

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**RESPOSTA IMUNE DE TILÁPIAS DO NILO  
(*Oreochromis niloticus*) VACINADAS CONTRA  
*Streptococcus agalactiae***

**Paulo Fernandes Marcusso**

Médico Veterinário

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**RESPOSTA IMUNE DE TILÁPIAS DO NILO  
(*Oreochromis niloticus*) VACINADAS CONTRA  
*Streptococcus agalactiae***

**Paulo Fernandes Marcusso**

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

**Co-orientador: Prof. Dr. Rogério Salvador**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Patologia Animal).

2014

M322r      Marcusso, Paulo Fernandes  
Resposta imune de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*)  
vacinadas contra *Streptococcus agalactiae* / Paulo Fernandes  
Marcusso. -- Jaboticabal, 2014  
iv, 76 p.; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014  
Orientador: Flávio Ruas de Moraes  
Co-orientador: Rogério Salvador  
Banca examinadora: Marco Antônio de Andrade Belo, Sérgio  
Henrique Canello Schalh  
Bibliografia

1. Tilápia. 2. Inflamação. 3. Estreptococose. 4. Anticorpos  
5. Exsudato. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências  
Agrárias e Veterinárias.

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.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

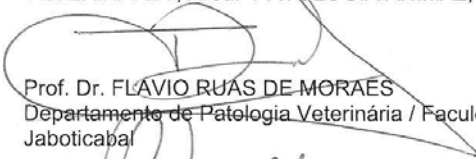
**TÍTULO:** RESPOSTA IMUNE DE TILÁPIAS DO NILO (*Oreochromis niloticus*) VACINADAS  
CONTRA *Streptococcus agalactiae*

**AUTOR:** PAULO FERNANDES MARCUSO

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. FLAVIO RUAS DE MORAES

**CO-ORIENTADOR:** Prof. Dr. ROGÉRIO SALVADOR

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MEDICINA  
VETERINÁRIA, Área: PATOLOGIA ANIMAL, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. FLAVIO RUAS DE MORAES

Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de  
Jaboticabal



Prof. Dr. MARCO ANTONIO DE ANDRADE BELO

Universidade Camilo Castelo Branco / Desçalvado/SP



Prof. Dr. SÉRGIO HENRIQUE CANELLO SCHALCH

Agência Paulista Tecnológica dos Agronegócios / Pindamonhangaba/SP

Data da realização: 28 de fevereiro de 2014.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**Paulo Fernandes Marcusso** – Nascido dia 30 de abril de 1988 em Porto Feliz Estado de São Paulo. Graduado Medicina Veterinária em julho de 2011 pela Universidade Estadual do Norte do Paraná. Realizou estágio de aperfeiçoamento técnico na área de microbiologia e imunopatologia de peixes no Laboratório de Imunopatologia de Peixes da Uenp – *Campus* Luiz Meneghel na cidade de Bandeirantes estado do Paraná. Durante a graduação de 2007 à 2009 foi bolsista do Programa Ciências Sem Fronteiras, categoria Extensão Universitária, no Laboratório de Imunopatologia de Peixes da Uenp – *Campus* Luiz Meneghel, onde desenvolveu trabalhos relacionados a vacinas de peixes e ictiosanidade. Em Janeiro de 2010 obteve bolsa da Fundação Araucária, categoria Iniciação Científica, para desenvolver o projeto intitulado “Influência da temperatura na sobrevivência de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) infectadas com *Streptococcus agalactiae*”. Em março de 2012 ingressou no programa de pós-graduação em medicina veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp, Departamento de Patologia Veterinária, *Campus* de Jaboticabal, sob a orientação do Prof. Dr. Flávio Ruas de Moraes. No mesmo período obteve bolsa de mestrado da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp).

Dedico este trabalho...

À Célio e Marcia, meus pais, por todo apoio e amor dedicados todos os dias de minha vida para que hoje eu possa estar realizando mais uma etapa. Agradeço pelos ensinamentos e pela educação que alicerçaram a construção do meu caráter. Me sinto privilegiado de tê-los ao meu lado sempre. Vocês são meus exemplos. Amo vocês.

À minha avó, Antônia Picco Marcusso pela grandeza de espírito, pelo amor ilimitado e pela confiança cega. O que nos une é mais que um sobrenome ou sangue, é o sentimento mais sincero e verdadeiro, o amor. Te amo.

**EPIGRAFE**

Enquanto os homens exercem seus podres poderes  
Motos e fuscas avançam os sinais vermelhos  
E perdem os verdes somos uns boçais

Queria querer gritar setecentas mil vezes  
Como são lindos, como são lindos os burgueses  
E os japoneses mas tudo é muito mais

Será que nunca faremos senão confirmar  
A incompetência da américa católica  
Que sempre precisará de ridículos tiranos?  
Será, será que será, que será, que será  
Será que esta minha estúpida retórica  
Terá que soar, terá que se ouvir por mais mil anos?

Enquanto os homens exercem seus podres poderes  
índios e padres e bichas, negros e mulheres  
E adolescentes fazem o carnaval

Queria querer cantar afinado com eles  
Silenciar em respeito ao seu transe, num êxtase  
Ser indecente mas tudo é muito mau

Ou então cada paisano e cada capataz  
Com sua burrice fará jorrar sangue demais  
Nos pantanais, nas cidades, caatingas e nos gerais  
Será que apenas os hermetismos pascoais  
Os toms, os miltons, seus sons e seus dons geniais  
Nos salvam, nos salvarão dessas trevas e nada mais?

Enquanto os homens exercem seus podres poderes  
Morrer e matar de fome, de raiva e de sede  
São tantas vezes gestos naturais

Eu quero aproximar o meu cantar vagabundo  
Daqueles que velam pela alegria do mundo  
Indo mais fundo tins e bens e tais

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, Oxalá e todos os Orixás pela permissão de estar encarnado, pela eterna fonte de amor e luz e pelos ensinamentos diários em minha vida que permitem minha evolução espiritual.

A toda minha família que esteve presente durante toda essa etapa, especialmente aos meus pais Célio e Marcia; irmãos Marcus, Eduardo e Pedro; minha cunhada Lívia; meus primos Éder, Gustavo e Lucas; minha primas Giovanna, Marina, Tamiris; minhas tias Cristina, Jane, Patrícia; meus tios Ricardo, Edson, Valdevino, Roberto, meus avós; Fábio, Nerso, Noemy e Antônia.

Aos meus eternos mestres Professores Doutores Flávio Ruas de Moraes e Rogério Salvador pela orientação, confiança, oportunidade e respeito.

A Banca Examinadora, Professores Dr. Marco Antônio de Andrade Belo e Dr. Sérgio Henrique Canello Schalch pelas observações e correções que acrescentaram e melhoraram o trabalho.

A uma das melhores equipes de trabalho que alguém poderia ter (ordem alfabética); Dayanne, Fausto, Gustavo, Isabela, Jefferson, Marina, Silas, Thalita, Thiago. Obrigado pela ajuda e parceria, sem vocês nada seria possível.

A minha turma de graduação, XIV turma de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Norte do Paraná – Uenp, que fazem falta todos os dias, tenho amigos de verdade e inesquecíveis.

Aos meus amigos de república os Piauienses Thiago Ibiapina, Ronny e Gabriel Júnior (Tranquilão), ao Gustavo Claudiano (Mano) e Lucas Boscov Braos, pela amizade e parceria.

Aos meus amigos da República Zona Rural de Bandeirantes, pela amizade, apoio e parceria.



Aos amigos boituvenses Tamires Antunes Fragozo, Eduardo Fernandes Ribeiro, Gabriel Fernandes Ribeiro, Felipe Fernandes Ribeiro e Ricardo Calegare.

Aos meus amigos Mutuca, Biliscado, Emo, Xaidizem e Dona Mel.

Aos funcionários do Departamento de Patologia Animal da FCAV - Unesp, especialmente a Cristina, Chica, Mabel e Moema.

Aos funcionários do Departamento de Patologia Geral do CLM – Uenp, especialmente a Marly Candido e Maria Imaculada.

A Supervisora da seção técnica de Pós-graduação Marcia Luciana Natareli dos Santos pela atenção, disposição e ajuda.


A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo apoio financeiro e por acreditar no trabalho.

Aos animais que deram sua vida para que o trabalho fosse realizado.

**unesp**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Jaboticabal**CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS****CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº 011687/12 do trabalho de pesquisa intitulado "**Resposta imune de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) vacinadas contra *Streptococcus agalactiae***", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Flávio Ruas de Moraes está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 03 de julho de 2012.

Jaboticabal, 03 de julho de 2012.

  
12/07/12

*Andrigo Barboza De Nardi*  
**Prof. Dr. Andrigo Barboza De Nardi**  
Coordenador - CEUA

## SUMÁRIO

### CAPÍTULO I – Considerações Gerais

|   |                                                             |    |
|---|-------------------------------------------------------------|----|
| 1 | INTRODUÇÃO .....                                            | 14 |
| 2 | OBJETIVOS.....                                              | 15 |
| 3 | REVISÃO DE LITERATURA .....                                 | 15 |
|   | 3.1 Piscicultura no Brasil .....                            | 15 |
|   | 3.2 Características do <i>S. agalactiae</i> em peixes ..... | 17 |
|   | 3.3 Sistema imune e inflamação em teleósteos.....           | 19 |
|   | 3.4 Vacinação em peixes .....                               | 22 |
|   | 3.5 Métodos de inativação bacteriana .....                  | 24 |
| 4 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                            | 25 |

### **CAPÍTULO II - Porcentagem relativa de sobrevivência e resposta imune de tilápias (*Oreochromis niloticus*) imunizadas com extrato bacteriano sonicado de *Streptococcus agalactiae***

|                                 |    |
|---------------------------------|----|
| Resumo .....                    | 36 |
| Introdução.....                 | 38 |
| Material e Métodos.....         | 39 |
| Resultados.....                 | 47 |
| Discussão .....                 | 52 |
| Referências Bibliográficas..... | 54 |

### **CAPÍTULO III - Resposta imune celular inespecífica de tilápias (*Oreochromis niloticus*) imunizadas com extrato bacteriano sonicado de *Streptococcus agalactiae***

|                                 |    |
|---------------------------------|----|
| Resumo .....                    | 58 |
| Introdução.....                 | 60 |
| Material e Métodos.....         | 61 |
| Resultados.....                 | 66 |
| Discussão .....                 | 54 |
| Referências Bibliográficas..... | 68 |

**LISTA DE ABREVIATURAS**

Abs – Absorbância  
CL – Concentração letal  
°C – Grau celsius  
CHCM – Concentração de hemoglobina corpuscular média  
dL – Decilitro  
DNA – Ácido desoxirribonucléico  
EDTA – Ácido etileno diamina tetra acético  
G – Giros por minuto  
g – Gramas  
Hb – Hemoglobina  
Ht – Hematócrito  
i.c. – Intracelomático  
L – Litro  
mg– Micrograma  
mL– Microlitro  
min – Minuto  
ng – Nanograma  
nm – Nanômetro  
od – Oxigênio dissolvido  
PBS – Tampão fosfato-salino  
pb – Pares de bases  
PCR – Reação em cadeia da polimerase  
pH – Potencial hidrogênico  
pM – Peso molecular  
PRS – Porcentagem relativa de sobrevivência  
rDNA – Ácido desoxirribonucléico ribossomal  
rpm – Rotações por minuto  
S/m – Siemens por metro  
t – Toneladas  
UFC – Unidades formadoras de colônias  
uL– Microlitro  
VCM – Volume globular médio

**LISTA DE FIGURAS****CAPÍTULO II - Porcentagem relativa de sobrevivência e resposta imune de tilápias (*Oreochromis niloticus*) imunizadas com extrato bacteriano sonicado de *Streptococcus agalactiae***

|                                                                                                                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Valores médios e respectivos desvios-padrão da titulação de anticorpos do grupo vacinado por meio da soroaglutinação direta em microplaca nos tempos pré-estabelecidos das coletas. .... | 46 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO II - Porcentagem relativa de sobrevivência e resposta imune de tilápias (*Oreochromis niloticus*) imunizadas com extrato bacteriano sonicado de *Streptococcus agalactiae***

- Tabela 1.** Valores médios ( $\pm$  desvio padrão) e análise de variância das concentrações de proteínas totais plasmáticas (PTT), albumina e globulinas (g/dL), nos grupos controle e vacinado, nos tempos de coletas. Valores bioquímicos dos animais imunizados com a fração insolúvel do *S. agalactiae* sonicado nos respectivos tempos de coleta .....48
- Tabela 2.** Valores médios ( $\pm$  desvio padrão) e análise de variância para contagem de leucócitos totais, trombócitos, linfócitos, monócitos e granulócitos do sangue de tilápias (*O. niloticus*) vacinadas e controle (PBS) nos tempos pré-estabelecidos.....49

### **CAPÍTULO III - Resposta imune celular inespecífica de tilápias (*Oreochromis niloticus*) imunizadas com extrato bacteriano sonicado de *Streptococcus agalactiae***

- Tabela 1.** Valores médios ( $\pm$  desvio padrão) e análise de variância para contagem de leucócitos totais, trombócitos, linfócitos, macrófagos e granulócitos do exsudato de tilápias (*O. niloticus*) injetadas com a fração insolúvel + adjuvant incompleto de Freund, injetadas com PBS + adjuvant incompleto de Freund e apenas com PBS (controle) depois de 6, 24 e 48 horas .....67

**RESPOSTA IMUNE DE TILÁPIAS DO NILO  
(*Oreochromis niloticus*) VACINADAS CONTRA *Streptococcus agalactiae***

**RESUMO**

A estreptococose provoca grandes perdas em sistemas de criação intensiva de tilápias no Brasil e uma das soluções é a utilização de vacinas. Assim, este estudo avaliou a resposta imune celular e humoral a uma vacina contra *S. agalactiae* e utilizou 425 tilápias do Nilo, *O. niloticus* ( $200 \pm 25$  g). Primeiramente foi determinada a porcentagem relativa de sobrevivência (PRS) para avaliar qual das porções (solúvel ou insolúvel) obtidas do *S. agalactiae* sonicado seria mais eficiente. Para tanto foram constituídos quatro grupos ( $n=20$ ), onde o grupo 1 (G1) foi injetado com PBS; grupo 2 (G2) com PBS + adjuvante incompleto de Freund; grupo 3 (G3) imunizado com a fração solúvel + adjuvante incompleto de Freund e grupo 4 (G4) imunizado com a fração insolúvel + adjuvante incompleto de Freund. Após 21 dias da imunização os peixes foram desafiados com cepa homóloga ( $CL_{50}$ ), resultando numa PRS de 100, 50 e 16,7% para G4, G3 e G2, respectivamente. Com base nestes resultados utilizou-se a fração insolúvel para avaliar a resposta imune humoral. Neste caso foram constituídos dois grupos; Grupo 5 injetado com PBS (controle) e Grupo 6 imunizado com a fração insolúvel + adjuvante incompleto de Freund, via i.c. Foram realizadas coletas de sangue nos tempos zero, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 60, 90 dias pós-vacinal. A avaliação da resposta imune foi feita por meio da soroprecipitação direta em microplaca. Os resultados demonstraram que o grupo vacinado apresentou titulação a partir do 21º, com resposta máxima no 60º dia pós vacinal. Para avaliar o componente celular da resposta inflamatória inespecífica provocada pela vacinação foram utilizados três grupos ( $n=63$ ), sendo Grupo 7 (controle) injetados com PBS, o Grupo 8 com PBS + adjuvante incompleto de Freund e Grupo 9 imunizado com a fração insolúvel + adjuvante incompleto de Freund, as injeções foram realizadas na bexiga natatória. A coleta dos exsudatos se deu nos tempos de 6, 24 e 48 horas. Os resultados do exsudato demonstram que após 24 horas houve a maior taxa de acúmulo celular na bexiga natatória e houve diferença entre os grupos com relação ao número de granulócitos e de macrófagos acumulados.

