

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP**  
**CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP**

**Eficácia de duas formulações de vacinas autógenas para o controle da lactococose em surubins híbridos *Pseudoplatystoma corruscans* x *Pseudoplatystoma reticulatum*.**

**Hirla Costa Silva Fukushima**

**Jaboticabal, São Paulo**

**2014**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP**  
**CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP**

**Eficácia de duas formulações de vacinas autógenas para o controle da lactococose em surubins híbridos *Pseudoplatystoma corruscans* x *Pseudoplatystoma reticulatum*.**

**Hirla Costa Silva Fukushima**

**Orientador: Dra. Maria José Tavares Ranzani de Paiva**

**Tese apresentada ao Programa de Pós  
Graduação em Aquicultura como parte das exigências  
para obtenção do título de Doutor em Aquicultura.**

**Jaboticabal/ São Paulo**

**2014**

## SUMÁRIO

RESUMO .....	1
ABSTRACT .....	2

### **CAPÍTULO 1 - Revisão Bibliográfica**

INTRODUÇÃO.....	4
1. Vacinação de peixes .....	5
1.1. Tipos de vacinas .....	7
1.2. Rotas de administração de vacinas .....	9
2. <i>Lactococcus garvieae</i> .....	11
3. Sistema imune de teleósteos. ....	13
REFERÊNCIAS .....	16
OBJETIVOS .....	27

### **CAPÍTULO 2 - Identificação de surtos causados por cocos Gram positivos em cachara=*Pseudoplatystoma reticulatum* e surubim híbrido *Pseudoplatystoma corruscans* x *P. reticulatum***

RESUMO.....	28
ABSTRACT.....	29
1. INTRODUÇÃO .....	30
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
1.1. Identificação Bioquímica e Molecular dos cocos Gram positivos	31
2.2. Postulado de Koch .....	35
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	36
4. CONCLUSÃO.....	40
5. AGRADECIMENTOS .....	40
6. REFERÊNCIAS .....	40

### **CAPÍTULO 3 - Eficácia de duas formulações de vacinas para o controle da lactococose em surubins híbridos *Pseudoplatystoma corruscans* x *Pseudoplatystoma reticulatum*.**

RESUMO.....	47
ABSTRACT.....	48

1. INTRODUÇÃO .....	49
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	51
2.1 Preparo das vacinas.....	51
2.2 Vacinação.....	53
2.3 Desafio.....	54
2.4 Dinâmica da resposta imune adaptativa e modulação da imunidade inata em surubins.....	55
2.4.1. Avaliação hematológica.....	55
2.4.2. Atividade de Lisozima.....	56
2.4.3. Avaliação da Titulação dos Anticorpos .....	57
<b>ELISA</b> .....	57
<b>Provas de aglutinação dos soros</b> .....	58
2.5. Análise Estatística.....	58
3. RESULTADOS .....	59
4. DISCUSSÃO .....	70
5. CONCLUSÃO .....	74
6. AGRADECIMENTOS .....	74
7.REFERÊNCIAS.....	75

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho não é resultado apenas de um esforço individual. Ele nasce de significativas contribuições que recebi durante minha trajetória profissional e acadêmica juntamente com pessoas que acreditaram e colaboraram, assim como algumas instituições que foram fundamentais para essa construção.

Consciente de que é impossível listar todos que de uma forma ou de outra me acrescentaram conhecimentos e experiências essenciais à forma de ver o mundo e nele atuar - particularmente em relação à área piscicultura preciso expressar meu agradecimento por ter convivido e aprendido com pessoas como:

À minha querida orientadora Masé, por todo apoio oferecido desde o princípio, pela oportunidade e confiança depositada, além dos valiosos ensinamentos e das sugestões e discussões no decorrer do trabalho, desde a elaboração do projeto até a redação final da tese;

Ao Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (CAUNESP), pela viabilização logística deste trabalho junto ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura;

Ao Laboratório de Doenças de Organismos Aquáticos da Universidade Federal de Minas Gerais, onde fui muito bem recebida pelo Professor Henrique Figueiredo e Professor Carlos Leal, por me ensinar e colaborar muito com o grande conhecimento específico da área;

À Universidade de Málaga, que sob supervisão do Professor Miguel Angel, me aceitou em seu laboratório dando as condições necessárias de trabalho para algumas análises, assim como o Professor Salvador Arijo, que muito me acrescentou na área profissional, mostrando sempre sua ética.

Ao Pesquisador Fabio Sussel pelo convívio e por ter sempre disponibilizado a infra-estrutura do Setor de Piscicultura do Apta, Pirassununga,

SP, para a realização de experimentos desta Tese. Pelo acolhimento, por toda força e dedicação;

Ao Professor Dr. Paulo Lacava, da Universidade Federal de São Carlos, por ceder um espaço em seu laboratório para conclusão de minhas análises, assim como por me orientar no Estágio de Docência em Microbiologia;

Ao Professor Dr. Ricardo Carneiro Borra por toda disponibilidade dispensada, obrigada pelas sugestões e contribuições nas análises estatísticas e imunológicas deste projeto;

À Pesquisadora Márcia Ishikawa, da Embrapa (Dourados, MS), pela disponibilidade e atenção prestada ao longo destes últimos anos;

À Mestranda Raissa Bertoncetto por todo o auxílio prestado, pelo companheirismo e pela alegre convivência;

A Minha Amiga Veralice Cappato por todo apoio;

Aos membros da banca de defesa da tese por aceitarem o nosso convite, agradeço desde já a atenção dispensada!

Aos pesquisadores e funcionários de todas as Instituições citadas acima, que de forma direta ou indireta auxiliaram para conclusão deste trabalho.

## **APOIO FINANCEIRO**

**FAPESP, Bolsa de Doutorado, Processo n°2010/16149-5; Auxilio a pesquisa, Processo 2012/07852-0.**

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1-** Comparação da imunologia de teleósteos e mamíferos (adaptado de Kibenge *et al.* (2012)..... 14

### **CAPÍTULO 2 - Identificação de surtos causados por cocos Gram positivos em *Pseudoplatystoma reticulatum* e surubim híbrido *Pseudoplatystoma corruscans* x *P. reticulatum*.**

**Tabela 1-** Resultado da identificação fenotípica e molecular de cocos Gram positivos isolados de surubins *Pseudoplatystoma corruscans* x *P. reticulatum* (BR-LG1; BR-LG2; BR-LG3) e cacharas *Pseudoplatystoma reticulatum* (BR-LG4 e BR-LG5) doentes ..... 37

### **CAPÍTULO 3 – Eficácia de duas formulações de vacinas para o controle da lactococose em surubins híbridos *Pseudoplatystoma corruscans* x *P. reticulatum*.**

**Tabela 1** - Delineamento experimental utilizado para avaliação da potência das vacinas, 30 dias após a imunização, na sobrevivência dos surubins híbridos *Pseudoplatystoma corruscans* x *Pseudoplatystoma reticulatum* após desafio com *L. garvieae*..... 53

**Tabela 2** – Mortalidade acumulada de surubins híbridos *Pseudoplatystoma corruscans* x *P. reticulatum* vacinados com bacterina aquosa e bacterina oleosa após infecção experimental com *L. garvieae* 30 dias após a vacinação **Erro! Indicador não def**

**Tabela 3** - Valores médios ( $\pm$ desvio padrão) do hematócrito e da contagem total de eritrócitos, trombócitos e leucócitos 30 dias após a vacinação de surubins híbridos *Pseudoplatystoma corruscans* x *P. reticulatum* contra lactococose com bacterina aquosa e bacterina oleosa antes e após desafio experimental com cepa viva de *L. garvieae*..... 62

**Tabela 4** - Valores médios ( $\pm$ erro padrão) dos números absolutos de leucócitos (transformação) de surubins híbridos *Pseudoplatystoma corruscans* x *P. reticulatum* 30 dias após imunização contra *Lactococcus garvieae*..... 63

**Tabela 5** – Médias dos resultados da variável tempo na análise ANOVA de dois fatores na titulação de anticorpos de surubins híbridos *Pseudoplatystoma corruscans* x *P. reticulatum* vacinados e não vacinados antes e após desafio experimental com cepa viva de *Lactococcus garvieae*. .....65



**Tabela 6** – Resultados das médias dos tratamentos de vacinas por ANOVA 2 fatores de surubins híbridos *Pseudoplatystoma corruscans* x *P. reticulatum* vacinados e não vacinados antes e após desafio experimental com cepa viva de *Lactococcus garvieae*.....65

**Tabela 7** – Aglutinação de soros de surubins híbridos *Pseudoplatystoma corruscans* x *P. reticulatum* imunizados com bacterina aquosa (BA), bacterino oleosa (BO) e controles (C) 15, 30 e 60 dias após a vacinação (dpv) contra lactococose ..... 69

## LISTA DE FIGURAS

### **CAPÍTULO 2 - Identificação de surtos causados por cocos Gram positivos em *Pseudoplatystoma reticulatum* e surubim híbrido *Pseudoplatystoma corruscans* x *P. reticulatum*.**

**Figura 1:** Cepas brasileiras de *Lactococcus garvieae* (BR- LG1, BR- LG2 e BR- LG3) agrupados no mesmo cluster com *L. garvieae* isola ATCC49156 e X54262, mostrando 100% de porcentagem de “bootstrap” em análise filogenética de seqüências de 16S rRNA.....38

### **CAPÍTULO 3 – Eficácia de duas formulações de vacinas para o controle da lactococose em surubins híbridos *Pseudoplatystoma corruscans* x *P. reticulatum*.**

**Figura 1.** Curva de Kaplan-Meier de surubins híbridos *Pseudoplatystoma corruscans* x *P. reticulatum* após infecção experimental com *Lactococcus garvieae*, 30 dias após a vacinação ..... 59

**Figura 2.** Sintomatologia clínica de surubins híbridos *Pseudoplatystoma corruscans* x *P. reticulatum* após infecção experimental com *L. garvieae*, 30 dias após a vacinação: (a) septicemia hemorrágica; (b) hemorragia na área periocular e exoftalmia; (c) ulcerações na pele; (d) distensão abdominal ..... 60

**Figura 3.** Atividade da lisozima de surubins híbridos *Pseudoplatystoma corruscans* x *P. reticulatum* vacinados e não vacinados antes e após desafio experimental com cepa viva de *Lactococcus garvieae*. Tratamentos (n=6): GI controle sem desafio; GII – vacinados com bacterina aquosa sem desafio; GIII – vacinados com bacterina oleosa sem desafio; GIV – controle com desafio; GV – vacinados com bacterina aquosa com desafio; GVI – vacinados com bacterina oleosa com desafio..... 64

**Figura 4.** Titulação de anticorpos de surubins híbridos *Pseudoplatystoma corruscans* x *P. reticulatum* imunizados com bacterina aquosa 15 dias após a imunização (15dpv BA) pelo método Elisa indireto ..... 66

**Figura 5.** Titulação de anticorpos de surubins híbridos *Pseudoplatystoma corruscans* x *P. reticulatum* imunizados com bacterina oleosa 15 dias após a imunização (15dpv BO) pelo método Elisa indireto. (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,001$  .....66

**Figura 6.** Titulação de anticorpos de surubins híbridos *Pseudoplatystoma corruscans* x *P. reticulatum* imunizados com bacterina aquosa 30 dias após a imunização (30dpv BA) pelo método Elisa indireto. (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,001$   
.....67

**Figura 7.** Titulação de anticorpos de surubins híbridos *Pseudoplatystoma corruscans* x *P. reticulatum* imunizados com bacterina oleosa 30 dias após a imunização (30dpv BO) pelo método Elisa indireto. (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,001$   
.....67

**Figura 8.** Titulação de anticorpos de surubins híbridos *Pseudoplatystoma corruscans* x *P. reticulatum* imunizados com bacterina aquosa 60 dias após a imunização (60dpv BA) pelo método Elisa indireto. (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,001$   
.....68

**Figura 9.** Titulação de anticorpos de surubins híbridos *Pseudoplatystoma corruscans* x *P. reticulatum* imunizados com bacterina oleosa 60 dias após a imunização (60dpv BO) pelo método Elisa indireto. (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,001$   
.....69

## RESUMO

Identificou-se no presente estudo o agente patogênico causador de surtos de estreptococose em cachara e surubins como sendo a *Lactococcus garvieae*. Considerando que a lactococose é uma doença emergente de importância econômica mundial, que gera surtos de mortalidade em massa em diversas espécies de peixes, avaliamos a possibilidade de prevenção e controle desta patologia com o uso de vacinas. Após confirmação da patogenicidade da bactéria pelo Postulado de Koch, foram formuladas duas bacterinas inativadas com formalina, uma aquosa e uma oleosa, com emprego de adjuvante. Surubins híbridos foram imunizados via intraperitoneal com ambas bacterinas e com PBS. Para avaliar a eficiência das vacinas foi comparada a potência dos imunobiológicos desenvolvidos na sobrevivência dos animais, na cinética de anticorpos 15, 30 e 60 dias após a vacinação e na modulação da resposta imune após desafio bacteriano. Melhores níveis de proteção foram observados com a imunização com bacterina oleosa, onde foi observado maior nível de anticorpos circulantes e cujo valor de porcentagem relativa de sobrevivência foi de 81,7%. O presente fez o primeiro registro de surto de septicemia hemorrágica causada por *Lactococcus garvieae* em surubins híbridos e cacharas, e demonstrou que a imunidade dos surubins pode ser estimulada com emprego de vacinas, e que a bacterina oleosa proporciona proteção mais eficaz contra a lactococose.

## ABSTRACT

The present study identified the pathogen causing outbreaks of streptococose in cachara and surubins as being the *Lactococcus garvieae*. Whereas lactococose as an emerging disease of worldwide economic importance, that generates outbreaks of mass mortality in several species of fish, we evaluated the possibility of prevention and control of this pathogen with the use of vaccines. After confirming the pathogenicity of the bacterium by Koch postulate, two inactivated bacterins with formalin, an aqueous and an oily, with the use of adjuvant, were formulated. Surubins hybrids were immunized intraperitoneally with PBS and both bacterins. To evaluate the efficacy of the vaccines was compared the potency of the biopharmaceuticals developed in survival of the animals, on the kinetic of antibody 15, 30 and 60 days after vaccination and in the modulation of the immune response after bacterial challenge. Best levels of protection were observed with immunization with oily bacterin, where were observed higher level of circulating antibodies and whose value relative survival percentage was 81.7 %. This work made the first recorded outbreak of haemorrhagic septicemia caused by *Lactococcus garvieae* in hybrid surubins and cacharas, and demonstrated that the immunity of surubins can be stimulated through the use of vaccines, and oily bacterin provides more effective protection against lactococose .

## **CAPÍTULO 1**

### **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## INTRODUÇÃO

O declínio dos estoques naturais dos peixes tem sido um incentivo para diversificação do setor aquícola atual (Whyte, 2007). Atualmente, mais de 600 espécies de peixes são produzidas no mundo e a aquicultura representa o setor de maior crescimento de produção animal de alimentos, fornecendo cerca de metade (47 por cento) de todo pescado destinado à alimentação humana e, a previsão é de que até 2030 a demanda internacional de pescado aumente em mais 100 milhões de toneladas por ano (FAO, 2012). A produção mundial hoje é da ordem de 126 milhões de toneladas. O Brasil é um dos poucos países que tem condições de atender à crescente demanda mundial por produtos de origem pesqueira, sobretudo por meio da aquicultura (MPA, 2011).

O cultivo de surubins híbridos no Brasil aumentou 40% entre 2008-2010, acompanhando a tendência nacional de produção aquícola, que passou de 282.008,1 toneladas para 394.340 toneladas no mesmo período (MPA, 2012). Contudo, com a intensificação das produções, os animais são submetidos a desafios rotineiros, como manejo, transporte e adensamento. Estas práticas são capazes de alterar o equilíbrio homeostático dos peixes e afetar processos dependentes de energia, como reprodução e crescimento (Wedemeyer, 1996). Com isto, a intensificação dos cultivos tem tornado estas culturas altamente vulneráveis à doenças infecciosas, visto que o estresse crônico dos animais promove oportunidades para emergência de doenças causada por patógenos que poderiam ser inofensivos em condições naturais (Kiron, 2012).

Adicionalmente, o ambiente aquático remete uma série de desafios, incluindo a falta de barreiras físicas com as populações de peixes selvagens, que funcionam como reservatório de patógenos para peixes de viveiro. Portanto, deve-se considerar que a erradicação do patógeno não pode ser realizada neste ambiente e que as doenças são particularmente devastadoras na aquicultura (Plant e LaPatra, 2011), sendo portanto, tratamentos efetivos vitais, e a vacinação, um método sustentável para controlar e prevenir possíveis doenças infecciosas (Kibenge et al., 2012)

Os agentes patogênicos mais comuns na aquicultura são bactérias (54,9%), seguidos por vírus (22,6%), parasitas (19,4%) e fungos (3,1%) (McLoughlin, 2006). Dentre as enfermidades diagnosticadas nos surubins, as de

etiologia bacteriana estão entre as mais impactantes (Campos, 2005), devido à elevada taxa de mortalidade, de 60 à 90% (Pavanelli et al. 2002), e custo elevado para sua prevenção e controle (Sacchetin e Moraes, 2010).

Vacinas efetivas têm sido provavelmente um dos fatores mais importantes para o crescimento e sucesso do sistema intensivo de produção de peixes em todo mundo (Brudeseth et al., 2013). A introdução de vacinas oleosas na Noruega demonstrou um impacto significativo na redução da utilização de antibióticos de 50.000 kg para 1.000-2.000 kg em 10 anos, enquanto no mesmo período a produção de peixes aumentou de 50.000 toneladas para 350.000 toneladas (Somerset et al., 2005). Neste contexto, a vacinação tem se tornado cada vez mais importante na aquicultura, já que seu emprego é considerado um método eficaz de controle de importantes patogenias (Toranzo et al., 2009).

Considerando-se as projeções sobre o crescimento da aquicultura brasileira, torna-se necessário o desenvolvimento de programas contra enfermidades e a combinação racional de produtos preventivos, economicamente viáveis e ecologicamente seguros para manutenção da saúde dos animais aquáticos. Desta forma, muitos estudos têm sido realizados para melhorar a imunidade de peixes a doenças, com crescente utilização de "alimentos funcionais", vacinas, medicamentos e imunoestimulantes contra as doenças de peixes criados em cativeiro (Muiswinkel, 2008).

## **1. Vacinação de peixes**

A imunidade representa proteção a doenças, mais especificamente contra doenças infecciosas, e as barreiras físicas, células, moléculas e processos responsáveis pela imunidade constituem o sistema imune. Do ponto de vista evolucionário, os peixes são considerados como a primeira classe de vertebrados a ter ambos sistemas de defesa, inato e adaptativo, embora a segunda linha de defesa não seja tão evoluída quanto nos vertebrados superiores (Miller et al., 2010).

Na natureza os peixes são capazes de se proteger com a ajuda de um complexo mecanismo de defesa inato (Ellis, 2001), entretanto, nas criações, a pressão de infecção tende a ser muito maior devido as práticas comumente



empregadas no cultivo intensivo (Kiron, 2012). Portanto, o entendimento da biologia das espécies de peixes que são cultivadas, em particular, a resposta imune, é essencial para otimização do manejo do cultivo, bem como da saúde dos animais (Whyte, 2007), já que os peixes estão em constante interação com o ambiente ao redor, e podem facilmente encontrar potenciais patógenos.

