEN, J.; SPANGGARD, B., HUBER, I., NIELSEN, T.F. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.3, p.969-9732, 1999.

GRIESHOP, C.M. The interaction of nutrition and the immune system: a discussion on the role of energy, protein and oligosaccharides. Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries. In: PROCEEDINGS OF ALLTECH'S NINETEENTH SYMPOSIUM. England: Nottingham University Press, 2003, p.499–507.

HARMON, R. J.; EBERHART, R.J., JASPER, D.E., LANGLOIS, B.E., WILSON, R.A. Microbiological procedures for diagnosis of bovine udder infection. Arlington: Nat Mastitis Counc, 1990.

HILL, D.J.; ROWLEY, A.F. The thromboxane mimetic, U-46619, induces the aggregation of fish thrombocytes. **Brazilian Journal of Haematology**, v. 92, p. 200-211, 1996.

HRUBEC, T. C.; CARDINALE, J. L.; SMITH, S. A. Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Veterinary Clinical Pathology**, p.29, 2000.

JENEY, G.; GALEOTTI, M.; VOLPATTI, D. JENEY, Z., ANDERSON, D.P. Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. **Aquaculture**, v. 154, p. 1-15, 1997.

JØRGENSEN, J.B.; LUNDE, H.; ROBERTSEN, B. Peritoneal and head kidney cell response to intraperitoneally injected yeast glucan in Atlantic salmon, *Salmo Salar*, L. **Journal of Fish Diseases**, v. 16, p. 313-325, 1993.

JØRGENSEN, J.B.; ROBERTSEN, B. Yeast b-glucan stimulates respiratory burst activity of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. macrophages. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 19, p. 43–57. 1995.



KOLLNER, B.; WASSERRAB, B.; KOTTERBA, G.; FISHER, U. Evaluation of immune functions of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) – how can environmental influences be detected? **Toxicology Letters**, v.131, p.83-95, 2002.

KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams e Wilkins, 1984. 1268p.

LI, P.; GATLIN III, D.M. Dietary brewers yeast and the prebiotic Grobiotick AE influence growth performance, immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. **Aquaculture**, v.231, n. 5, p.445–456, 2003.

LORENZI, T. F. **Manual de hematologiapropedeutica e clínica**. São Paulo, MEDSI. 1999, 641 p.

MANNING, M. J. Fishes . In: TURNER (ed.), **Immunology**, Chichester: John Wiley and Sons, p.69-100, 1994.

MARINO, G.; DI MARCO, P.; MANDICH, P.; FINOIA, A.; CATAUDELLA, S. Changes in serum cortisol, metabolites, osmotic pressure and electrolytes in response to different blood sampling procedures in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax* L). **Journal of Applied Ichthyology**, v. 17, p. 115-120, 2001.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **NUTRIENT REQUIREMENTS OF FISH**. Washington: Academy Press, 1993. 125p.

NIKOSKELANEN, S.; SALMINEN, S.; BYLUND, G., OUWEHAND, A.C. Characterization of the properties of human and dairy-derived probiotics for prevention of infectious diseases in fish. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.6, p.2430-2435, 2001.

PILARSKI, F. **Imunização de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com cultura inativada de *Flavobacterium columnare* e suplementação alimentar com vitamina C**. 2006. 118f. Tese (Doutorado em Aqüicultura) – Centro de Aqüicultura da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

PIMENTEL GOMES, F. Curso de estatística experimental, 14ª edição. Piracicaba, SP. 477p., 2000.

PULSFORD, A. L.; LEMAIRE-GONY, S.; TOMLINSON, M.; COLLINGWOOD, N.; GLYNN, P. J. Effects of acute stress on the immune system of dab *Limanda*. **Comp. Bioch. and Physiology**, v. 109, p. 129-139, 1994.

QUINTANA, C. F. **Respostas locais e sistêmicas induzidas por endotoxina em *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) tratados com cromo**. 2002. 67 p. Tese (Tese de Doutorado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal, SP, 2002.

RANZANI-PAIVA, M. J. Células do sangue periférico e contagem diferencial de leucócitos de tainha *Mugil platanus* Gunther, 1980 (Osteichthyes: Mugilidae) da região estuarino-lagunar de Cananéia – SP (Lat. 25°00'S-Long.47°55'W). **Boletim do Instituto de Pesca**, SP, v. 22, n. 1, p. 23-40, 1995.

REQUE, V. R. **Suplementação alimentar com *Saccharomyces cerevisiae* na inflamação induzida por *Aeromonas hydrophila* em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2005. p.63 Dissertação (Mestrado em aquicultura). – Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, S.P., 2005.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALI, D **Immunology**. 5<sup>th</sup>. London, Mosby. 1998, 423p.

ROMERO, R.; GOMEZ-BASUARI, J. Yeast and yeast products, past present and future: from flavors to nutrition and health. Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries. In: PROCEEDINGS OF ALLTECH'S NINETEENTH SYMPOSIUM. England: Nottingham University Press, 2003, p. 365-371.

SAHOO, P. K.; MUKHERJEE, S. C. Effect of dietary 1,3  $\beta$ -glucan on immune responses and disease resistance of healthy and aflatoxin B<sub>1</sub>-induced immunocompromised rohu *Labeo rohita* Hamilton. **Fish Shellfish Immunology**, v. 11, p.683-95, 2002.

SCAPINELLO, C., FARIA, H.G., FURLAN, A.C., MICHELAN, A.C. Efeito da utilização de oligossacarídeo manose e acidificantes sobre o desempenho de coelhos em crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 30, n. 4, p. 1272-1277, 2001a.

SCAPINELLO, C., FARIA, H.G., FURLAN, A.C., MICHELAN, A.C. Efeito do uso de oligossacarídeo manose e acidificantes em rações com alto teor de amido, para coelhos em crescimento. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, n. 4, p. 1039-1043, 2001b.

SGARBIERI, V.C., ALVIM, I.D., VILELA, E.S.D., BALDINI, V.L.S., BRAGAGNOLO, N. Produção piloto de derivados de levedura (*Saccharomyces* sp.) para uso como ingrediente na formulação de alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas v. 2, n. 1-2, p. 119-125, 1999.

SALVADOR, R, MULLER, E. E.; FREITAS, J. C., LEONHARDT, J. H., PRETTO-GIORDANO, L.G.; DIAS, J. A. Isolation and characterization of group B *Streptococcus* spp from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) breeding in hapas nets and in earth nurseries in the north region of Parana State, Brazil. **Ciência Rural**, v.35, n. 6, p.1374-1378, 2005.

SHELBY, R.A.; KLESIOUS, P.H.; SHOEMAKER, C.A.; EVANS, J.J.. Passive immunization of tilapia, *Oreochromis niloticus*, with anti-*Streptococcus iniae* whole sera. **Journal of Fish Disease**, v. 25, p.1-6, 2002.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; MORENO, S. Q. Variação dos parâmetros limnológicos em um viveiro de piscicultura nos períodos de seca e chuva. **Revista UNIMAR**, v.16, n.4., p.229-242, 1994.

SIWICKI, A.K.; ANDERSON, D. P. ; RUMSEY, G. L. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 41, p. 123-139, 1994.

SPRING, P. Yeast's secret weapon aids animal production. In: SIMPÓSIO SOBRE ADITIVOS ALTERNATIVOS NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL, 2001, Campinas. **Anais...** Campinas, p.41-50, 2000.

SPRINGER, T. A. Adhesion receptors of the immune system. **Nature**, v.346, p.425-433, 1990.

SURESH, A. V. Tilapia Update 1998. **World Aquaculture**, v.30, n.4, p.8-68. 1998.

TAVARES-DIAS, M.; SANDRIM, E. F. S.; MORAES, F. R.; CARNEIRO, P. C. F. Physiological responses of tambaqui, *Colossoma macropomum* (CHARACIDAE) to acute stress. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 27, n.1, p. 43-48, 2001.