**Palavra-chave:** tilápia, inflamação, estreptococose, anticorpos, exsudato

## ABSTRACT

Streptococcal infection causes significant losses in intensive farmed of tilapia in Brazil and one of the solutions is the use of vaccines. Thus, this study assessed the humoral and cellular immune response to a vaccine against *S. agalactiae*; and to this end were used 425 Nile tilapia, *O. niloticus* ( $200 \pm 25$  g). Firstly, the relative percentage of survival (PRS) was determined to evaluate which portions of sonicate *S. agalactiae* (soluble or insoluble) would be more efficient. For this, four groups were formed (n=20), G1 – injected with PBS, G2- injected with PBS + adjuvant incomplete of Freund; G3- immunized with the soluble fraction + adjuvant incomplete of Freund; G4 - immunized with the insoluble fraction + adjuvant incomplete of Freund. 21 days after immunization, fish were challenged with homologous strains (LC50) resulting in a PRS 100, 50, and 16.7% to G4, G3, and G2, respectively. Based on these results, the insoluble fraction was used to evaluate the humoral immune response. Group 5 (G5) was injected with PBS (control) and Group 6 (G6) was immunized with the insoluble fraction + incomplete Freund's adjuvant, intracoelomic route. They were performed blood samples at 0; 7; 14; 21; 28; 35; 42; 60, and 90 days post-vaccination. The evaluation of immune response was made by direct agglutination test in microplaque. The results showed that the vaccinated group presented titration from 21th day, with maximal response at 60 days post vaccination. To assess the cellular component of the nonspecific inflammatory response elicited by vaccination, three groups were used (n = 63), G7 – injected with PBS, G8- injected with PBS + incomplete Freund's adjuvant, G9 - immunized with the insoluble fraction + incomplete Freund's adjuvant. All injections were performed in the swim bladder. Therefore, we collected exudates at 6, 24, and 48 hours post-stimulus. The exudate results showed that after 24 hours there was a higher rate of cell accumulation in the swim bladder and there was no difference between the groups regarding the number of granulocytes and macrophages accumulated.

**Keywords:** Tilapia, inflammation, streptococcal infection, antibodies, exudates



## **CAPÍTULO I – Considerações Gerais**

## 1. INTRODUÇÃO

A piscicultura avança significativamente nas áreas de melhoramento genético, manejo, sanidade e nutrição. É uma importante fonte de proteína, com alto valor nutritivo para consumo humano e é recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), por isso torna-se cada vez mais procurada pelo consumidor (MPA, 2011).

A intensificação dos sistemas de produção é acompanhada pelo elevado adensamento populacional, diminuição da qualidade da água que aliada a outros fatores, como o manejo zootécnico, causa estresse nos animais, tornando-os mais susceptíveis a doenças bacterianas e parasitárias, com prejuízo do ganho de peso e do crescimento dos peixes (TORRECILAS et al., 2007).

A septicemia por *Streptococcus* sp. é uma das maiores causas de perdas na tilapicultura e está presente em diversos estados e sistemas de criação brasileiros (EVANS et al., 2002; SALVADOR et al., 2005; 2012).

Para minimizar tais efeitos é comum a utilização de drogas antimicrobianas que podem ser adicionadas à ração. No entanto esta prática seleciona bactérias resistentes, além de provocar desequilíbrio da flora bacteriana intestinal dos peixes (YOUSEFIAN; AMIRI, 2009; BELEM-COSTA; CYRINO, 2006).

A vacinação dos peixes de cativeiro é a alternativa ao uso de antibióticos e outros fármacos na prevenção de infecções (ROMANO; MEJÍA, 2003; SACCHETINI et al., 2010). Haja vista a crescente preocupação com a saúde pública e a adoção de Boas Práticas de Manejo (BPMs) durante o ciclo de produção animal (QUEIROZ et al., 2005).

## 2. OBJETIVOS

Com base nas considerações anteriormente citadas o presente trabalho teve como objetivo avaliar as respostas imunes celular e humoral induzidas em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) imunizadas contra *S. agalactiae* por meio de vacinas inativadas por sonicação, por meio das determinações:

- Da porcentagem relativa de sobrevivência dos peixes imunizados com diferentes vacinas e desafiados com *S. agalactiae*.
- Do efeito das vacinas sobre a resposta imune humoral das tilápias contra *S. agalactiae*.
- Do perfil hematológico após as vacinações contra *S. agalactiae* e na vigência das resposta imune humoral.
- Da resposta imune celular inespecífica dos animais imunizados com a vacina contra *S. agalactiae*.

## 3. Revisão de Literatura

### 3.1 Piscicultura no Brasil

A produção de pescado nacional registrou em 2011 um incremento de 13,2% em relação a 2010, totalizando 1.431.974,4 toneladas (t). A pesca extrativa marinha continuou sendo a principal fonte de produção de pescado nacional e responsável por 553.670,0 t (38,7% do total de pescado), seguida pela aquicultura continental (544.490,0 t; 38,0%), pesca extrativa continental (249.600,2 t; 17,4%) e aquicultura marinha (84.214,3 t; ~6%) (MPA, 2011).

O Nordeste é a região de maior produção de pescado no país, com 454.216,9 t, respondendo por 31,7% da produção nacional. As regiões Sul, Norte, Sudeste e Centro-Oeste registraram 336.451,5 t (23,5%), 326.128,3 t (22,8%), 226.233,2 t (15,8%) e 88.944,5 t (6,2%), respectivamente (MPA, 2011).

Em relação a produção estadual de pescado em 2011, o Estado de Santa Catarina se manteve como o maior produtor do Brasil, com 194.866,6 t (13,6%), seguido pelos estados do Pará com 153.332,3 t (10,7%) e Maranhão com 102.868,2 t (7,2%). O estado de São Paulo encontra-se na décima posição com aproximadamente 80.000,0 t (~ 5,5%) (MPA, 2011).

Atualmente, existe uma tendência crescente de intensificação e fortalecimento de integração entre os setores pesqueiros, especialmente, em decorrência da demanda crescente por produtos com elevado valor nutritivo como aqueles preparados a base de pescado. Desta forma, torna-se necessária a realização de pesquisas direcionadas para obtenção de uma produção cada vez mais eficiente e sustentável (REIS NETO, 2012).

Embora o Brasil apresente condições de produzir, de maneira sustentável, 20 milhões de toneladas de pescado por ano, o principal entrave para o país alcançar posição de destaque na aquicultura mundial, é a baixa competitividade para exportação, especialmente de tilápias (peixe mais produzido no país), necessitando portanto de investimentos no setor e consolidação do segmento como ocorreu na área de frigoríficos de carne bovina (MENDES; VELOSO, 2012).

A tilápia é a espécie mais cultivada no Brasil devido a elevada produtividade, precocidade, adaptabilidade em diversas condições ambientais, excelente conversão alimentar, pouca susceptibilidade a doenças parasitárias e elevada resistência a baixas concentrações de oxigênio (FIGUEIREDO; VALENTE, 2008; FITZSIMMONS; MARTINEZ-GARCIA; GONZALES-ALANIS, 2011). Além disso, a referida espécie possui carne de boa qualidade, branca e de textura firme, ausência de espinhas em “Y”, sabor delicado e agradável (CONTE, 2002). Estas qualidades têm como consequência a elevada aceitação pelos consumidores no mercado nacional e internacional (PEREIRA; GAMEIRO, 2007).

O ciclo de produção da tilápia inicia-se com os alevinos até atingirem em média 30 -50 gramas, em seguida passam para a fase de engorda e finalmente são abatidos com peso entre 800 a 1000 g, variando em função do mercado consumidor.

O tempo necessário para que atinja o tamanho comercial pode variar de cerca de quatro meses a um ano, em função de vários fatores como o tipo de alimentação, temperatura, qualidade da água, densidade de estocagem, entre outros (LEITE, 2009).

### **3.2 Características do *Streptococcus agalactiae* em peixes**

O *Streptococcus agalactiae* é um patógeno cosmopolita (EVANS; KLESZIUS; SHOEMAKER, 2006) que provoca surtos infecciosos com altas taxas de morbidade e mortalidade, especialmente na tilapicultura. A mortalidade em criação de cativeiro atinge taxas de até 90% na idade pré-comercialização, quando volumes substanciais de ração já foram consumidos (SALVADOR et al., 2005; ABUSELIANA et al., 2010; ZAMRI-SAAD et al., 2010).

Os estreptococos patogênicos possuem várias características que contribuem para sua virulência, como a aderência às superfícies epiteliais, capacidade de invasão de epitélio e endotélio e injúria direta aos tecidos (NIZET, 2002).

A principal via de transmissão é a horizontal pelo contato com peixes e/ou alimentos contaminados, como também pelo contato indireto mediado pela água dos sistemas de criação (LIM; WEBSTER, 2006). A bactéria é excretada pelas fezes de peixes infectados e pode permanecer viva na coluna de água aumentando a possibilidade de transmissão fecal-oral (NGUYEN et al., 2002). Outra importante via é a oral através do canibalismo de animais mortos ou moribundos (WONGSATHEIN, 2012). Jiménez et al. (2011) não constataram transmissão vertical do *S. agalactiae* em tilápias infectadas naturalmente, pois não detectaram as bactérias nas larvas oriundas do peixes progenitores infectados.

Os principais sinais clínicos são anorexia, escurecimento da pele, natação errática, rodopio, letargia, curvatura do corpo, exoftalmia acompanhada de opacidade de córnea e/ou hemorragia intraocular uni ou bilateral, sulfusões no opérculo e base das nadadeiras, ulceração da epiderme e morte. As lesões internas são caracterizadas por congestão branquial, hepatomegalia e esplenomegalia acompanhadas de congestão, ascite, e encefalomalácea (SALVADOR et al., 2003; 2005; TRABULSI; ALTERTHUM, 2005; FIGUEIREDO et al., 2006; MARCUSSO et al., no prelo).

A severidade da doença em tilápias está relacionada a fatores como a estirpe do *S. agalactiae*, dose infectante, temperatura da água, biomassa e manejo zootécnico (CHANG; PLUMB, 1996). Entretanto condições de alto adensamento, baixa qualidade da água e manejo inadequado induzem os animais ao estresse, que impõe alta exigência energética e leva ao esgotamento das reservas de glicogênio que parece favorecer a diminuição da resistência aos patógenos (EVANS et al., 2002; OBA et al., 2009).

A fisiopatologia da infecção por *S. agalactiae* não está totalmente esclarecida. Contudo os estudos iniciais partiram da associação da presença de colônias bacterianas em lesões hepáticas, esplênicas, renais e cerebrais em peixes naturalmente infectados (SUANYUK et al., 2005; ZAMRI-SAAD et al., 2010).

As bactérias causam necrose local, invadem e se multiplicam dentro de macrófagos que atuam como veículo para o *S. agalactiae*, permitindo a invasão e disseminação pela corrente sanguínea para vários órgãos, incluindo-se a transposição da barreira hematoencefálica, características de septicemia (ELDAR et al., 1994; EVANS et al., 2002; MUSA et al., 2009; NGUYEN et al., 2001).

O diagnóstico sugestivo de estreptococose é baseado na presença de sinais clínicos característicos da doença e na ocorrência de cocos Gram-positivos no cérebro, rim ou outros órgãos internos. Para realizar o diagnóstico definitivo faz-se o isolamento e

subsequente verificação das características sorológicas e/ou moleculares das bactérias (PAVANELLI et al., 2008; MARCUSSO et al., em prelo).

### **3.3 Sistema imune em teleósteos**

O processo inflamatório é uma reação às agressões físicas, químicas ou biológicas, na tentativa de diluir, circunscrever e isolar ou destruir o agente agressor (GARCIA LEME, 1989; KUMAR et al., 2004). Uma das suas principais características é a mobilização adequada e em tempo hábil, de leucócitos da microcirculação para o foco inflamado onde se acumulam (GARCIA LEME, 1989).

Nos mamíferos, a inflamação aguda tem duração relativamente curta, perdurando por minutos, horas, por um ou dois dias, e se caracteriza por vasodilatação arteriolar, capilar e venular; aumento de permeabilidade vascular e instituição de edema; aumento da viscosidade sanguínea e marginação leucocitária, diapedese, quimiotaxia, acúmulo de leucócitos no foco lesado e fagocitose por células competentes (GARCIA LEME, 1989; KUMAR, 2004; MORAES; MORAES, 2009). Este quadro sofre pequenas variações em função do tipo de tecido afetado, do agente causal, da intensidade da agressão e do nível de especificidade da resposta (GARCIA LEME, 1989). Independente da natureza do estímulo que a tenha iniciado, a inflamação aguda é estereotipada, isto é, obedece a um padrão semelhante de desenvolvimento (GARCIA LEME, 1989).

Reação semelhante, mas menos complexa, ocorre em peixes teleósteos, havendo, também, o acúmulo de células no foco lesado e fagocitose por células competentes. Outros mecanismos de defesa envolvem a produção de peptídeos para controle microbiano, atividade de lisozima, sistema complemento e outras proteínas sanguíneas (COLONNA et al., 2006).

Em peixes a resposta inflamatória foi avaliada por diversos autores que utilizaram diversas metodologias e abordagens, nas mais variadas espécies de peixes, o que dificulta

o conhecimento exato dos mecanismos envolvidos no processo inflamatório. Ellis et al. (1976) por injeção de carvão coloidal, analisaram as propriedades fagocíticas do tecido linforreticular em *Pleuronectes platessa*, destacando a importante atividade fagocítica dos elipsóides do baço e discutindo a significância da associação de estruturas linfóides no contexto dos mecanismos de defesa dos peixes. Finn e Nielssen (1971) estudaram a resposta inflamatória em truta arco íris, por meio da inoculação de solução composta por adjuvante completo de Freund (ACF) e *Staphylococcus aureus*, demonstrando a existência de fenômenos vasculares como o aumento da permeabilidade vascular, marginação leucocitária, fagocitose por polimorfonucleares e macrófagos. Claudiano et al. (2013) demonstraram o aumento de permeabilidade vascular em *Piaractus mesopotamicus* inoculados com *Aeromonas hydrophila* inativada utilizando o azul de Evans. Suzuki (1986) por meio da injeção de parafina líquida via i.p. destaca a atividade fagocítica dos neutrófilos no exsudado de *Cyprinus carpio* e *Oreochromis niloticus*. McArthur (1984) utilizou o *Vibrio alginolyticus*, para monitorar a cinética de aparecimento dos diferentes tipos celulares em *P. platessa*.

No Brasil, Matushima e Mariano (1996), Martins (2000) e Martins et al. (2001) demonstraram a resposta inflamatória induzida pela carragenina na bexiga natatória de *O. niloticus*, *P. mesopotamicus* e no híbrido tambacu, respectivamente. Martins et al. (2006) utilizaram novamente carragenina na bexiga natatória de *P. mesopotamicus*, os resultados em seis horas pós-inoculação, demonstraram quantidades significantes de trombócitos e macrófagos, acompanhados por número pouco expressivo de granulócitos e linfócitos.

Bozzo et al. (2007) estudaram a composição celular do exsudato inflamatório na bexiga natatória de pacu após a injeção de tioglicolato, *A. hydrophila* inativada e endotoxina (LPS) de *Escherichia coli*, seis, 24 e 48 horas após os estímulos. Os resultados demonstraram que as células predominantes no foco da inflamação foram os trombócitos,



acompanhados de menor quantidade de linfócitos, macrófagos e granulócitos, resultado obtido em todas as avaliações, independentemente da hora e do tipo de estímulo inflamatório.

Diversas características anatômicas e funcionais dos vertebrados homeotermos estão presentes nos teleósteos, mas existem diferenças como a falta de centros germinativos em órgãos do sistema imune e de medula óssea, substituídos pela parte anterior do rim, que junto com o timo constituem os órgãos linfóides primários (ZAPATA et al., 1996; QUINTANA, 2002). Os tecidos linfóides secundários são representados pelo baço e tecidos linfóides associados à mucosa localizados na região de íleo do trato gastrointestinal e brânquias (ZAPATA et al., 1996).