Estatísticas demonstram que doenças foram a causa primária de perdas na indústria da tricultura em 2009, sendo 90% destas perdas decorrente de enfermidades que poderiam ser prevenidas (NASS, 2010). A vacinação é parte integral de uma estratégia de manejo sanitário aplicado com sucesso em todo animal de criação (Thorarinsson e Powell, 2006). A intenção da vacinação é estimular o sistema imunológico de forma que se o hospedeiro encontrar o organismo patogênico em um momento futuro, uma forte resposta protetora será rapidamente levantada. As vacinas são, portanto, baseadas no sistema imune adaptativo e são inerentes à memória imunológica (Toranzo et al., 2009).

Os primeiros estudos sobre a viabilidade do estímulo do sistema imune em peixes foi realizado em 1938 por Snieszko et al., quando os autores demonstraram que a carpa construiu uma imunidade protetora após injeção intraperitoneal de *Aeromonas hydrophila* inativadas. Contudo entre os anos 40 e 50, o interesse para o desenvolvimento de uma vacina efetiva para os peixes foi diminuído devido à disponibilidade de drogas potentes (sulfa) e antibióticos, os quais eram muito efetivos para tratamentos bacterianos em peixes (Gudding e Muiswinkel, 2013).

Posteriormente, com o desenvolvimento de resistência de certos patógenos aos antibióticos e a preocupação de que as drogas usadas na aquicultura poderiam prejudicar a saúde animal e humana, levou ao reestabelecimento de pesquisas com vacinação em peixes a partir de 1960 (Muiswinkel, 2008). Já, em 1976 a primeira vacina foi licenciada nos EUA contra *Yersinia ruckeri*, via oral e em 1981 uma vacina intraperitoneal com adjuvante foi licenciada contra *A. salmonicida* (Plant e LaPatra, 2011).

Atualmente, o desenvolvimento de uma indústria de aquicultura viável depende do desenvolvimento e implementação de regimes de vacinação que tornem a situação de doença previsível e manejável no cultivo intensivo (Evensen et al., 2005; Plant e LaPatra, 2011; Sommerset et al., 2005; Thorarinsson e

Powell, 2006 ), especialmente quando a erradicação do patógeno é improvável que seja bem sucedida (Kibenge et al., 2012). Neste contexto, hoje existem vacinas para mais de 17 espécies de peixes que protegem contra 22 diferentes doenças bacterianas e 6 doenças virais. As vacinas estão disponíveis em mais de 40 países e são mais usadas em espécies com potencial para industrialização, de elevado valor comercial (Brudeseth et al., 2013). Apesar disto, existem muitas doenças de peixes conhecidas atualmente para as quais não existem vacinas eficazes, e a utilização de vacinas de baixa eficácia pode reduzir a rentabilidade dos cultivos (Thorarinsson e Powell, 2006).

No ano de 2011, foi licenciada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento a primeira vacina para utilização na aquicultura nacional. Essa é empregada no controle da estreptococose em criações de tilápia. Contudo, apesar de ser uma das espécies de peixes mais produzidas na aquicultura mundial, não há uma aplicação generalizada de vacinas em tilápias. O baixo valor relativo de cada peixe na despesa faz com que seja difícil para as pequenas pisciculturas investir em vacinas eficazes para esta espécie de peixe. Adicionalmente, não existem vacinas licenciadas para o uso na piscicultura de peixes nativos, incluindo nas criações de surubins, peixes de elevado valor comercial e grande potencial de industrialização.

O termo estratégia de vacinação consiste na decisão de contra qual doença os animais serão vacinados, bem como o tipo de vacina, o método de vacinação, o momento da vacinação e a necessidade do uso da revacinação.

### **1.1. Tipos de vacinas**

A maioria das vacinas utilizadas até hoje na aquicultura têm sido inativadas em formalina, e os melhores resultados são obtidos com aquelas bacterinas que incluem tanto as células bacterianas quanto os produtos extracelulares (cápsulas) (Plant e LaPatra, 2011). Poucas vacinas conferem níveis de proteção com formulações aquosas administradas por injeção ou imersão, sendo os níveis de proteção adequados alcançados por imunização com bacterinas em óleo adjuvante empregadas por injeção intraperitoneal (Brudeseth et al., 2013). O salmão do Atlântico é a espécie de salmonídeo mais importante na aquicultura

mundial, tanto em termos de valor, como de escala de produção (Katare et al., 2005). Por isto, há duas décadas muitos estudos vêm sendo desenvolvidos visando à proteção destes peixes contra doenças infecciosas. Desde então, várias vacinas licenciadas para o salmão do Atlântico e o salmão prateado estão disponíveis comercialmente no mercado.

A maior parte das vacinas são oleosas e administradas por injeção intraperitoneal (Plant e LaPrata, 2011). No entanto, regimes de vacinação diferentes são aplicados dependendo da prevalência regional de doenças específicas (Sommerset et al., 2005). Atualmente, a vacina injetável oleosa mais abrangente para o salmão do Atlântico é composto por sete diferentes antígenos que protegem contra a furunculose, vibriose, vibriose de água fria, necrose infecciosa do pâncreas e anemia infecciosa do salmão e são administradas com uma única injeção (Brudeseth et al., 2013).

Outro tipo de vacina são as vivas atenuadas, que podem ter potencialmente muitas vantagens na aquicultura, uma vez que os microorganismos atenuados, a partir de passagens sucessivas em meios de cultura ou culturas celulares, sobrevivem e replicam dentro do animal vacinado, o que resulta em uma forte resposta imunológica celular que confere uma proteção de longa duração (Biering et al., 2005). Além disto, a cepa da vacina é disseminada por peixes vacinados, o que leva a propagação eficaz do antígeno em toda população durante um período prolongado de tempo. Até hoje, apenas uma vacina viva atenuada está licenciada para uso na aquicultura nos EUA, contra *Edwardsiella ictaluri* e têm sido testadas experimentalmente, entretanto problemas com relação a segurança, permanência nos peixes e no meio ambiente, reversão da virulência e risco de atingir espécies não alvo, devem ser resolvidos antes da utilização destas vacinas vivas na produção (Brudeseth et al., 2013). Uma vacina viva atenuada contra koi herpesvírus, modificada por irradiação UV (Perelberg et al., 2005), foi licenciada recentemente e tem sido amplamente utilizada em fazendas de carpas em Israel (OIE, 2011).

Existe ainda um grupo de novas vacinas que têm sido recentemente desenvolvidas por recombinação genética, produzidas através de modernas técnicas de biologia molecular e engenharia genética, onde o antígeno é expresso (produzido) por outros microrganismos (por exemplo, leveduras). Essas vacinas

possuem vantagens teóricas sobre as demais vacinas: em mamíferos, após vacinação com vacinas recombinantes, o sistema imunológico responde produzindo anticorpos e ativando células T-helper e células citotóxicas. Entretanto, antes de ser empregada em empreendimentos comerciais na aquicultura, a segurança para o peixe, meio ambiente e consumidor devem ser asseguradas (Plant e LaPatra, 2011). Até o momento só há uma vacina de DNA recombinante licenciado comercialmente contra o vírus da necrose hematopoiética infecciosa (IHNV) para peixes (Lorenzen e LaPatra, 2005; Kurath et al., 2007; Kurath, 2008).

## **1.2. Rotas de administração de vacinas**

O método de administração da vacina é um fator importante a considerar em termos de eficácia, custo e efeitos colaterais. A administração de vacinas pode ser feita na forma oral através da alimentação, por imersão em suspensões de vacinas diluídas, por injeção via intraperitoneal (vacinas oleosas) ou intramuscular (vacinas de DNA) (Corbeil et al., 2000). Em geral o nível e duração da eficácia são maiores com a injeção intraperitoneal, método mais utilizado atualmente, entretanto, também é o método que exige maior manejo e estressa mais os peixes.

O segundo método de administração de vacina mais empregado para peixes é a imersão em suspensão vacinal (Sommerset et al., 2005). A imersão pode ser por banho, mergulho, ou pulverização. Tais métodos são baratos e fáceis (Plant e LaPatra, 2011) e são eficazes para várias vacinas bacterianas. No entanto, requerem grandes volumes de vacina (Nakanishi e Ototake, 1997), e não existe um bom controle para a dose. Além disso, o grau e duração da proteção imune induzida por vacinação de imersão é variável (Kibenge et al., 2012).

Do ponto de vista econômico, vacinação oral é a rota ideal para ser empregada em larga escala, contudo, até recentemente, a vacinação oral tem sido inferior em termos de eficácia (Vandenberg, 2004). Para a vacinação oral, pesquisas estão focadas na proteção do antígeno na digestão e decomposição durante a passagem através do estômago e intestino anterior, para assegurar que os antígenos permaneçam no trato intestinal tempo suficiente para ser

processado pelo GALT (tecido linfóide do intestino), e adicionalmente, no controle da dose de antígeno, a fim de garantir que todos os peixes ingiram a vacina (Quentel e Vigneulle, 1997; Rombout et al., 2011).

Quando os peixes são injetados com as vacinas, os antígenos protetores podem ser localizados no baço e no rim (Tatner et al., 1986), que são os principais órgãos de filtração fagocítica e os principais locais de imunidade protetora. Por outro lado, após a imersão na vacina, os antígenos são quase exclusivamente localizados na superfície externa, tanto da pele como das brânquias (Ellis, 2001). De fato, enquanto a injeção induz uma resposta imune sistêmica no baço e rim, acredita-se que a imersão induza principalmente uma resposta imunitária tegumentária nas membranas mucosas da pele, brânquias e intestino (Ellis, 1988). Em carpas, estudos sugerem que a administração oral de antígenos estimula a produção de anticorpos no intestino, brânquias e pele, mas não no rim e no sangue, enquanto que a injeção parentérica estimula o compartimento sistêmico, mas não o compartimento de mucosas (Hoel et al., 1997; Ellis, 1999).

Os resultados de todas as vacinas estudadas demonstram que a injeção proporciona proteção imunitária muito melhor que a imersão (Gudding et al., 1999; Midtlyng et al., 1996; Tatner et al., 1986). Atualmente, a melhor estratégia é a utilização de vacinação por imersão para peixes de até 5 g, para protegê-los até que estes sejam suficientemente grandes para receber a injeção (Kibenge et al., 2012). A versão mais recente da vacinação por imersão utiliza ultra-som (Plant e LaPatra, 2011), uma onda de som de alta-frequência de aproximadamente 20 kHz que aumenta a permeabilidade celular. O método mostrou proporcionar proteção com mesma eficiência que com a injeção intraperitoneal (Zhou et al., 2002a; Zhou et al., 2002b). Outro método novo e igualmente eficaz usa um instrumento de punção para produzir múltiplas pequenas lesões nos lados do peixe enquanto eles estão imersos na vacina (Nakanishi et al., 2002).

Embora estes diferentes métodos possuam diferentes vantagens e desvantagens com respeito ao nível de proteção, efeitos colaterais, praticidade e custo-benefício, é de consenso geral que apenas as rotas de injeção intraperitoneal e banhos de imersão conferem proteção satisfatória para serem usadas como rotas primárias na imunização de peixes na aquicultura (Toranzo, 2009).

O desenvolvimento de vacinas de peixe é caro e demorado, e devido a isso, provavelmente não seria rentável ou realista desenvolver vacinas contra todos os patógenos identificados, por isso, existem muitas doenças de peixes conhecidas hoje para os quais não existem vacinas comerciais eficazes desenvolvidas (Thorarinsson e Powell, 2006). A fim de aumentar a disponibilidade de vacinas, produção de diferentes vacinas autógenas é um cenário futuro. No entanto, a importância global a ser ressaltada é a qualidade do produto vacinal juntamente com as melhores práticas de vacinação e de gestão da saúde dos peixes (Brudeseth et al., 2013).

## **2. *Lactococcus garvieae***

O gênero *Lactococcus* foi criado em 1985 para acomodar microorganismos até então incluídos no gênero *Streptococcus* e que eram conhecidos como “estreptococos do grupo ácido láctico”, devido a capacidade de produzirem tal ácido a partir da fermentação de carboidratos (Schleifer et al., 1985). Os microorganismos deste gênero apresentam características fenotípicas semelhantes às do gênero *Enterococcus*, o que pode contribuir para que sejam erroneamente identificados como tal e, conseqüentemente, os dados encontrados na literatura referentes à sua importância clínica sejam escassos (Teixeira et al., 1996). Dentre as espécies que compõem este gênero, a *Lactococcus garvieae* representa a principal espécie responsável por infecções em seres humanos.

O histórico da *Lactococcus garvieae* é um exemplo de como a aquicultura moderna influencia a disseminação de patógenos e como um novo patógeno instala-se em um novo nicho (Eygnor et al., 2004). A descrição original de *L. garvieae* é de 1984, quando o organismo foi isolado a partir de uma mastite bovina no Reino Unido (Vendrell et al., 2006). No entanto, em contraste com a irrelevância como agente mastitogênico, *L. garvieae* tornou-se o fator de risco mais importante para a indústria de truta na Europa Mediterrânea, causando perdas substanciais de aproximadamente 50% da produção total (Eygnor et al., 2004).

Embora as doenças de peixes devido a cocos Gram-positivos sejam conhecidas no Japão há mais de 50 anos (Teixeira et al., 1996), a associação entre *L. garvieae* e peixes infectados foi determinada apenas em 1991, quando foram

analisadas amostras coletadas a partir de peixes doentes durante a década de 1970 e (erroneamente) descritos como *Enterococcus seriolicida* sp. nov. (Vendrell et al., 2006). Na verdade, estudos posteriores indicaram que *E. seriolicida* é um sinônimo júnior de *L. garvieae* (Fefer et al., 1998; Fihman et al., 2006).

*L. garvieae* é uma bactéria Gram positiva, não móvel, cocos ovóide, ocorre em pares ou em cadeias curtas, produz colônias alfa-hemolíticas em ágar sangue, é catalase e oxidase negativa e não esporulada (Ravelo et al., 2001; Vendrell et al., 2006). Este patógeno tem sido isolado na aquicultura marinha e de água doce e reportado com aumento de frequência em muitos continentes (Vendrell et al., 2007) e em diversas espécies de peixes, incluindo yellowtail (*Seriola quinqueradiata*), truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), black rockfish (*Sebastes schlegelii*), e olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) (Shin et al., 2009). As perdas podem exceder 50-80% do total da produção (Tanrikul, 2007).

Peixes infectados exibem sinais clínicos de septicemia hemorrágica e meningite (Chang et al., 2002; Vendrell et al., 2006). Sorologicamente, isolados de *L. garvieae* são caracterizados em dois sorotipos: KG(+) e KG(-). Os isolados sorotipo KG (-) são mais virulentos que os isolados sorotipos KG(+) devido a presença de uma cápsula (Ooyama et al., 2002), que lhes confere resistência à opsonofagocitose (Yoshida et al., 1997; Barnes et al., 2004), e ainda pode estar envolvida na prevenção de uma resposta efetiva de anticorpos mascarando as proteínas antigênicas localizadas na superfície das células (Barnes et al., 2004; Schmidtke e Carson, 2003).

A rápida propagação do agente patogênico por diversos continentes é um resultado das múltiplas vias de difusão e transmissão da bactéria, que incluem a dispersão direta através do movimento de peixes infectados ou portadores assintomáticos, bem como a transmissão horizontal por água contaminada (Vendrell et al., 2006). A septicemia lactococócica causada pela *L. garvieae* parece ser mais severa quando a temperatura da água permanece acima de 20°C em tilápias, trutas arco-íris e ayu (*Plecoglossus altivelis*) (Austin e Austin, 2007). Estresses ambientais, como mudanças repentinas de temperatura, parâmetros de baixa qualidade da água e nutrição inadequada, podem influenciar a severidade da doença. As espécies de peixes também podem ter papel importante na severidade das perdas enterococócicas (Vendrell et al., 2006). Atualmente, para o

controle da lactococose estão inclusas medidas como a vacinação, quimioterapia, bem como o uso de imunostimulantes não específicos (Romalde et al., 2004).

Kav e Erganis (2008) observaram que todos os isolados de *Lactococcus garvieae* avaliados foram susceptíveis a penicilina G, ampicilina, amoxicilina, ampicilina + sulbactam, amoxicilina + ácido clavulânico, vancomicina, ciprofloxacina, marbofloxacina, cloranfenicol, florfenicol, eritromicina, oxitetraciclina, cefoperazone, sulbactam + cefoperazone, e novobiocina. Os autores realizaram o experimento *in vitro*, onde testes de susceptibilidade de antibióticos foram realizados com difusão em disco. Contudo, nas criações, os antibióticos geralmente são administrados incorporados na ração, e como os peixes enfermos apresentam o consumo de alimento afetado, acabam sendo administradas subdoses de antimicrobianos, que além de reduzir a eficácia do tratamento, ainda gera resistência bacteriana.

Portanto, embora alguns quimioterápicos possuam atividade contra *L. garvieae*, o uso impróprio de antibacterianos pode gerar resistência dos microorganismos aos antibióticos, restrições legais e dificuldades devido à anorexia (Hossenli et al., 2011). O gasto envolvido com utilização de componentes antimicrobianos e o comprovado aumento da resistência às drogas (Kav e Erganis, 2008) mostra a relevância do desenvolvimento de medidas imunoproláticas para prevenir estas infecções (Ravelo et al., 2006). Neste contexto, a segurança e eficácia de uma vacina contra lactococose é necessária (Vendrell et al., 2007).

### **3. Sistema imune de teleósteos**

Os peixes respondem de forma diferente em relação às aves e aos mamíferos para a vacinação. Os teleósteos possuem muitos componentes do sistema imune que estão associados com vertebrados superiores. Os dois órgãos linfóides primários em teleósteos são o rim (pronefro) e o timo. O rim cefálico e o baço possuem funções análogas à medula óssea dos vertebrados superiores. Desenvolvimento de células B no rim cefálico e posterior tem sido demonstrado desde os estágios iniciais até a secreção de moléculas de IgM (Zwollo



et al., 2010). A tabela 1 ilustra as peculiaridades do sistema imune dos teleósteos quando comparado aos vertebrados superiores.

TABELA 1 - Comparação da imunologia de teleósteos e mamíferos (adaptado de Kibenge et al. (2012))

	Teleósteos*	Mamíferos
Barreiras físicas	Muco da pele, escamas e brânquias.	Pele e epitélio respiratório dos pulmões
Tipos de células imunes efectoras	Neutrófilo, eosinófilo, basófilo, monócito, célula dendrítica, célula NK, linfócitos T e linfócitos B.	Neutrófilo, eosinófilo, basófilo, monócito, células dendrítica, células NK, linfócitos T e linfócitos B
Células apresentadoras de antígenos	Monócitos	Célula dendrítica e monócitos
Tecidos linfoides	Pronefro, timo, baço, tecido linfóide associado ao intestino, tecido linfóide Interbranquial.	Medula óssea, timo, baço, linfonodos, tecido linfóide associado ao intestino e centros germinativos.
Anticorpos	IgM; IgD; IgT	IgM; IgD; IgA; IgE; IgG
Resposta ao desafio	Vagarosa e fraca resposta de memória (temperatura dependente)	Memória rápida e forte
Maturação da afinidade	Baixa afinidade e baixa maturação da afinidade	Elevada afinidade e elevada maturação da afinidade

\* Dados provenientes de estudos com salmonídeos (temperatura fisiológica ótima 10-15°C)

A principal diferença entre o peixe e outros vertebrados é que seu metabolismo e resposta imunológica são dependentes da temperatura (Harraty et al., 2001). Além disso, os peixes produzem anticorpos com menor afinidade para os antígenos (Pilstrom, 2005) e a natureza da memória imunológica de longo prazo é ainda mal compreendida (Katari et al., 2005; Ye et al., 2011). Um exemplo extremo é o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*), que não produz anticorpos específicos para infecção natural ou por vacinação e, apesar disso,

pode ser especialmente protegido contra a doença através da vacinação (Pilstrom, 2005; Barr et al., 2011). Não há informações na literatura sobre a atuação da resposta imune adaptativa celular na proteção dos peixes após vacinação. Estas características únicas do sistema imune dos peixes fizeram com que, em contraste com a de aves e suínos, peixes vacinados normalmente não sejam monitorados para as respostas de anticorpos em testes sorológicos convencionais (Kibenge et al., 2002). Por outro lado, as respostas de anticorpos específicos em salmão do Atlântico foram fortemente correlacionadas com a proteção da vacina contra a infecção com *Aeromonas salmonicida* virulenta (Bricknell et al., 1999 e O'Dowd et al., 1999).