TAVARES-DIAS, M.; MATAQUEIRO, M. I.; PERECIN, D. Total leukocyte counts in fishes by direct or indirect methods? **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 28, n. 2, p. 155-161, 2002.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. Características hematológicas da *Tilapia rendalli* Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) capturada em "Pesque-Pague" de Franca, São Paulo, Brasil. **Bioscience Journal**, v. 19, n. 1, 2003.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. Hematologia de peixes teleósteos. 1ª edição. Biblioteca Central – FMRP – USP: Ribeirão Preto – São Paulo, 144p. 2004.

VANDAMME, P.; DEVRIESE, L.A.; POT, B.; KERSTERS, K.; MELIN, P. *Streptococcus difficile* is a nonhemolytic Group B, type Ib Streptococcus. **International Journal Systematic Bacteriology**, v.47, n.1, p.81-85, 1997.

VALLEJO, A. N.; MILLER, N. W.; CLEM, L. W. Antigen processing and presentation in teleost immune responses. **Annual Review of Fish Disease**, v.2, p.73-89, 1992.

VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELOOS, P., VERSTRAETE, W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64, n.4, p.655-671, 2000.

WATANABE, A.L. **Suplementação de levedura desidratada (*Saccharomyces cerevisiae*) e derivados na alimentação de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**, 2006. 82 F. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2006.

WHITE, A.; FLETCHER, T.; PEPYS, M; BALDO, B. The effect of inflammatory agents on C reactive protein and serum amyloid P component levels in plaice (*Pleuronectes platessa* L.) serum. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 69, p.325-329, 1981.

### **CAPÍTULO III**

SUPLEMENTAÇÃO ALIMENTAR COM *Saccharomyces cerevisiae* E  
VACINAÇÃO CONTRA *Streptococcus agalactiae* EM TILÁPIA DO  
NILO: INFLAMAÇÃO E DESAFIO

## SUPLEMENTAÇÃO ALIMENTAR COM *Saccharomyces cerevisiae* E VACINAÇÃO CONTRA *Streptococcus agalactiae* EM TILÁPIA DO NILO: INFLAMAÇÃO E DESAFIO

**Resumo:** O presente trabalho teve por objetivos avaliar a inter-relação entre a suplementação alimentar com 0,3% de parede celular de levedura e vacinação com extrato oleoso de *Streptococcus agalactiae* inativado sobre o componente celular inflamatório em tilápia do Nilo. Oitenta e quatro tilápia com peso médio inicial de  $125,0 \pm 1,5$ g foram distribuídas em 12 caixas de fibra, seguindo o esquema fatorial 2x2x3, correspondente a dois níveis de parede celular de levedura (0,0 e 0,3% parede celular), dois tratamentos (solução salina e vacina) e três coletas após o desafio com a bactéria viva (seis, 24 e 48h) com sete repetições. Os peixes foram alimentados com as rações teste durante 77 dias. A vacinação foi realizada 60 dias após o início da alimentação, por meio da inoculação intraperitoneal de 0,5 mL da vacina contendo  $10^8$  UFC/mL. Após 15 dias da vacinação, todos os peixes foram submetidos ao desafio com *Streptococcus agalactiae*, por meio da inoculação intraperitoneal de  $10^8$  UFC/mL, veiculadas em 0,5 mL de solução salina (0,85%). Nenhuma ocorrência de mortalidade foi observada nos peixes alimentados com dieta contendo levedura. Nos peixes submetidos à dieta controle, ocorreu percentual de mortalidade entre 30,0 e 40,0%, sendo maior entre os peixes não vacinados. A suplementação alimentar com a levedura associada à vacinação induziu maior migração de leucócitos totais, trombócitos e linfócitos para o foco inflamatório. A maior migração de neutrófilos ocorreu nos peixes submetidos à dieta com levedura, enquanto que a de macrófagos, nos peixes vacinados. Os resultados deste trabalho sugerem que a suplementação alimentar com 0,3% de parede celular de levedura associada à vacinação, além de minimizar os problemas relativos à administração da substância isoladamente, melhora a resposta de defesa dos peixes, no que se refere à inflamação aguda e destaca a importância da vacinação.

**Palavras Chave:** *Saccharomyces cerevisiae*, vacinação, *Streptococcus agalactiae*, inflamação.

## SUPPLEMENTATION DIETS WITH *Saccharomyces cerevisiae* AND VACCINATION AGAINST *Streptococcus agalactiae* IN NILE TILÁPIA: INFLAMMATION AND CHALLENGE

This work evaluate the interrelation between supplementation diets with 0,3% of cellular wall of yeast and vaccination with oily vaccine against *Streptococcus agalactiae* in the inflammatory cellular component of Nile tilapia. Eighty four fish with initial average weight of 125,0 + 1,5g were distributed in 12 fiber aquaria, following the factorial design 2x2x3, corresponding to two levels of cellular wall of yeast (0,0 and 0,3% cellular wall), two treatments (saline solution and vaccine) and three collections after the challenge with the bacteria live (six, 24 and 48h) with seven replicates. Fish were fed with tests diets during 77 days. The vaccination of fish was done 60 days after the beginning of feeding, through intraperitoneal inoculation of 0,5 mL of the vaccine containing  $10^8$  UFC/mL. After 15 days of vaccination, all fish were challenged with *Streptococcus agalactiae*, through the intraperitoneal inoculation of  $10^8$  UFC/mL, diluted in 0,5 mL of saline solution (0,85%). No mortality was observed in fish fed diet containing yeast. Fish submitted to control diet presented a mortality rate ranging from 30,0 to 40,0%, being larger among vaccinated fish. The supplementation diets with yeast associated to the vaccination induced larger migration of total leucocytes, thrombocytes and lymphocytes for the inflammatory focus. In fish submitted diet with yeast was observed a large neutrophils migration, while in vaccinated fish, occurs macrophages migration. The results of this work suggest that supplementation diets with 0,3% of cellular wall of yeast associated to the vaccination, besides minimizing problems caused by administration of isolate substance, improves immune response of fish, in relation to the sharp inflammation and it detaches the importance of the vaccination.

**Keywords:** *Saccharomyces cerevisiae*, vaccination, *Streptococcus agalactiae*, inflammation

## **Introdução.**

O *Streptococcus* sp. é responsável por elevada morbidade e mortalidade em várias espécies de peixes (PASNIK et al., 2006). WU (1970) relatou o primeiro isolamento desta bactéria em tilápia e desde então, é responsabilizada por elevadas taxas de mortalidade no Japão (KITAO et al., 1981), Taiwan (MING-CHEN et al., 1985), Israel (HUBERT, 1989), Arábia Saudita (AL-HARB, 1994), EUA e América Central (PLUMB, 1997).

Estreptococos isolados de tilápia do Nilo criadas em sistemas intensivos no Paraná, Brasil, apresentaram o mesmo perfil bioquímico de referência de *Streptococcus agalactiae*, sugerindo seu envolvimento na limitação da tilapicultura, dentre outros patógenos (SALVADOR et al., 2005).

Alimentos funcionais como *Saccharomyces cerevisiae* são utilizados como suplemento alimentar para melhorar a eficiência do sistema de defesa dos peixes (SAKAI, 1999; FREIMUND et al., 2003; REQUE, 2005) e a vacinação é boa alternativa à utilização indiscriminada de antibióticos e outros produtos na prevenção de infecções (ROMANO e MEJÍA, 2003).

A inflamação dilui, destrói e circunscreve agentes estranhos ao organismo. A mobilização adequada e em tempo hábil de leucócitos da microcirculação para o foco inflamado é uma das suas etapas fundamentais,



primeira ação de defesa do organismo e principal característica do fenômeno (GARCIA-LEME, 1989).

A avaliação do componente celular na inflamação induzida por tioglicolato, lipopolissacarídeo (LPS) e *Aeromonas hydrophila* inativada em *Piaractus mesopotamicus*, demonstrou que o primeiro induziu o maior acúmulo de células totais, seis horas após aplicação. A inoculação de *A. hydrophila* inativada proporcionou acúmulo progressivo de células totais, que foi máximo após 24 horas e maior que nos outros grupos. O LPS provocou maior acúmulo de células que o do grupo controle, porém menor que o induzido pelos outros dois flogógenos. A contagem diferencial demonstrou predominância de trombócitos e menor número de linfócitos e macrófagos (BOZZO et al., 2007).