Os peixes teleósteos apresentam sistema imune inato desenvolvido, composto de barreiras físicas, como a pele, e químicas, como lisozimas séricas e do muco que recobre a pele e as mucosas e envolve ovos embrionados formando uma barreira de proteção contra patógenos ambientais. Além da lisozima incluem-se moléculas do sistema complemento, proteína C-reativa, células fagocíticas como macrófagos, neutrófilos e trombócitos (WATTS; MUNDAY, 2001).

A resposta imune inata ou inespecífica é uma modalidade de resposta inflamatória dirigida contra antígenos no primeiro contato. A resposta imune adaptativa requer o contato prévio com o antígeno, sendo específica e dirigida contra ele na segunda exposição, mais rápida e intensa que geralmente elimina a infecção e protege o hospedeiro contra a reinfecção (FEARON; LOCKSLEY, 1996).

O sistema imune adquirido dos peixes é subdividido em resposta imune humoral e celular, envolvendo os órgãos e tecidos linfóides (primários e secundários), células apresentadoras de antígeno (APCs), linfócitos T e B, imunoglobulinas e moléculas do sistema complemento (ZAPATA et al., 1996; WATTS; MUNDAY, 2001).

A resposta imune humoral é representada por reações mediadas pela produção de imunoglobulinas (Ig), constituídas por uma molécula tetramérica, similar a Ig M de mamíferos, após a sensibilização prévia (SCAPIGLIATI et al., 1999). A Ig M 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 fluidos corporais (LITMAN et al., 1999). A IgM é a principal imunoglobulina produzida pelos linfócitos B e reconhecem e neutralizam antígenos e os preparam para a eliminação por diversos mecanismos efetores. As imunoglobulinas unem-se aos antígenos solúveis para formar complexos antígeno-anticorpo que serão eliminados pela fagocitose. (RUBIO-GODOY, 2010). Além desta existem outras três imunoglobulinas, a Ig D (HIRONO et al., 2003), Ig Z (DANILOVA et al., 2005) e Ig T (HANSEN et al., 2005), cujas funções na resposta imune humoral de teleósteos são pouco conhecidas.

Nos peixes os mecanismos de resposta imune celular são pouco estudados, mas Grimholt et al. (1993) demonstraram a existência de genes ligados a expressão de molécula de MHC de classe I em peixes. AOYAGI et al. (1999) evidenciaram reação de hipersensibilidade tardia a enxertos primários e secundários, demonstrando que ocorre a ativação de tipos celulares funcionalmente equivalentes às células T de mamíferos. Estes relatos demonstram a existência de resposta imune celular em peixes, mesmo que pouco desenvolvida.

### **3.4 Vacinação em peixes**

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; SALVADOR et al., 2012).

A aplicação de vacinas pela via intra-celomática em peixe 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 (NAKANISHI; OTOTAKE, 1997).

Shoemaker et al. (2010) relataram alta titulação de anticorpos em tilápia do Nilo imunizadas com vacinas modificadas contra isolados de *Streptococcus iniae*. Evans et al. (2004) avaliaram duas vacinas elaboradas com *S. iniae* e *S. agalactiae* inativados, e inoculados via intra-celomática (i.c.) em tilápias que foram desafiadas com cepas homólogas. Após 14 dias a mortalidade foi de 15,0% no grupo vacinado e de 76,0% no controle. Em um grupo vacinado com *S. iniae* desafiado com *S. agalactiae*, ambos por via i.c., a mortalidade foi 100,0%, sugerindo não existir imunidade cruzada entre as espécies.

Pretto-Giordano et al. (2010) obtiveram resultados de 83,6 e 96,4% de porcentagem relativa de sobrevivência em tilápias do Nilo imunizadas com vacinas inativadas contra *S. agalactiae* em dose única e com reforço, respectivamente.

Salvador et al. (2012) suplementaram tilápias vacinadas contra *S. agalactiae* com parede celular inata de *S. cerevisiae* e observaram que o suplemento favoreceu a resposta imune celular.

Shoemaker et al. (2012) testaram uma vacina morta bivalente (*S. iniae* e *Vibrio vulnificus*) inoculada via i.c. em tilápias, um grupo desafiado com *S. iniae* e outro desafiado com *V. vulnificus*, foi observada um Percentual Relativo de Sobrevivência (PRS) de 69 a 100% e de 79 a 89%, respectivamente. Os autores concluíram que a melhor estratégia seria combinar vacinas monovalentes em bivalentes, para evitar o estresse do manejo e os custos de vacinação por animal.

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

### **3.5 Métodos de inativação bacteriana**

A maioria das vacinas bacterianas utilizadas em peixes, seja experimental ou comercial, é inativada e administrada por injeção intra-celomática. Inúmeras vacinas contra estreptococose de peixes foram testadas por vários autores, entretanto, os métodos de inativação são relativamente comuns e/ou semelhantes, utilizando calor ou formol (EVANS et al., 2004; PASNIK et al., 2005; SHOEMAKER et al., 2010; PRETTO-GIORDANO et al., 2010; MARTINS et al., 2001; SALVADOR et al., 2012).

Entretanto existem diferentes métodos de inativação bacteriana que podem ser testados na produção de vacinas, como a utilização da pressão (RIVALAIN; ROQUAIN; DEMAZEU, 2010), a terapia fotodinâmica antimicrobiana (ALMEIDA, 2011; TESSAROLLI, 2010) e a sonicação (REIS, 2011) entre outros.

A sonicação é um processo de fragmentação aleatória e dentre as suas principais vantagens destacam-se o pouco tempo de aplicação do ultra-som, a necessidade de pouca quantidade de reagentes, a facilidade na indução de reações de fragmentação e solubilização de estruturas antigênicas e a simplificação do processo de produção da vacina com redução de custos (BARBOZA; SERRA, 1992).

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUSELIANA, A.; HASSAN, D.; SALEHA, A.A.; SITI-KHAIRANI, B.; MILUD A. *Streptococcus agalactiae* the etiological agent of mass mortality in farmed red tilapia (*Oreochromis* sp.). **J Anim Vet Adv** 20:2640–2646. 2010.

ALMEIDA, M. J. “**Análise da Efetividade da Terapia Fotodinâmica sobre Feridas Cutâneas Infectadas por *Staphylococcus aureus*, em Ratos**” Dissertação de Mestrado. Universidade do Vale do Paraíba. São José dos Campos-SP. 2011.

AOYAGI, K; NAKANISHI, T; XIA, C. Specific cell-mediated immunity in fish. **Vet Immunol Immupath**, v.72, p. 101 – 109, 1999.

BARBOZA, J. C. S.; SERRA, A. A. “Ultra-Som (I): Influência do Ultra-Som na Química”. **Quím. Nova**, 15, 302-316, 1992.

BELÉM-COSTA, A; CYRINO, J. E. P. ANTIBIOTIC RESISTENCE OF *Aeromonas hydrophila* ISOLATED FROM *Piaractus esopotamicus* (Holmberg, 1887) AND *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). **Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)**, v.63, n.3, p.281-284, May/June 2006.

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.

CHANG PH, PLUMB, JA. Effects of salinity on *Streptococcus* infection of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Journal of Applied Aquaculture** 6:39-45. 1996.

CLAUDIANO, G. da S.; PETRILLO, T.R.; MANRIQUE, W.G.; CASTRO, M.P.; LOUREIRO, B.A.; MARCUSSO, P.F.; BELO, M.A.A.; MORAES, J.R.E. de; MOREAS, F.R. Acute aerocystitis in *Piaractus mesopotamicus*: participation of eicosanoids

and pro-inflammatory cytokines. **Fish and Shellfish Immunology**, v.34, p.1057-1062, 2013.

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

CONTE, L. **Produtividade e economicidade da tilapicultura em gaiolas na região sudeste do Estado de São Paulo: estudo de casos**. Piracicaba, 2002. 73 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

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.

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

EVANS JJ, KLESIOUS PH, GILBERT PM, SHOEMAKER CA, AL SARAWI MA, LANDSBERG J, DUREMDEZ R, AL MARZOUK A, AL ZENKI S. Characterization of b-hemolytic group B *Streptococcus agalactiae* in cultured sea bream, *Sparus auratus* L., and wild mullet, *Liza klunzingeri*, in Kuwait. **Journal of Fish Diseases** 25:505–513. 2002.

EVANS J.J., KLESIOUS P.H. & SHOEMAKER C.A. Warmwater fish vaccinology in catfish production. **Animal Health Research Reviews** 5,305-311.2004.

EVANS JJ, PASNIK DJ, KLESIOUS PH, AL-ABLANI, S. First report of *Streptococcus agalactiae* and *Lactococcus garvieae* from a wild bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). **J Wildl Dis**; 42:561–9. 2006.

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

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

FINN, J.P. e NIELSEN, O. N. The effect of temperature variation on the inflammatory response of rainbow trout. **J. Path.** 105: 257-268, 1971.

FIGUEIREDO HCP, CARNEIRO DO, FARIA FC, COSTA, GM. *Streptococcus agalactiae* associado à meningoencefalite e infecção sistêmica em tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil. **Arq Bras Med Vet Zootec** 58:p.678-680. 2006.

FIGUEIREDO, C. A. Jr.; VALENTE, A. S. V. Jr. Cultivo de tilápias no Brasil: origens e cenário atual. In: **CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL**, XLVI, 2008, Rio Branco. Anais... Rio Branco: SOBER, 2008.

FITZSIMMONS, K.; MARTINEZ-GARCIA, R.; GONZALES-ALANIS, P. Why tilapia is becoming the most important food fish on the planet. In: **International Symposium in Tilapia in Aquaculture**, 9th, 2011, China. Proceedings... China: Shanghai Ocean University, 2011.

GARCIA LEME, J. **Hormones and Inflammation**, CRC Press, Boca Raton, 1989. p.12-38.

GRIMHOLT, U.I; HORDVIK, V.M; FOSSE, I; OLSAKER, C.E, LIE, Y. Molecular cloning of major histocompatibility complex class I cDNAs from atlantic salmon (*Salmo salar*). **Immunogenetics**, v.37, p. 469 – 473, 1993.

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.

HIRONO, I., NAM, B.H., ENOMOTO, J., UCHINO, K., AOKI, T. Cloning and characterization of a cDNA encoding Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* IgD. **Fish Shellfish Immunol.** 15, 63–70, 2003.

JIMÉNEZ A, TIBATÁ V, JUNCA H, ARIZA F, VERJAN N, IREGUI C. Evaluating a nested-PCR assay for detecting *Streptococcus agalactiae* in red tilapia (*Oreochromis* sp.) tissue. **Aquaculture** 321:203–206. 2011.

KUMAR, V.; CONTRAN; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Patologia – Bases Patológicas das Doenças**. 4ª. Elsevier. 49pp. 2004.

LEITE, M. J. C. **Utilização de microrganismos eficazes como probióticos no cultivo de tilápias do Nilo**. Areia, 2009. 63 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2009.

LIM C, WEBSTER CD. Tilápia: biology, culture and nutrition. **An Imprint of the Haworth Press**, New York, United Stated. 678pp. 2006.

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

MARCUSSO, P.F.; CLAUDIANO, G.S.; ETO, S.F.; VIEIRA, F.C.F.; SLAVADOR, R.; MORAES, J.R.E.; MORAES, F.R. Isolamento de *Streptococcus agalactiae* em diferentes órgãos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) criadas em tanques-rede. **Bioscience Journal**, em prelo.

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.; ONAKA, E.M.; TAVARES-DIAS, M.; BOZZO, F.R.; MALHEIROS, E.B. Características hematológicas do híbrido tambacu, seis e 24 horas após a injeção de substâncias irritantes na bexiga natatória. **Rev. Ictiol.**, Corrientes, 9 (1-2): 25-31. 2001.
- 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*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.33, n.1, p.5-10, 1996.
- McARTHUR, 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.
- MENDES, L. H.; VELOSO, T. Valor Econômico destaca crescimento do mercado de pescado no Brasil. Caderno B16/Agronegócios, 2012.
- MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. 2011. Estatística da pesca e aquicultura. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/index.php/informacoes-e-estatisticas/estatistica-da-pesca-e-aquicultura>. Acesso em 15 de janeiro de 2014.
- MORAES, F. R.; MOREAS, J. R.E. Nutracêutico na inflamação e cicatrização e peixes de interesse zootécnico. In: TAVARES-DIAS, M. (Org.) Manejo e sanidade de peixes em cultivo. **Macapá: Embrapa Amapá**, p. 625-723. 2009.
- MUSA N, WEI LS, MUSA N, HAMDAN RH, LEONG LK, WEE W, AMAL MN, Kutty BM, Abdullah SZ (2009) *Streptococcosis* in red hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*) commercial farms in Malaysia. *Aquaculture* 40:630-632.
- NAKANISH, T.; OTOTAKE, M. Antigen uptake and immune responses after immersion vaccination. In:GUDDING R. et al. **Fish Vaccinology**, p.59-68, 1997.

- NIZET, V. Streptococcal b-hemolysins: genetics and role in disease pathogenesis. **Trends Microbiol.** 10 (12), 575–580. 2002.
- NGUYEN HT, KANAI K, YOSHIKOSHI K. Immunohistochemical examination of experimental *Streptococcus iniae* infection in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. **Fish Pathol.** 36:169-178. 2001.
- NGUYEN HT, KANAI K, YOSHIKOSHI K. Ecological investigation of *Streptococcus iniae* in cultured Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) using selective isolation procedures. **Aquaculture.** 205: 7-17. 2002.
- OBA ET, MARIANO WS, SANTOS LRB. Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para manejo. In: TAVARES-DIAS, M. (Org.) **Manejo e sanidade de peixes em cultivo.** Macapá: Embrapa Amapá 226-247. 2009.
- PASNIK, D. J., EVANS, J. J., KLESIUS, P. H. Duration of protective antibodies and correlation with survival in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* following *Streptococcus agalactiae* vaccination. **Dis. Aquat. Organ.**, 66,129-34, 2005.
- PAVANELLI, G.C.; EIRAS, J.C.; TAKEMOTO, R.M.; **Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento.** Maringá: Eduem, 2008, 311p., 3ed.
- PEREIRA, E. P.; GAMEIRO, A. H. Análise da tilapicultura brasileira com ênfase no comércio internacional. **CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, XLV.**, 2007, Londrina. Anais... Londrina: Administração e Sociologia Rural, Universidade Estadual de Londrina, 2007.
- PRETTO-GIORDANO, L.G.; MÜLLER, E.E.; KLESIUS, P.; SILVA, V.G. Efficacy of na experimentally inactivated *Streptococcus agalactiae* vaccine in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in Brazil. **Aquaculture Research.** v.41, 1539-1544. 2010.
- QUEIROZ, J.F.; LOURENÇO, J.N.P.; KITAMURA, P.C.; SCORVO-FILHO, J.D.; CYRINO, J.E.P.; CASTAGNOLLI, N.; VALENTI, W.C.; BERNARDINO, G.

Aquaculture in Brazil: research priorities and potential for further international collaboration. **World Aquaculture**, Baton Rouge, v.36, n.1, p.45-50, Mar. 2005.

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

REIS, R.S. dos **Abordagem proteômica da interação bactéria-hospedeiro na colibacilose aviária**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2011.

REIS NETO, R. V. **Avaliação genética das características morfométricas de tilápias do Nilo, variedade GIFT, sob seleção para ganho em peso**. Lavras, 2012. 77 f. Tese (Doutorado em Zootecnia), Departamento de Produção Animal, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

RIVALAIN, N., ROQUAIN, J., DEMAZEAU, G. Development of high hydrostatic pressure in biosciences: pressure effect on biological structures and potential applications in biotechnologies. **Biotechnology Advances** 28, 659-672. 2010.