Apesar da similaridade de funções da medula óssea, os teleósteos não possuem linfonodos, centros germinativos ou mucosa associada ao tecido (MALT) (Tort et al., 2003). Entretanto, recentemente, foi descoberto um tecido linfóide interbranquial (ILT), diferente da MALT dos mamíferos, sendo considerado um órgão linfóide secundário dos teleósteos. O tecido linfóide associado ao intestino (GALT) é bem desenvolvido em teleósteos, pois estes possuem linfócitos epiteliais (células T e células B) em seu interior (Kibenge et al., 2012)

Até recentemente, acreditava-se que as células B dos teleósteos produziam apenas dois isótopos: IgD e IgM, onde o IgM era considerado ser o único isótopo responsável por patógenos em ambos componentes, sistêmico e mucoso (Kaattari et al., 2008). Porém, um terceiro isótopo parece ser especializado na imunidade da mucosa do intestino, sugerindo que a diferenciação dos isótopos de imunoglobulinas ocorreu antes da evolução dos animais terrestres. Em contraste com os mamíferos, as células B em peixes podem maturar sistemicamente e migrar aos tecidos, onde podem produzir anticorpos no próprio local da infecção (Miller et al., 2010). No entanto, não se sabe se as células secretoras de IgT estão localizadas em locais da mucosa ou são transportados para lá sistemicamente (Kibenge et al., 2012).

Pela natureza peilotérmica dos peixes, a resposta imune é diretamente afetada pela temperatura do corpo, assim, a temperatura da água durante a imunização determina a rapidez com que a imunidade se desenvolve (Secombes, 2011). Adicionalmente, a longevidade da proteção imunológica é uma grande preocupação para a vacinação de peixes de viveiro. Raramente a duração da

proteção induzida por uma única vacinação dura todo o tempo de criação (Horne e Ellis, 1988; Newman, 1993; Mitchell, 1995). Por conseguinte, muitas das vacinas de peixes disponíveis são de potência limitada. Vacinações de reforço são necessárias para aumentar a duração da proteção. Trata-se de trabalho considerável, manuseio e estresse para os peixes, o que pode resultar em morte. Adjuvantes podem ser utilizados para aumentar o grau de proteção imunitária mas devem ser testados pois podem causar reações graves ou ser tóxicos para os peixes (Adams et al., 1988, Gudding et al., 1999; Midtlyng e Lillehaug, 1998; Evensen et al., 2005).

#### 4. REFERÊNCIAS

ADAMS, A.; JOHNSEN, P.B.; ZHOU, H.Q. The potency of adjuvant injected vaccines in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) and bath vaccines in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against furunculosis. **Aquaculture**, v.69, p.15-26, 1988.

AUSTIN, B.; AUSTIN, D. A. **Bacterial fish pathogens: diseases of farmed and wild fish**. Springer, 457p., 2007.

BARNES, A.C.; ELLIS, A.E. Role of capsule in serotypic differences and complement fixation by *L. garvieae*. **Fish and Shellfish Immunology**, v.16, p.207-214, 2004.

BARR, S., NEDERBRAGT, A. J., JENTOFT, S., GRIMHOLT, U., MALMSTRØM, M., GREGERS, T. F. e JAKOBSEN, K. S. The genome sequence of Atlantic cod reveals a unique immune system. **Nature**, v. 477, p. 207-210, 2011.

BIERING, E.; VILLOING, S.; SOMMERSET, I.; CHRISTIE, K.E. **Update on viral vaccines of fish**. In: Midtlyng, P.J. (Ed.), Progress in Fish Vaccinology, Developments in Biological Standardization, vol.121. Karger, Basel, Switzerland, pp.97-113. 2005.

BRICKNELL, I.R.; KING, J.A.; BOWDEN, T.J. Duration of protective antibodies, and correlation with protection in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), following vaccination with *Aeromonas salmonicida* vaccine containing iron-regulated outer membrane proteins and secretory polysaccharide. **Fish and Shellfish Immunology**, v.9, p.139-151, 1999.

BRUDESETH, B.E.; WIULSROD, R.; FREDRIKSEN, B.N.; LINDMO, K.; LOKLING, K.; BORDEVIK, M.; STEINE, N.; KLEVAN, A.; GRAVNINGEN, K. Status and future perspectives of vaccines for industrialised fin-fish farming. **Fish and Shellfish Immunology**, p.1-10, 2013.

CAMPOS, J.L., 2005. **O cultivo do pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* (Spix e Agassiz, 1829)**. In: Baldisseroto, B., Gomes, L.C. (Eds.), Espécies nativas com potencial para a piscicultura. Editora U.F.S.M., pp. 327–343.

CHANG, P.H.; LIN, C.W.; LEE, Y.C. *Lactococcus garviae* infection of cultured rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* in Taiwan and associated biophysical characteristics and histopathology. **Bulletim of European Association of Fish Pathology** v.22, p. 319-327, 2002.

CORBEIL, S.; LaPATRA, S.E.; ANDERSON, E.D. e KURATH,G. Nanogram quantities of a DNA vaccine protect rainbow trout fry against heterologous strains of infectious hematopoietic necrosis virus. **Vaccine**, v. 18, p. 2817-2824, 2000.

ELLIS, A. E. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. **Development e Comparative Immunology**, v. 25, p. 827-839, 2001.

ELLIS, A.E. 1988. **General principles of fish vaccination**. In: ELLIS, A.E. (ed) Fish Vaccination. London: Academic Press, p. 1-19.

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

EVENSSSEN, O.; BRUDESETH, B.; MUTULOKI, S. 2005. **The vaccine formulation and its role in inflammatory processes in fish – effects and adverse effects**. In: Midtlyng P., editor. Progress in Fish Vaccinology, p.117-127.

EYNGOR, M.; ZLOTKIN, A.; GHITTINO, C.; PREARO, M.; DOUET, D. G.; CHILMONCZYK, S. e ELDAR, A. Clonality and diversity of the fish pathogen *Lactococcus garvieae* in Mediterranean countries. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 5132-5137, 2004.

**FAO, Fishery and Aquaculture**, 2012.< <http://www.fao.org/fishery/statistics/en>>

FEFER, J.J.; RATZAN, K.R.; SHARP, S.E.; SAIZ, E. *Lactococcus garvieae* endocarditis: report of a case and review of literature. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.29, p.2731-2734, 1998.

FIHMAN, V.; RASKINE, L.; BARRON, Z.; KIFFEL, C.; RIAHI, J.; BERCOT, B.; SANSON-LE PORS, M.J. *Lactococcus garvieae* endocarditis: identification by 16S rRNA and sonda sequence analysis. **Journal of Infectiology**, v.52, p.3-6, 2006.

GUDDING, R.; MUISWINKEL V. W. B. A history of fish vaccination: Science-based disease prevention in aquaculture. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 35, n. 6, p. 1683-1688, 2013.

GUDDING, R.; LILLEHAUG, A.; EVENSEN, Recent developments in fish vaccinology. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.

72, p.203-212, 1999.

HARRAHY, L.N.M.; SCHRECK, C.B.; MAUE, A.G. Antibody-producing cells correlated to body weight in juvenile Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) acclimated to optimal and elevated temperatures. **Fish and Shellfish Immunology**, v.11, p.653-659, 2001.

HOEL, K.; SALONIUS, K.; LILLEHAUG, A. Vibrio antigens of polyvalent vaccines enhance the humoral response of *Aeromonas salmonicida* antigens in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Fish and Shellfish Immunology**, v.7, p.71-80, 1997.

HORNE, M.T.; ELLIS, A.E. 1988. **Strategies of fish vaccination**. In: Ellis, A.E. (Ed.), Fish Vaccination. Academic Press Limited, London, pp.55-66.

HOSSENI, M. H.; AKHLAGHI, M. H.; MOAZZENI JULA, M.; Gh. Experimental vaccine against lactococcosis in cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Archives of Razi Institute**, v. 66, p. 51-57, 2011.

KAATTARI, S.; BROWN, G.; KAATTAR, I.; YE, J.; HAINES, A. e BROMAGE, E. The cellular and developmental biology of the teleost antibody response. **Fish Defences, volume 1: Immunology**. Ed: Science Publishers, p. 75-129, 2008.

KATARI, Y.K.; MUTHUKUMARAN, T.; PANDA, A.K. Influence of particle size, antigen load, dose and additional adjuvant on the immune response from antigen loaded PLA microparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v.301, p.149-160, 2005.

KAV, K.; ERGANIS, O. Antibiotic susceptibility of *Lactococcus garviae* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms. **Bulletim of Veterinary Institute of Pulawy**, v.52, p.223-226, 2008.

KIBENGE, F.S.B.; GODOY, M.G.; FAST, M.; WORKENHE, S.; KIBENGE, M.T. Countermeasures against viral diseases of farmed fish. **Antiviral Research**, v.95, p.257-281, 2012.

KIBENGE, M.T.; et al. Serological evidence of infectious salmon anaemia virus (ISAV) infection in farmed fish, using an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Diseases of Aquatic Organisms**, v.51, p.1-11, 2002.

KIRON, V. Fish immune system and nutritional modulation for preventive health care. **Animal Feed Science and Technology**, v. 172; p. 111-123, 2012.

KURATH, G. Biotechnology and DNA vaccines for aquatic animals. **Review of Science Technology of International Epizooties**, v.27, p.175-196, 2008.

KURATH, G.; PURCELL, M.K.; GARVER, K.A. Fish rhabdovirus models for understanding host response to DNA vaccines. **CAB Reviews**, v.2, p.1-12, 2007.

LORENZEN, N.; LaPATRA, S.E. DNA vaccines for aquacultured fish. **Review Science Technology**, v.24, p.201-213, 2005.

McLOUGHLIN, M. **Fish vaccination: a brief overview**. In: [www.imb.ie/images/uploaded/documents/Fish%20Overview.pdf](http://www.imb.ie/images/uploaded/documents/Fish%20Overview.pdf) (Published January, 25, 2006; Consultado em 20 de Fevereiro de 2012)

MIDTLYNG, P.J.; LILLEHAUG, A. Growth of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) after intraperitoneal administration of vaccines containing adjuvant. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.32, p.91-97, 1998.

MIDTLYNG, P.J.; REITAN, L.J.; LILLEHAUG, A.; RAMSTAD, A. Protection, immune responses and side effects in Atlantic salmon (*Salmo salar* L) vaccinated against furunculosis by different procedures. **Fish and Shellfish Immunology**, v.6, p.599-613, 1996.

MILLER, F. P.; VANDOME, A. F.; McBREWSTER, J. **Fish Diseases and Parasites**. Ed.: Alphascript Publishing, 218 p. 2010.

MITCHELL, H. Choosing a furunculosis vaccine: points to consider. **Bulletin of Aquaculture Association of Canadá**, v.95, p.30-37, 1995.

MPA. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura**. Governo Federal: Brasília, fev. 2012. Disponível em: <[http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes\\_e\\_Estatisticas/Boletim%20Estat%C3%ADstico%20MPA%202010.pdf](http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20Estat%C3%ADstico%20MPA%202010.pdf)>. Acesso em: 2 out. 2012.

MPA. **O potencial brasileiro para a aquicultura**. Governo Federal: Brasília, 29 ago. 2011. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/index.php/aquiculturampa/informacoes/potencial-brasileiro>>. Acesso: 20 out. 2011.

MUISWINKEL, W.B.V. A history of fish immunology and vaccination I. The early days. **Fish and Shellfish Immunology**, v.25, p.397-408, 2008.

NAKANISHI, T.; KIRYU, I.; OTOTAKE, M. Development of a new vaccine delivery method for fish: percutaneous administration by immersion with application of a multiple puncture instrument. **Vaccine**, v. 20, n. 31, p. 3764-3769, 2002.



NAKANISHI, T.; OTOTAKE, M. Antigen uptake and immune responses after immersion vaccination. **Developments in Biological Standardization**, v.90, p.59-68, 1997.

NASS-USDA. **Trout Production**. In:<[http://usda.mannlib.cornell.edu/usda/current/Trout\\_Prod-02-26-2010.pdf](http://usda.mannlib.cornell.edu/usda/current/Trout_Prod-02-26-2010.pdf).> 2010.

NEWMAN, S.C. Bacterial vaccines for fish. **Annual Review of Fish Disease**, v.3, p.145-185, 1993.

O'DOWD, AM, BRICKNELL, IR, SECOMBES, CJ, and ELLIS, AE. The primary and secondary antibody responses to IROMP antigens in Atlantic salmon (*Salmo salar*) immunised with *Aeromonas salmonicida* bacterins. **Fish and Shellfish Immunology** , v. 9, p. 125-138, 1999.

OIE, 2011. **Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals**. <<http://www.oie.int/international-standard-setting/aquatic-manual/access-online>> (Published in 2011, Consultado em 01 março de 2012).

OOYAMA, T., HIROKAWA, Y., MINAMI, T., YASUDA, H., NAKAI, T., ENDO, M., RUANGPAN, L.; YOSHIDA, T. (2002) Cell-surface properties of *Lactococcus garvieae* strains and their immunogenicity in the yellowtail *Seriola quinqueradiata*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.51, p.169–177, 2002.

PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M. 2002. **Doenças de Peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento**. Maringá: Eduem, 305p.

PERELBERG, A.; RONEN, A., HUTORAN, M., SMITH, Y., e KOTLER, M. (2005). Protection of cultured *Cyprinus carpio* against a lethal viral disease by an attenuated virus vaccine. **Vaccine**, v.23, p.3396-3403, 2005.

PILSTRON, L. 2005. **Adaptative immunity in teleosts: humoral immunity**. In: Midtlyng, P.J. (Ed.), *Progress in Fish vaccinology, Developments in Biological Standardization*, vol. 121. Karger, Basel, Switzerland, p. 23.

PLANT, K.P.; LaPATRA, S.E. Advances in fish vaccine delivery. **Developmental and Comparative Immunology**, v.35, p.1256-1262, 2011.

QUENTEL, C.; VIGNEULLE, M. Antigen uptake and immune responses after oral vaccination. **Developments in Biological Standardization**, v.90, p.69-78, 1997.

RAVELO, C.; MAGARIÑOS, B.; ROMALDE, J.L.; e TORANZO, A.E. Conventional versus miniaturized systems for the phenotypic characterization of *Lactococcus garvieae* strains. **Bulletin of the European Association of Fish Pathologists**, v. 21, 136–144, 2001.

RAVELO, C.; MAGARIÑOS, B.; HERRERO, M.C.; COSTA, L.; TORANZO, A.E.; ROMALDE, J.L. Use of adjuvanted vaccines to lengthen the protection against lactococcosis in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v.251, p.153-158, 2006.

ROMALDE, J. L.; LUZARDO-ALVÁREZ, A.; RAVELO, C.; TORANZO, A. E.; BLANCO MÉNDEZ, J. Oral imunization using alginatte microparticules as a useful strategy for booster vaccination against fish lactococcosis. **Aquaculture**, Amsterdam, v.41, p.119-129, 2004.

ROMBOUT, J.H.W.M.; ABELLI, L.; PICCHIETTI, S.; SCAPIGLIATI, G.; KIRON, V. Teleost intestinal immunology. **Fish and Shellfish Immunology**, v.31, p.616-626, 2011.

SACCHETIN, P. S. C., MORAES, A. M. Produção de micropartículas de alginato contendo *Flavobacterium columnare* inativada pelo método de emulsão para vacinação de peixes por via oral. **Química Nova**, v. XY, p. 1-6, 2010.

SCHLEIFER, K.H.; KRAUS, J.; DVORAK, C.; KILPPER-BAELZ, R.; COLLIS, M.D.; FISHER, W. Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. **System Applied Microbiology**, v.6, p.183-195, 1985.

SCHMIDTKE, L.M.; CARSON, J. Antigens recognition by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) of whole cell proteins expressed by *Lactococcus garviae* when obtained directly from fish and under iron limited culture conditions. **Veterinary Microbiology**, v.93, p.63-71, 2003.

SECOMBES, C.J. Fish immunity: the potential impact on vaccine development and performance. **Aquaculture Research**, v.42, p.90-92, 2011.

SHIN, G.W.; NHO, S.W.; PARK, S.B.; JANG, H.B.; CHA, I.S.; HA, M.A.; KIM, Y.R.; DALVI, R.S.; JOH, S.J.; JUNG, T.S. Comparison of antigenic proteins from *L. garviae* KG(-) and KG (+) strains that are recognized by olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) antibodies. **Veterinary Microbiology**, v.139, p.113-120, 2009.

SNIESZKO, S.; PIOTROWSKA, W.; KOCYLOWSKI, B.; MAREK, K. **Badania bakteriologiczne i serologiczne nad bakteriami posocznicy Karpia**. Memoires de l'Institut d'Ichtyobiologie Piscicultura et de la Estação de Piscicultura Experimentale um Mydlniki de l'Universite Jagiellonienne um Cracovie, 1938.

SOMMERSET, I.; KROSSOY, B.; BIERING, E.; FROST, P. Vaccines for fish in aquaculture. **Expert Review of Vaccines**, v. 4, p.89-101, 2005.

TANRIKUL, T.T. Vibriosis as an epizootic disease of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) in Turkey. **Pak Journal Biol Science**, v.10, p.1733-1737, 2007.

TATNER, M.F. The ontogeny of humoral immunity in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.12, p.93-105, 1986.

TEIXEIRA, L.M., MERQUIOR, V.L.C., VIANNI, M.C.E., CARVALHO, M.G.S., FRACALANZZA, S.E.L., STEIGERWALT, A.G., BRENNER, D.J.; FACKLAM, R.R. (1996) Phenotypic and genotypic characterization of atypical *Lactococcus garvieae* strains isolated from water buffalos with subclinical mastitis and confirmation of *L. garvieae* as a senior subjective synonym of *Enterococcus seriolicida*. **International Journal of Systematic Microbiology**, v.46, p.664-668, 1996.

THORARINSON, R.; POWELL, D.B. Effects of disease risk, vaccine efficacy, and market price on the economics of fish vaccination. **Aquaculture**, v.256, p. 2336-2340, 2006.

TORANZO, A.E.; ROMALDE, J.V.; MAGARIÑOS, B.E. e BARJA, J.L. Present and future of aquaculture vaccines against fish bacterial diseases. **Options Méditerranées**, v.86, p.155-176, 2009.

TORT, L.; BALASCH, J.C.; MACKENZE, S. Fish immune system: a crossroads between innate and adaptive responses. **Immunologia**, v.22, p.277-286, 2003.

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

VENDRELL, D.; BALCÁZAR, J. L.; RUIZ-ZARZUELA, I.; BLAS, I.; GIRONÉS, O.; MÚZQUIZ, J. L. *Lactococcus garvieae* in fish: A review. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 29, p. 177-198, 2006

VENDRELL, D.; BALCÁZAR, J. L.; RUIZ-ZARZUELA, I.; BLAS, I.; GIRONÉS, O.; MÚZQUIZ, J. L. Safety and efficacy of an inactivated vaccine against *Lactococcus garvieae* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Preventive Veterinary Medicine**, v. 80, p. 222-229, 2007.