Na inflamação de tilápia com dietas suplementadas com *Saccharomyces cerevisiae*, houve maior acúmulo de células totais em relação àquelas alimentadas com ração não suplementada. O acúmulo foi maior nas tilápias alimentadas com dietas suplementadas com parede celular do que nas que receberam levedura íntegra. A contagem diferencial evidenciou predominância de trombócitos e menor número de neutrófilos, macrófagos e linfócitos nos peixes alimentados com a ração controle. A variação na contagem de trombócitos e leucócitos sanguíneos sugerem que o estímulo inflamatório tenha provocado seu recrutamento dos

compartimentos de reserva. Assim, as duas formulações foram benéficas para o sistema de defesa orgânica dos peixes, facilitando a resposta de defesa (REQUE, 2005).

Com base no exposto, este ensaio teve como objetivo avaliar o componente celular inflamatório de tilápias alimentadas com dietas suplementadas com 0,3% de parede celular de levedura, vacinadas e desafiadas com cepa homóloga de *S. agalactiae*.

## **Material e Métodos**

### **Local e Acondicionamento dos peixes**

O experimento foi conduzido na Universidade Estadual Paulista – Unesp, Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos (Lapoa) do Centro de Aqüicultura da Unesp (Caunesp), Jaboticabal, SP. Oitenta e quatro tilápias com peso médio inicial de  $125,0 \pm 1,5$ g foram distribuídas em caixas de fibra de 310 L, abastecidas com água de poço artesiano, vazão de 1L/min e aeração contínua. Diariamente, a temperatura ( $28,0 \pm 1,7^{\circ}\text{C}$ ) da água foi aferida e, semanalmente, o potencial hidrogeniônico ( $7,3 \pm 0,3$ ) e o oxigênio dissolvido ( $5,54 \pm 0,82$ mg/L), permanecendo dentro dos valores recomendados para o bem estar (SIPAÚBA-TAVARES, 1994). Em dias alternados, foi realizada a limpeza das caixas por meio de sifonagens.

## **Grupos**

Para a constituição dos grupos, foram utilizadas 12 caixas de fibra, sendo três por tratamento (n=7). O grupo 1 (G1) recebeu ração básica não suplementada com ingrediente teste (controle) e foi vacinado; grupo 2 (G2), dieta controle e não vacinado; grupo 3 (G3) ração suplementada com 0,3% de parede celular e não vacinado e grupo 4 (G4) ração suplementada com 0,3% de parede celular e vacinado.

## **Confecção e formulação das rações e manejo alimentar**

As dietas foram formuladas e elaboradas no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos – AquaNutri, da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Câmpus de Botucatu.

As rações foram formuladas conforme o NRC (1993), sendo isoprotéicas (32,0% PD), isoenergéticas (3200 kcal de ED/kg), isofosfóricas (0,6 Pdisp.) e com mesmo nível de fibra bruta (5,0%) (BACCARIN e PEZZATO, 2001). O percentual dos ingredientes e a composição químico-bromatológica das dietas estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Composição percentual e químico-bromatológica das dietas experimentais.

<b>INGREDIENTES</b>	<b>%</b>
Farelo de Soja	45,00
Glúten de milho	9,50
Farinha de Peixe	5,50
Fubá Milho	15,00
Farelo Trigo	8,00
Quirera Arroz	7,60
Alginato	0,30
Celulose	1,84
DL – Metionina	0,45
Treonina	0,40
Óleo de soja	0,50
Fosfato Bicalcico	3,00
Calcáreo	2,00
Vit. C <sup>1</sup>	0,08
Sal Comum	0,10
Suplemento vitam/min <sup>2</sup>	0,4
BHT <sup>3</sup>	0,02
Levedura autolisada <sup>4</sup>	0,30
Energia digestível (Kcal/kg)	3240,00
Proteína digestível (%)	28,00
Fibra Bruta (%)	5,00
Extrato Etéreo (%)	3,00
Relação Ca: P	2,95

<sup>1</sup> Vitamina C 35,0% ativa<sup>2</sup> Suplemento vitamínico e mineral (Supremais)/ kg de ração: vitA 1200000 UI; vitD3 200000 UI; vitE 12000 mg; vitK3 2400 mg; vitB1 4800 mg; vitB2 4800 mg; vitB6 48000 mg; B12 4800 mg; ác. fólico 1200 mg; ác. pantotênico 12000 mg; vitC 56 mg; biotina 48 mg; colina 65 mg; niacina 24000 mg; Fe 10000 mg; Cu 600 mg; Mn 4000 mg; Zn 6000 mg; I 20 mg; Co 2 mg e Se 20 mg.<sup>3</sup> Antioxidante ( $\beta$ -hidroxi-tolueno)<sup>4</sup> Ausente na ração controle

Os ingredientes foram moídos e homogeneizados em misturador automático. Essa mistura foi submetida ao processo de peletização. As dietas foram secas em estufa de circulação de ar forçada a 55,0°C, durante 24 horas. Os peletes foram fracionados em diâmetros compatíveis com o tamanho dos peixes e armazenados a 20,0°C negativos. Os peixes foram alimentados *ad libitum*, três vezes ao dia (9h00, 14h00 e 18h00), com fornecimento de 3,0% da biomassa, durante os 77 dias.

### **Padronização do inóculo vacinal e desafio**

Amostras de *Streptococcus agalactiae* foram isoladas de tilápias infectadas naturalmente com sinais de meningoencefalite e identificadas segundo as características culturais, morfológicas, tintoriais e bioquímicas (VANDAMME et al., 1997; SALVADOR et al., 2005).

Para a determinação da concentração bacteriana letal para 50,0% dos peixes (CL<sub>50</sub>) e determinação do inóculo do desafio, foram utilizadas três caixas de fibra, contendo 10 peixes em cada, com peso médio inicial de 120,0 ± 0,5g. Os peixes das caixas 1, 2 e 3 foram inoculados com as concentrações 10<sup>4</sup>; 10<sup>6</sup> e 10<sup>8</sup> UFC/mL de *S. agalactiae*, respectivamente. Após 15 dias os resultados da mortalidade diária foram submetidos à análise estatística pelo programa estatístico Spearman-Kärber, e a CL<sub>50</sub> determinada foi de 10<sup>8</sup> UFC/mL.

Para a confecção da vacina, o microrganismo foi semeado em 500 mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion – DIFCO®). Após cinco dias de incubação a 29,0°C, em aerofilia, o meio foi centrifugado a 4000G (4,0°C), durante 20 minutos. O sobrenadante foi desprezado, a massa bacteriana foi ressuspendida em 500 mL de PBS (tampão fosfato) e novamente centrifugada. Repetiu-se essa operação por mais três vezes.

A massa bacteriana foi diluída em 100 mL de PBS de modo a conter  $10^8$  UFC/mL, correspondente ao grau oito da escala de MacFarland. A solução foi incubada em banho-maria, por 30 minutos, a 40,0°C. Para a confirmação da inativação do microrganismo, realizou-se a semeadura em meio BHI, incubado a 29,0°C, por sete dias. Em ausência de crescimento bacteriano, o adjuvante incompleto de Freund, na diluição 1:1 foi incorporado à vacina e emulsionada em misturador elétrico. Com a solução mantida em gelo, realizou-se o teste de emulação e preparação das doses. Aliquotas de 0,5 mL foram transferidas para seringas de 1,0 mL e mantidas em gelo até o momento de imunização.

A vacinação dos peixes (G1 e G4) foi realizada 60 dias após o início da alimentação dos peixes. Para isso, 0,5 mL da solução oleosa de *S. agalactiae*, contendo  $10^8$  UFC, foi inoculada intraperitonealmente (i.p.). Nos peixes não vacinados (G2 e G3), 0,5 ml de solução salina foi injetado i.p. Após 15 dias, todos os peixes foram desafiados com cepa homóloga de

*S. agalactiae*, por inoculação i.p.  $10^8$  UFC, veiculadas em 0,5 mL de solução salina (0,85%).