ROMANO, L. A., MEJÍA J. Infección por *Streptococcus iniae*: Una enfermedad emergente que afecta a peces de cultivo y a humanos. **Revista AquaTIC**, nº 18, Enero-Junio. 2003.

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

SACCHETIN, P.S.C. et al. Produção e micropartículas de alginate contendo *Flavobacterium columnare* inativada pelo método de emulsão para vacinação de peixes por via oral. **Química Nova**, v.33, n.2, p.263-268, 2010.

SALVADOR R, MULLER EE; FREITAS JC, LEONHARDT JH, PRETTOGIORDANO LG, DIAS JA, MORENO AM. Isolation of *Streptococcus* spp from Nile tilapia

(*Oreochromis niloticus*) and quality of water in hapas nets in North Region of Parana State, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias** 24:35-42. 2003.

SALVADOR R, MÜLLER EE, FREITAS JC, LEONHADT JH, PRETTO-GIORDANO LG, DIAS JA. Isolation and characterization of *Streptococcus* spp. group B in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in hapas nets and earth nurseries in the northern region of Parana State, Brazil. **Ciência Rural** 35:1374-1378. 2005.

SALVADOR, R.; TOAZZA, C.S.; MORAES, J.R.E; MORAES, F.R. Inflammatory responses of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* to *Streptococcus agalactiae*: effects of vaccination and yeast diet supplement. **Diseases of Aquatic Organisms**.v.98, p.235–241, 2012.

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.

SHOEMAKER, C.A.; LAFRENTZ, B.R.; KLESIUS, P.H.; EVANS, J.J. Protection against heterologous *Streptococcus iniae* isolates using a modified bacterin vaccine in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Journal of Fish Diseases**. 3:7, 537–544, 2010.

SHOEMAKER, C. A.; LAFRENTZ, B. R.; KLESIUS, P. H. Bivalent vaccination of sex reversed hybrid tilapia against *Streptococcus iniae* and *Vibrio vulnificus*. **Aquaculture**, v.354-355, p.45-49, 2012.

SUANYUK N, KANGHEAR H, KHONGPRADIT R, SUPAMATTAYA K. *Streptococcus agalactiae* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Songklanakarin J Sci Technol**. 27: 307-319. 2005.

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.

TESSAROLLI, V. “**Ação da Terapia Fotodinâmica (TFD) sobre Biofilme Dentário Humano**”, Dissertação Mestrado. USP. Bauru-SP. 2010.

TRABULSI LR, ALTERTHUM F, MARTINEZ MB, CAMPOS LC, GOMPERTZ OF, RÁCZ ML. 2005. **Microbiologia**. 5ed. Atheneu, São Paulo, 780pp.

TORRECILAS, S.; MAKOL, A.; CABALLERO, R.J.; MONTERO, D.; ROBAINA, L.; REAL, F.; SWEETMAN, J.; TORT, L.; IZQUIERDO, M.S. Immune stimulation and improved infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. **Fish & Shellfish Immunology**. v.23, p.969-981, 2007.

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

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

YOUSEFIAN, M.; AMIRI, M. S. The review of the use of prebiotic in aquaculture for fish and shrimp Mehdi. Kouzestan, I.R. Iran. **African Journal of Biotechnology** v.8 (25), p.7313-7318, 29 ISSN 1684–5315. 2009.

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

ZAMRI-SAAD M, AMAL MNA, SITI-ZAHRAH A. Pathological changes in red tilapias (*Oreochromis* spp.) naturally infected by *Streptococcus agalactiae*. **Journal of Comparative Pathology** 143:227-229. 2010.

## CAPÍTULO II

### **Porcentagem relativa de sobrevivência e resposta imune de tilápias (*Oreochromis niloticus*) imunizadas com antígenos de *Streptococcus agalactiae* obtidos por sonicação**

Relative percentage of survival and immune response of tilapia  
(*Oreochromis niloticus*) immunized with *Streptococcus agalactiae* antigens  
obtained by sonication

Paulo Fernandes Marcusso<sup>1</sup>; Silas Fernandes Eto<sup>1</sup>; Gustavo Silva. Claudiano<sup>1</sup>; Jefferson Yunis<sup>2</sup>; Dayanne Carla Fernandes<sup>1</sup>; Fausto de Almeida Marinho Neto<sup>3</sup>; Rogério Salvador<sup>3</sup>; Julieta Rodini Engrácia deMoraes<sup>1</sup>; Flávio Ruas de Moraes<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal Pathology, College of Agricultural Sciences and Veterinary, UNESP Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, Brazil.

<sup>2</sup>Aquaculture Center of UNESP, Jaboticabal, São Paulo, Brazil.

<sup>3</sup>Universidade do Norte do Paraná, Campus Luiz Meneghel, Bandeirantes, Parana, Brazil.

Correspondence: Flávio Ruas de Moraes –[fruasmoraes@gmail.com](mailto:fruasmoraes@gmail.com)

Phone number: +55 (16) 3209-2600.

Unesp, Universidade Estadual Paulista. Via Profº Paulo Donato Castellane, km 05, Jaboticabal, São Paulo, Brazil.

## RESUMO

Inúmeras vacinas contra estreptococose de peixes estão sendo testadas em todo o mundo, porém muitas delas utilizam processos de inativação semelhantes como a utilização de formol. O objetivo deste trabalho foi avaliar porcentagem relativa de sobrevivência (PRS) e resposta imune de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) imunizadas com antígenos de *S. agalactiae* obtidos por sonicação. Para tanto foram utilizados 362 peixes com  $200 \pm 25$ g. Para o cálculo da porcentagem relativa de sobrevivência (PRS) das diferentes porções do antígeno obtidas por sonicação, foram utilizados quatro grupos (n= 20), grupo 1 injetado com PBS, grupo 2 injetado com PBS + adjuvante incompleto de Freund, grupo 3 imunizado com a fração solúvel do antígeno sonicado + adjuvante incompleto de Freund e grupo 4 imunizado com a fração insolúvel do antígeno sonicado + adjuvante incompleto de Freund. Após 21 dias da imunização os peixes foram desafiados com inóculo de  $10^8$  UFC ml<sup>-1</sup> de *S. agalactiae* e observados por 15 dias, resultando numa PRS de 100, 50 e 16,7% para G4, G3 e G2, respectivamente. Posteriormente avaliou-se a resposta imune humoral dos animais, que foram divididos em dois grupos (n= 63), sendo eles; grupo 5 injetado com PBS (controle) e grupo 6 imunizado com a fração insolúvel do *S. agalactiae* sonicado + adjuvante incompleto de Freund. Os estímulos ocorreram via intracelomática (i.c.). Coletaram-se amostras de sangue nos tempos zero, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 60 e 90 dias pós-vacinal. O grupo controle não apresentou soroaglutinação em nenhum dos tempos. O grupo vacinado, apresentou titulação de anticorpos a partir do 21º dia pós vacinal, com título máximo no 60º dia após a vacinação. As análises hematológicas demonstraram aumento no número de linfócitos no grupo vacinado do 14º ao 90º dia pós vacinal. Os resultados foram submetidos ao teste de homocedastidade e havendo distribuição normal dos dados, comparados através de análise de variância (ANOVA) ao nível de 5% de probabilidade e a diferença entre as médias foi comparada pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

**Palavras-chave:** Sonicação, anticorpos, estreptococose, vacinação, teleósteo.

## ABSTRACT

Different vaccines against streptococcal infection in fish are being tested throughout the world, but most of them using similar processes of inactivation as the use of formaldehyde. The objective of this study was to evaluate the relative percentage survival (RPS) and immune response of Nile tilapia (*O. niloticus*) immunized with antigens of *S. agalactiae* obtained by sonication. For both tests, 362 fish ( $200 \pm 25$ g) were used. To calculate the relative percentage survival (RPS) of the different portions of the antigen obtained by sonication four groups ( $n = 20$ ), G1 – injected with PBS, G2- injected with PBS + adjuvant incomplete of Freund; G3- immunized with the soluble fraction + adjuvant incomplete of Freund; G4 - immunized with the insoluble fraction + adjuvant incomplete of Freund. 21 days after immunization, fish were challenged with a inoculum of  $10^8$  CFU ml<sup>-1</sup> of *S. agalactiae* and observed for 15 days, resulting in a PRS of 100, 50 and 16.7% to G4, G3, and G2, respectively. Subsequently, we evaluated the humoral immune response of the animals dividing into two groups ( $n = 63$ ), Group 5 (G5) was injected with PBS (control) and Group 6 (G6) was immunized with the insoluble fraction + incomplete Freund's adjuvant. The stimuli were performed at intracoelomic route (ic). We collected blood samples at 0; 7; 14; 21; 28; 35; 42; 60, and 90 days post-vaccination. The control group showed no agglutination test in any time. The vaccinated group, showed antibody titers from day 21 after vaccination with peak titer on day 60 after vaccination. Hematological analyzes showed an increase in the number of lymphocytes in the vaccinated group from the 14th to 90th day post vaccination. The results were submitted to homocedastidade test and present normal distribution. Data were compared using analysis of variance (ANOVA) at 5 % probability and the difference between the means was compared by Tukey test ( $p < 0.05$ ).

**Keywords:** Sonication, antibodies, streptococcal infection, vaccination, teleost



## INTRODUÇÃO

Entre as espécies de *Streptococcus* sp. que acometem os teleósteos, destaca-se o *Streptococcus agalactiae*. No Brasil é responsável por altas taxas de morbidade e mortalidade em diferentes sistemas de criação, principalmente em tilápia do Nilo (SALVADOR et al., 2003; 2005; 2012).

O *S. agalactiae* (Grupo B) já foi relatado em seis países e três continentes como Estados Unidos da América, Israel, Kuwait, Taiwan, Japão e Brasil, responsável por significantes taxas de morbidade e mortalidade de peixes de água doce e salgada (EVANS; KLESIUS; SHOEMAKER, 2006). Estratégias de controle incluem manejo (retirada de animais mortos e moribundos), tratamento (antibioticoterapia) e prevenção (vacinação) (SHOEMAKER et al., 2010).

A resposta imune inata ou inespecífica é uma modalidade de resposta inflamatória dirigida contra antígenos no primeiro contato. A resposta imune adaptativa requer o contato prévio com o antígeno, sendo específica e dirigida contra ele na segunda exposição, mais rápida e intensa que geralmente elimina a infecção e protege o hospedeiro (FEARON; LOCKSLEY, 1996).

Inúmeras vacinas contra estreptococose de peixes foram testadas por vários autores, entretanto os métodos de inativação são relativamente comuns e/ou semelhantes, utilizando-se o calor ou formol (EVANS et al., 2004; PASNIK et al., 2005; SHOEMAKER et al., 2010; PRETTO-GIORDANO et al., 2010; MARTINS et al., 2001; SALVADOR et al., 2012). A sonicação é utilizada particularmente em microrganismos Gam negativos utilizados como vetores na produção de vacinas recombinantes, como a *Escherichia coli*, visando extração e posterior purificação de proteínas de interesse (CHIARINI; PENNA, 2003). Todavia, são escassas na literatura as referências à utilização desse método na produção de vacinas para peixes.

Com isto em mente este trabalho teve como objetivo avaliar a porcentagem relativa de sobrevivência e a resposta imune de tilápia do Nilo imunizada com antígenos de *S. agalactiae* obtidos por sonicação.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Local, animais e acondicionamento.**

O presente estudo foi realizado no Departamento de Patologia Veterinária da FCAV-Unesp e Setor de Patologia Geral do Campus Luiz Meneghel - Uenp. (Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCAV-Unesp, Protocolo nº 011687/12).

Foram utilizadas 362 tilápias do mesmo lote e revertidas sexualmente, *Oreochromis niloticus*, com peso médio de  $200 \pm 25$ g, oriundas de pisciculturas do norte do Paraná. Os peixes foram aclimatados pelo período de 10 dias, em caixas fibra de 250 L, abastecidas com água corrente, proveniente de poço artesiano, com vazão de um litro por minuto, com aeração suplementar.

Após o período de acondicionamento os animais foram conduzidos ao infectório e dispostos em grupos de acordo com o modelo experimental. Os peixes foram distribuídos em caixas plásticas com capacidade útil de 90 L, dotados de sistema de fluxo contínuo de água desprovida de cloro, oriunda de poço artesiano e aeração suplementar.

Durante experimento os peixes foram alimentados pela manhã e tarde com ração comercial, correspondendo a 3% da biomassa. As caixas foram sifonadas semanalmente e a qualidade da água determinada nos momentos da alimentação. Os parâmetros da água como temperatura, oxigênio dissolvido e condutividade, foram determinados por meio do analisador portátil multiparâmetros (YSI®, modelo YSI 600R). Durante todo o experimento as variáveis físico-químicas (temperatura=  $27,5 \pm 1,0$  °C, oxigênio

dissolvido =  $5,1 \pm 1,0$  mg / L, pH =  $7,66 \pm 0,5$  e condutividade =  $117,96 \pm 30,5$  mS /cm) mantiveram-se em zona de conforto para a espécie (BOYD, 1990).

A carcaça dos animais foram descartados, após eutanásia, em sacos plásticos brancos (Lixo Tipo A) e congelados para posterior recolhimento por empresa terceirizada para destino adequado, segundo resolução número 358 de 2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA).

### **Experimentos:**

#### **Experimento I: Avaliação da porcentagem relativa de sobrevivência de tilápias vacinadas com duas diferentes frações de antígenos de *S. agalactiae* obtidos por sonicação**

Após a sonicação do antígeno foram obtidas duas frações antigênicas sendo uma delas solúvel em PBS e outra insolúvel. Para avaliar qual das frações apresentava maior porcentagem relativa de sobrevivência (PRS), foram constituídos os seguintes grupos:

- Grupo 1 (G1) injetado com PBS via intra-celomática (i.c.) (controle) (n=20)
- Grupo 2 (G2) injetado com PBS e adjuvante incompleto de Freund 1:1, i.c. (n=20)
- Grupo 3 (G3) imunizado com a fração solúvel do antígeno de *S. agalactiae* obtido por sonicação+ adjuvante incompleto de Freund 1:1, i.c. (n=20)
- Grupo 4 (G4) imunizado com a fração insolúvel do antígeno de *S. agalactiae* obtido por sonicação + adjuvante incompleto de Freund 1:1, i.c. (n=20)

Os animais foram acondicionados e alimentados conforme item 4.1. Depois de 21 dias da imunização os peixes foram desafiados com inóculo de *S. agalactiae* capaz de produzir a mortalidade em 50% dos peixes (CL<sub>50</sub>), previamente determinada. Após o

desafio os peixes foram observados por 15 dias para determinação da porcentagem relativa de sobrevivência (PRS) de acordo com Amend (1981). :

$$PRS = [1 - (\% \text{ mortalidade entre vacinados} / \% \text{ mortalidade entre controles})] \times 100$$

Os peixes que apresentaram sinais clínicos compatíveis com a infecção estreptocócica e tornaram-se excessivamente debilitados ou moribundos, foram submetidos à eutanásia por anestesia profunda. De posse deste resultado foi escolhida a fração do antígeno sonificado capaz de proporcionar a maior porcentagem de sobrevivência para os experimentos seguintes.

### **Experimento II: Avaliação da resposta imune humoral de tilápias imunizadas com a fração insolúvel de antígeno de *S. agalactiae* obtidos por sonicação**

Para avaliar a resposta imune humoral os peixes receberam o estímulo antigênico na cavidade celomática e foram constituídos os seguintes grupos:

- Grupo 5 (G5) injetado com salina 0,65% (controle) (n=56)
- Grupo 6 (G6) imunizado com a fração insolúvel do antígeno de *S. agalactiae* obtido por sonicação + adjuvante incompleto de Freund (n=56)

Nos grupos 5 e 6 foram realizadas uma coleta de sangue antes da imunização e coletas seriadas pós-vacinais depois de 7, 14, 21, 28, 35, 42, 60 e 90 dias. Após a coleta do sangue foi realizada a caracterização do leucograma e perfil bioquímico, e avaliação da resposta de anticorpos por meio da soroaglutinação direta em microplaca.