WEDEMEYER, G. **Physiology of fish in intensive culture systems**. Chapman e Hall (Ed), London, p. 270. 1996.

WHYTE, S. K. The innate immune response of finfish – A review of current knowledge. **Fish and Shellfish Immunology**, v.23, p.1127-1151, 2007.

YE, J.; KAATARI, I.M.; KAATARI, S.L.; The differential dynamics of antibody subpopulation expression during affinity maturation in a teleost. **Fish and Shellfish Immunology**, v.30, p.372-377, 2011.

YOSHIDA, T.; ENDO, M.; SAKAI, M.; INGLIS, V. A cell capsule with possible involvement in resistance to opsonophagocytosis in *Enterococcus seriolicida* isolated from yellowtail *Seriola quinqueradiata*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.29, p.233-235, 1997.

ZHOU, Y.C.; HUANG, H.; WANG, J.; ZHANG, B.; SU, Y.Q. Vaccination of the grouper, *Epinephalus awoara*, against vibriosis using the ultrasonic technique. **Aquaculture**, v.203, p.229-238, 2002a.

ZHOU, Y.C.; et al. Ultrasonic immunization of sea bream, *Pragus major* (Temminck e Schlegel), with a mixed vaccine against *Vibrio alginolyticus* and *V. anguillarum*. **Journal of Fish Disease**, v.25, p.325-331, 2002b.

ZWOLLO, P.; MOTT, K.; BARR, M. Comparative analyses of B cell populations in trout kidney and mouse bone marrow; establishing B cell signatures. **Developmental and Comparative Immunology**, v.34, p.1292-1299, 2010.

## OBJETIVOS

Objetivou-se com este estudo desenvolver uma vacina autógena contra *Lactococcus garvieae* para utilização em juvenis surubins híbridos *Pseudoplatystoma corruscans* x *P. reticulatum*.

### *Objetivos gerais:*

Prover informações sobre a possibilidade do estímulo do sistema imune adaptativo de surubins híbridos através da vacinação.

### *Objetivos específicos:*

1. Avaliar a proteção conferida pela vacina 30 dias após a vacinação através da porcentagem relativa de sobrevivência dos animais após desafio com bactéria viva;
2. Avaliar a dinâmica da resposta imune adaptativa nos tempos 15, 30 e 60 dias após a vacinação através da avaliação da presença de anticorpos específicos circulantes nos soros dos animais pela técnica ELISA indireto e aglutinação do soro;
3. Avaliar a modulação de algumas respostas imunes inatas e adquiridas promovido pelo imunobiológico desenvolvido, através da avaliação das alterações hematológicas na quantificação de células do sistema imune, bem como avaliação da atividade de lisozima dos soros dos peixes imunizados e não imunizados 30 dias após a vacinação.

## **CAPÍTULO 2**

**Identificação de surtos causados por cocos Gram positivos em  
cachara *Pseudoplatystoma reticulatum* e surubim híbrido  
*Pseudoplatystoma corruscans* x *P. reticulatum***



## **Identificação de surtos causados por cocos Gram positivos em cachara *Pseudoplatystoma reticulatum* e surubim híbrido *Pseudoplatystoma corruscans* x *P. reticulatum***

Hirla Costa Silva Fukushima<sup>1</sup>, Carlos Augusto Gomes Leal<sup>2</sup>; Henrique César Peirera Figueiredo<sup>2</sup>; Marcia Ishikawa<sup>3</sup>; Maria José Tavares Ranzani de Paiva<sup>4</sup>. <sup>1</sup> Doutoranda em Aquicultura, Caunesp; <sup>2</sup>Docente Universidade Federal de Minas Gerais; <sup>3</sup> Pesquisadora Científica Embrapa Oeste; <sup>4</sup>Pesquisadora Científica Instituto de Pesca.

### **RESUMO**

Estreptococose é uma causa comum de patologia e mortalidade em peixes, que resulta em perdas econômicas significativas para a indústria da aquicultura mundial. A identificação fenotípica com utilização do kit comercial API 20strept e o sequenciamento genético dos cocos Gram positivos isolados de surubins e cacharas doentes, bem como a comprovação da patogenicidade desta bactéria pelo postulado de Koch foram obtidos no presente estudo. Os testes fenotípicos realizados não foram conclusivos, sendo fundamentais métodos moleculares para confirmar a identidade bacteriana. Os resultados das análises moleculares demonstraram que o agente etiológico responsável pelas infecções em surubins híbridos e cacharas foi a *Lactococcus garvieae*, com amplificação de um fragmento de 1.100 pb no ensaio de PCR específica para *L. garvieae*, bem como com sequenciamento do gene 16S rRNA. Esta bacteriose está associada a perdas econômicas substanciais na criação de peixes em todo o mundo. Após desafio bacteriano experimental, foram verificados 66% de mortalidade nos surubins híbridos. Desta forma, a doença foi reproduzida com êxito e os principais sintomas clínicos verificados foram anorexia, letargia e exoftalmia. Ao final do período experimental, os animais sobreviventes tornaram-se portadores assintomáticos. Esta é a primeira evidência da presença deste patógeno em cacharas e surubins híbridos no Brasil.

Palavras chave: cocos Gram positivos; lactococose; surubim híbrido; *Pseudoplatystoma reticulatum*.

## ABSTRACT

Estreptococose is a common cause of disease and mortality in fish, resulting in significant economic losses to the aquaculture industry worldwide. The phenotypic characterization was performed by commercial kit API 20 STREPT and the molecular identification by genetic sequencing of Gram positive cocci isolated from hybrid surubins and cacharas, as well as proof of the pathogenicity of this bacterium by Koch postulated were obtained in the present study. Biochemical tests were inconclusive and molecular methods were fundamental to confirm bacterial identity. The results of molecular analyzes showed that the etiological agent responsible for infections in hybrids surubins and cacharas was *Lactococcus garvieae* with amplifying a fragment of 1,100 bp in the PCR assay specific for *L. garvieae*, as well as 16S rRNA sequencing us. This bacterial disease is associated with substantial economic loss in the farming of fish throughout the world. After experimental bacterial challenge, were found 66% mortality in hybrid surubins. Thus, the disease was reproduced successfully and the major clinical symptoms were anorexia, lethargy, and exophthalmos. At the end of the experimental period, the surviving animals become asymptomatic carriers. This is the first evidence of the presence of the pathogen in hybrid cacharas and hybrids surubins of Brazil.

Keywords: Gram positive cocci; lactococose; hybrid surubim; *Pseudoplatystoma reticulatum*.

## 1. INTRODUÇÃO

Durante as últimas décadas houve um crescimento contínuo da produção aquícola no Brasil (MPA, 2012) e com a intensificação das produções, houve maior prevalência de problemas com doenças. Recentemente, vêm sendo diagnosticadas novas bacterioses no cultivo de peixes no Brasil, como *Lactococcus garvieae* na criação de pintados *Pseudoplatystoma corruscans*, e *Weissella* sp. no cultivo de trutas *Oncorhynchus mykiss* (Evans et al., 2009; Figueiredo et al., 2012).

Surtos de cocos Gram positivos em peixes iniciaram há mais de cinco décadas em fazendas japonesas de criação de truta arco-íris (Hoshina, 1956) e servelha *Seriola quinqueradiata* (Kusuda et al., 1976). O patógeno, inicialmente identificado como o *Streptococcus* sp., foi reclassificado como *Enterococcus seriolicida* (Kusuda, 1992), e, em seguida, como *Lactococcus garvieae* (Domenech et al., 1993; Eldar et al., 1996). Desde então, doenças epidêmicas e esporádicas têm sido reportadas em diferentes partes do mundo, como no Japão (Kitao, 1993), Singapura (Foo et al., 1985), Austrália (Carson et al., 1993), Israel (Elder et al., 1995), Itália (Ghittino e Prearo, 1992), Espanha (Toranzo et al., 1995), França (Michel et al., 1997), África do Sul (Braag e Broere, 1986) e Estados Unidos (Perera et al., 1994).

A taxonomia revela que pelo menos seis diferentes espécies de cocos Gram positivos, incluindo estreptococos (Pier e Madin 1976; Domenech et al., 1996), lactococos (Collins et al., 1984; Eldar et al., 1996) e vagicocos (Walkbanks et al., 1990) são responsáveis por estas infecções na aquicultura (Ringo e Gatesoupe, 1998). A temperatura da água é considerada um fator predisponente para o aparecimento da doença causada por esses patógenos. Os surtos associados com infecções por *Lactococcus piscium*, *Vagococcus salmoninarum*, e *Carnobacterium piscicola* normalmente ocorrem em temperaturas de água abaixo de 15 ° C e são denominados estreptococoses de água fria (Muzquiz et al., 1999) . Por outro lado, os surtos que ocorrem a temperaturas de água acima de 15°C, ou estreptococose de água quente, são produzidos por *L. garvieae*,

*Streptococcus iniae*, *Streptococcus parauberis* e *Streptococcus difficilis* (Muzquiz et al., 1999) .

Peixes com infecção de estreptococose de água quente possuem sinais clínicos muito semelhantes, independentemente do agente etiológico (Bercovier et al., 1997; Doménech et al., 1996; Eldar et al., 1994; Eldar et al., 1995; Eldar et al., 1999; Muzquiz et al., 1999) e, portanto, um diagnóstico definitivo deve ser baseado na análise microbiológica de peixes doentes. Os agentes patogênicos associados à estreptococose de água quente podem ser identificados por métodos à base de testes fenotípicos. No entanto, a identificação bioquímica de algumas destas bactérias pode ser difícil quando se utiliza sistemas de identificação comerciais, pois estas não são incluídas nas bases de dados dos sistemas comerciais atualmente disponíveis. Apesar disto, ensaios de PCR individuais foram desenvolvidos para detecção e identificação de agentes patogênicos de peixe associadas com estreptococose em água quente (Mata et al., 2004).

Objetivou-se no presente capítulo identificar e comprovar a patogenicidade do agente etiológico que vem causando surtos de septicemia hemorrágica em criações de surubins.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

A identificação fenotípica e molecular dos cocos Gram positivos isolados de surubins e cacharas doentes, bem como a comprovação da patogenicidade dos cocos nos surubins foram realizados no Laboratório de Doenças de Animais Aquáticos do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

### **2.1 Identificação Fenotípica e Molecular dos cocos Gram positivos**

Para determinar o agente etiológico responsável por surtos de doenças em cachara brasileira e surubim híbrido, cinco peixes exibindo

sinais clínicos da doença foram amostrados e armazenados a 4 °C antes do seu transporte para um laboratório para análise bacteriológica. “Swabes” de cérebro e tecido renal de cada peixe foram realizados de forma asséptica, semeados em ágar sangue (5%) e incubados a 28 °C durante 72 h. Colônias puras de cocos Gram positivos foram submetidos a coloração de Gram, seguido por testes de catalase e oxidase. Os isolados foram caracterizados fenotipicamente, usando a API 20 Strep kit (BioMerieux, França). As cepas foram armazenadas a -80 °C em BHI, com 15% de glicerol, até à sua utilização. Para efeitos de análise molecular, as amostras foram descongeladas, semeados em ágar sangue e incubados a 28°C durante 24h. O DNA total das cepas bacterianas foi extraído utilizando o kit DNeasy (Qiagen, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante. Para confirmar a identificação das bactérias, foi realizado uma PCR *L. garvieae*-específica utilizando iniciadores PLG- 1 (5' CAT AAC AAT GAG AAT CGC 3') e PLG -2 (5' GCA GTT CCC CGG TCG G 3') de acordo com o método descrito por Mata et al. (2004), onde as amplificações foram efetuadas em um termociclador de gradiente Mastercycler (Eppendorf) com os seguintes parâmetros: um passo de desnaturação inicial a 94 ° C durante 2 min, 25 ciclos de série de um passo de desnaturação a 92 ° C durante 1 min, hibridação a 55 ° C durante 1 min, extensão a 72 ° C durante 90 s, e um passo de extensão final de 72 ° C durante 5 min. Um controle negativo (sem DNA molde) e um controle positivo (50 ng de DNA purificado de uma linhagem de *Lactococcus garvieae*) foram incluídos. Produtos gerados pela PCR foram detectados por eletroforese de 20 µL de cada mistura de amplificação em géis de agarose a 2% em 1% de tampão Tris-acetato-EDTA. Os géis foram corados com brometo de etídio (0,5 ug mL<sup>-1</sup>).

A amplificação e sequenciamento de cístrons de 16S rRNA foram realizadas para três isolados (BR-LG1, BR-LG2 e BR-LG3) selecionados aleatoriamente. Cístrons de rRNA 16S foram amplificados pela PCR com os iniciadores universais C70 (5' -AGA GTT TGA TYMTGG C -3') e B37 (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG A-3') com a utilização do kit comercial Ampliwax PCR Gem 100's (Perkin-Elmer) de acordo com o método descrito

em Fox et al. (1995), onde foram usadas as seguintes condições para a amplificação: desnaturação a 94°C durante 45 s, hibridação a 50°C durante 45 s, e alongamento a 72°C por 45 s. Um total de 25 ciclos foram executados, seguidos por um passo de alongamento final a 72°C durante 15 min. A pureza do produto amplificado foi determinada por eletroforese em gel de agarose a 1% (FMC, Bioproducts). O DNA foi corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta de curto comprimento de onda.

Em seguida foi realizada a purificação dos produtos de PCR para o sequenciamento, com a utilização do kit Wizard PCR preps (Promega, Estados Unidos). O DNA amplificado foi purificado por precipitação com polietileno-glicol 8000. A amostra foi centrifugada durante 15 min a 15.000 x g, e o pellet foi lavado com etanol (80%), e centrifugado como anteriormente. O pellet foi seco ao ar e dissolvido em 30 ml de água destilada e usado para o ciclo de sequenciamento. A amostra de DNA da PCR foi sequenciada diretamente com um kit de ciclo de sequenciamento BigDye™ (Applied Biosystems, Estados Unidos) e processados com o analisador genético ABI 3730XL (Applied Biosystems). As sequências encontradas foram comparadas com as sequências do banco de dados do NCBI, usando o algoritmo BLASTn. O limite fixado para a identificação de uma espécie bacteriana foi de 98 % de identidade de nucleotídeos para o gene de 16S rRNA.

As relações filogenéticas dos isolados foram determinados pela análise da sequência 16S rRNA gene comparativa. Sequências dos isolados foram alinhadas em BioEdit usando CLUSTALW (Thompson, et al., 1994) com as sequências das seguintes espécies bacterianas: *Lactococcus garvieae* ATCC 49156 (número de acesso GenBank NC015930.1), *Lactococcus garvieae* (X54262.1), *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (AB181302), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (NC002662), *Globicatella sanguis* (S50214.1), *Vagococcus fluvialis* (X54258.1), *Enterococcus faecalis* (AF039902.1), *Enterococcus hirae* (AF061011.1), *Enterococcus durans* (AF061000.1), *Enterococcus faecium* (AF039901.1) e *Leuconostoc mesenteroides* (M23035.1). Matriz de distâncias genéticas

foram obtidas usando o modelo de dois parâmetros de Kimura (Kimura, 1980) e uma árvore evolucionária foi criada usando o método de neighbor-joining (Saitou e Nei, 1987) com a quinta versão do software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (Mega 5) (Tamura, *et al.*, 2011) .

## 2.2. Postulado de Koch

Para cumprir o postulado de Koch, surubins híbridos juvenis foram infectados experimentalmente com uma linhagem *L. garvieae* selecionada aleatoriamente (BR- LG3). Para tanto, 30 peixes (média de 10,27 g de peso) foram mantidos em aquários de 57L, equipado com circulação de água sem cloro ( $2L\ h^{-1}$ ), à temperatura variando de 28 ° a 30 ° C, e equipados com um sistema de aeração suplementar. Três peixes foram recolhidos aleatoriamente antes dos ensaios de desafio e submetidos à análise bacteriológica PCR-*L. garvieae* específica para assegurar que estavam livres de infecção bacteriana.

Cinco grupos experimentais (n=6) foram usados no ensaio de desafio. Os membros dos grupos I e II foram infectados por meio de inoculação intraperitoneal com 0,1 mL de *L. garvieae* numa dosagem final de  $5,5 \times 10^6$  UFC por peixe. Os grupos III e IV foram sujeitos a uma injeção intraperitoneal de 0,1 mL de BHI estéril. O quinto grupo foi mantido sob as mesmas condições, para servir como um controle experimental. Para iniciar a infecção experimental, a linhagem BR- LG3 foi descongelada, semeada em ágar sangue 5% e incubada a 28 ° C durante 24 h. As colônias selecionadas para o ensaio de desafio foram inoculadas em caldo BHI a 30 ° C durante 8 h sob baixa agitação (150 rpm) até atingir uma concentração de  $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>. Antes dos desafios, os peixes foram anestesiados por imersão num banho com 10 mg L<sup>-1</sup> de benzocaína (Sigma- Aldrich). Os peixes foram monitorados quatro vezes por dia durante o período experimental de 21 dias. As análises bacteriológicas foram realizadas em todos os peixes mortos. Ao final do período experimental, todos os peixes sobreviventes foram sacrificados por overdose de benzocaína e submetidos ao mesmo exame, para

verificar a presença de lesões macroscópicas e para determinar se estes peixes eram portadores assintomáticos.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A escassez de laboratórios especializados em bacteriologia de peixes no Brasil leva a falta de conhecimento dos agentes etiológicos causadores nas pisciculturas (Garcia e Moraes, 2009). Na maioria dos casos, os surtos ocorrem nas propriedades e não são notificados e registrados. As infecções estreptocócicas aumentaram substancialmente em nível mundial na última década como consequência da intensificação da aquicultura. Essas bacterioses são responsáveis por perdas econômicas significativas no setor de piscicultura em todo o mundo (Austin e Austin, 2007). A estreptococose em peixes, a partir de um ponto de vista clínico, é um termo genérico utilizado para designar semelhantes, mas diferentes doenças, em que qualquer uma de pelo menos seis diferentes espécies de cocos gram-positivos, incluindo estreptococos, lactococos e vagicocos, estão envolvidos (Mata et al., 2004) pode ser responsável pela infecção.

No presente estudo foram avaliadas cinco isolados (BR-LG1; BR-LG2; BR-LG3; BR-LG4; BR-LG5) do cérebro de peixes doentes provenientes de duas fazendas de Mato Grosso do Sul, Brasil. Estes foram caracterizados como cocos Gram-positivos, catalase -negativa, oxidase - negativa e não hemolítica. O teste comercial 20 Strep API indicou perfis bioquímicos semelhantes, mas as identificações deste kit foram inconclusivas (Tabela 1). Existem dificuldades na diferenciação dos gêneros *Enterococcus* e *Lactococcus* através de testes fenotípicos, uma vez que ambos se apresentam como cocos Gram positivos isolados aos pares ou em cadeias, são catalase negativos, hidrolisam a esculina na presença de bile, crescem em caldo contendo 6,5% de cloreto de sódio, são PYR positivos (hidrolise de L-pirroglutamil-beta-naftilamida) e LAP positivos (hidrolise da L-leucina-beta-naftilamida).



Tabela 1- Resultado da identificação fenotípica e molecular de cocos Gram positivos isolados de surubins *Pseudoplatystoma corruscans* x *P. reticulatum* (BR-LG1; BR-LG2; BR-LG3) e cacharas *Pseudoplatystoma reticulatum* (BR-LG4 e BR-LG5) doentes.