Cada caixa dos grupos de tratamento representou um tempo de avaliação do componente celular inflamatório, ou seja, seis, 24 e 48 horas após o desafio.

A eficácia da vacinação foi calculada como porcentagem de sobrevivência relativa (PSR), segundo AMEND (1981):

PSR:  $[1 - (\% \text{ mortalidade de vacinados} / \% \text{ mortalidade de controle})] \times 100$

### **Avaliação do componente celular inflamatório**

Os peixes foram sacrificados com solução de benzocaína, por aprofundamento do plano anestésico, até perderem completamente os movimentos operculares.

Após dissecação e visualização dos órgãos internos, o interior da bexiga natatória foi lavado com a injeção de 0,5 mL de solução de PBS contendo 0,01 ml de EDTA a 5%. O mesmo volume injetado foi recolhido com pipeta Pasteur e transferido para tubos de centrifuga mantidos no gelo. Uma alíquota desse volume foi transferida para câmara de Neubauer para contagem das células inflamatórias totais em microscopia de luz. Para a contagem diferencial de trombócitos, linfócitos, macrófagos e granulócitos, o exsudato foi centrifugado a 1000 rpm, por cinco minutos, em centrífuga

clínica. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento total foi retirado com pipeta Pasteur e colocado sobre lâmina histológica. Após homogeneização foi feita a extensão do exsudato. Deixou-se a lâmina secar em temperatura ambiente para posterior fixação em álcool metílico por um minuto. Depois de secas foram coradas pancromicamente com corante May-Grunwald-Giemsa-Wright (TAVARES-DIAS e MORAES, 2003) para posterior contagem em microscopia de luz. Foram contadas até 100 células dentre os diferentes tipos acumulados no foco inflamatório.

### **Análise estatística**

Os dados foram analisados pelo teste F, segundo PIMENTEL GOMES (2000) e BARBIN (2003), ao nível de 5,0% de probabilidade. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), no esquema fatorial 2x2x3, correspondente a dois níveis de parede celular de levedura (0,0 e 0,3% parede celular), dois tratamentos (solução salina e vacina oleosa de *S. agalactae*) e três coletas após o desafio com *S. agalactie* (6h, 24h e 48h), com sete repetições.



## Resultados

Após o desafio com o *S. agalactiae* nenhuma ocorrência de mortalidade foi observada nos peixes alimentados com dietas suplementadas, independente do efeito vacinação (PSR 100%). Entre os submetidos à dieta controle, a mortalidade dos vacinados (G1) foi de 28,57% e a dos não vacinados (G2) foi de 38,09%, correspondendo à PSR de 25%. De todos os peixes que vieram à óbito, foi possível o isolamento de *S. agalactiae* a partir de rim e encéfalo.

A contagem de células acumuladas no foco inflamatório demonstrou que não houve interferência significativa da interação tripla dos efeitos dieta, vacinação e tempo (Tabela 2).

Tabela 02. Número médio de células totais e número médio percentual de células presentes no foco inflamado de tilápia do Nilo, alimentadas com dietas suplementadas com 0,3% de parede celular de levedura e vacinadas contra *Streptococcus agalactiae*.

Tratamentos	Variáveis					
	Células Totais	Tromb. (%)	Neutr. (%)	Macr. (%)	Linf. (%)	CGE (%)
Com Levedura	1775,47 a	24,13	1,05	0,45	56,76	17,58
Sem Levedura	778,03 b	21,01	2,53	1,27	64,08	11,08
Com Vacina	1517,64 a	22,88	1,25	1,04	57,73	17,07
Sem Vacina	1243,19 b	22,89	2,00	0,53	61,54	13,01
6 horas	1648,34 a	22,94	2,49	0,86	61,48	12,21
24 horas	1389,26 b	23,59	1,16	0,14	66,89	11,18
48 horas	1103,75 c	25,03	1,29	1,32	51,07	21,28
<b>F para:</b>						
Levedura (L)	407,37 *	0,44 ns	2,01 ns	2,01 ns	1,95 ns	1,82 ns
Vacina (V)	32,10 *	0,00 ns	0,54 ns	0,80 ns	0,55 ns	0,74 ns
Tempo (T)	42,52 *	0,31 ns	0,67 ns	1,46 ns	3,31 ns	1,87 ns
L X V	5,45 *	4,04 *	6,09 *	2,12 *	1,84 *	0,60 ns
L X T	39,14 *	1,26 ns	3,10 *	0,17 ns	4,02 *	1,33 ns
V X T	5,71 *	2,06 ns	1,54 ns	2,46 *	5,69 *	0,68 ns
L X V X T	23,34 ns	0,33 ns	0,17 ns	0,55 ns	0,34 ns	0,88 ns
CV	14,7	74,36	61,2	85,77	35,95	131,9

Para cada variável aferida, em cada fator de variação, médias seguidas de letras distintas diferem entre si, no nível de 5% de probabilidade

Ao analisar-se o número de células totais na interação dieta x vacinação, observou-se que o maior número de células ocorreu nos peixes alimentados com dieta suplementada e vacinados, e o menor, nos alimentados com ração controle e não vacinados. O número de células totais foi significativamente maior nos peixes alimentados com dietas suplementadas, independentemente da vacinação. Nos alimentados com a dieta controle, o maior número ocorreu entre os vacinados, com significativa diferença em relação aos não vacinados (Tabela 3).

Os peixes alimentados com dietas suplementadas apresentaram diminuição no número de leucócitos totais ao longo das coletas, comportamento oposto aos peixes alimentados com a ração controle. O número de células totais diminuiu com o tempo entre os vacinados e não vacinados. Porém, independentemente do tempo da análise, o valor desta variável foi significativamente maior nos vacinados (Tabela 4).

Tabela 3. Efeito da interação entre os níveis de parede celular de levedura e vacinação sobre o valor de células totais de tilápia do Nilo.

<b>Células Totais</b>	Com Vacina	Sem Vacina
0,3 % parede celular de levedura	1824,76 A	1726,19 A
0,0% parede celular de levedura	1021,53 Ba	567,00 Bb

Médias seguidas de letras distintas, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, diferem no nível de 5%

Tabela 4. Efeito da interação entre tempo e níveis de parede celular de levedura ou vacinação sobre o valor de células totais de tilápia do Nilo.

<b>Células Totais</b>	6 horas	24 horas	48 horas
0,3 % parede celular de levedura	2292,85 Aa	1655,00 Ab	1378,57 Ac
0,0% parede celular de levedura	645,77 Ba	975,88 Bb	719,00 Bc
Com Vacinação	1900,00 Aa	1520,00 Ab	1165,00 c
Sem Vacinação	1417,66 Ba	1269,41 Bb	1042,50 c

Para cada fator, médias seguidas de letras distintas, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, diferem no nível de 5%

O maior número de trombócitos foi observado entre os vacinados. Nos não vacinados a dieta esteve associada à diferenças acentuadas, porém, não significativas. O maior número foi observado nos peixes alimentados com dietas suplementadas e o menor nos submetidos à dieta controle (Tabela 5).

Tabela 5. Efeito da interação entre os níveis de parede celular de levedura e vacinação sobre o valor percentual de trombócitos de tilápia do Nilo.

<b>Trombócitos (%)</b>	Com Vacina	Sem Vacina
0,3 % parede celular de levedura	27,84	20,43
0,0% parede celular de levedura	26,33	14,87

Médias seguidas de letras distintas, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, diferem no nível de 5%

O número de neutrófilos foi significativamente maior nos peixes alimentados com dietas suplementadas, sendo maior entre os vacinados. Nos alimentados com a dieta controle, o maior número de neutrófilos ocorreu entre os não vacinados. Independentemente da dieta, o efeito vacinação não determinou diferenças significativas no número destas células (Tabela 6).