### **Obtenção e identificação molecular da *S. agalactiae***

Amostras de *S. 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). Seguiu-se a identificação pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional. Para a identificação das espécies do gênero *Streptococcus*, realizou-se a extração de DNA das colônias isoladas de acordo com Jafar et al. (2009). Quantificou-se o DNA em espectrofotômetro (NanodropND-1000), as quantidades foram ajustadas para a reação de PCR (50-100 µg/µl) e o DNA armazenado à -20 °C até as reações de PCR.

O DNA genômico bacteriano foi submetido à amplificação por PCR com dois *primers* específicos para *S. agalactiae*, amplificando uma sequência específica do gene 16S rDNA (MARTINEZ et al., 2001). Foram utilizados os *primers*: F15'GAGTTTGATCATGGCTCAG3' e IMOD 5'ACCAACATGTGTTAATTACTC 3', que amplificam um fragmento de 220 pb (pares de bases). As reações de PCR continham 1x Taq DNA polimerase *buffer*, DNA genômico, *primers* específicos (0.2 pM de cada *primer*), 100 pM de dNTP e 1.25 U de Taq DNA polimerase. As condições para a ciclagem foram: desnaturação inicial a 94 °C por 4 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento dos *primers* a 55 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 1 min. Após a reação, os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose (1,5%, p/v), corados com solução de brometo de etídio (0,005%, p/v).

O sequenciamento dos isolados identificados como *S. agalactiae* foi realizado a partir do gene 16S rDNA pelo Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO) da Universidade Estadual Paulista, Unesp, campus de Jaboticabal. As sequências resultantes foram comparadas com sequências bacterianas depositadas na base de dados do *National Center for Biotechnology Information* NCBI (LANGE et al., 2011).

O resultado demonstrou que a bactéria era homóloga em 99,6% com a cepa de *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813 strain JCM 5671. Essa bactéria foi utilizada durante todas as etapas do presente trabalho.

### **Determinação do inóculo vacinal e da CL<sub>50</sub>**

Para a determinação da concentração bacteriana letal para 50,0% dos peixes (CL<sub>50</sub>) e determinação do inóculo vacinal, foram utilizados quatro caixas plásticas, contendo 10 peixes cada, com peso médio inicial de  $200 \pm 25$ g, totalizando 40 animais. Os peixes dos aquários 1, 2, 3 e 4 foram inoculados via i.c. com as concentrações crescentes de  $10^2$ ;  $10^4$ ;  $10^6$  e  $10^8$  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> foi determinada (SALVADOR, 2008). A determinação da concentração bacteriana letal para 50,0% dos peixes (CL<sub>50</sub>) resultou em uma concentração bacteriana de  $10^8$  UFC/mL.

### **Padronização do inóculo vacinal e imunização**

Para a confecção do inóculo vacinal 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 ressuspensa em 500 mL de PBS (tampão fosfato-salino) e novamente centrifugada. Essa operação foi repetida por mais três vezes.

A massa bacteriana foi diluída em PBS de modo a conter quantidade adequada de unidades formadoras de colônias obtidas pela determinação prévia da CL<sub>50</sub>. Após a obtenção do extrato adicionou-se bloqueador de proteinase (CellLytic™ B Plus Kit - SIGMA®) e a solução final foi submetida a sonicação (5 pulsos) em potência 7 por 1 min,

com intervalos de 1 min entre as sonicações e mantidos no gelo durante todo o processo (Fisher Scientific<sup>®</sup>, Modelo 120 Dismembrator). Para a confirmação da inativação o produto final foi semeado em meio sólido BHI adicionado 5% de sangue de ovino e incubados à 29°C, durante 7 dias em aerofilia. Confirmada a inativação realizou-se a padronização da concentração dos inóculos (solúvel e insolúvel), cada amostra teve sua quantidade de proteínas padronizadas por meio de espectrofotometria utilizando aparelho bioquímico semi-automático (Thermoplate<sup>®</sup>, Modelo TP Analyzer plus) e kit comercial (Interlab<sup>®</sup>).

Também foi mensurado em cada amostra a concentração de DNA e pureza determinadas por leituras em absorvância de 260 nm (Concentração do DNA em mg/mL = Absx100x50), segundo SAMBROOK et al. (1989).

Foi incorporado o adjuvante incompleto de Freund, na fração 1:1 à vacina e emulsionada em misturador elétrico. Com a solução mantida em gelo, foi realizado o teste de emulação e preparação das doses que foram mantidas em gelo até o momento da imunização.

Para a imunização os animais foram anestesiados em banho de solução de benzocaina (1:20,000), diluída em álcool etílico 98° (0.1 g/mL) (WEDEMEYER, 1970) e mantidos nesta solução até atingir o plano cirúrgico da escala de ROSS e ROSS (1999). Atingido o plano anestésico desejado, os animais foram posicionados em decúbito dorsal para a inoculação da solução bacteriana, com auxílio de agulha (25x7) e seringa (1ml), na cavidade celomática.

### **Preparo da solução *S. agalactiae* para soroaglutinação**

Para o preparo da solução o microrganismo foi semeado em 500 mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion – DIFCO<sup>®</sup>) e 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 ressuspensa em 500 mL de PBS (tampão fosfato-salino) e novamente centrifugada. Essa operação foi repetida por mais três vezes.

A massa bacteriana foi diluída em PBS de modo a conter quantidade adequada de unidades formadoras de colônias obtidas na determinação da  $CL_{50}$  e foi imediatamente utilizada na técnica de soroglutinação direta em microplaca.

### **Determinação do título de anticorpos IgM por soroglutinação direta em microplaca**

A determinação dos títulos de soroglutinação foi efetuada em microplacas de titulação com 96 poços com fundo em “U”. Para isto, foram realizadas diluições seriadas do soro, variando de 1:2 até 1:4096. As diluições foram feitas em tampão fosfato-salina. A cada poço contendo a amostra de soro diluída foi acrescentado 50µl de solução bacteriana pura e inativada de *S. agalactiae*. O título de soroglutinação foi estimado como o recíproco da última diluição na qual não se detecta a soroglutinação. A soroglutinação foi considerada positiva quando da formação visível de grumos de células aderidas e negativa, quando não ocorre a formação de grumos visíveis (FERNANDES, 2013).

### **Análises de parâmetros hematológicos e do perfil bioquímico sérico**

As amostras de sangue para determinações hematológicas e bioquímicas séricas foram coletadas por punção do vaso caudal, com seringas contendo EDTA (ácido etileno diamina tetra acético), nos tempos pré-determinados; pré-imune, sete, 14, 21, 28, 35, 42, 60 e 90 dias para acompanhamento da reposta imune humoral. Todas foram acondicionadas em micro tubos (1,5ml) identificados e encaminhados para as respectivas análises.

O leucograma e o trombograma foram determinados em extensões sanguíneas coradas de acordo com método descrito por Tavares-Dias e Moraes (2003). A



identificação e nomenclatura dos leucócitos seguiram as recomendações de Tavares-Dias et al. (1999).

Durante a contagem diferencial de leucócitos, também foram avaliadas a presença de alterações morfológicas, como a presença de grânulos tóxicos, vacuolização e/ou presença de corpúsculos. O desvio à esquerda foi considerado quando observada uma porcentagem superior a 3% no número de neutrófilos bastonetes com relação aos leucócitos totais (JAIN, 1993).

A dosagem de albuminas totais foi realizada por método colorimétrico, com o uso de “kit” comercial, utilizando amostras de plasma.

As concentrações de globulinas totais foram determinadas pela subtração das albuminas totais em relação às proteínas totais plasmáticas, tendo como resultado a expressão dos valores das globulinas totais.

## **RESULTADOS**

A fração solúvel demonstrou a quantidade de 8 mg/dL de proteínas totais. Para a padronização dos inóculos a fração insolúvel foi diluída até atingir 8 mg/dL. As concentrações de DNA das porções foram mensuradas resultando em 437,4 ng/ul de DNA na fração solúvel e 593,9 ng/ul na fração insolúvel.

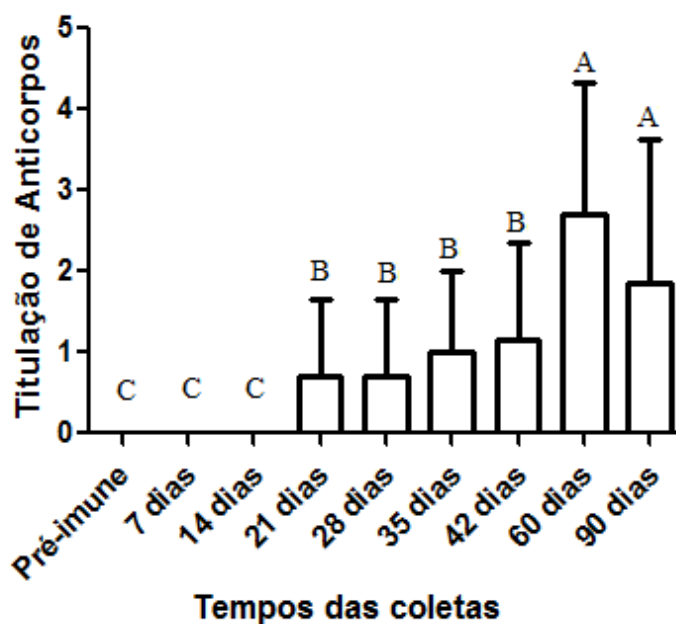
O grupo controle apresentou uma porcentagem de mortalidade de 60%, essa foi utilizada para o cálculo da PRS dos grupos a seguir, onde o grupo imunizado com a fração insolúvel apresentou maior ( $p < 0.05$ ) PRS na ordem de 100%, seguido dos grupos imunizado com fração solúvel com PRS de 50% e inoculado com adjuvante que foi de 16,67%. Portanto os testes foram realizados com a imunização da fração insolúvel da bactéria.

O grupo vacinado apresentou titulação de anticorpos positiva no 21º dia após a vacinação, que se manteve até o 28º dia e aumentou progressivamente aos 35 e 42 dias,

para atingir o máximo após 60 dias e embora tenha diminuído no 90º dia, a diferença não foi significativa em relação à observação anterior.

Não houve soroaglutinação e título de anticorpos para os animais do grupo controle em nenhum dos tempos avaliados.

Para a titulação de anticorpos os valores da soroaglutinação foram transformados em valores logarítmicos na base dois (Figura 1).



**Figura 1** – Valores médios e respectivos desvios-padrão da titulação de anticorpos do grupo vacinado por meio da soroaglutinação direta em microplaca nos tempos pré-estabelecidos das coletas.

Os valores da concentração de globulinas no grupo controle não se alteraram significativamente entre os diferentes tempos de avaliação. O grupo vacinado apresentou acréscimo significativo aos 35, 60 e 90 dias pós vacinal com máximo aos 60 dias pós vacinação (Tabela 1).

**Tabela 1.** Valores médios ( $\pm$  desvio padrão) e análise de variância das concentrações de proteínas totais plasmáticas (PTT), albumina e globulinas (g/dL), nos grupos controle e vacinado, nos tempos de coletas.

| Tratamentos | Variáveis  | Pós-inoculação               |                               |                              |                               |                               |                              |                               |                              |                              |
|-------------|------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|
|             |            | Zero                         | 7 dias                        | 14 dias                      | 21 dias                       | 28 dias                       | 35 dias                      | 42 dias                       | 60 dias                      | 90 dias                      |
| Controle    | PTT        | 5,4 $\pm$ 0,42 <sup>a</sup>  | 4,7 $\pm$ 0,35 <sup>ab</sup>  | 4,6 $\pm$ 0,78 <sup>ab</sup> | 4,8 $\pm$ 0,40 <sup>ab</sup>  | 4,8 $\pm$ 0,78 <sup>ab</sup>  | 4,3 $\pm$ 0,64 <sup>b</sup>  | 5,2 $\pm$ 0,34 <sup>ab</sup>  | 4,9 $\pm$ 0,38 <sup>ab</sup> | 5,2 $\pm$ 0,18 <sup>ab</sup> |
|             | Albumina   | 1,8 $\pm$ 0,38 <sup>a</sup>  | 1,1 $\pm$ 0,11 <sup>b</sup>   | 1,2 $\pm$ 0,37 <sup>ab</sup> | 1,7 $\pm$ 0,24 <sup>a</sup>   | 1,8 $\pm$ 0,64 <sup>a</sup>   | 1,2 $\pm$ 0,27 <sup>ab</sup> | 1,3 $\pm$ 0,40 <sup>ab</sup>  | 1,8 $\pm$ 0,41 <sup>a</sup>  | 1,3 $\pm$ 0,22 <sup>ab</sup> |
|             | Globulinas | 3,6 $\pm$ 0,33 <sup>ab</sup> | 3,7 $\pm$ 0,29 <sup>ab</sup>  | 3,3 $\pm$ 0,46 <sup>bc</sup> | 3,0 $\pm$ 0,50 <sup>c</sup>   | 3,0 $\pm$ 0,22 <sup>c</sup>   | 3,1 $\pm$ 0,21 <sup>bc</sup> | 3,9 $\pm$ 0,39 <sup>a</sup>   | 3,1 $\pm$ 0,21 <sup>bc</sup> | 3,8 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>  |
| Vacinado    | PTT        | 5,0 $\pm$ 0,93 <sup>ab</sup> | 5,2 $\pm$ 0,34 <sup>ab</sup>  | 4 $\pm$ 0,42 <sup>b</sup>    | 5,1 $\pm$ 0,99 <sup>ab</sup>  | 5,3 $\pm$ 0,52 <sup>a</sup>   | 5,7 $\pm$ 0,84 <sup>ab</sup> | 5,1 $\pm$ 0,23 <sup>ab</sup>  | 5,6 $\pm$ 0,29 <sup>ab</sup> | 5,5 $\pm$ 0,33 <sup>ab</sup> |
|             | Albumina   | 1,8 $\pm$ 0,66 <sup>ab</sup> | 1,4 $\pm$ 0,35 <sup>b</sup>   | 1,2 $\pm$ 0,55 <sup>b</sup>  | 1,5 $\pm$ 0,59 <sup>b</sup>   | 1,8 $\pm$ 0,37 <sup>a</sup>   | 1,5 $\pm$ 0,47 <sup>ab</sup> | 1,5 $\pm$ 0,22 <sup>b</sup>   | 1,2 $\pm$ 0,11 <sup>b</sup>  | 1,3 $\pm$ 0,28 <sup>b</sup>  |
|             | Globulinas | 3,2 $\pm$ 0,42 <sup>d</sup>  | 3,8 $\pm$ 0,14 <sup>abc</sup> | 3,4 $\pm$ 0,99 <sup>cd</sup> | 3,6 $\pm$ 0,47 <sup>bcd</sup> | 3,5 $\pm$ 0,41 <sup>bcd</sup> | 4,1 $\pm$ 0,41 <sup>ab</sup> | 3,8 $\pm$ 0,25 <sup>bcd</sup> | 4,4 $\pm$ 0,22 <sup>a</sup>  | 4,2 $\pm$ 0,22 <sup>ab</sup> |

\* As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

**Tabela 2** - Valores médios ( $\pm$  desvio padrão) e análise de variância para contagem de leucócitos totais, trombócitos, linfócitos, monócitos e granulócitos do sangue de tilápias (*O. niloticus*) vacinadas e controle (PBS) nos diferentes tempos de avaliação.