Código*	API 20 Strep	PCR específica <i>Lactococcus</i> <i>garvieae</i>	Sequenciamento	
			Blast	Árvore filogenética
BR-LG1	<i>Lactococcus lactis</i> 68,9%	Positiva	<i>Lactococcus garvieae</i> Lg2 98%	100% <i>L. garvieae</i> ATCC 49156
BR-LG2	<i>Lactococcus lactis</i> 70,5%	Positiva	<i>Lactococcus garvieae</i> Lg2 99%	100% <i>L. garvieae</i> ATCC 49156
BR-LG3	<i>Enterococcus durans</i> 75,7%	Positiva	<i>Lactococcus garvieae</i> Lg2 99%	100% <i>L. garvieae</i> ATCC 49156
BR-LG4	<i>Enterococcus durans</i> 46%	Positiva	<i>Lactococcus garvieae</i> FMA395 99%	100% <i>L. garvieae</i> ATCC 49156
BR-LG5	<i>Lactococcus lactis</i> 45,9%	Positiva	<i>Lactococcus garvieae</i> Lg2 99%	100% <i>L. garvieae</i> ATCC 49156

Em diversos estudos anteriores, a *L. garvieae* foi erroneamente identificada em laboratórios de microbiologia, devido à sua semelhança com os membros do gênero *Enterococcus*, e devido à dependência em

métodos fenotípicos (Teixeira et al., 1996). Da mesma forma, não fomos capazes de identificar os isolados pelo uso de testes bioquímicos, indicando a importância dos métodos moleculares para o diagnóstico correto deste patógeno em animais aquáticos. Portanto, são fundamentais testes complementares para a identificação precisa.

Por outro lado, foi verificado resultado positivo no ensaio de PCR específica para *L. garvieae* para as cinco cepas, com a amplificação de um fragmento de 1.100 pb. As sequências de DNA dos isolados brasileiros avaliados pela análise BLAST apresentaram 99% de similaridade com as sequências das linhagens *L. garvieae* Lg2 (Kawanishi et al., 2005) e ATCC49156, tendo esta última sido previamente isolada a partir de animais doentes (Kusuda et al., 1991). Na árvore filogenética, as cepas brasileiras foram agrupadas no mesmo cluster das linhagens *L. garvieae* ATCC49156 e X54262 (Figura 1), indicando 100% de porcentagem de “bootstrap”.

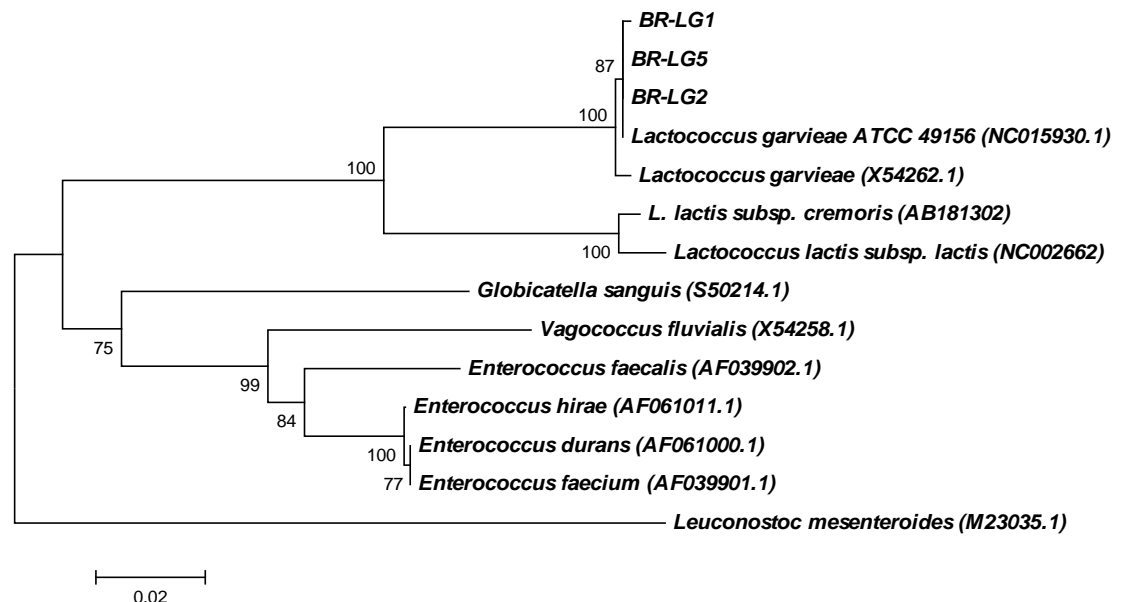


Figura 1: Cepas brasileiras de *Lactococcus garvieae* (BR- LG1, BR- LG2 e BR- LG3) agrupados no mesmo cluster com *L. garvieae* isola ATCC49156 e X54262, mostrando 100% de porcentagem de “bootstrap” em análise filogenética de seqüências de 16S rRNA.

*Lactococcus garvieae*, o agente etiológico da lactococose, é considerado um dos mais importantes cocos Gram positivos patogênicos em peixes por ser responsável por sérios problemas nas criações de muitas espécies marinhas e dulcícolas (Kav e Erganis, 2008). As manifestações clínicas deste agente são caracterizadas por exoftalmia uni ou bilateral, hemorragia na área periocular, no opérculo, na área da boca, na base das nadadeiras e na superfície, escurecimento da pele e distensão abdominal. Internamente, a cavidade abdominal também pode apresentar hemorragia e exsudatos purulentos (Austin e Austin, 2007).

A doença foi reproduzida com êxito em surubim híbrido. Os principais sintomas clínicos verificados foram anorexia, letargia e exoftalmia. Os grupos III e IV apresentaram taxas de mortalidade de 66% (quatro peixes de cada grupo). A bactéria foi recuperada a partir de vários órgãos de animais doentes: cérebro, rim, baço e fígado. Os dois peixes restantes pertencentes a estes grupos apresentavam sinais clínicos da doença, que, entretanto, se recuperaram antes do final do período experimental. Resultados positivos, em termos de bacteriologia de cérebro e rim foram obtidos para estes animais. Não foram observados sinais clínicos ou mortalidades em peixes dos grupos controle durante o período experimental. Estes dados corroboram com a revisão realizada por Vendrell et al. (2006) para a lactococose em diversas espécies de peixes, onde foi demonstrado que este patógeno causa severas perdas econômicas devido as elevadas taxas de mortalidade reportadas (acima de 50%).

Este patógeno tem sido isolado na aquicultura marinha e de água doce e relatado com aumento de frequência em muitos continentes (Eygnor et al., 2004) e em diversas espécies de peixes, incluindo *Seriola quinqueradiata*, *Oncorhynchus mykiss*, *Sebastes schlegeli*, *Paralichthys olivaceus* (Shin et al., 2009), *Anguilla japonica* (Kusuda et al., 1991), *Mugil cephalus* (Chen et al., 2002), *Coris aygulla* (Colorni et al., 2003), *Seriolla dumerilli* e *Seriolla lalandi* (Kawanishi et al., 2005). Adicionalmente, está demonstrado que a patogenicidade da *L. garvieae* varia de acordo com fatores como: a espécie de peixe, a truta arco-íris é

a espécie mais susceptível a lactococose, enquanto a carpa comum *Cyprinus carpio* é resistente à doença (Eldar et al., 1995b); a cepa de *L. garvieae*, cepas capsuladas são mais virulentas que cepas não capsuladas (Ooyama et al., 2002); a idade do hospedeiro, cuja fase aguda da doença foi reportada ser mais pronunciada em peixes mais jovens (Múzquiz et al., 1999); a qualidade da água, a baixa qualidade da água influencia na virulência e evolução da doença (Fukuda et al., 1997; Hurvitz et al., 1997; Ghittino e Múzquiz, 1998).

Este estudo representa o primeiro registro da infecção por *Lactococcus garvieae* em fazendas comerciais de criação de cachara e surubim híbrido no Brasil. Este patógeno é um agente etiológico clássico, responsável por doenças em peixes de água fria (Austin e Austin, 2007). Um número crescente de casos, no entanto, recentemente foi relatado a partir de peixes tropicais, como o pintado, *Pseudoplatystoma corruscans*, e tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus*, bem como outros animais aquáticos (Evans et al., 2009; Tsai et al., 2012). Além de peixes, *L. garvieae* tem sido isolada de outros animais homeotérmicos e pecilotérmicos, como vacas, búfalos e camarões (Ravelo et al., 2001). Além disto, também tem sido encontrada em humanos e, portanto a possibilidade de zoonose deve ser considerada.

#### **4. CONCLUSÃO**

Conclui-se que *Lactococcus garvieae* é um patógeno emergente que infecta cachara e surubim híbrido no Brasil. Recomenda-se que estudos futuros devem concentrar-se na diversidade genética de *Lactococcus garvieae*, bem como no desenvolvimento de medidas profiláticas para o controle da doença nas fazendas brasileiras.

#### **5. AGRADECIMENTOS**

À Fapesp pelo apoio financeiro ao projeto (201207852-0/ 201016149-5). À Embrapa Centro Oeste pela doação das cepas de cocos Gram positivos para

identificação, e à Empresa Mar e Terra pela doação dos animais para realização do Postulado de Koch.

## 6. REFERÊNCIAS

AUSTIN, B.; AUSTIN, D.A. **Bacterial fish pathogens: Disease of farmed and wild fish**. Spring, 457p. 2007.

BERCOVIER, H.; GHITTINO, C.; ELDAR, A. Immunization with bacterial antigens: infections with streptococci and related organisms. **Developments in biological standardization** , v. 90, p.153. 1997.

BRAG, R.R.; BROERE, J.S.E. Streptococcosis in rainbow trout in South Africa. **Bulletim of European Association of Fish Pathology**, v.6, p.89-91, 1986.

CARSON, J.; GUDKOV, N.; AUSTIN, B. Characteristics of an Enterococcus-like bacterium from Australia and South Africa, pathogenic for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). **Journal of Fish Pathology** v.16, p.381-388, 1993.

CHEN SC, LIAW LL, SU HY, KO SC, WU CY, CHAUNG HC. *Lactococcus garvieae*, a cause of disease in grey mullet, *Mugil cephalus* L., in Taiwan. **Journal of Fish Diseases**, v.25, p. 727-732, 2002.

COLLINS, M.D.; FARROW, F.A.E.; PHILLIPS, B.A.; KAMDLER, O. *Streptococcus garvieae* sp. nov. and *Streptococcus plantarum* sp. nov. **Journal of Genetic Microbiology**, v.129, .3427-3431, 1984.

COLORNI, A., RAVELO C.; ROMALDE J. L.; TORANZO A. E. *Lactococcus garvieae* in wild Red Sea wrasse *Coris aygula* (Labridae). **Diseases Aquatic Organisms**, v. 56, p.275–278, 2003.

DOMENECH, A.; PRIETA, J.; FERNANDEZ-GARAYZABAL, J.F.; COLLINS, M.D.; JONES, D.; DOMINGUEZ, L. Phenotypic and phylogenetic evidence for a close relationship between *Lactococcus garvieae* and *Enterococcus seriolicida*. **Microbiologia SEM**, v.9, p.63-68, 1993.

DOMENECH, A.; FERNANDEZ-GARAYZABAL, J.F.; PASQUAL, C.; GARCIA, J.A.; CUTULI, M.T.; COLLINS, M.D.; DOMINGUEZ, L. Streptococcosis in cultured turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), associated with *Streptococcus parauberis*. **Journal of Fish Disease**, v.19, p.33-38, 1996.

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

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

ELDAR A, BEJERANO Y, LIVOFF A, HOROVITCZ A, BERCOVIER H. Experimental streptococcal meningoencephalitis in cultured fish. **Veterinary Microbiology**, v. 43, p. 33–40, 1995b.

ELDAR, A.; GHITTINO, C.; ASANTA, L.; BOZZETTA, E.; GORIA, M.; PREARO, M.; BERCOVIER, H. *Enterococcus seriolicida* is a Junior synonym of *Lactococcus garvieae*, a causative agent of septicemia and meningoncephalitis in fish. **Current Microbiology**, v.32, p. 85-88, 1996.

ELDAR, A., M. GORIA, C. GHITTINO, A. ZLOTKIN, E H. BERCOVIER. Biodiversity of *Lactococcus garvieae* strains isolated from fish in Europe, Asia, and Australia. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p. 1005-1008, 1999.

EVANS, J.J.; KLESIOUS, F.H.; SHOEMAKER, C.A. First isolation and characterization of *Lactococcus garvieae* from Brazilian Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), and pintado, *Pseudoplathystoma corruscans* (Spix e Agassiz). **Journal of Fish Diseases**, v.32, p.943–951, 2009.

EYNGOR, M.; ZLOTKIN, A.; GHITTINO, C.; PREARO, M.; DOUET, D. G.; CHILMONCZYK, S. e ELDAR, A. Clonality and diversity of the fish pathogen *Lactococcus garvieae* in Mediterranean countries. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 5132-5137, 2004.

FIGUEIREDO, H. C. P., COSTA, F. A. A., LEAL, C. A. G., CARVALHO-CASTRO, G. A., e LEITE, R. C. *Weissella* sp. outbreaks in commercial rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Brazil. **Veterinary microbiology**, v. 156,n. 3, p. 359-366, 2012.

FOO, J.T.W.; HO, B.; LAM, T.J. Mass mortality in *Siganus canaliculatus* due to streptococcal infection. **Aquaculture**, v. 49, p.185-195, 1985.

FOX, J.G.; YAN, L.; DEWHIRST, F.E.; PASTER, B.J.; SHAMES, B.; MURPHY, J.C.; HAYWARD, A.; BELCHER, J.C.; MENDES, E.N. (1995) *Helicobacter bilis* sp. nov., a novel *Helicobacter* isolated from bile, livers and intestines of aged, inbred mouse strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, p.445–454, 1995.

FUKUDA Y, MAITA M, SATOH K, OKAMOTO N. Influence of dissolved oxygen concentration on the mortality of yellowtail experimentally infected with *Enterococcus seriolicida*. **Fish Pathology**, v. 32, p.129–30, 1997.

GARCIA, F.; MORAES, F. R. Hematologia e sinais clínicos de *Piaractus mesopotamicus* infectados experimentalmente com *Aeromonas hydrophila*. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 31, p. 17-21, 2009.

GHITTINO, C.; PREARO, M. Report of streptococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Italy: reliminary note. **Società Italiana di Patologia Ittica Bulletin**, v.8, p.4-11, 1992.

GHITTINO C, MÚZQUIZ JL. La estreptococosis de la trucha arco iris en España. Reunión de Piscicultores. Zaragoza. **Revista Aquatic**, p.2, 1998.

HOSHINA, T. An epidemic disease affecting rainbow trout in Japan. **Journal of Tokyo University of Fish**, v. 42, n. 1, p. 15-17, 1956.

HURVITZ A, BERCOVIER H, VAN RIJN J. Effect of ammonia on the survival and the immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) vaccinated against *Streptococcus iniae*. **Fish and Shellfish Immunology**, v.7, p. 45–53, 1997.

KAV, K.; ERGANIS, O. Antibiotic susceptibility of *Lactococcus garviae* in rainbow trout (*Oncorhynchus mikiss*) farms. **Bulletim of Veterinary Institute of Pulawy**, v.52, p.223-226, 2008.

KAWANISHI, M.; KOJIMA, A.; ISHIHARA, K.; ESAKI, H.; KIJIMA, M.; TAKAHASHI, T.; SUZUKI, S.; TAMURA, Y. Drug resistance and pulsed-field gel electrophoresis patterns of *Lactococcus garvieae* isolates from cultured *Seriola* (yellowtail, amberjack and kingfish) in Japan. **Letters in Applied Microbiology**, v.40, p.322–328, 2005.



KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v.16, p.111–120, 1980.

KITAO, T. 1993. Streptococcal infections. In: Inglis V. Roberts, R.J.; Bromage, N.R. (Eds.). **Bacterial Diseases of Fish**. Blackwell Scientific Publications, Oxford, p.196-210.

KUSUDA, R.; TOYOSHIMA, T.; KOMATSU, I.; KAWAI, K. A new pathogenic bacterium belonging to the genus *Streptococcus*, isolated from an epizootic cultured yellowtail. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, v.42. 1976.

KUSUDA, R., KAWAI, K., SALATI, F., BANNER, C.; FRYER, J.I. *Enterococcus seriolicida* sp. nov., a fish pathogen. **International Journal of Systematic Microbiology**, v.41, p.406–409, 1991.

KUSUDA, R. Bacterial fish diseases in mariculture in Japan with special emphasis on streptococciosis. **Israeli Journal of Aquaculture/Bamidgeh**, v. 44, n. 4, p. 140, 1992.

MATA, A.I., GIBELLO, A., CASAMAYOR, A., BLANCO, M.M., DOMINGUEZ, L.; FERNADEZ-GARAYZÁBAL, J.F. Multiplex PCR assay for detection of bacterial pathogens associated with warm-water Streptococcosis in fish. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p.3183–3187, 2004.

MICHEL, C.; NOUGAYREDE, P.; ELDAR, A.; SOCHON, P. *Vagococcus salmoninarum*, a bacterium of pathological significance in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) farming. **Disease of Aquatic Organisms**, v.30, p.199-208, 1997.

MUZQUIZ, J. L., F. M. ROYO, C. ORTEGA, I. DE BLAS, I. RUIZ, e J. L. ALONSO. 1999. Pathogenicity of streptococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): dependence on age of diseased fish. **Bulletin-European Association of Fish Pathologists**, v. 19, p.114-119, 1999.

OOYAMA, T., HIROKAWA, Y., MINAMI, T., YASUDA, H., NAKAI, T., ENDO, M., RUANGPAN, L.; YOSHIDA, T. (2002) Cell-surface properties of *Lactococcus garvieae* strains and their immunogenicity in the yellowtail *Seriola quinqueradiata*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.51, p.169–177, 2002.

PERERA, R.P.; JOHNSON, S.K.; COLLINS, M.D.; LEWIS, D.H.; *Streptococcus iniae* associated with mortality of *Tilapia nilótica* X *T. aurea* hybrids. **Journal of Aquaculture Animal Health**, v.6, p.335-340, 1994.

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

RAVELO, C.; MAGARIÑOS, B.; ROMALDE, J.L.; TORANZO, A.E. Conventional versus miniaturized systems for the phenotypic characterization of *Lactococcus garvieae* strains. **Bulletin of the European Association of Fish Pathologists**, v.21, p.136–144, 2001.

RINGO, E.; GATESOUBE, F.J. Lactic acid bacteria in fish: a review. **Aquaculture**, v.160, n.3, p. 177-203, 1998.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v.4, p.406–425, 1987.

SHIN, G.W.; NHO, S.W.; PARK, S.B.; JANG, H.B.; CHA, I.S.; HA, M.A.; KIM, Y.R.; DALVI, R.S.; JOH, S.J.; JUNG, T.S. Comparison of antigenic proteins from *L. garvieae* KG(-) and KG (+) strains that are recognized by olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) antibodies. **Veterinary Microbiology**, v.139, p.113-120, 2009.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v.28, p.2731–2739, 2011.