Os peixes alimentados com dietas suplementadas apresentaram número de neutrófilos significativamente maior do que os que receberam ração controle, na primeira (6h) e segunda coleta (24h) (Tabela 7). Nos primeiros, ocorreu significativa diminuição entre elas e nos alimentados com a ração controle, não houve diferença significativa.

Tabela 6. Efeito da interação entre os níveis de parede celular de levedura e vacinação sobre o valor percentual de neutrófilos de tilápia do Nilo.

<b>Neutrófilos (%)</b>	Com Vacina	Sem Vacina
0,3 % parede celular de levedura	4,31 A	3,65 A
0,0% parede celular de levedura	0,48 B	1,75 B

Médias seguidas de letras distintas, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, diferem no nível de 5%

Tabela 7. Efeito da interação entre tempo e níveis de parede celular de levedura ou vacinação sobre o valor percentual de neutrófilos de tilápia do Nilo.

<b>Neutrófilos (%)</b>	6 horas	24 horas	48 horas
0,3 % parede celular de levedura	4,80 Aa	2,97 Ab	0,16c
0,0% parede celular de levedura	1,00 B	0,12 B	0,14

Médias seguidas de letras distintas, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, diferem no nível de 5%

O número de macrófagos foi significativamente maior nos peixes vacinados, independentemente do efeito dieta. Entre os não vacinados, o maior número foi observado nos alimentados com ração controle (Tabela 8).

A análise desta variável ao longo do tempo demonstrou que nos peixes vacinados, houve diminuição significativa entre a primeira (6h) e segunda (24h) coleta e aumento entre a segunda e terceira (48h). O mesmo comportamento foi observado nos peixes não vacinados, porém sem diferenças significativas. Embora o número de macrófagos tenha sido maior em todas as coletas nos peixes vacinados, esta diferença em relação aos não vacinados somente foi significativa na terceira coleta (Tabela 9).

Tabela 8. Efeito da interação entre os níveis de parede celular de levedura e vacinação sobre o valor percentual de macrófagos de tilápia do Nilo.

<b>Macrófagos (%)</b>	Com Vacina	Sem Vacina
0,3 % parede celular de levedura	2,25 a	0,51 b
0,0% parede celular de levedura	2,09 a	0,56 b

Médias seguidas de letras distintas, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, diferem no nível de 5%

Tabela 9. Efeito da interação entre tempo e os níveis de parede celular de levedura ou vacinação sobre o valor percentual de macrófagos de tilápia do Nilo.

<b>Macrófagos (%)</b>	6 horas	24 horas	48 horas
Com Vacinação	1,21a	0,18 b	2,42 Ac
Sem Vacinação	0,22	0,11	0,47 B

Médias seguidas de letras distintas, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, diferem no nível de 5%

O maior número de linfócitos ocorreu nos peixes vacinados e alimentados com dietas suplementadas. O menor nos alimentados com a ração controle e não vacinados. Entre os não vacinados, a dieta com levedura influenciou positiva e significativamente o número de linfócitos (Tabela 10). Nos peixes alimentados com dietas suplementadas, ocorreu discreto aumento entre a primeira e segunda coleta, e significativa diminuição na terceira. Nos vacinados, ocorreu significativa redução, mais acentuada na terceira coleta.

Nos peixes alimentados com a ração controle ou não vacinados, observou-se tendência de aumento no número de linfócitos entre a primeira e segunda coleta e discreta diminuição na terceira, porém com valores ainda superiores aos da primeira coleta (Tabela 11).

Tabela 10. Efeito da interação entre os níveis de parede celular de levedura e vacinação sobre o valor percentual de linfócitos de tilápia do Nilo.

<b>Linfócitos (%)</b>	Com Vacina	Sem Vacina
0,3 % parede celular de levedura	66,84 a	61,69 Ab
0,0% parede celular de levedura	61,44	52,09 B

Médias seguidas de letras distintas, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, diferem no nível de 5%

Tabela 11. Efeito da interação entre tempo e os níveis de parede celular de levedura ou vacinação sobre o valor percentual de linfócitos de tilápia do Nilo.

<b>Linfócitos (%)</b>	6 horas	24 horas	48 horas
0,3 % parede celular de levedura	64,75 a	65,61 a	39,93 Ab
0,0% parede celular de levedura	56,41	68,85	66,66 B
Com Vacinação	69,35 a	68,58 a	37,85 Ab
Sem Vacinação	54,27	66,10	64,26 B

Para cada fator, médias seguidas de letras distintas, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, diferem no nível de 5%

## Discussão

A redução da porcentagem de mortalidade sob condições de imunossupressão, devido à suplementação com levedura, foi descrita para a carpa indiana (SAHHO e MUKHERJEE, 2002) e salmonídeos infectados com *Vibrio anguillarum* e alimentados com 0,2 % de parede celular (BURRELS et al., 2001). Entretanto, nem sempre a suplementação alimentar com levedura é capaz de melhorar a resposta imune e aumentar a resistência de peixes submetidos ao estresse (BRIDLE et al., 2005).

Os resultados deste trabalho diferem das observações de BRIDLE et al. (2005), pois durante esta pesquisa nenhuma mortalidade ocorreu nos peixes alimentados com dietas suplementadas, o que sugere aumento da eficiência dos mecanismos de defesa. Glicanos e mananos presentes na composição da *S. cerevisiae* e derivados (autolisado e parede celular) quando utilizados na alimentação, determinam incremento da resposta inflamatória, inclusive aumentando a resistência contra patógenos (SAKAI,

1999; SAKAI et al., 2001; SCAPINELLO et al., 2001ab; ORTUÑO et al., 2002; LI e GATLIN III, 2003; LI et al., 2004).

A menor mortalidade observada nos peixes alimentados com a ração controle e vacinados, em relação aos alimentados com a ração controle e não vacinados, sugere que a vacinação melhora a condição orgânica, tornando-os mais resistentes ao desafio. Estes dados corroboram com KLESIUS et al. (2000) e EVANS et al. (2004) que observaram mortalidade significativamente menor em peixes vacinados e desafiados por *S. agalactiae*. Entretanto, a baixa porcentagem de sobrevivência relativa (PSR) observada no presente trabalho entre os peixes que receberam dieta controle (25%), em comparação aos peixes submetidos à suplementação dietética (100%), sugere melhor eficácia da vacina na proteção dos peixes, em associação com a suplementação dietética com parede celular de levedura.

PRETTO-GIORDANO (2007) observou PSR de 83,6% em tilápias vacinadas com apenas uma dose contendo  $2,0 \times 10^8$  UFC /mL de *Streptococcus agalactiae* inativado por formalina e desafiadas após 30 dias com a cepa homóloga contendo  $3,0 \times 10^6$  UFC /mL. Quando os peixes foram vacinados com duas doses, à intervalo de 21 dias, a PSR foi de 96,4%. Portanto, é provável que o reforço vacinal no presente trabalho, poderia contribuir com a proteção dos peixes ao desafio experimental.



Adicionalmente, vários fatores podem influenciar a eficácia da vacina, sendo eles: composição e concentração da vacina, via de inoculação, idade dos peixes, temperatura da água, concentração do inóculo para o desafio, período de observação pós-desafio, espécie e cepa de estreptococos, uso de adjuvantes e dose reforço, entre outros.

O acúmulo de leucócitos no sítio lesado é uma das principais características do processo inflamatório. A mobilização adequada e em tempo hábil de leucócitos da microcirculação para o foco inflamatório pelo mecanismo de quimiotaxia é uma das etapas fundamentais da reação e se traduz na primeira ação de defesa do organismo e na principal característica do fenômeno (GARCIA-LEME, 1989). Entretanto, a literatura é controversa em relação aos tipos celulares que constituem o componente celular da inflamação em peixes, particularmente nos processos não granulomatosos.