| Tratamentos | Variáveis         | Pós-inoculação               |                               |                             |                             |                              |                             |                            |                               |                             |  |  |
|-------------|-------------------|------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|----------------------------|-------------------------------|-----------------------------|--|--|
|             |                   | Zero                         | 7 dias                        | 14 dias                     | 21 dias                     | 28 dias                      | 35 dias                     | 42 dias                    | 60 dias                       | 90 dias                     |  |  |
| Controle    | Leucócitos Totais | 391 $\pm$ 30 <sup>ABCa</sup> | 352 $\pm$ 38 <sup>ABCDa</sup> | 313 $\pm$ 19 <sup>CDb</sup> | 427 $\pm$ 49 <sup>Ab</sup>  | 420 $\pm$ 117 <sup>ABa</sup> | 317 $\pm$ 50 <sup>CDb</sup> | 257 $\pm$ 45 <sup>Da</sup> | 325 $\pm$ 49 <sup>BCDa</sup>  | 307 $\pm$ 56 <sup>CDa</sup> |  |  |
|             | Trombócitos       | 249 $\pm$ 14 <sup>Aa</sup>   | 207 $\pm$ 24 <sup>ABCDa</sup> | 182 $\pm$ 22 <sup>CDb</sup> | 246 $\pm$ 28 <sup>ABb</sup> | 239 $\pm$ 70 <sup>ABCa</sup> | 180 $\pm$ 26 <sup>CDa</sup> | 151 $\pm$ 32 <sup>Da</sup> | 190 $\pm$ 34 <sup>ABCDa</sup> | 178 $\pm$ 35 <sup>CDa</sup> |  |  |
|             | Granulócitos      | 62 $\pm$ 13 <sup>ABCa</sup>  | 64 $\pm$ 14 <sup>ABa</sup>    | 59 $\pm$ 10 <sup>ABCa</sup> | 77 $\pm$ 13 <sup>Aa</sup>   | 77 $\pm$ 19 <sup>Aa</sup>    | 48 $\pm$ 9 <sup>BCb</sup>   | 40 $\pm$ 10 <sup>Ca</sup>  | 60 $\pm$ 10 <sup>ABCa</sup>   | 57 $\pm$ 13 <sup>ABCa</sup> |  |  |
|             | Linfócitos        | 54 $\pm$ 12 <sup>Aa</sup>    | 47 $\pm$ 8 <sup>Aa</sup>      | 55 $\pm$ 14 <sup>Ab</sup>   | 67 $\pm$ 18 <sup>Ab</sup>   | 62 $\pm$ 26 <sup>Ab</sup>    | 67 $\pm$ 11 <sup>Ab</sup>   | 57 $\pm$ 22 <sup>Aa</sup>  | 47 $\pm$ 11 <sup>Ab</sup>     | 45 $\pm$ 11 <sup>Ab</sup>   |  |  |
|             | Monócitos         | 26 $\pm$ 6 <sup>BCDa</sup>   | 34 $\pm$ 12 <sup>ABCa</sup>   | 17 $\pm$ 7 <sup>DEa</sup>   | 37 $\pm$ 13 <sup>ABa</sup>  | 42 $\pm$ 10 <sup>Aa</sup>    | 22 $\pm$ 9 <sup>CDEb</sup>  | 8 $\pm$ 5 <sup>Eb</sup>    | 28 $\pm$ 5 <sup>ABCDa</sup>   | 26 $\pm$ 8 <sup>BCDa</sup>  |  |  |
| Vacinados   | Leucócitos Totais | 376 $\pm$ 25 <sup>Ba</sup>   | 336 $\pm$ 25 <sup>Ca</sup>    | 398 $\pm$ 36 <sup>BCa</sup> | 551 $\pm$ 126 <sup>Aa</sup> | 394 $\pm$ 32 <sup>BCa</sup>  | 453 $\pm$ 93 <sup>Ba</sup>  | 227 $\pm$ 36 <sup>Da</sup> | 386 $\pm$ 68 <sup>Ba</sup>    | 330 $\pm$ 49 <sup>Ca</sup>  |  |  |
|             | Trombócitos       | 235 $\pm$ 25 <sup>Aa</sup>   | 206 $\pm$ 30 <sup>ABa</sup>   | 236 $\pm$ 38 <sup>Aa</sup>  | 254 $\pm$ 67 <sup>Aa</sup>  | 176 $\pm$ 18 <sup>Bb</sup>   | 179 $\pm$ 34 <sup>Ba</sup>  | 84 $\pm$ 15 <sup>Cb</sup>  | 91 $\pm$ 26 <sup>Cb</sup>     | 63 $\pm$ 20 <sup>Cb</sup>   |  |  |
|             | Granulócitos      | 55 $\pm$ 9 <sup>Ba</sup>     | 50 $\pm$ 9 <sup>Ba</sup>      | 59 $\pm$ 18 <sup>Ba</sup>   | 94 $\pm$ 24 <sup>Aa</sup>   | 73 $\pm$ 15 <sup>ABa</sup>   | 88 $\pm$ 18 <sup>Aa</sup>   | 50 $\pm$ 12 <sup>Ba</sup>  | 45 $\pm$ 17 <sup>Ba</sup>     | 52 $\pm$ 18 <sup>Ba</sup>   |  |  |
|             | Linfócitos        | 51 $\pm$ 6 <sup>Fa</sup>     | 56 $\pm$ 10 <sup>Fa</sup>     | 84 $\pm$ 12 <sup>DEFa</sup> | 166 $\pm$ 46 <sup>BCa</sup> | 111 $\pm$ 14 <sup>DEa</sup>  | 128 $\pm$ 35 <sup>CDa</sup> | 68 $\pm$ 13 <sup>EFa</sup> | 240 $\pm$ 42 <sup>Aa</sup>    | 191 $\pm$ 22 <sup>Ba</sup>  |  |  |
|             | Monócitos         | 35 $\pm$ 13 <sup>Ba</sup>    | 24 $\pm$ 10 <sup>BCa</sup>    | 19 $\pm$ 7 <sup>BCa</sup>   | 37 $\pm$ 18 <sup>Ba</sup>   | 34 $\pm$ 12 <sup>Ba</sup>    | 58 $\pm$ 12 <sup>Aa</sup>   | 25 $\pm$ 7 <sup>Bca</sup>  | 10 $\pm$ 8 <sup>Cb</sup>      | 22 $\pm$ 13 <sup>BCa</sup>  |  |  |

As médias (n=7), seguidas de pelo menos uma letra em comum não são diferentes pelo teste de Tukey (p<0,05). Letras maiúsculas comparam as diferenças entre os tempos, enquanto as letras minúsculas comparam entre os diferentes tratamentos. Os valores representados na contagem são  $\times 10^3$  de células/ $\mu$ L.

Na tabela 2 as avaliações hematológicas demonstraram que no grupo controle não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os valores de linfócitos do grupo controle durante o experimento, diferente do ocorrido no grupo vacinado, onde ocorreu aumento significativo ( $p < 0,05\%$ ) no número dessas células nos vacinados a partir do 14º dia diferindo até o fim do experimento aos 90 dias após a vacinação.

O número de leucócitos totais se diferiu ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos nos tempos de 14, 21 e 35 dias após a vacinação.

## **DISCUSSÃO**

Os resultados do presente estudo demonstraram que a vacina contra *S. agalactiae* inativada por sonicação, utilizando a fração insolúvel do antígeno apresentou alta eficiência na proteção de tilápias do Nilo contra o desafio com a cepa homóloga ao se considerar o percentual relativo de sobrevivência.

No entanto, a maioria dos trabalhos que envolve vacinação de peixes utiliza o tratamento com formalina para inativação das bactérias utilizadas como antígeno (KLESIUS et al., 1999, 2000; EVANS et al., 2004; PASNIK et al., 2005; PRETTO-GIORDANO et al., 2010; SHOEMAKER et al., 2010).

A fração insolúvel do *S. agalactiae* sonicado + adjuvante incompleto de Freund (vacina) demonstrou proteção de longa duração, com titulação máxima aos 60 dias pós vacinação. A função do adjuvante incompleto de Freund é manter o imunógeno entre os glóbulos de óleo após a injeção, permitindo liberação prolongada e lenta dos antígenos no tecido de animais vacinados para permitir o aumento da formação de anticorpos e favorecer a proteção dos peixes contra a infecção (STILLS; BAILEY, 1991; ALLISON; GREGORIADIS, 1974).

Shelby et al. (2002) evidenciaram o papel do anticorpo na proteção de peixes contra *S. iniae*, por meio de imunização passiva de soro anti-*S.iniae* que mostrou-se protetora. Da mesma forma Carandina (2013), demonstrou porcentagem relativa de sobrevivência de 40 e 70% de tilápias do Nilo que receberam soro anti-*S. agalactiae* inativado e anti-*S. agalactiae* não inativado, respectivamente, sugerindo que a imunização passiva foi eficiente na proteção. Então os anticorpos transferidos de doadores para receptores foram capazes de protegê-los contra o desafio por cepa homóloga. Neste trabalho ficou demonstrada a PRS de 100% entre os peixes vacinados com antígeno insolúvel associado ao adjuvante incompleto de Freund e houve elevada concentração de anticorpos anti-*S. agalactiae* sugerindo a proteção imune adquirida.

Pasnik et al. (2005) relataram percentual de mortalidade de 32% em tilápias do Nilo imunizadas com vacina contra *S. agalactiae* inativado com formalina ou seus produtos extracelulares. Shin et al. (2007), demonstraram proteção de moderada a alta contra *S. iniae* em *Paralichthy solivaceus* imunizados com vacina semelhante. Essas vacinas apresentaram eficácia inferiores à da vacina com a fração insolúvel do antígeno de *S. agalactiae* preparada por sonicação + adjuvante incompleto de Freund, como observado no presente trabalho.

Eldar et al. (1995) relataram que o extrato de proteínas obtido por sonicação de *S. agalactiae* protegeu 92% tilápias contra o desafio letal pela bactéria homóloga. Todavia os autores não descreveram detalhes da constituição do extrato utilizado. Os resultados do presente ensaio demonstraram proteção semelhante, porém superior.

A literatura demonstra variações interespecíficas na concentração de proteínas totais em teleósteos, que por alterações do peso, sazonalidade, sexo, maturação gonadal, entre outras situações devido ao catabolismo (TAVARES-DIAS, 2004; ANDREEVA, 2010; SHAMSUDDIN et al., 2011; AZEVEDO, 2012). Neste trabalho a concentração de

proteínas plasmáticas totais não apresentou diferença significativa entre os grupos e os valores observados forma similares aos encontrados por Tavares-Dias (2004), Mlay (2007), Melo (2009) e Crivelenti et al. (2011).

No presente estudo os animais vacinados apresentaram aumento progressivo da concentração de globulinas séricas ao longo do tempo, com diferença significativa aos 35, 60 e 90 dias após a imunização, sugerindo o incremento da resposta imune. Estes resultados são semelhantes aos de Sahoo e Mukherjee (2001) que relataram aumento da concentração de globulinas no soro. Labarrere (2011) por sua vez sugere que esse aumento melhora da resposta imune e que peixes submetidos ao estresse apresentam diminuição da concentração de globulinas e por consequência piora da resposta imune.

Neste trabalho a avaliação do perfil do leucograma demonstrou que os peixes vacinados apresentaram maior número de linfócitos a partir do 21º dia pós vacinação. Resultados semelhantes foram observados por Salvador et al. (2013) que demonstraram que peixes vacinados contra *S. agalactiae* e desafiados com cepa homóloga apresentaram aumento do número médio de leucócitos como reflexo de linfocitose e de trombocitose em relação aos peixes não vacinados.

Neste trabalho apesar do grupo controle apresentar um tromobograma maior que o grupo vacinado entre os 28 e 90 dias, os trombócitos são células mais abundantes no depois dos eritrócitos e seus valores podem sofrer diversas variações no sangue de peixes (BLAXHALL; DAISLEY 1973; ELLIS, 1976; UEDA et al., 1997).

O gênero *Streptococcus* sp. apresenta na composição capsular proteínas de superfície contribuem para a capacidade de aderência, invasão e escape do sistema imune do hospedeiro (BARON; KASPER, 2005). Apesar das vacinas e seus diferentes métodos de preparo, novas epidemias por *S. iniae* ocorreram em peixes e a cepa isolada apresentava alterações na composição capsular (BACHRACH et al., 2001; ZLOTKIN et

al., 1998). Então o uso do antígeno insolúvel em que estas proteínas estão presentes poderia, pelo menos em tese, manter a eficiência da vacina demonstrada neste ensaio por maior tempo.

## **CONCLUSÃO**

Os resultados deste trabalho sugerem que a vacinação de tilápias do Nilo com antígeno insolúvel de *S. agalactiae* induz o aumento significativo da concentração de globulinas séricas, do título de anticorpos e o mantém elevado por até 90 dias. Tilápias do Nilo imunizados com esta vacina apresentaram porcentagem relativa de sobrevivência de 100%, enquanto as vacinadas com o antígeno solúvel obtido por sonicação atingiram 50% e as não vacinadas 16,7%.



**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ALLISON, A.C.; GREGORIADIS, G. Liposomes as immunological adjuvants. **Nature**. 252, 252. Doi :10.1038/252252a0. 1974.

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

ANDREEVA, A.M. The Role of Structural Organization of Blood Plasma Proteins in the Stabilization of Water Metabolism in Bony Fish (*Teleostei*). **Journal of Ichthyology**, v. 50, n. 7, p. 552–558, 2010.

AZEVEDO, T.M.P. Variações de valores hematológicos e bioquímicos de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) cultivadas em tanques-rede. **Tese apresentada à Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal nos Trópicos**. 2012.

BACHRACH, G., A. ZLOTKIN, A. HURVITZ, D. L., EVANS, AND A. ELDAR. Recovery of *Streptococcus iniae* from diseased fish previously vaccinated with a *Streptococcus* vaccine. **Appl. Environ. Microbiol.** 67: 3756–3758. 2001.

BARON, M.J.; KASPER, D.L. Anchors away: contribution of a glycolipid anchor to bacterial invasion of host cells. **The Journal of Clinical Investigation**, Oxford, v.115, n.9, p. 2325-2327, 2005.

BLAXHALL, P.C. The haematological assessment of the health of freshwater fish. A review of selected literature. **J. Fish Biol.**, 4: 593-604. 1973.

BOYD, C.E. **Water quality in ponds for aquaculture**. Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University. 1990.

CARANDINA, L. Utilização da imunização passiva com anticorpos anti-*Streptococcus agalactiae* na proteção de tilápias do Nilo (*Oreochormis niloticus*). **Dissertação**

**apresentada ao Programa de Pós- Graduação (nível: Mestrado) em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção de título de mestre em Ciência Animal. 2013.**

CHIARINI, E.; PENNA, T.C.V. Extração, purificação e caracterização físico-química da proteína verde fluorescente recombinante (GFPuv) expressa em *Escherichia coli*. **Rev. Bras. Cienc. Farm.** vol. 39. n.4. São Paulo, 2003.

CONAMA, **resolução**; nº 358, de 29 de abril de 2005 Publicada no DOU no 84, de 4 de maio de 2005, Seção 1, páginas 63-65, 2005.

CRIVELENTI, L. Z.; BORIN, S.; SOCHA, J.J.M.; MUNDIM, A.V. Valores Bioquímicos séricos de Tilápias del Nilo (*Oreochromis niloticus*) em cultivo intensivo. **Ver Inv Vet Perú.** 22 (4), p. 318-323, 2011.

ELDAR, A.; BEJERANO, Y.; LIVOFF, A.; HOROVITCZ, A.; BERCOVIER, H. Experimental streptococcal meningo-encephalitis in cultured fish. **Veterinary Microbiology**, v. 43, p. 33-40, 1995.

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

EVANS J.J., KLESIUS P.H. & SHOEMAKER C.A. Warmwater fish vaccinology in catfish production. **Animal Health Research Reviews** 5,305-311. 2004.

EVANS J.J., KLESIUS P.H. & SHOEMAKER C.A. An overview of *Streptococcus* in warm-water fish. **Aquaculture Health International** 7,10-14, 2006.

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

FERNANDES, D.C. **Resposta imune humoral em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) imunizadas com hemácia de carneiro.** Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual do Norte do Paraná. 2013.