TEIXEIRA, L.M.; MERGUIOR, V.L.C.; VIANNI, M.C.E.; CARVALHO, M.G.S.; FRACALANZZA, S.E.L.; STEIGERWALT, A.G.; BRENNER, D.J.; FACKLAM, R.R. Phenotypic and genotypic characterization of atypical *Lactococcus garvieae* strains isolated from water buffalos with subclinical mastitis and confirmation of *L. garvieae* as a senior subjective synonym of *Enterococcus seriolicida*. **International Journal of Systematic Microbiology**, v.46, p.664–668, 1996.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

TORANZO, A.E.; DEVESA, S.; ROMALDE, J.L.; LAMAS, J.; RIAZA, A.; LEIRO, J.; BARJA, J.L. Efficacy of intraperitoneal and immersion vaccination against *Enterococcus* sp. infection in turbot. **Aquaculture**, v.134, p.17–27, 1995.

TSAI, M.A.; WANG, P.C.; LIAW, L.L.; YOSHIDA, T.; CHEN, S.C. Comparison of genetic characteristics and pathogenicity of *Lactococcus garvieae* isolated from aquatic animals in Taiwan. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.102, p.43–51, 2012.

VENDRELLI, D.; BALCÁZAR, J.L.; RUIZ-ZARZUELA, I.; BLAS, I.; GIRONÉS, O.; MÚZQUIZ, J.L. *Lactococcus garvieae* in fish: A review. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.29, p.177–198, 2006.

WALLBANKS, S.; MARTINEZ-MURCIA, A.J.; FRUER, J.L.; PHILLIPS, B.A.; COLLINS, M.D. 16S rRNA sequencedetermination for members of the genus *Carnobacterium* and relatedlatic acid bacteria and description of *Vagococcus salmoninarum* sp. nov. **International Journal of System Bacteriology**, v.40, p.224-230, 1990.

## **CAPÍTULO 3**

**Eficácia de duas formulações de vacinas para o controle da lactococose em surubins híbridos *Pseudoplatystoma corruscans* x *Pseudoplatystoma reticulatum*.**

## **Eficácia de duas formulações de vacinas para o controle da lactococose em surubins híbridos *Pseudoplatystoma corruscans* x *Pseudoplatystoma reticulatum*.**

Hirla Costa Silva Fukushima<sup>1</sup>, Raissa Bertoncello<sup>2</sup>, Carlos Augusto Gomes<sup>3</sup> Leal; Henrique César Pereira Figueiredo Figueiredo<sup>3</sup>; Salvador Arijo<sup>4</sup>; Miguel Angel Moriñigo<sup>4</sup>; Ricardo C. Borra<sup>5</sup>; Fernando Salles<sup>6</sup>; Fábio Sussef<sup>6</sup>; Maria José Tavares Ranzani de Paiva<sup>7</sup>. <sup>1</sup>Doutoranda em Aquicultura, Caunesp; <sup>2</sup>Mestranda em Aquicultura, Instituto de Pesca; <sup>3</sup>Docente Universidade Federal de Minas Gerais; <sup>4</sup>Docente Universidade Estadual de Málaga, Espanha; <sup>5</sup> Docente Universidade Federal de São Carlos; <sup>6</sup>Pesquisador APTA; <sup>7</sup>Pesquisadora Científica Instituto de Pesca.

### **RESUMO**

*Lactococcus garvieae* é uma bactéria patogênica que causa grandes perdas na aquicultura mundial. Este estudo avaliou a possibilidade de prevenção e controle da lactococose em surubins híbridos pela imunização. Para tanto, cepas de *L. garvieae* previamente isoladas de surubins híbridos infectados foram inativadas em formalina e, posteriormente, produzida uma bacterina aquosa e uma bacterina oleosa. Surubins híbridos foram imunizados via intraperitoneal com ambas bacterinas e com PBS. Foram comparados a potência dos imunobiológicos desenvolvidos na sobrevivência dos animais após desafio bacteriano, na cinética de anticorpos 15, 30 e 60 dias após a vacinação e na modulação da resposta imune inata após desafio bacteriano. A imunização dos surubins preveniu um quadro de anemia microcítica após infecção lactocococica. A melhor proteção dos surubins foi alcançada com imunização com bacterina oleosa, tratamento que foi observado maior nível de anticorpos circulantes e valor de porcentagem relativa de sobrevivência de 81,7%. O presente estudo demonstrou que a imunidade adaptativa dos surubins pode ser estimulada com emprego de vacinas e que a bacterina oleosa aumentou a resistência à lactococose 30 dias após a vacinação.

Palavras chave: vacinação, lactococose, surubim híbrido.

## **ABSTRACT**

*Lactococcus garvieae* is a pathogen bacterium that causes major losses in world aquaculture. This study evaluated the possibility of prevention and control of lactococose in hybrids surubins by immunization. For this, strains of *L. garvieae* previously isolated from infected hybrids surubins were inactivated with formalin and subsequently produced an aqueous and an oily bacterin. Hybrids Surubins were immunized intraperitoneally with PBS and both bacterins. Were compared the power of immunobiological developed in animal survival after bacterial challenge in the kinetics of antibodies 15, 30 and 60 days after vaccination and in the modulation of the immune response after bacterial challenge. Satisfactory protection was achieved by immunization with bacterin oily after challenging time where higher levels of circulating antibodies and whose value relative of survival percentage was 81.7%. Immunization of surubins prevented of a framework for microcítica lactocococica anemia after lactococosis infection. The activity of lysozyme as well as the total number of circulating leukocytes were affected by the bacterial challenge. The present study demonstrated that immunity can be stimulated in hybrids surubins with the use of vaccines and that bacterin oily vaccine improved resistance for lactococose 30 days after vaccination.

**Keywords: vaccination lactococose, hybrid surubim.**

## INTRODUÇÃO

Aquicultura, por definição, muitas vezes implica na criação de animais aquáticos em densidades elevadas em comparação à natureza. Esta condição compromete o sistema de defesa imune dos animais criados e favorece a proliferação de agentes patogênicos oportunistas, como viroses, bacterioses e parasitoses (Ellis, 2001). Neste contexto, a prevenção e controle de patógenos oportunistas têm sido desenvolvidos como parte integrante da aquicultura moderna (Lie, 2008) e, atualmente, a vacinação é a medida profilática de maior importância na aquicultura industrial (Whyte, 2007).

O Brasil é um país muito rico em peixes nativos de grande potencial econômico, como é o caso da produção de surubins híbridos, que vem crescendo substancialmente nos últimos anos (MPA, 2012). Atualmente, surubins híbridos são produzidos em escala industrial em vários estados da região Centro-Oeste e possui participação expressiva em vários mercados, sendo inclusive exportado para os EUA e países da União Europeia. Trata-se de peixes de elevado valor comercial que são criados de forma intensiva, fundamentalmente em viveiros escavados e em temperaturas geralmente entre a 26-32°C ao longo da criação (Labarrere, 2011). Nestas condições, o ambiente torna-se propício para o desenvolvimento microbiano que pode se tornar potencial agente patogênico em animais imunodeficientes.

Dentre as enfermidades diagnosticadas nos surubins, as de etiologia bacteriana estão entre as mais impactantes (Campos, 2005). Entretanto, não se conhece a especificidade das bactérias em relação aos peixes nativos, bem como a susceptibilidade e particularidades dos mecanismos de defesa destes animais frente às bactérias (Garcia e Moraes, 2009). Adicionalmente, até o momento não há relatos sobre a viabilidade do estímulo do sistema imune em surubins a fim de controlar patogenias persistentes e emergentes.

A lactococose é uma doença que vêm se tornando cada vez mais frequente na produção aquícola mundial, causando perdas econômicas significativas na criação de peixes marinhos e dulcícolas na Europa, Japão e Austrália (Vendrell et al., 2006) e no Brasil (Evans et al., 2009). Desde então, são requeridos meios para erradicação e controle deste importante



patógeno. Embora agentes quimioterápicos apresentem atividade contra *L. garvieae*, medidas terapêuticas geralmente são ineficientes sob condições de criação, provavelmente devido a condição anoréxica de peixes doentes (Romalde et al., 2004), sendo a vacinação de populações susceptíveis a melhor opção de controle da lactococose (Toranzo et al., 2009).

As primeiras vacinas experimentais preparadas contra *L. garvieae* estimularam a imunidade de linguado (*Scophthalmus maximus*), truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e tilápia (*Oreochromis niloticus*), quando administradas via intraperitoneal (Toranzo et al., 1995; Akhlaghi et al., 1996; Bercovier et al., 1997). Desde então, diversos estudos vêm sendo realizados no intuito de desenvolver uma estratégia de vacinação apropriada contra a lactococose na imunogenicidade de *O. mykiss* e *Seriolla quinqueradiata* (Ooyama et al., 2002; Romalde et al., 2004; Ravelo et al., 2006; Vendrell et al., 2007; Hossenli et al., 2011; Bastardo et al., 2012), espécies altamente susceptíveis a lactococose. Variações na proteção dos animais têm sido observadas dependendo da espécie de peixe avaliada, cepa da bactéria utilizada para confecção da bacterina, bem como da rota de administração empregada na vacinação.

Todas as vacinas experimentais desenvolvidas até o momento contra *L. garvieae* são a partir de cepas de bactérias mortas em formalina. Estas vacinas tiveram melhores resultados de proteção quando foram administradas via intraperitoneal (Akhlaghi et al., 1996; Toranzo et al., 2009) e quando utilizadas cepas capsuladas da bactéria para produção da bacterina (Ooyama et al., 1999; 2002). Contudo, alguns estudos têm demonstrado que proteção em longo prazo, acima de três meses, é conferida apenas com a utilização de adjuvantes (Bastardo et al., 2012; Ravelo et al., 2006) ou emprego de revacinação, que pode ser administrada via oral com utilização de micropartículas de alginato contendo a bacterina (Romalde et al., 2004).

Atualmente, a imunização com uma vacina injetável oleosa contra lactococose faz parte de um regime profilático específico em alguns países europeus e no Japão, para espécies como truta arco íris, *Seriola quinqueradiata* e *Seriola dumerili*. Estas espécies são altamente

susceptíveis a lactococose, e o regime de vacinação adotado deve gerar um impacto positivo significativo sobre a mortalidade dos peixes e redução do uso de antibióticos (Brudeseth et al., 2013).

A fim de tornar a situação de doença previsível e manejável na criação intensiva são necessários estudos que garantam o desenvolvimento de protocolos de vacinação adequados para cada espécie de peixe contra doenças as quais são susceptíveis (Evensen et al., 2005; Plant e LaPatra, 2011; Sommerset et al., 2005; Thorarinsson e Powell, 2006 ). Ademais, o entendimento da biologia das espécies de peixes que são criadas, em particular, a resposta imune, é essencial para otimização do manejo da criação, bem como da saúde dos animais (Whyte, 2007).

Deste modo, objetivou-se no presente estudo avaliar a eficácia de duas formulações de vacinas contra a lactococose na sobrevivência do surubim híbrido, bem como na modulação de algumas respostas imunes inatas e adaptativas dos surubins imunizados.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### ***2.1 Confecção das vacinas***

Após identificação e a comprovação da patogenicidade da *Lactococcus garvieae*, duas preparações de vacinas foram testadas contra a mesma, sendo uma bacterina aquosa inativada com adição de formalina e uma bacterina oleosa, preparada com adjuvante Montanide ISA-763-A (Seppic Ltd, França). As formulações das vacinas foram desenvolvidas no Laboratório de Doenças de Animais Aquáticos do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal de Belo Horizonte.

Para evitar a mascaramento dos antígenos pela formalina na confecção da bacterina, inicialmente foi investigada a concentração de formalina e o tempo de incubação mínimos para inativação da bactéria. Para tanto, foram testadas as seguintes concentrações: 0,1% de formalina por 24 ou 48 horas a 4°C; 0,25% de formalina por 24 ou 48 horas a 4°C; 0,5% de

formalina por 24 ou 48 horas a 4°C ou 1% de formalina por 24 ou 48 horas a 4°C; o tratamento controle foi inoculado com PBS sem adição de formalina.

Para padronização da concentração ótima de formalina, uma cepa previamente identificada e isolada de surubins híbridos doentes foi descongelada e semeada em Agar sangue por 24h, à 30°C. A massa bacteriana foi coletada por centrifugação (6000g por 20 min a 4°C) e lavada duas vezes com solução estéril de tampão fosfato salino (PBS). As células foram ressuspensas em PBS com as respectivas quantidades de formalina e incubados a 4°C, nos respectivos tempos de incubação. Cada tratamento foi realizado em triplicata. Posteriormente, as soluções foram lavadas três vezes com PBS e semeados em placas Tood Hewitt Agar (THA) (Himedia Ltd., Mumbai, India) a 30°C por 48 horas para verificar o tratamento capaz de inativar as bactérias com a menor quantidade de formalina.

Após avaliação da quantidade mínima de formalina, a mesma cepa previamente identificada foi utilizada para a produção das vacinas. Essa foi descongelada e semeada em Agar sangue por 24h à 30°C. A massa bacteriana foi coletada por centrifugação (6000g por 20 min a 4°C) e lavada duas vezes com solução estéril de tampão fosfato salino (PBS). As células foram ressuspensas em PBS com 1% de formalina e incubados a 4°C por 24h. Posteriormente, as células foram centrifugadas (6000g por 20 min a 4°C) e o “pellet” bacteriano lavado três vezes com PBS estéril para remoção dos resíduos do formol. Uma amostra foi coletada, semeada em Agar sangue e incubada a 30°C por 48 horas para confirmação da inativação da bactéria.

A bacterina foi misturada na proporção 1:1 com adjuvante Montanide ISA-763-A para preparação da vacina com adjuvante oleoso. Posteriormente, ambas formulações de vacina foram armazenada em frascos de vidro estéreis a 4°C até vacinação dos peixes.

## **2.2 Vacinação**

A vacinação e desafio dos animais foram realizados na Unidade de Pesquisa de Desenvolvimento de Pirassununga, da Agência Paulista de Tecnologia Agropecuária, da Secretaria de Agricultura do Estado de São Paulo (APTA).

Para tanto, foram utilizados 250 juvenis de surubim híbrido de aproximadamente 40g de peso vivo (PV) dispostos em 6 unidades experimentais (30 peixes por caixa), com capacidade de 1000L de água, aeração contínua e alimentação com ração comercial (40% de proteína bruta) duas vezes ao dia. Os peixes foram aclimatados nas unidades experimentais durante 40 dias.

O delineamento adotado foi inteiramente casualizado consistindo de seis tratamentos. Os tratamentos testados são descritos a seguir na tabela 1.

TABELA 1. Delineamento experimental utilizado para avaliação da potência das vacinas, 30 dias após a imunização, na sobrevivência dos surubins híbridos *Pseudoplatystoma corruscans* x *Pseudoplatystoma reticulatum* após desafio com *Lactococcus garviae*.

Tratamentos*	Número de Peixes	Vacinação	Desafio
GI	30	PBS	PBS
GII	30	Bacterina aquosa	PBS
GIII	30	Bacterina oleosa	PBS
GIV	30	PBS	<i>L. garviae</i>
GV	30	Bacterina aquosa	<i>L. garviae</i>
GVI	30	Bacterina oleosa	<i>L. garviae</i>

\* GI: controle sem desafio bacteriano; GII: vacinados com bacterina aquosa sem desafio bacteriano; GIII: vacinados com bacterina oleosa sem desafio bacteriano; GIV: controle com desafio bacteriano; GV: vacinados com bacterina aquosa com desafio bacteriano; GVI: vacinados com bacterina oleosa com desafio bacteriano.

Após o período de quarentena, 15 animais foram coletados aleatoriamente para exame bacteriológico. Após confirmação da inocuidade dos mesmos, os demais peixes foram anestesiados em solução de benzocaina (0,1g x L<sup>-1</sup> de água) e, em seguida, vacinados com 0,1 mL da

formulação vacinal via intraperitoneal de acordo com os respectivos tratamentos. Além disto, seis peixes foram imunizados com sobredose de bacterina aquosa (0,2mL) e seis peixes foram imunizados com sobredose de bacterina oleosa (0,2mL) para verificar a segurança da vacina na sobrevivência dos animais.

Os parâmetros físico-químicos da água monitorados diariamente foram: oxigênio dissolvido, temperatura, pH e amônia.

### **2.3 Desafio**

O desafio foi realizado 30 dias após a vacinação (Tabela 1). Para isso uma amostra de *Lactococcus garvieae* foi selecionada ao acaso, descongelada e semeada em THA por 24h à 30°C. Em seguida, uma colônia foi inoculada em caldo THB incubada à 30°C por 9 horas, sob agitação lenta (100 rpm) até atingir a concentração aproximada de  $10^8$  UFC/mL.

Para o desafio, cada grupo de 30 peixes foi subdividido em três repetições de 10 peixes, onde permaneceram estocados em caixas de 50L, mantidos a 30°C, com aeração constante. Antes do desafio os peixes permaneceram sob aclimatação nestas caixas por 15 dias. Em seguida, os peixes foram desafiados com 0,1 mL ( $10^7$  UFC peixe<sup>-1</sup>) do inóculo bacteriano por via intraperitoneal. Após o desafio, os animais foram monitorados quatro vezes ao dia e a taxa de mortalidade diária e a ocorrência de sinais clínicos de lactococose foram avaliadas durante 21 dias. A proteção da vacina foi determinada pela porcentagem relativa de sobrevivência (RPS), onde  $RPS = 1 - (\%mortalidade \text{ do grupo vacinado} / \%mortalidade \text{ grupo controle}) * 100$  e valores de RPS > que 50% indicam efeito protetor da vacina (Amend, 1981).

Para avaliar a probabilidade de sobrevivência nos diferentes grupos desafiados realizamos a análise de sobrevivência dos animais. Para tanto foi realizada a curva de Kaplan-Meier, onde foram comparadas as porcentagens de doentes que morreram em cada grupo experimental, a cada 24 horas durante 21 dias. Todos os animais mortos foram encaminhados imediatamente ao laboratório para reisolamento da bactéria a fim de confirmar sua presença.

## **2.4 Dinâmica da resposta imune adaptativa e modulação da imunidade inata em surubins**

Para avaliação da dinâmica da resposta imune foram realizadas avaliações dos níveis de anticorpos dos animais nos momentos 15, 30 e 60 dias após a vacinação. Em cada momento foram coletados 6 peixes vacinados com PBS (controle), 6 peixes vacinados com bacterina aquosa e 6 peixes vacinados com bacterina oleosa e comparados os níveis de anticorpos circulantes.

Para avaliação da modulação da resposta imune inata, 30 dias após a vacinação, foram comparados os perfis hematológicos de cada tratamento (PBS, bacterina aquosa e bacterina oleosa) antes e após o desafio bacteriano (n=6).

Para tanto, os peixes foram anestesiados com solução de benzocaina (0,1g L<sup>-1</sup> de água) e o sangue foi extraído por venopunção com duas seringas, uma heparinizada para análises hematológicas e outra seringa não heparinizada para obtenção do soro e posterior análises imunológicas. Para obtenção do soro, uma alíquota do sangue foi mantida em descanso em tubos de coagulação durante 6 horas, a 4°C. Posteriormente, foi centrifugado a 6000 g, durante 20 min para retirada do coágulo. Em seguida, o soro foi centrifugado novamente durante 10 min e congelado a -80°C até avaliação.

### **2.4.1. Avaliação hematológica**

Imediatamente após a coleta de sangue foram realizadas as análises de número de eritrócitos em câmara de Neubauer, hematócrito pelo método do microhematócrito (Goldenfarb et al., 1971) e o volume corpuscular médio dos eritrócitos de acordo com Ranzani Paiva et al. (2013).

Além das variáveis sanguíneas descritas, foram realizadas duplicatas de extensões sanguíneas coradas com May-Grunwald/Giemsa (Rosenfeld, 1947) para posterior contagem total e diferencial de leucócitos e total de trombócitos segundo metodologia de Hrubec e Smith (1998).