MACARTHUR et al. (1984) avaliaram o efeito da injeção de lipopolissacarídeo B de *Escherichia coli* na cavidade peritoneal de *Pleuronectes platessa* e verificaram aumento significativo no número de leucócitos totais naquela cavidade. Tais observações foram confirmadas neste trabalho, uma vez que após a inoculação de *S. agalactiae* na cavidade peritoneal, ocorreu acúmulo significativo de leucócitos totais no foco inflamado e significativamente nos grupos que receberam suplementação

alimentar com parede celular de levedura. Esse fato sugere que a suplementação incrementa a resposta inflamatória, favorecendo a defesa do organismo.

Outros autores comprovaram o aumento da resistência contra patógenos em peixes que receberam o mesmo suplemento, demonstrando sua ação benéfica (FIGUERAS et al., 1998; ESTEBAN et al., 2000; ORTUNO et al., 2002; GANNAM, 2005). Em modelo experimental semelhante, REQUE (2005) verificou maior acúmulo de células inflamatórias induzida por *A. hydrophila* inativada em tilápias alimentadas com dietas suplementadas com 0,3% de parede celular de levedura do que nas tilápias alimentadas com dietas suplementadas com 2,0% da levedura íntegra autolisada ou com ração sem levedura. Os resultados encontrados nessa pesquisa confirmam essa observação.

Segundo HILL e ROWLEY (1996) os trombócitos de peixes possuem funções de defesa expressa pela fagocitose e hemostasia graças aos mecanismos de agregação, contribuindo para manter o hospedeiro livre de microrganismos após dano vascular. Estudos *in vitro* demonstraram que *Staphylococcus aureus* foram fagocitados por trombócitos do exsudato peritoneal de *Cyprinus carpio* (SUZUKI, 1986), o mesmo ocorrendo com *Edwardsiella tarda* em *Anguilla japonica* (KUSUDA e IKEDA, 1987).

Inúmeros autores não fazem menção à presença de trombócitos na inflamação induzida por diferentes flogógenos, em diversas espécies de peixes, com filogenética variada (BODAMMER, 1986; JENKINS e KLESIUS, 1998). Todavia, outros obtiveram resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho. O exame de extensões do exsudato e microscopia eletrônica revelou a presença de 63,0% de trombócitos e 17,0% de macrófagos, respectivamente, três horas após o estímulo por carragenina (MATUSHIMA e MARIANO, 1996). No mesmo modelo de estudo de inflamação em pacus, seis horas após a injeção de carragenina, havia 79,0% de trombócitos e 31,0% de macrófagos acompanhados por número pouco expressivo de granulócitos e de linfócitos (MARTINS et al., 2006). BOZZO et al. (2007) observaram a presença marcante de trombócitos na inflamação induzida na bexiga natatória de pacus por *A. hydrophila* inativada e por tioglicolato, seis e 24 horas após o estímulo lesivo, sendo o mesmo verificado por REQUE (2005), utilizando a mesma bactéria como estímulo lesivo. A cepa utilizada por REQUE (2005) e BOZZO et al. (2007) era a mesma e oriunda de carne bovina.

Neste trabalho o maior número de trombócitos entre os peixes vacinados, independentemente da dieta, sugere que a vacinação possa contribuir com a atividade destas células, efeito que pode ser incrementado na associação com a suplementação com parede celular de levedura. Esses

achados reforçam a idéia de que os trombócitos, ao lado dos leucócitos, também atuam como célula de defesa do organismo em peixes, como já observado por TAVARES-DIAS e MORAES (2004); REQUE (2005); BOZZO et al. (2007) e TAVARES-DIAS et al. (2007).

Os neutrófilos são fagócitos com atividade citotóxica não específica (SASAKI et al., 2002). WHITTINGTON et al. (2005) observaram que o aumento da resistência às doenças pela ação da parede celular de levedura ocorre mais pela resposta inflamatória inata do que pela resposta imune adaptativa. Essa conclusão em relação ao tipo celular referido é óbvia, uma vez que não participa de respostas relacionadas à memória imune, seja qual for a espécie de vertebrado considerada. Neste trabalho os peixes que receberam dieta suplementada apresentaram número de neutrófilos significativamente maior do que os alimentados com a ração controle, independentemente da vacinação.

ELLIS (1976, 1977) descreveu o predomínio de neutrófilos no foco inflamatório de peixes desafiados por diferentes flogógenos, até 48 horas quando começaram a ser substituídos pelos mononucleares. Nas condições do presente trabalho, foi verificada drástica diminuição de neutrófilos a partir da segunda coleta (24h). Uma hipótese é que esta diminuição esteja associada aos fatores de virulência do patógeno, uma vez que este tipo de resposta pode ser direcionada para as características do microrganismo

(FEARON e LOCKSLEY, 1996). Em mamíferos, ao contrário de peixes, esse fato é muito claro (MORAES et al., 1987) e ocorre porque os neutrófilos têm menor velocidade de quimiotaxia e vida média relativamente curta, cerca de 24 a 48 horas no foco lesado (GARCIA-LEME, 1989).

Quando o agente persiste na lesão inflamatória, a reação tende a cronificar-se, com o acúmulo de macrófagos inflamatórios, linfócitos, plasmócitos, além de componentes de tecido conectivo como fibroblastos, fibras colágenas, neovasos e, na dependência do agente causal, eosinófilos (COTRAN et al., 1996). Paralelamente à diminuição do número de neutrófilos, foi observado o aumento significativo do número de macrófagos, que ocorreu no grupo de peixes vacinados, independentemente do efeito dieta. Então a suplementação alimentar foi importante na estimulação da resposta inespecífica aguda, enquanto que a vacinação, à estimulação de resposta imune inespecífica tardia, representada pelo maior número de macrófagos. É possível que os peixes submetidos à dieta com 0,3% de parede celular de levedura disponham de maior fonte de energia para suprir a demanda imposta pela reação inflamatória no que tange à atividade de vasos, células e liberação, síntese ou neo-formação de mediadores farmacológicos que controlam o fenômeno.

A forma de atuação de imunoestimulantes sobre o fenômeno inflamatório foi sugerida por BRICKNELL e DALMO (2005). Segundo estes autores, diferentes leucócitos podem apresentar configurações distintas de receptores de reconhecimento, podendo ocorrer variações da resposta de acordo com o tipo de ligação do receptor e dos eventos de transmissão dos sinais intracelulares. Todavia, é uma hipótese de difícil aceitação visto a necessidade da estimulação e diferentes receptores para variados imunoestimulantes. Fato conhecido é que a reação inflamatória apesar de complexa é estereotipada em relação a estímulos de natureza diversa, como biológicos, físicos ou químicos. Ou seja, independentemente do tipo de estímulo ocorre vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, aumento da viscosidade sangüínea até a estase, marginação leucocitária, diapedese, quimiotaxia e fagocitose por células competentes (GARCIA - LEME, 1989; COTRAN et al., 1996).

Ratos alimentados com ração hipoprotéica ou diabéticos apresentam marcada diminuição da reação inflamatória no que se refere às respostas vasculares e celulares, porém sem alterar o padrão morfológico de resposta. O mesmo ocorre quando a concentração plasmática de corticosteróides adrenais está alta (GARCIA LEME, 1989). Peixes confinados, independentemente da densidade populacional, estão em ambiente diferente daquele para o qual foram selecionados pela evolução

genética. Assim, é possível que mantenham alta demanda por energia mesmo que os níveis de cortisol estejam em padrões considerados normais. Desta forma, ao terem sua dieta suplementada com vitamina C (PETRIC et al., 2003; MORAES et al., 2003; BRUM, 2003), vitamina E (BELO, 2002), parede celular de levedura ou levedura íntegra e autolisada (REQUE, 2005), consigam maior patamar homeostático, reduzindo a estimulação do eixo hipotálamo-hipófise-interrenal com menor liberação de cortisol, favorecendo ou facilitando a resposta inflamatória de modo a tornar mais eficientes as defesas contra o patógeno.