JAFAR, Q. A.; SAMEER, A. Z.; SALWA, A. M.; SAMEE, A. A.; AHMED, A. M.; FAISAL, A. S. Molecular investigation of *Streptococcus agalactiae* isolates from environmental samples and fish specimens during a massive fish kill in Kuwait Bay, **African Journal of Microbiology Research**, v. 3, n. 1, p. 22-26, 2009.

JAIN, N.C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 417p. 1993.

KLESZIUS P.H., SHOEMAKER C.A. & EVANS J.J. Efficacy of a killed *Streptococcus iniae* vaccine in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Bulletin of the European Association of Fish Pathologists** 19, 39–41. 1999.

LABARRERE, C.R. Perfil sanguíneo de híbridos de surubim (*Pseudoplatystoma reticulatum* X *P. coruscans*) criados em diferentes densidades de estocagem. **Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal**, 2011.

LANGE, C. C.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; ARCURI, E. F.; SOUZA, G. N.; MACHADO, M. A.; DOMINGUES, R.; SALIMENA, P. S. Uso de PCR e sequenciamento do rDNA 16S para identificação de bactérias do gênero *Staphylococcus* isoladas de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 36-40, jan. 2011.

MARTINEZ G.; HAREL J.; GOTTSCHALK M. Specific detection by PCR of *Streptococcus agalactiae* in milk. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 65, p. 68-72, 2001.

MARTINS, M.L.; ONAKA, E.M.; TAVARES-DIAS, M.; BOZZO, F.R.; MALHEIROS, E.B. Características hematológicas do híbrido tambacu, seis e 24 horas após a injeção de substâncias irritantes na bexiga natatória. **Rev. Ictiol., Corrientes**, 9 (1-2): 25-31. 2001.

MELO, D.C.; Oliveira, D.A.A.; Melo, M.M.; Júnior D.V.; Teixeira, E.A.; Guimarães, S. R. Perfil proteico de tilápia nilótica chitralada (*Oreochromis niloticus*), submetida ao estresse crônico por hipóxia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** vol.61 no.5 Belo Horizonte Oct. 2009.

MLAY, P.S.; SETH, M.; BALTHAZARY, S.T. Total plasma proteins and hemoglobin levels as affected by worm burden in freshwater fish in Morogoro, Tanzania. **Livestock Research for Rural Development**, v. 19, n. 2, 2007.

MORAES, F.R.; MARTINS, M.L. Condições predisponentes e principais enfermidades de teleósteos em piscicultura intensiva. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALOSI, D.M.; CASTAGNOLLI, N. **Tópicos especiais em piscicultura de água tropical intensiva**. São Paulo: Tec Art, 2004. p.343-383.

PASNIK, D. J., EVANS, J. J., KLESIUS, P. H. Duration of protective antibodies and correlation with survival in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* following *Streptococcus agalactiae* vaccination. **Dis. Aquat. Organ.**, 66,129-34, 2005.

PRETTO-GIORDANO, L.G.; MÜLLER, E.E.; KLESIUS, P.; SILVA, V.G. Efficacy of naexperimentally inactivated *Streptococcus agalactiae* vaccine in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in Brazil. **Aquaculture Research**. v.41, 1539-1544. 2010.

ROSS, L.G.; ROSS, B. **Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals**. Oxford: Blackwell Science, 159 p. 1999.

SAHOO P.K. & MUKHERJEE S.C. Effect of dietary  $\beta$ -1,3glucan on immune responses and disease resistance of healthy and aflatoxin B1-induced immunocompromised rohu (*Labeo rohita* Hamilton). **Fish & Shellfish Immunology** 11, 683–695. 2001.

SALVADOR, R, MULLER, E. E.; FREITAS, J. C., LEONHARDT, J. H., PRETTO-GIORDANO, L.G.; DIAS, J. A.; MORENO, A.M. Isolation of *Streptococcus* spp from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and quality of water in hapas nets in North Region of

Parana State, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n.1, p. 35-42, jan./jun. 2003.

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.

SALVADOR, R.; TOAZZA, C.S.; MORAES, J.R.E; MORAES, F.R. Inflammatory responses of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* to *Streptococcus agalactiae*: effects of vaccination and yeast diet supplement. **Diseases of Aquatic Organisms**.v.98, p.235–241, 2012.

SALVADOR, R.; CLAUDIANO, G.S.; LOUREIRO, B.A.; MARCUSSO, P.F.; ETO, S.F.; PILARSKI, F.; TOAZZA, C.S.; MORAES, J.R.E.; MORAES, F.R. Desempenho e hematologia de tilápias-do-nilo alimentadas com dieta suplementada com *Saccharomyces cerevisiae*, vacinadas e desafiadas com *Streptococcus agalactiae*. **Pesq. Agropec. Bras.** Brasília, v.48. n.8. 2013.

SAMBROOK, J.; FRITSCHI, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 1989.

SHAMSUDDIN, S.; SHAGUFTA, J.K.; GAYASUDDIN, M. Comparative Study of Serum Proteins of Man and Four Teleosts: Using Polyacrylamide Gel Electrophoresis. **Advances in Biological Research**, v. 5, n. 3, p. 170-173, 2011.

SHELBY RA, KLESIUS PH, SHOEMAKER CA, EVANS JJ. Passiveimmunization of tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), with anti- *S. iniaewhole* sera. **J. Fish Dis.** 25: 1-6. 2002.

SHIN GW, PALAKSHA KJ, YANG HH, SHIN YS, KIM YR, LEE EY, et al. Partial two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) maps of *Streptococcus iniae* ATCC29178 and *Lactococcus garvieae* KG9408. **Dis Aquat Org.** 70:71e9. 2007.

SHOEMAKER, C.A.; LAFRENTZ, B.R.; KLESIUS, P.H.; EVANS, J.J. Protection against heterologous *Streptococcus iniae* isolates using a modified bacterin vaccine in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Journal of Fish Diseases.** 3:7, 537–544, 2010.

STILLS, H.F., BAILEY, M.Q. The use of Freund's complete adjuvant. **Lab. Anim.** 20(4): 25-30 1991.

TAVARES DIAS, M., SCHALCH, S., MARTINS, M., SILVA, E., MORAES, F. e PERECIN, D. Hematologia de teleósteos brasileiros com infecção parasitária. I variáveis do *Leporinus macrocephalus* Garavelo e Britski, 1988 (Anastonmidae) e *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Characidae). **Acta Scientiarum.** 21, 2: 337-342, 1999.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R.; MARTINS, M.L.; SANTANA, A.E. Haematological changes in *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) with gill ichthyophthiriasis and saprolegniosis. **Boletim do Instituto de Pesca,** v.28, p.1-9, 2003.

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

UEDA, I.K.; EGAMI, M.I.; SASSO, W.S.; MATUSHIMA, E.R. Estudos hematológicos em *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) (Cichlidae, Teleostei) – Parte I. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, 34: 270-275. 1997.

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.

WEDEMEYER G, ROSS AJ, SMITH L. Some metabolic effects of bacterial endotoxin in salmonid fishes. **Journal of Fisheries Research Board of Canada;** 26:115 e 22. 1970.

ZLOTKIN A, ELDAR A, GHITTINEO C, BERCOVIER H. Identification of *Lactococcus garvieae* by PCR. **J. Clin. Micro.** 36(4): 983-985. 1998

### CAPÍTULO III

#### **Resposta imune celular inespecífica de tilápias (*Oreochromis niloticus*) imunizadas com antígeno de *Streptococcus agalactiae* obtido por sonicação**

Nonspecific cellular immune response of tilapia (*Oreochromis niloticus*)  
immunized with *Streptococcus agalactiae* antigen obtained by sonication

Paulo Fernandes Marcusso<sup>1</sup>; Silas Fernandes Eto<sup>1</sup>; Gustavo Silva Claudiano<sup>1</sup>; Jefferson Yunis<sup>2</sup>; Dayanne Carla Fernandes<sup>1</sup>; Fausto de Almeida Marinho Neto<sup>3</sup>; Rogério Salvador<sup>3</sup>; Julieta Rodini Engrácia de Moraes<sup>1</sup>; Flávio Ruas de Moraes<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal Pathology, College of Agricultural Sciences and Veterinary, UNESP Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, Brazil.

<sup>2</sup>Aquaculture Center of UNESP, Jaboticabal, São Paulo, Brazil.

<sup>3</sup>Universidade do Norte do Paraná, Campus Luiz Meneghel, Bandeirantes, Parana, Brazil.

Correspondence: Flávio Ruas de Moraes –[fruasmoraes@gmail.com](mailto:fruasmoraes@gmail.com)

Phone number: +55 (16) 3209-2600.

Unesp, Universidade Estadual Paulista. Via Profº Paulo Donato Castellane, km 05, Jaboticabal, São Paulo, Brazil.



## RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar a resposta imune celular inespecífica de tilápias (*Oreochromis niloticus*) imunizadas com a fração insolúvel do antígeno de *Streptococcus agalactiae* obtido por sonicação. Para tanto foram utilizadas 63 tilápias, *O. niloticus*, com peso médio de  $200 \pm 25$ g. divididas em três grupos, sendo Grupo 1 (G1) injetados com PBS (controle), o Grupo 2 (G2) injetado com adjuvante incompleto de Freund + PBS (1:1) e Grupo 3 (G3) imunizado com a fração insolúvel do antígeno de *S. agalactiae* obtido por sonicação + adjuvante incompleto de Freund (1:1). Em todos os casos as injeções e inoculações foram realizadas na bexiga natatória, um órgão oco, de circulação terminal, com raras células residentes que de fácil acesso para estímulos e coleta de exsudato. Depois de 6, 24 e 48 horas, sete animais de cada grupo, foram submetidos à eutanásia, por aprofundamento do plano anestésico com benzocaína (3g/10L), a bexiga natatória foi lavada cuidadosamente com 0,5 ml de solução gelada de PBS, contendo EDTA a 0,18% estéril para a coleta do exsudato. Os dados foram comparados através de análise de variância (ANOVA), ao nível de 5% de probabilidade e a diferença entre as médias foi comparada pelo teste de Tukey. Os resultados demonstraram que em 24 horas houve o maior ( $p < 0,05$ ) acúmulo de células totais na bexiga natatória em relação aos outros tempos avaliados com predomínio de granulócitos e macrófagos todos os grupos. O grupo controle apresentou menor acúmulo de células totais em relação aos grupos que receberam vacina e/ou adjuvante.

**Palavras chave:** Inflamação, exsudato, estreptococose, vacina

**ABSTRACT**

The present study aimed to characterize the nonspecific cellular immune response of tilapia (*Oreochromis niloticus*) immunized with the insoluble fraction of the antigen of *Streptococcus agalactiae* obtained by sonication. For both experiments, 63 tilapia, *O. niloticus*, weighing  $200 \pm 25$ g were used. Divided into three groups, Group 1 (G1) injected with PBS (control), group 2 (G2) injected with incomplete Freund's + PBS (1:1), and Group 3 (G3) immunized with the antigen of insoluble fraction *S. agalactiae* obtained by sonication + incomplete Freund's adjuvant (1:1). In all cases the injections and inoculations were performed at swim bladder, a hollow organ, with terminal circulation, and rare cells residents that presents easy access to stimuli and collection of exudate. After 6, 24, and 48 hours, seven animals from each group were euthanized by deepening the anesthetic dose, benzocaine (3g/10L). The swim bladder was washed with 0.5 ml of ice-cold PBS solution, containing EDTA 0,18%. Thus, we performed a sterile collection of exudate. Data were compared using analysis of variance (ANOVA) at 5 % probability and the difference between the means was compared by Tukey test. The results showed that within 24 hours there was higher ( $p < 0.05$ ) total cell accumulation in the swim bladder in relation to the other times, predominantly granulocyte and macrophage in all groups. The control group showed lower accumulation of total cells in the groups that received vaccine and/or adjuvant.

**Keywords:** Inflammation, exudate, streptococcal infection, vaccine

## INTRODUÇÃO

O organismo responde às agressões por meio da inflamação com o objetivo diluir, circunscrever e isolar ou destruir o agente agressor (GARCIA LEME, 1989; KUMAR et al., 2004). Uma das suas principais características é a mobilização adequada e em tempo hábil, de leucócitos da microcirculação para o foco inflamado onde se acumulam (GARCIA LEME, 1989).

Em peixes ocorre acúmulo de células no foco lesado e fagocitose por células competentes e outros mecanismos de defesa envolvem a produção de peptídeos para controle microbiano, atividade de lisozima, sistema complemento e outras proteínas sanguíneas (COLONNA et al., 2006).

Os peixes teleósteos apresentam sistema imune inato desenvolvido, composto de barreiras físicas, como a pele, e químicas, como lisozimas séricas e do muco que recobre a pele e as mucosas e envolve ovos embrionados formando uma barreira de proteção contra patógenos ambientais. Incluem-se moléculas do sistema complemento, proteína C-reativa, células fagocíticas como macrófagos, neutrófilos e trombócitos (WATTS; MUNDAY, 2001).

A resposta imune inata ou inespecífica é uma modalidade de resposta inflamatória dirigida contra antígenos no primeiro contato (FEARON; LOCKSLEY, 1996).

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar quantitativa e qualitativamente a resposta imune celular inespecífica de tilápias (*O. niloticus*) induzidas pela fração insolúvel do antígeno *S. agalactiae* obtido por sonicação, associado ao adjuvante incompleto de Freund.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Local, Animais e Acondicionamento.

O presente estudo foi realizado no Departamento de Patologia Veterinária da FCAV-Unesp e Setor de Patologia Geral do Campus Luiz Meneghel – Uenp (Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCAV-Unesp, Protocolo nº 011687/12).

Foram utilizadas 63 tilápias, *O. niloticus*, com peso médio de  $200\pm 25$ g, oriundas de pisciculturas do norte do Paraná. Os peixes foram aclimatados pelo período de 10 dias, em caixas fibra de 250 L, abastecidas com água corrente, proveniente de poço artesiano, com vazão de um litro por minuto, com aeração suplementar.

Após o período de acondicionamento os animais foram conduzidos ao infectório e dispostos em grupos de acordo com o modelo experimental. Os peixes foram distribuídos em aquários com capacidade útil de 90 L, dotados de sistema de fluxo contínuo de água desprovida de cloro, oriunda de poço artesiano e aeração suplementar.

Durante experimento os peixes foram alimentados pela manhã e tarde com ração comercial, correspondendo a 3% da biomassa. As caixas foram sifonadas semanalmente e a qualidade da água determinada nos momentos da alimentação. Os parâmetros da água foram determinados por meio do analisador portátil multiparâmetros (YSI®, modelo YSI 600R).

Os peixes eutanasiados foram descartados em sacos plásticos brancos (Lixo Tipo A) e congelados e recolhidos por empresa terceirizada para o destino adequado, segundo resolução número 358 de 2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA).

## **Grupos**

Para avaliar a resposta imune celular inespecífica ao extrato bacteriano sonificado os peixes receberam o estímulo na bexiga natatória e foram constituídos os seguintes grupos:

- Grupo 1 (G1) inoculado com PBS (controle) (n=21)
- Grupo 2 (G2) injetado com adjuvante incompleto de Freund + PBS (1:1) (n=21)
- Grupo 3 (G3) imunizado com a fração insolúvel + adjuvante incompleto de Freund (1:1) (n=21)

As coletas para os grupos supracitados ocorreram nos tempos pré-estabelecidos de 12, 24 e 48 horas, sete animais de cada grupo.

## **Imunização**

Para a imunização os animais foram anestesiados em banho de solução de benzocaina (1:20,000), diluída em álcool etílico 98° (0,1 g/mL) e mantidos nesta solução até atingir o plano cirúrgico da escala de ROSS e ROSS (1999). Atingido o plano anestésico desejado, os animais foram posicionados em decúbito dorsal e inoculadas com auxílio de agulha (25x7) e seringa (1ml), na bexiga natatória com o PBS (G1); adjuvante incompleto de Freund + PBS (1:1) (G2) e com a vacina preparada com a fração insolúvel do antígeno de *S. agalactiae* + adjuvante incompleto de Freund (1:1) (G3). Produzida conforme metodologia descrita anteriormente neste mesmo trabalho.