### **2.4.2 Atividade de Lisozima**

A avaliação da atividade de lisozima foi realizada segundo Kim e Austin (2006), utilizando-se como substrato bactérias Gram positivas. A atividade foi medida pela redução da densidade óptica verificada durante a lise da parede celular da bactéria pela enzima. Foram comparados “pools” de soros de peixes (n=6) de cada grupo experimental (Tabela 1). No controle negativo foi utilizado PBS. Foram acrescentados 100µL de diluições seriadas de soro dos peixes em PBS a uma placa de 96 poços de fundo plano. Em seguida acrescentou-se 100µL de suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* ATCC N ° 4698 (Sigma - Aldrich) (0,4mg mL<sup>-1</sup> em tampão fosfato sódico 0,05M, pH 6,2) em cada poço. A placa foi incubada a 25°C e a absorbância foi medida e comparada a 590 nm para t=0; 5; 15; 30, 45 e 60 min.

### **2.4.3. Avaliação da Titulação dos Anticorpos**

A avaliação dos níveis de anticorpos entre os tratamentos foi realizada no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências da Universidade de Málaga, Espanha. Para tanto foram utilizados ensaios ELISA e Aglutinação, como descritos abaixo.

#### **ELISA**

Para titulação dos níveis de anticorpos nos animais vacinados e não vacinados foi realizado teste de ELISA indireto.

Anticorpos policlonais de coelhos anti-IgM de surubins híbridos (Anti-Ig) conjugados com peroxidase (Patsos Biotecnologia, Minas Gerais, Brasil) foram utilizados para realização do teste ELISA, padronizado por titulação em bloco soro de surubim híbrido (vacinados e não vacinados) e anticorpos de coelhos anti-IgM de surubins híbridos conjugados com peroxidase.

Após determinação das concentrações ideais dos parâmetros supracitados, placas de ELISA de 96 poços de fundo plano (Nunc MaxiSorp, Sigma-Aldrich, EUA) foram revestidas com 50µL do antígeno (40µg mL<sup>-1</sup>) em tampão de carbonato de sódio 0,05M, pH 7,2, e permaneceram “overnight” a 4°C. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes em PBS contendo 0,25% de Tween 20 (PBST; Sigma, USA) e, ao final, adicionados 200µL de solução de bloqueio (leite em pó desnatado 3% em PBST). Após incubação por 2 horas, à temperatura ambiente, as placas foram lavadas três vezes com PBST e amostras de soro de surubim híbrido foram diluídas em PBS. Em cada poço foram adicionados 50µL de cada diluição. Todos os soros foram testados em duplicata. Depois de nova incubação por 2h à temperatura ambiente, as placas foram lavadas três vezes com PBST. Em seguida, foram adicionados em cada poço 50µL de anticorpo policlonal de coelho anti-IgM de surubim híbrido conjugado com peroxidase e incubado por 1 hora, à temperatura ambiente. Após três lavagens, 200µL de solução reveladora OPG- Fast (Sigma\_aldrich) foi adicionada em cada poço. Após 30 minutos de incubação no escuro, a reação foi interrompida pela adição de 50µL de ácido sulfúrico 4M e a absorbância das placas foram determinadas com a utilização de um leitor de microplaca (Biotek, USA) a 490nm.

### **Provas de aglutinação dos soros**

Para comprovar o poder de aglutinação dos anticorpos circulantes de cada tratamento foram realizados ensaios. Para tanto, foi utilizado como antígeno a bactéria viva *L. garvieae* na concentração de 1\*10<sup>8</sup>UFC mL<sup>-1</sup> de PBS (D.O. 1,3 a 600nm). Foram testadas diluições seriadas dos soros em PBS: 1/2; 1/4; 1/8; 1/16; 1/32 e 1/64. Foram misturados 10 µL de antígeno com 10 µL de cada diluição de soro dos tratamentos (n=6). Transcorridos dez minutos, foi observado em microscópio óptico (x40) a existência de aglutinação do soro. O título de anticorpos específicos frente a *L. garvieae* com capacidade aglutinante foi obtido considerando-se como título o valor da diluição mais alta que se evidenciou aglutinação. Para comprovar que as aglutinações dos soros foram específicas para *L. garvieae*, também foram



testados *Streptococcus sp.* e *Staphylococcus aureus* como antígenos (controle negativo).

## 2.5. Análise Estatística

As diferenças nas porcentagens relativas de sobrevivência foram avaliadas pelo teste de Qui-quadrado, sendo consideradas significativas quando  $P < 0,05$ . A análise de sobrevivência dos animais foi realizada com o teste Kaplan-Meier, onde probabilidades menores que 5% foram consideradas significativas. Os níveis de anticorpos específicos foram submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e a seguir os tratamentos foram comparados pelo teste Anova de dois fatores e Teste Post-Hoc (Games –Howell) – assumindo variâncias diferentes. Probabilidades menores que 5% foram consideradas significantes. As análises estatísticas supracitadas foram realizadas com a utilização do software estatístico SPSS, Versão 16.0. (SPSS Inc., Chicago).

As variáveis hematológicas foram analisadas utilizando o SAS<sup>®</sup> Software estatístico, versão 6.12 (SAS Institute Inc., USA). Após analisada a normalidade dos dados pelo teste Kolmogorov-Smirnov, foram adotadas as seguintes transformações para avaliação dos resultados: Log 10 (eritrócito, leucócito, neutrófilo, trombócito); rank (basófilo e CGE);  $1/\sqrt{\phantom{x}}$  (monócitos). Em seguida, os tratamentos foram comparados pelo teste one-way ANOVA seguido por teste  $t$  student. Probabilidades menores que 5% foram consideradas significantes.

## 3. RESULTADOS

A concentração de formalina e o tempo de incubação mínimos para inativação da bactéria foi determinada como 1% de formalina por 24 horas a 4°C. O teste de esterilidade mostrou nenhuma bactéria viva na vacina formulada quando cultivados por 72 horas a 30°C em THA. Entre os peixes expostos às duas doses da vacina, nenhum sinal de doença ou morte foi verificado 96 horas após a exposição, o que ilustra a segurança do preparo da vacina.

Os parâmetros de qualidade da água foram semelhantes entre os tratamentos mantidos e permaneceram dentro dos parâmetros para a espécie: temperatura  $30^{\circ}\text{C}\pm 0,6$ ; pH  $7,86\pm 0,24$ ; oxigênio dissolvido  $3,5\pm 0,45\text{mg/L}$  e amônia ( $\text{NH}_3$ )  $< 0,02\text{mg/L}$ .

A curva de sobrevida dos peixes desafiados está demonstrada na Figura 1. Observou-se que a mortalidade dos peixes infectados começou a partir do segundo dia e perdurou até o dia 10. Os peixes imunizados com bacterina oleosa apresentaram probabilidade de sobrevida significativamente maior que os peixes não imunizados ( $P < 0,001$ ), contudo não foi observada diferença entre os animais imunizados com bacterina aquosa e oleosa. Os tratamentos que foram desafiados com PBS não apresentaram mortalidade e/ou sintomatologia clínica característicos da lactococose.

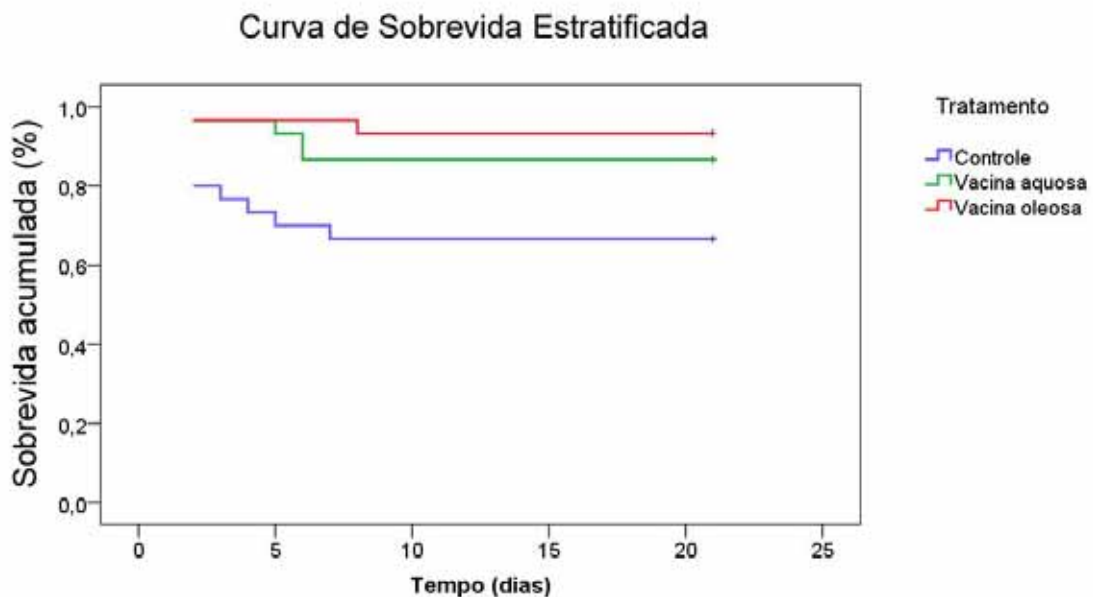


FIGURA 1: Curva de Kaplan-Meier de surubins híbridos *Pseudoplatystoma corruscans* x *P. reticulatum* após infecção experimental com *Lactococcus garvieae*, 30 dias após a vacinação.

Os surubins híbridos desafiados com *L. garvieae* apresentaram sinais típicos da doença, como anorexia, exoftalmia, melanose, septicemia hemorrágica, distensão abdominal, prolapso anal, hemorragia na área

periocular, hemorragia na base das nadadeiras e ulcerações cutâneas. As lesões dos animais vacinados e não vacinados foram similares (Figura 2).

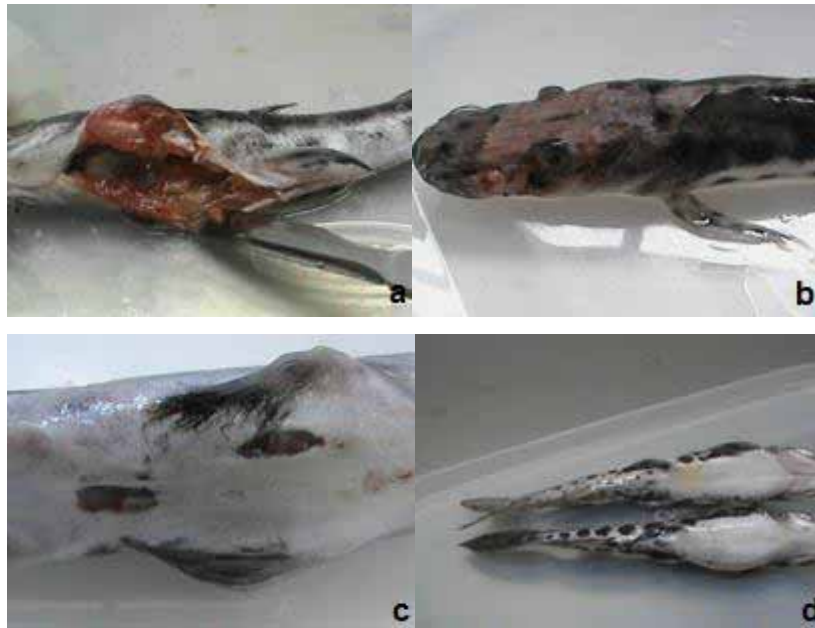


FIGURA 2 – Sintomatologia clínica de surubins híbridos *Pseudoplatystoma corruscans* x *P. reticulatum* após infecção experimental com *L. garvieae*, 30 dias após a vacinação: (a) septicemia hemorrágica; (b) hemorragia na área periocular e exoftalmia; (c) ulcerações na pele; (d) distensão abdominal.

Os dados pertinentes à porcentagem relativa de sobrevivência (RPS) estão discriminados na tabela 2. Ao final do experimento, a mortalidade dos surubins foi significativamente maior no grupo controle quando comparado com os grupos imunizados com bacterina ou bacterina oleosa. Elevados níveis de proteção foram observados após um mês de imunização com bacterina aquosa e oleosa com valor de RPS de 63,8% e 81,7%, respectivamente. Ao final do período de observação, os animais sobreviventes foram sacrificados e constatou-se que as bactérias foram erradicadas do rim e do cérebro dos animais imunizados, enquanto os animais não imunizados tornaram-se portadores assintomáticos das mesmas.

TABELA 2 – Mortalidade acumulada de surubins híbridos *Pseudoplatystoma corruscans* x *P. reticulatum* vacinados com bacterina aquosa e bacterina oleosa após infecção experimental com *L. garvieae* 30 dias após a vacinação.

TRATAMENTOS	Número de peixes	Desafio (UFC/peixe)	Mortalidade (%)	RPS <sup>1</sup> (%)
Bacterina	30	1x10 <sup>7</sup>	13,3 <sup>ab</sup>	63,8
Bacterina oleosa	30	1x10 <sup>7</sup>	6,7 <sup>a</sup>	81,7
Controle (PBS)	30	1x10 <sup>7</sup>	36,7 <sup>b</sup>	

<sup>1</sup> RPS= porcentagem relativa de sobrevivência. Letras diferentes indicam diferença estatística entre as médias dos tratamentos (p<0,05).

A tabela 3 demonstra que a contagem de eritrócitos tendeu a aumentar com o desafio bacteriano, mas não variou entre os tratamentos de vacina. Da mesma forma, a imunização e o desafio bacteriano não alteraram a quantidade de trombócitos e o hematócrito no sangue dos animais. Por outro lado, quando avaliado o volume corpuscular médio dos eritrócitos, observou-se redução significativa dos valores no tratamento controle após a infecção experimental por *L. garvieae*, indicando anemia microcítica nestes animais.

A tabela 4 demonstra a contagem total e diferencial de leucócitos antes e após o desafio bacteriano. A quantidade de leucócitos circulantes aumentou significativamente após desafio bacteriano em todos os tratamentos (P<0,01). Observou-se que, apesar de não haver diferença estatística, o desafio bacteriano desencadeou tendência de linfocitose e neutrofilia nos surubins híbridos. Por outro lado, não foi observada diferença no número de basófilos circulantes entre os tratamentos e/ou desafio, e as células granulocíticas especiais apresentaram grande variação entre os animais. Adicionalmente constatou-se maior quantidade de monócitos circulantes nos tratamentos controle que nos tratamentos imunizados com bacterina aquosa e oleosa antes e após desafio bacteriano, respectivamente (P<0,05).

TABELA 3 - Valores médios ( $\pm$ desvio padrão) do hematócrito, da contagem total de eritrócitos, do número de trombócitos e do volume corpuscular médio (VCM) dos eritrócitos 30 dias após a vacinação de surubins híbridos *Pseudoplatystoma corruscans* x *P. reticulatum* contra lactococose com bacterina aquosa e bacterina oleosa antes e após desafio experimental com cepa viva de *L. garvieae*.

TRATAMENTOS	Hematócrito (%)	Número de Eritrócitos ( $10^6$ células)	VCM (fL)	Trombócitos Totais
<b><i>Antes da infecção</i></b>				
Controle (PBS)	26,17 $\pm$ 1,90 <sup>a</sup>	1,80 $\pm$ 0,13 <sup>ab</sup>	160,52 $\pm$ 18,56 <sup>a</sup>	41.196,12 $\pm$ 30.881,61 <sup>a</sup>
Bacterina Aquosa	25 $\pm$ 1,26 <sup>a</sup>	1,51 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>	165,98 $\pm$ 13,74 <sup>a</sup>	64.411,60 $\pm$ 28.926,41 <sup>a</sup>
Bacterina Oleosa	24,16 $\pm$ 2,56 <sup>a</sup>	1,60 $\pm$ 0,16 <sup>b</sup>	151,79 $\pm$ 21,49 <sup>a</sup>	61.499,58 $\pm$ 23.455,46 <sup>a</sup>
<b><i>Após infecção</i></b>				
Controle (PBS)	26,5 $\pm$ 1,52 <sup>a</sup>	2,16 $\pm$ 0,47 <sup>a</sup>	126,26 $\pm$ 21,09 <sup>b</sup>	66.868,52 $\pm$ 32.045,51 <sup>a</sup>
Bacterina aquosa	25,16 $\pm$ 3,65 <sup>a</sup>	1,69 $\pm$ 0,20 <sup>ab</sup>	149,29 $\pm$ 14,49 <sup>ab</sup>	50.094,11 $\pm$ 29.226,05 <sup>a</sup>
Bacterina Oleosa	25,16 $\pm$ 3,06 <sup>a</sup>	1,90 $\pm$ 0,28 <sup>ab</sup>	133,621 $\pm$ 15,143 <sup>ab</sup>	51.190,05 $\pm$ 14.167,02 <sup>a</sup>

Letras diferentes indicam diferença estatística entre as médias dos tratamentos ( $p < 0,05$ ).

TABELA 4 - Valores médios ( $\pm$ desvio padrão) dos números absolutos de leucócitos de surubins híbridos *Pseudoplatystoma corruscans* x *P. reticulatum* 30 dias após imunização contra *Lactococcus garvieae*.

TRATAMENTOS	LEUCÓCITOS					
	Leucócitos	Linfócitos	Neutrófilos	Morócitos	Basófilos	CGE*
<b><i>Antes da infecção</i></b>						
Controle (FBS)	30.839,52 $\pm$	36.904,00 $\pm$	6.172,46 $\pm$	4.848,58 $\pm$	601,91 $\pm$	1.300,7 $\pm$
	17.107,84 <sup>b</sup>	2.289,00 <sup>ab</sup>	4.890,62 <sup>ab</sup>	5.486,02 <sup>ab</sup>	851,24 <sup>a</sup>	1.565,38 <sup>ab</sup>
Bactéria aquosa	22.538,49 $\pm$	18.725,50 $\pm$	2.763,12 $\pm$	769,76 $\pm$	154,35 $\pm$	125,77 $\pm$
	7908,96 <sup>b</sup>	7.202,78 <sup>b</sup>	1.382,97 <sup>b</sup>	320,51 <sup>c</sup>	210,13 <sup>a</sup>	195,65 <sup>b</sup>
Bactéria deosa	36.061,19 $\pm$	28.308,00 $\pm$	5.733,36 $\pm$	1.054,30 $\pm$	261,81 $\pm$	703,78 $\pm$
	10.151,78 <sup>b</sup>	7.485,30 <sup>ab</sup>	2.157,39 <sup>ab</sup>	397,61 <sup>bc</sup>	186,42 <sup>a</sup>	652,62 <sup>ab</sup>
<b><i>Após a infecção</i></b>						
Controle (FBS)	57.331,47 $\pm$	39.617,83 $\pm$	10.504,6 $\pm$	5.434,41 $\pm$	790,34 $\pm$	1.116,02 $\pm$
	23.771,54 <sup>a</sup>	17.939,41 <sup>ab</sup>	5.185,08 <sup>a</sup>	2.679,48 <sup>a</sup>	963,53 <sup>a</sup>	742,88 <sup>a</sup>
Bactéria aquosa	44.539,22 $\pm$	34.904,00 $\pm$	6.168,96 $\pm$	2.028,88 $\pm$	88,34 $\pm$	779,64 $\pm$
	9.265,33 <sup>a</sup>	9.133,33 <sup>ab</sup>	2.556,14 <sup>ab</sup>	219,72 <sup>ab</sup>	197,54 <sup>a</sup>	515,11 <sup>ab</sup>
Bactéria deosa	56.466,89 $\pm$	44.162,17 $\pm$	7.617,91 $\pm$	1.766,4 $\pm$	513,46 $\pm$	740,16 $\pm$
	28.076,58 <sup>a</sup>	20.376,59 <sup>a</sup>	4.882,37 <sup>ab</sup>	762,20 <sup>b</sup>	601,84 <sup>a</sup>	355,45 <sup>ab</sup>

\*CGE: célula granulocítica especial; Letras diferentes indicam diferença estatística entre as médias dos tratamentos ( $p < 0,05$ ).