Necessário ter em mente que quando os imunoestimulantes são injetados nos peixes, independentemente da cavidade ou tecido e da substância empregada, ocorre a inflamação. Ao serem desafiados, particularmente quando a mesma via é utilizada, os macrófagos já estarão em estado de alerta e responderão mais prontamente recrutando neutrófilos para o foco inflamado (FERREIRA, 1980).

Neste ensaio, a vacinação pode ter produzido esse tipo de efeito, apesar do tempo decorrido para desafio. Assim, para que fique caracterizada a participação do sistema imune específico, é necessária a titulação de anticorpos. De fato, quando o imunoestimulante é oferecido por via oral ocorre sua degradação pela digestão, fato que tornaria difícil, a sensibilização de receptores de membrana celular de qualquer leucócito.

Desse modo, o incremento da resposta inflamatória graças a um maior patamar homeostático facilitando a ação dos elementos que participam do processo torna-se idéia atraente e atende a um dos aspectos da resposta do hospedeiro que é a uniformidade. Essa padronização destaca-se quando se considera não só a inflamação, mas qualquer tipo de lesão celular em função da infinidade de tipos de agentes injuriantes de natureza biológica, química e física.

Neste trabalho, o maior número de linfócitos ocorreu nos peixes alimentados com dieta contendo levedura e vacinados, sendo assim, verificado efeito sinérgico positivo entre estes fatores. KLESIUS et al. (2000) e SHELBY et al. (2000) verificaram maior número de linfócitos em tilápias que foram vacinadas contra *S. iniae*, mas que não receberam  $\beta$  glicano de levedura. No presente trabalho, nos peixes exclusivamente vacinados, também foi verificado aumento no número de linfócitos, porém menor, em comparação aos peixes alimentados com dietas suplementadas e vacinados. Mais uma vez, com base nessas informações, a hipótese de que as substâncias ditas imunoestimulantes atuem por melhorar o patamar homeostático é atraente, pois na produção de anticorpos assim como na mobilização de leucócitos, a demanda energética aumenta.

A presença de linfócitos na cavidade peritoneal indica que o desafio estimulou os mecanismos de defesa e a resposta ocorreu. Entretanto, a



diminuição do número destas células especialmente a partir da terceira coleta nos peixes alimentados com dietas suplementadas ou vacinados, sugere que a resposta inflamatória foi eficiente no controle da infecção. Portanto, é possível concluir que, também em peixes, o acúmulo de células no foco inflamatório é fato relevante.

Os resultados deste trabalho sugerem que a suplementação alimentar com 0,3% de parede celular de levedura associada à vacinação, além de minimizar os problemas relativos à administração da substância isoladamente, melhora a resposta de defesa dos peixes, no que se refere à inflamação aguda e destaca a importância da vacinação.

## Referências Bibliográficas

- AL-HARB, A. H. First isolation of *Streptococcus* sp from hybrid tilapia (*Oreochromus niloticus* x *O. aureus*) in Saudi Arabia. **Aquaculture**, v.128, p.263-271, 1994.
- AMEND, D. F. Potency testing of fish vaccines. **Development in biological standartization**, v.49, p.447-454, 1981.
- BACCARIN, A. E.; PEZZATO, L. E. Efeito da utilização da levedura desidratada de álcool em dietas para tilápia do Nilo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36 (3), p. 549-556, 2001.
- BARBIN, D. Planejamento e análise de experimentos agrônômicos. Arapongas: Midas, 2003. 208 p.
- BELO, M.A.A. **Efeito do estresse e da suplementação alimentar com vitamina E sobre a formação de gigantócitos em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo de *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887**. 2002. 65 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, 2002.
- BODAMMER, J.E. Ultrastructural observations on peritoneal exudates cells from the striped bass. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 12, p. 127-140, 1986.
- BOZZO, F. R., MORAES, J. R. E., MORAES, F. R., PEREIRA, G., TAVARES-DIAS, M., ONAKA, E. M. Kinetics of cellular component in inflammatory response induced by different stimuli in the swim bladder of pacu *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Characidae). **Journal of the World Aquaculture Society**, v.38, p.302 - 308, 2007.
- BRICKNELL, I.; DALMO, R.A. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. **Fish & Shellfish Immunology**, London, v. 19, n. 5, p.457-472, 2005.

BRIDLE, A.R., CARTER, C.G., MORRISON, R.N., NOWAK, B.F. The effect of b-glucan administration on macrophage respiratory burst activity and Atlantic salmon, *Salmo salar* L., challenged with amoebic gill disease – evidence of inherent resistance. **Journal of Fish Diseases**, v. 28, n. 6, p.347–376, 2005.

BRUM, C.D. **Efeito do estresse e da suplementação alimentar com vitamina C sobre a formação de gigantócitos em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887**. 2002. 76 p. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura, Unesp, Jaboticabal, SP, 2003.

BURRELS, C.; WILLIAMS, P. D.; FORNO, P. F. Dietary nucleotides : a novel supplement in fish feeds, effects on resistance to disease in salmonids. **Aquaculture**, v.199, p.159-169, 2001.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Robbins - Patologia Estrutural e Funcional. 3ed. Editora Interamericana, 1996.

ELLIS, A. E. Leucocytes and related cells in the plaice *Pleuronectes platessa* **Journal of Fish Biology**, v.8, p.143-156, 1976.

ELLIS, A. E. The leucocytes of fish: A review. **Journal of Fish Biology**, v.11, p.453-491, 1977.

ESTEBAN, M.A.; MULERO, V.; CUESTA, A.; ORTUÑO, J.; MESEGUER, J., Effects of injecting chitin particles on the innate immune response of gilthead seabream (*Spaurus aurata* L.). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 10, p. 543–554. 2000.

EVANS, J.J.; WIEDENMAYER, A.A.; KLESIUS, P.H.; SHOEMAKER, C.A. Survival of *Streptococcus agalactiae* from fish following natural and experimental infections. **Aquaculture**, v.233, p.15-21, 2004.

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

FERREIRA , S.H. Are macrophages the body's alarm cells? **Agents and Actions**, v.10, p.227-230, 1980.

FIGUERAS, A.; SANTARÉM, M.M.; NOVOA, B. Influence of the sequence of administration of  $\beta$ -glucans and a *Vibrio damsela* vaccine on the immune response of turbot (*Scophthalmus maximus L.*). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.64, n.1, p.59-68, 1998.

S FREIMUND, S.; SAUTER, M.; KÄPPELI, O.; DUTLER, H. A new non-degrading isolation process for 1,3- $\beta$ -D-glucan of high purity from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Carbohydrate polymers**, Barking, v.2, p.159 – 171, 2003.

GANNAM, A. Immunostimulants in fish diets. In: SIMPÓSIO DE NUTRIÇÃO E SAÚDE DE PEIXES, 1., 2005, Botucatu: 2005, p.93-102.

GARCIA LEME, J. **Hormones and inflammation**. Boca Raton: CRC Press, 1989, p. 238.

HILL, D.J.; ROWLEY, A.F. The thromboxane mimetic, U-46619, induces the aggregation of fish thrombocytes. **Brazilian Journal of Haematology**, v. 92, p. 200-211, 1996.

HUBERT, R. M. Bacterial diseases in warm water aquaculture. In SHILO, M.; SARIG, S. (Ed.) *Fish Culture in Warm Water Systems. Problems and Trends*. Boca Raton: CRC, 1989. p. 194-197.

JENKINS, J.A.; KLESIOUS, P.H. Elicitation of macrophages from the peritoneal cavity of channel catfish. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 10, p. 69-74, 1998.

KITAO, T.; AOKI, T.; SAKOH, R. Epizootic caused by beta-haemolytic *Streptococcus* species in cultured freshwater fish. **Fish Pathology**, v.15, p.301-307, 1981.

KLESIOUS, P.H.; SHOEMAKER, C. A.; EVANS, J. J. Efficacy of a single and combined *Streptococcus iniae* isolate vaccine administered by intraperitoneal and intramuscular routes in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v.188, p.237-246, 2000.

KUSUDA, R.; IKEDA, Y. Studies on classification of eel leucocytes. **Nippon Suisan Gakkaishi**, v. 53, n. 2, p. 205-209, 1987.