## **Indução e avaliação da resposta imune celular inespecífica**

Para a indução e avaliação da resposta imune celular inespecífica utilizou-se 63 animais divididos em três grupos, sendo Grupo 1 (G1) injetados com PBS (controle), o Grupo 2 (G2) injetado com adjuvante incompleto de Freund + PBS (1:1) e Grupo 3 (G3)

imunizado com a fração insolúvel do extrato bacteriano sonicado + adjuvante incompleto de Freud (1:1). Em todos os casos as injeções de solução PBS e as inoculações foram realizadas na bexiga natatória, um órgão oco, de circulação terminal, com raras células residentes e de fácil acesso para estímulos e coleta de exsudato (MARTINS et al., 2009).

Depois de tempos pré-estabelecidos de 6, 24 e 48 horas, sete animais de cada grupo, foram submetidos à eutanásia, por aprofundamento do plano anestésico com benzocaína (3g/10L). A bexiga natatória foi lavada cuidadosamente com 0,5 ml de solução gelada de PBS, contendo EDTA a 0,18% estéril. O mesmo volume injetado foi recolhido com o auxílio de seringa descartável e transferido para tubos cônicos, mantidos no gelo. Uma parte da solução PBS-EDTA-exsudato foi centrifugada a 1000 rpm, por cinco minutos, 4.000 G, em centrífuga clínica. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento total ressuspenso com a adição de 100 microlitros de solução salina e 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 foi colocada uma gota deste exsudato sobre lâmina histológica, juntamente com uma gota de soro de tilápia, extraída no dia anterior e mantidos refrigerados. Após homogeneização, foi realizada a estensão do exsudato, a lâmina foi deixada 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 de até 100 células dentre os diferentes tipos acumulados no foco inflamatório, para estabelecer o percentual de cada um.

## RESULTADOS

Durante todo o experimento as variáveis hídricas (temperatura=  $28,0 \pm 1,0$  °C, oxigênio dissolvido =  $4,8 \pm 1,0$  mg / L, pH =  $7,34 \pm 0,5$  e condutividade =  $115,62 \pm 30,5$  mS /cm) mantiveram-se em zona de conforto para a espécie (BOYD, 1990).

Os resultados apresentados na Tabela 1 demonstram que em 24 horas houve a maior taxa de acúmulo celular para a bexiga natatória em todos os grupos, todavia o grupo controle apresentou menor acúmulo comparado os demais grupos.

**Tabela 1** - Valores médios ( $\pm$  desvio padrão) e análise de variância para contagem de leucócitos totais, trombócitos, linfócitos, macrófagos e granulócitos do exsudato de tilápias (*O. niloticus*) injetadas com a fração insolúvel + adjuvant incompleto de Freund; com PBS + adjuvant incompleto de Freund e apenas com PBS (controle) nos tempos de 6, 24 e 48 horas.

| Tratamentos | Tempo | Variáveis                   |                            |                            |                          |                           |
|-------------|-------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|
|             |       | Leucócitos Totais           | Trombócitos                | Granulócitos               | Linfócitos               | Macrófagos                |
| Controle    | 6 h   | 96 $\pm$ 20 <sup>Cb</sup>   | 74 $\pm$ 20 <sup>Ca</sup>  | 12 $\pm$ 1 <sup>Bb</sup>   | 2 $\pm$ 1 <sup>Aa</sup>  | 8 $\pm$ 3 <sup>Ab</sup>   |
|             | 24 h  | 318 $\pm$ 29 <sup>Ab</sup>  | 237 $\pm$ 27 <sup>Ab</sup> | 47 $\pm$ 11 <sup>Ac</sup>  | 5 $\pm$ 3 <sup>Ab</sup>  | 29 $\pm$ 5 <sup>Bc</sup>  |
|             | 48 h  | 177 $\pm$ 51 <sup>Bb</sup>  | 138 $\pm$ 37 <sup>Bb</sup> | 21 $\pm$ 8 <sup>Bb</sup>   | 3 $\pm$ 2 <sup>Ab</sup>  | 15 $\pm$ 6 <sup>Ba</sup>  |
| Adjuvante   | 6 h   | 158 $\pm$ 64 <sup>Ca</sup>  | 102 $\pm$ 41 <sup>Ba</sup> | 34 $\pm$ 17 <sup>Ba</sup>  | 5 $\pm$ 3 <sup>Ba</sup>  | 17 $\pm$ 8 <sup>Ba</sup>  |
|             | 24 h  | 502 $\pm$ 80 <sup>Aa</sup>  | 311 $\pm$ 61 <sup>Aa</sup> | 118 $\pm$ 13 <sup>Aa</sup> | 18 $\pm$ 9 <sup>Aa</sup> | 55 $\pm$ 8 <sup>Aa</sup>  |
|             | 48 h  | 312 $\pm$ 110 <sup>Ba</sup> | 241 $\pm$ 79 <sup>Aa</sup> | 44 $\pm$ 18 <sup>Ba</sup>  | 4 $\pm$ 1 <sup>Ba</sup>  | 23 $\pm$ 16 <sup>Ba</sup> |
| Vacinado    | 6 h   | 170 $\pm$ 69 <sup>Ca</sup>  | 105 $\pm$ 42 <sup>Ca</sup> | 43 $\pm$ 21 <sup>Ba</sup>  | 5 $\pm$ 2 <sup>Ba</sup>  | 17 $\pm$ 7 <sup>Ca</sup>  |
|             | 24 h  | 561 $\pm$ 38 <sup>Aa</sup>  | 318 $\pm$ 21 <sup>Aa</sup> | 147 $\pm$ 23 <sup>Ab</sup> | 21 $\pm$ 8 <sup>Aa</sup> | 74 $\pm$ 5 <sup>Ab</sup>  |
|             | 48 h  | 332 $\pm$ 45 <sup>Ba</sup>  | 244 $\pm$ 50 <sup>Ba</sup> | 51 $\pm$ 9 <sup>Ba</sup>   | 6 $\pm$ 2 <sup>Bab</sup> | 31 $\pm$ 10 <sup>Ba</sup> |

\*As médias (n=7), seguidas de pelo menos uma letra em comum não são diferentes pelo teste de Tukey (p <0,05). Letras maiúsculas comparam as diferenças entre os tempos, enquanto as letras minúsculas comparam entre os diferentes tratamentos.

Também é possível observar que em todos os grupos que a menor taxa de acúmulo ocorreu após 6 horas, atingiu o máximo após 24 horas e diminuiu após 48 horas.

Houve diferença entre o número de granulócitos e macrófagos acumulados entre todos os grupos, nos quais o grupo vacinado apresentou maior número dos dois tipos celulares no período de maior acúmulo (24 horas).

## DISCUSSÃO

No presente trabalho foi possível observar que o maior acúmulo de leucócitos totais na bexiga natatória ocorreu 24 horas após o estímulo e foi maior ( $p < 0,05$ ) nos grupos estimulados com a vacina (fração insolúvel + adjuvante incompleto de Freund, 1:1) e estimulados com o adjuvante (adjuvante incompleto de Freund + PBS, 1:1), se comparados ao grupo controle (PBS).

Foi possível observar que ocorreu maior acúmulo ( $p < 0,05$ ) de macrófagos e granulócitos 24 horas após o estímulo com a vacina comparado aos outros grupos.

Castro et al. (2014) obtiveram resultados semelhantes aos deste trabalho e observaram maior acúmulo de células totais entre 12 horas e 24 horas após a estimulação com *S. agalactiae* inativado pelo calor na bexiga natatória de tilápias do Nilo. Segundo estes autores o exsudato era constituído predominantemente por trombócitos.

Segundo Parslow e Bainton (2004), o adjuvante intensifica a resposta ao imunógeno quando administrado conjuntamente. Sua ação consiste em prolongar a retenção do imunógeno e aumentar seu tamanho efetivo, estimulando o influxo de macrófagos e outros tipos de células imunocompetentes para o local estimulado.

Os monócitos possuem atividade fagocítica e citotóxica e são considerados células em trânsito no sangue. Durante o processo inflamatório migram para o local da



inflamação onde se transformam em macrófagos (WITTEN et al., 1998; CUESTA et al., 1999).

Os granulócitos em geral exercem importante função na modulação do sistema imune inato pela fagocitose e eliminação do patógeno, como também na apresentação de antígenos para ativação e expansão clonal de linfócitos (SECOMBES, 1996; VERLHAC; GABAUDAN, 1997; ABBAS, LICHTMANN; PILLAI, 2008).

Dadas as características das células supracitadas, seu maior acúmulo na bexiga natatória do grupo estimulado com a fração insolúvel da vacina associada ao adjuvante se comparados aos demais grupos, sugere incremento da resposta primária e, portanto, maior ativação e proliferação linfocitária. Esta resposta incrementada poderia favorecer a produção mais elevada de anticorpos e proteção imune mais efetiva para as tilápias vacinadas.

Os trombócitos são células mais abundantes no sangue de peixes depois dos eritrócitos (BLAXHALL; DAISLEY, 1973; ELLIS, 1976; UEDA et al., 1997). Neste estudo foram as células predominantes no foco inflamado em todos os grupos e estes resultados estão de acordo com o observado por Bozzo et al. (2007), Martins et al. (2009), Claudiano et al. (2013) e Castro et al. (2014). Há evidências de que os trombócitos contêm substâncias importantes para a fagocitose como glicogênio (AFFONSO et al., 2000; PASSANTINO et al., 2005; TAVARES-DIAS; BARCELLOS, 2005; TAVARES-DIAS, 2006), fosfatase ácida (ZINKL et al., 1991; SCHÜTT et al., 1997) e alcalina (ZINKL et al., 1991; PASSANTINO et al., 2005) e peroxidase (DAIMON et al., 1985). E que os trombócitos de peixes podem ser o elo entre os mecanismos de defesa inato e adaptativo (PASSANTINO et al., 2005), e expressar moléculas de superfície e intracelulares envolvidas na função imune (KÖLLNER et al., 2004).

Neste trabalho observou-se o maior acúmulo de leucócitos nos peixes estimulados com a vacina em relação aos demais grupos. A mobilização adequada de leucócitos e trombócitos da microcirculação, assim como seu acúmulo no foco inflamado, são fundamentais para a eliminação dos agentes invasores e para o desenvolvimento da resposta imune adquirida. Esta ocorrerá mais rápida e intensamente quando houver outros contatos com o antígeno natural.

## **CONCLUSÃO**

Os resultados deste trabalho permitem concluir que a estimulação com a fração insolúvel do antígeno associada ao adjuvante incompleto de Freund provocou o maior ( $p < 0,05$ ) acúmulo de células da primeira linha de defesa, macrófagos e granulócitos, se comparados aos grupos estimulados somente com o adjuvante ou com PBS.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- AFFONSO, 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.
- ABBAS, A.; LICHTMANN, A.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. Editora Elsevier, 6ª edição, 2008.
- BLAXHALL, P. C.; DAISLEY, K. W. Routine haematological methods for use with fish blood. **J. Fish Biol.**, v. 5, p. 771-781, 1973.
- BOYD, C.E. **Water quality in ponds for aquaculture**. Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University. 1990.
- 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.
- CASTRO, M.P.; CLAUDIANO, G.S.; PETRILLO, T.R.; SHIMADA, M.T.; BELO, M.A.A.; MARZOCCHI-MACHADO, C.M.; MORAES, J.R.E.; MANRINQUE.W.G.; MORAES, F.R. Acute aerocystitis in Nile tilapia bred in net and supplemented with chromium carbochelate and *Saccharomyces cerevisiae*, **Fish & Shellfish Immunology**. v. 36, p. 284-290, 2014.
- CLAUDIANO, G. da S.; PETRILLO, T.R.; MANRIQUE, W.G.; CASTRO, M.P.; LOUREIRO, B.A.; MARCUSSO, P.F.; BELO, M.A.A.; MORAES, J.R.E. de; MOREAS, F.R. Acute aerocystitis in *Piaractus mesopotamicus*: participation of eicosanoids and pro-inflammatory cytokines. **Fish and Shellfish Immunology**, v.34, p.1057-1062, 2013.

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

CONAMA, **resolução**; nº 358, de 29 de abril de 2005 Publicada no DOU no 84, de 4 de maio de 2005, Seção 1, páginas 63-65, 2005.

CUESTA, A.; ANGELES ESTEBAN, M.; MESEGUER, J. Natural cytotoxic activity of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) leucocytes assessment by flow cytometry and microscopy. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.71, p.161-171, 1999.

DAIMON, T.; GOTOH, Y.; KAWAI, K.; UCHIDA, K. Ultrastructural distribution of peroxidase in thrombocytes of mammals and submammals. **Histochemistry**, v.82, p 345-350, 1985.

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

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

GARCIA LEME, J. Hormones and Inflammation, CRC Press, Boca Raton, 1989. p.12-38

KÖLLNER, B.; FISCHER, U.; ROMBOUT, J. H. W. M.; TAVERNE-THIELE, J. J.; HANSEN, J. D. Potential involvement of rainbow trout thrombocytes in immune functions: a study using a panel of monoclonal antibodies and RT-PCR. **Devices Compendium of Immunology**, v.28, p.1049–1062, 2004.

KUMAR, V.; CONTRAN; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Patologia – Bases Patológicas das Doenças**. 4ª. Elsevier. 49pp. 2004.

MARTINS, M.L.; D.M.Y. MYIAZAKI, M. TAVARES-DIAS; J. FENERICK JR.; E.M. ONAKA; F.R. BOZZO; R.Y. FUJIMOTO & F.R. MORAES. Characterization of the acute inflammatory response in the hybrid tambacu (*Piaractus mesopotamicus* male x

*Colossoma macropomum* female) (Osteichthyes). **Brazilian Journal of Biology**, 69(2): 631-637, 2009.

PARSLOW, T.G.; BAINTON, D.F. Imunidade inata. In: PASLOW, T.G.; STITES, D.P.; TERR, A.I.; IMBODEN, J.B. (Eds.) **Imunologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004. p. 16-33.

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

ROSS, L.G.; ROSS, B. **Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals**. Oxford: Blackwell Science, 159 p. 1999.

SECOMBES, C.J. The nonspecific immune system: cellular defenses. In: IWAMA, G; NAKANISHI, T. (Ed.). **The fish immune system**. London: Academic Press. p.95-103. 1996.

SCHÜTT, D. A.; LEHMANN, 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.

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.; BARCELLOS, J. F. M. Peripheral blood cells of the armored catfish *Hoplosternum littorale* Hancock, 1828: a morphological and cytochemical study. **Brazilian Journal of Morphology Science**, v.22, p. 215–220, 2005.

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.

UEDA, I. K.; EGAMI, M. I.; SASSO, W. S.; MATUSHIMA, E. R. Estudos hematológicos em *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) (Cichlidae, Teleostei) – Parte I. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 34, n. 5, p. 270-275, 1997.

VERLHAC, V.; GABAUDAN, J. 1997. The effect of vitamin C on Fish Health. **Roche Technical Bulletin**, Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland, 30 pp.

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

WEDEMEYER G, ROSS AJ, SMITH L. Some metabolic effects of bacterial endotoxin in salmonid fishes. **Journal of Fisheries Research Board of Canada**; 26:115 e 22. 1970.

WITTEN, P.E.; VILLWOCK, W.; RENWRANTZ, L. Haematogram of the tilápia *Oreochromis niloticus* (Cichlidae, Teleostei) and application of a putative phenoloxidase for differentiating between neutrophilic granulocytes and monocytes. **Canadian Journal of Zoology**, v.76, p.310-319, 1998.

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.