LI, P.; GATLIN III, D.M. Dietary brewers yeast and the prebiotic Grobiotick AE influence growth performance, immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. **Aquaculture**, v.231, n. 5, p.445– 456, 2003.

LI, P.; LEWIS, D.H.; GATLIN III, D.M. Dietary oligonucleotides from yeast RNA influence immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. **Fish e Shellfish Immunology**, v.16, n. 5, p. 561 - 569, 2004.

MACARTHUR, J.I.; FLETCHER, T.C.; PIRIE, B.J.S.; DAVISON, R.J.L.; THOMSON, A.W. Peritoneal inflammatory cells in plaice, *Pleuronectes platessa* L.: effects of stress and endotoxin. **Journal of Fish Biology**, v. 25, p. 69-81, 1984.

MARTINS, M. L., MORAES, F. R., FUJIMOTO, R. Y., ONAKA, E. M., BOZZO, F. R., MORAES, J. R. E. Carrageenin induced inflammation in *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthues: Characidae) cultured in Brazil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.32, p.31 - 39, 2006.

MATUSHIMA, E.R.; MARIANO, M. Kinetics of the inflammatory reaction induced by carrageenin in the swimbladder of *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.33, n.1, p.5-10, 1996.

MING-CHEN, T.; CHEN, S. C.; TSAI, S. S. General septicemia of streptococcal infection in cage cultured tilapia in southern Taiwan. **CAO Fisheries Series, n. 4, Fish Disease Research (VII)**, 1985.

MORAES, F.R.; BECHARA, G.H.; MORAES, J.R.E. Effect of alloxan diabetes and adrenalectomy on carrageenin-induced pleurisy in the rat. **Brazilian Journal of Medicine and Biology**, São Paulo, v. 20, n. 1, p.47-53, 1987.

MORAES, J. R. E.; FREITAS, J. B.; BOZZO, F. R.; MORAES, F. R.; MARTINS, M. L. A suplementação alimentar com vitamina C acelera a evolução do processo cicatricial em *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 29, n. 1; p. 57-67, 2003.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **NUTRIENT REQUIREMENTS OF FISH**. Washington: Academy Press, 1993. 125p.

ORTUÑO, J.; CUESTA, A.; RODRÍGUEZ, A.; ESTEBAN, M.A.; MESEGUER, J. Oral administration of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the cellular innate immune responses of gilthead seabream (*Spaurus aurata L.*). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.85 (1-2). p.41-50, 2002.

PASNIK, D.J., EVANS, J.J., KLESIUS, P.H. Passive immunization of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) provides significant protection against *Streptococcus agalactiae*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 21, p.365-371, 2006.

PETRIC, M. C.; MARTINS, M. L.; ONAKA, E. M.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R.; MALHEIROS, E. B. Suplementação alimentar com vitamina C potencializa a formação de macrófagos policariontes em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae). B. Inst. Pesca, v. 29, n. 1, p. 69-76, 2003.

PIMENTEL GOMES, F. Curso de estatística experimental, 14<sup>a</sup> edição. Piracicaba, SP. 477p., 2000.

PLUMB, J. A. Infections diseases of tilapia. In: TILAPIA AQUACULTURE IN THE AMERICAS, edited by Costa-pierre, B. A. Rakocy, J. E; v.1, World Aquaculture Society, Baton Rouge, L. A, USA, 1997. v.1. p.212-218.

PRETTO-GIORDANO, L. G. ***Streptococcus agalactiae*: Avaliação da patogenicidade “in vivo” e eficácia da vacina experimental em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2007. 61f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

REQUE, V. R. **Suplementação alimentar com *Saccharomyces cerevisiae* na inflamação induzida por *Aeromonas hydrophila* em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2005. p.63 Dissertação (Mestrado em aquicultura). – Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, S.P., 2005.

ROMANO LA, MEJÍA J. Infección por *Streptococcus iniae*: Una enfermedad emergente que afecta a peces de cultivo y a humanos. **Revista AquaTIC**, n.18, 2003.

SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulants. **Aquaculture**, v. 172, p. 63-92, 1999.

SAKAI, M.; TANIGUCHI, K.; MAMOTO, K.; OGAWA, H.; TABATA, M. Immunostimulant effects of nucleotide isolated from yeast RNA on carp, *Cyprinus carpio* L. **Journal of Fish Diseases**, v. 24, n. 8, p. 433-438, 2001.

SALVADOR, R, MULLER, E. E.; FREITAS, J. C., LEONHARDT, J. H., PRETTO-GIORDANO, L.G.; DIAS, J. A. Isolation and characterization of group B *Streptococcus* spp from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) breeding in hapas nets and in earth nurseries in the north region of Parana State, Brazil. **Ciência Rural**, v.35, n. 6, p.1374-1378, 2005.

SAHOO, P. K.; MUKHERJEE, S. C. Effect of dietary 1,3  $\beta$ -glucan on immune responses and disease resistance of healthy and aflatoxin B<sub>1</sub>-induced immunocompromised rohu *Labeo rohita* Hamilton. **Fish Shellfish Immunol.**, v. 11, p.683-95, 2002.

SASAKI, Y.; MAITA, M.; OKAMOTO, N. Rainbow trout neutrophils are responsible for non-específica cytotoxicity. **Fish e Shellfish Immunology**, v. 12, p. 243-252, 2002.

SCAPINELLO, C.; FARIA, H.G.; FURLAN, A.C.; MICHELAN, A.C. Efeito da utilização de oligossacarídeo manose e acidificantes sobre o desempenho de coelhos em crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia, Viçosa**, v. 30, n. 4, p. 1272-1277, 2001a.

SCAPINELLO, C.; FARIA, H.G.; FURLAN, A.C.; MICHELAN, A.C. Efeito do uso de oligossacarídeo manose e acidificantes em rações com alto teor de amido, para coelhos em crescimento. **Acta Scientiarum, Maringá**, v. 23, n. 4, p. 1039-1043, 2001b.

SHELBY, R.A., KLESIOUS, P.H., SHOEMAKER, C.A., EVANS, J.J. Passive immunization of tilapia, *Oreochromis niloticus*, with anti-*Streptococcus iniae* whole sera. **Journal of Fish Diseases**, v.25, p.1 – 6, 2000.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; MORENO, S. Q. Variação dos parâmetros limnológicos em um viveiro de piscicultura nos períodos de seca e chuva. **Revista UNIMAR**, v.16, n.4., p.229-242, 1994.

SUZUKI, K. Morphological and phagocytic characteristics of peritoneal exudate cells in tilapia, *Oreochromis niloticus* and carp, *Cyprinus carpio* L. **Journal of Fish Biology**, v. 29, p. 349-364, 1986.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. Características hematológicas da *Tilapia rendalli* Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) capturada em "Pesque-Pague" de Franca, São Paulo, Brasil. **Bioscience**, v. 19, n. 1, 2003.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. Hematologia de peixes teleósteos. 1ª edição. Biblioteca Central – FMRP – USP: Ribeirão Preto – São Paulo, 144p. 2004.

TAVARES-DIAS, M.; ONO, E.A.; PILARSKI, F.; MORAES, F. R. Can thrombocytes participate in the removal of cellular debris in the blood circulation of teleost fish? A cytochemical study and ultrastructural analysis. **Journal of Applied Ichthyology**, 2007.

VANDAMME, P.; DEVRIESE, L.A.; POT, B.; KERSTERS, K.; MELIN, P. *Streptococcus difficile* is a nonhemolytic Group B, type Ib Streptococcus. **International Journal Systematic Bacteriology**, v.47, n.1, p.81-85, 1997.

WHITTINGTON, R.; LIM, C.; KLESZIUS, P.H. Effect of dietary  $\beta$ -glucan levels on the growth response and efficacy of *Streptococcus iniae* vaccine in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, v.248, p.217-225, 2005.

WU, S. Y. New bacterial disease of tilapia. **Fish Culture Bulletin**, v.23, p.3-40. 1970.