A atividade de lisozima do soro dos surubins híbridos tampouco foi afetada pelo tratamento das vacinas (Figura 3). Observou-se que após o desafio bacteriano (GIV, GV, GVI), a atividade de lisozima do soro apresentou a mesma intensidade de resposta independente da imunização.

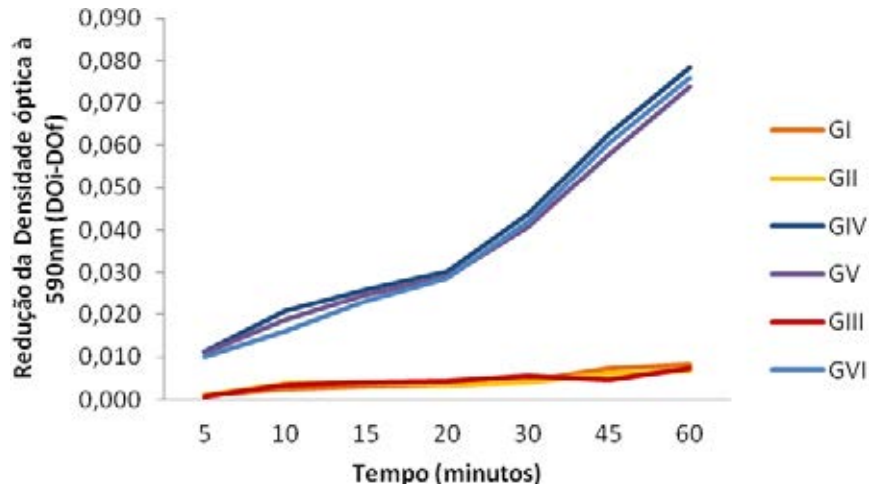


FIGURA 3 – Atividade da lisozima de surubins híbridos *Pseudoplatystoma corruscans* x *P. reticulatum* vacinados e não vacinados antes e após desafio experimental com cepa viva de *Lactococcus garvieae*. Tratamentos (n=6): GI controle sem desafio; GII – vacinados com bacterina aquosa sem desafio; GIII – vacinados com bacterina oleosa sem desafio; GIV – controle com desafio; GV – vacinados com bacterina aquosa com desafio; GVI – vacinados com bacterina oleosa com desafio.

Após titulação em bloco, foram padronizadas as concentrações ideais do soro dos surubins (1:100) e anti-IgM (1:1000) para realização dos ensaios ELISA indireto.

Foi observada interação positiva entre o tempo e a titulação de anticorpos, sendo que nos momentos de 30 e 60 dias após a vacinação os peixes apresentaram maiores níveis de anticorpos ( $P < 0,001$ ).

Tabela 5 – Médias da variável tempo na análise ANOVA de dois fatores na titulação de anticorpos de surubins híbridos *Pseudoplatystoma corruscans* x *P. reticulatum* vacinados e não vacinados antes e após desafio experimental com cepa viva de *Lactococcus garvieae*.

Tempo de vacinação (dias)	Média	Menor valor	Maior valor
15	0,275 <sup>b</sup>	0,263	0,287
30	0,311 <sup>a</sup>	0,299	0,323
60	0,295 <sup>ab</sup>	0,283	0,308

Letras diferentes demonstram médias com nível de significância ( $p < 0,05$ ). Erro padrão (0,006)

Além disto, também ficou constatado (Tabela 6) que as médias dos níveis de anticorpos dos tratamentos com bacterina oleosa foram significativamente maiores ( $P < 0,05$ ) que as dos peixes dos outros tratamentos.

Tabela 6 – Resultados das médias dos tratamentos de vacinas por ANOVA 2 fatores de surubins híbridos *Pseudoplatystoma corruscans* x *P. reticulatum* vacinados e não vacinados antes e após desafio experimental com cepa viva de *Lactococcus garvieae*.

Tratamento	Médias	Menor valor	Maior valor
Controle	0,272 <sup>b</sup>	0,264	0,281
Bacterina aquosa	0,276 <sup>ab</sup>	0,264	0,288
Bacterina oleosa	0,300 <sup>a</sup>	0,288	0,311

Letras diferentes demonstram diferença significativa entre grupos ( $p < 0,05$ ). Erro padrão = 0,004

Não foi detectada diferença entre os níveis de anticorpos dos surubins híbridos 15 e 30 dias após a vacinação com bacterina aquosa e os tratamentos



controles (Figura 4 e 6), enquanto, nos mesmos momentos, foram verificadas titulações de 1: 3.200 nos tratamentos imunizados com bacterina oleosa (Figura 5 e 7).

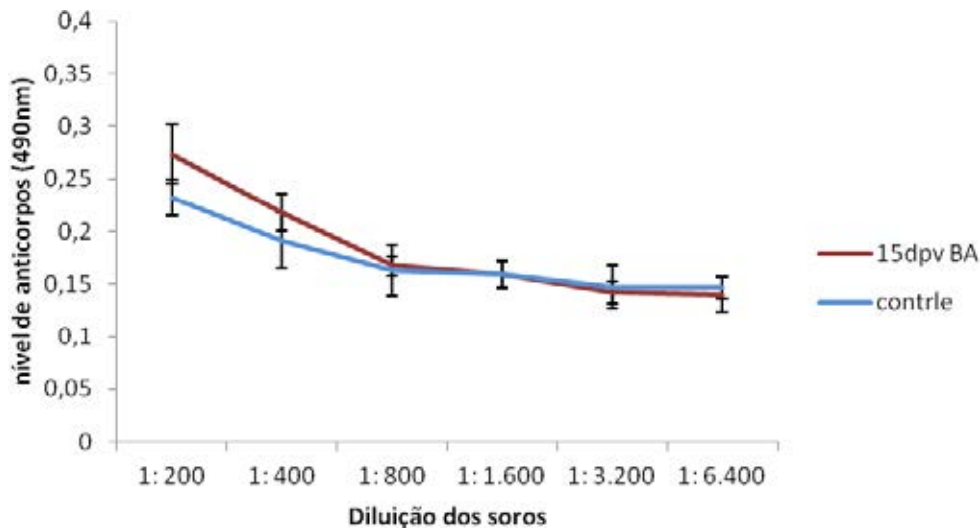


Figura 4. Titulação de anticorpos de surubins híbridos *Pseudoplatystoma corruscans* x *P. reticulatum* imunizados com bacterina aquosa 15 dias após a imunização (15dpv BA) pelo método Elisa indireto.

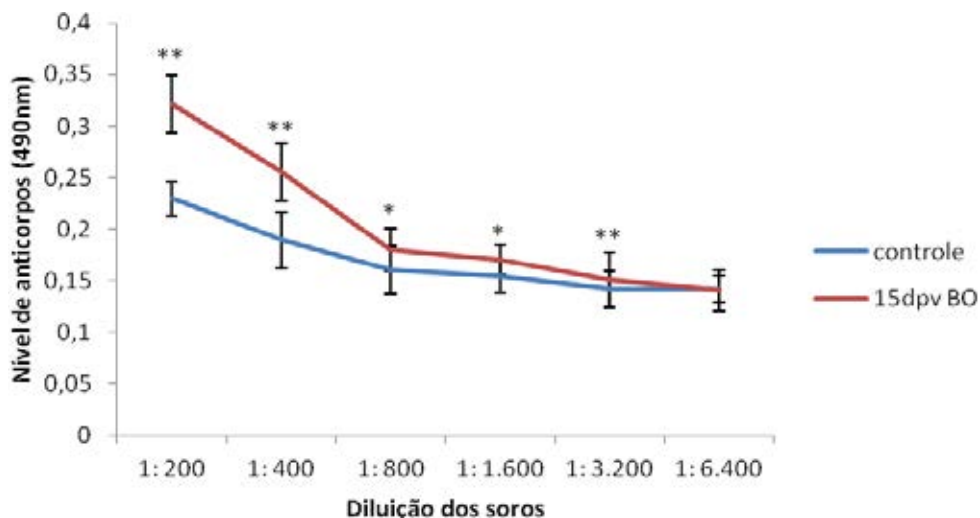


Figura 5. Titulação de anticorpos de surubins híbridos *Pseudoplatystoma corruscans* x *P. reticulatum* imunizados com bacterina oleosa 15 dias após a imunização (15dpv BO) pelo método Elisa indireto. (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,001$

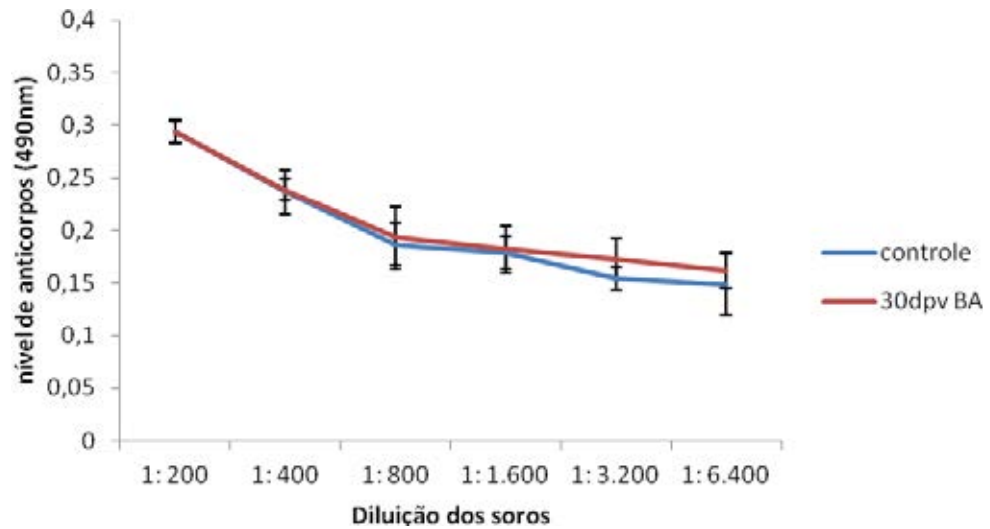


Figura 6. Titulação de anticorpos de surubins híbridos *Pseudoplatystoma corruscans* x *P. reticulatum* imunizados com bacterina aquosa 30 dias após a imunização (30dpv BA) pelo método Elisa indireto. (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,001$

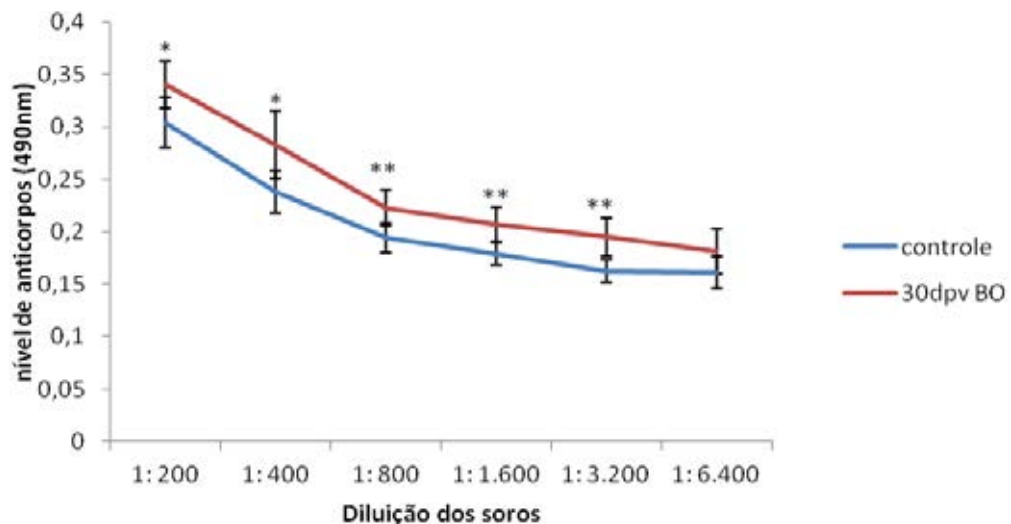


Figura 7. Titulação de anticorpos de surubins híbridos *Pseudoplatystoma corruscans* x *P. reticulatum* imunizados com bacterina oleosa 30 dias após a imunização (30dpv BO) pelo método Elisa indireto. (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,001$

Por outro lado, dois meses após a imunização dos surubins híbridos com bacterina aquosa detectou-se aumento de anticorpos circulantes, com titulação de anticorpos específicos de 1:3.200 (Figura 8). No mesmo momento, os níveis de anticorpos dos surubins imunizados com bacterina oleosa apresentaram titulação de anticorpos 1:6.400 (Figura 9).

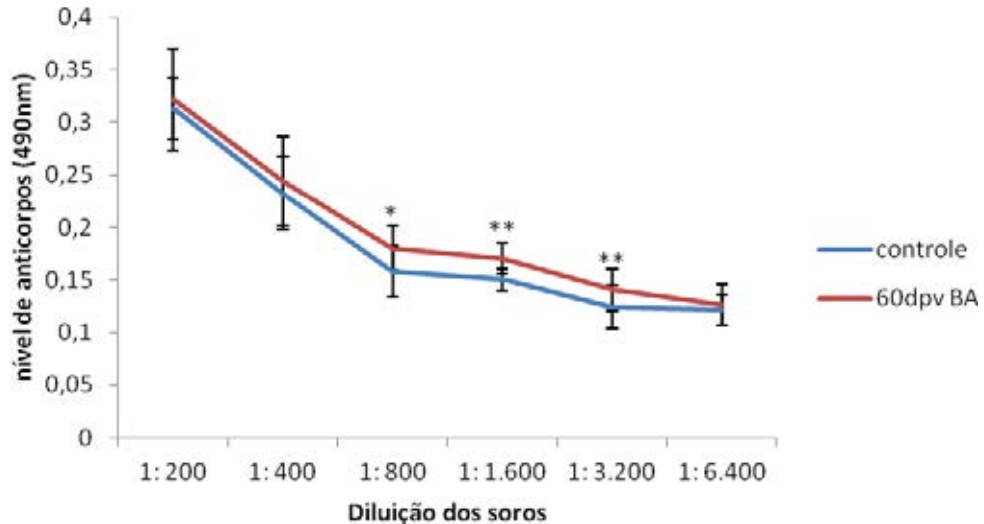


Figura 8. Titulação de anticorpos de surubins híbridos *Pseudoplatystoma corruscans* x *P. reticulatum* imunizados com bacterina aquosa 60 dias após a imunização (60dpv BA) pelo método Elisa indireto. (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,001$

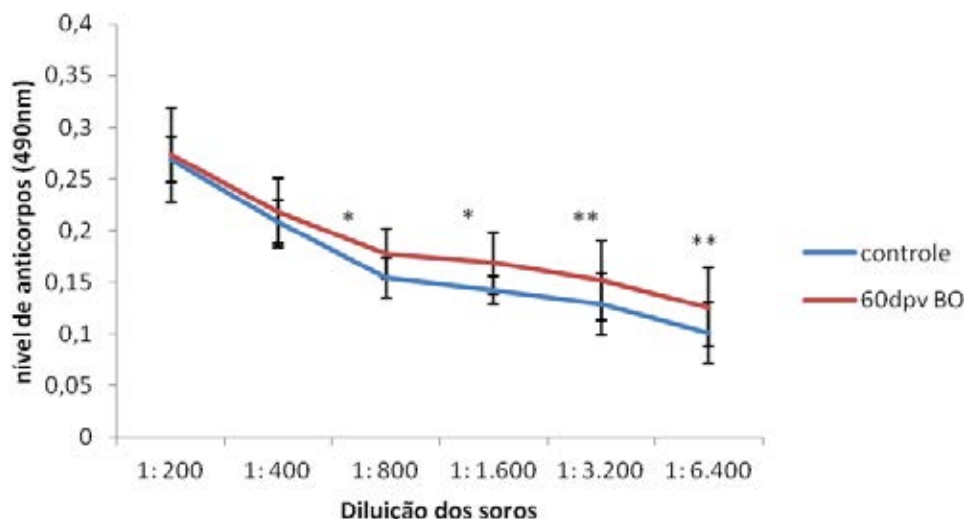


Figura 9. Titulação de anticorpos de surubins híbridos *Pseudoplatystoma corruscans* x *P. reticulatum* imunizados com bacterina oleosa 60 dias após a imunização (60dpv BO) pelo método Elisa indireto. (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,001$

Os testes de aglutinação demonstraram resultado positivo para anticorpos específicos nos soros dos animais imunizados com bacterina oleosa e aquosa até 60 dias após a vacinação, sendo a titulação de aglutinação mais elevada no soro dos animais imunizados com bacterina oleosa (Tabela 7). Quando avaliada a aglutinação dos soros com *Streptococcus* sp. ou *Staphylococcus aureus* não foi verificada aglutinação de nenhum soro, indicando que esta era específica para *L. garvieae*.

TABELA 7 – Aglutinação de soros de surubins híbridos *Pseudoplatystoma corruscans* x *P. reticulatum* imunizados com bacterina aquosa, bacterina oleosa e PBS (controle) (C) 15, 30 e 60 dias após a vacinação contra lactococose.

Tratamentos	Controle			Bacterina Aquosa			Bacterina Oleosa		
Dias após vacinação	15	30	60	15	30	60	15	30	60
Diluição limite	0	0	0	0	0	1:2	1:2	1:8	1:4

#### 4. DISCUSSÃO

A vacinação de peixes para prevenção de doenças bacterianas que afetam criações comerciais tem impacto significativo nas criações por ser maneira eficaz de proteger os animais contra doenças infecciosas. O objetivo da imunização é prover o indivíduo com uma proteção imunológica contra exposição tardia de agentes infecciosos, através do desenvolvimento de células T e B de memória (Miller et al., 2010).

No presente estudo, estimou-se que a probabilidade de que um surubim híbrido permaneça vivo após infecção com *L. garvieae* é de 93,3% nos animais imunizados com bacterina oleosa, contra 66,7% dos animais não imunizados. Além disso, foi observado que os animais imunizados apresentaram proteção satisfatória contra *L. garvieae*, com valores de RPS acima de 50% (Amend, 1981), e que, após o período experimental, não foi constatada presença da bactéria nos animais imunizados sobreviventes. Desta forma, o sistema imunológico dos animais vacinados preveniu e

erradicou a lactococose, e, considerando que um número suficiente de indivíduos possa ser imunizado, a transmissão desta doença infecciosa entre indivíduos pode ser interrompida.

Diversas tentativas têm sido realizadas para o desenvolvimento de uma estratégia de vacinação apropriada contra a lactococose, contudo variações na proteção tem sido relatadas dependendo a espécie de peixe, bem como da rota de administração (Toranzo et al., 2009). Autovacinas tem sido desenvolvidas em diversas espécies de peixes (Vendrell et al., 2006; Eldar et al., 1995; Eldar et al., 1997). Tanrikul (2012) desenvolveu uma vacina autógena contra *L. garvieae* isolada de surtos em criações de truta arco-íris Israel e obteve níveis de proteção de 83,3% após desafio experimental. Vendrell et al. (2007) relataram 94% de sobrevivência após desafio por *L. garvieae* de truta arco-íris vacinadas intraperitonealmente. Por outro lado, Hossenli et al. (2011) relataram sobrevivência de 54% após desafio com *L. garvieae* em truta arco-íris vacinadas por imersão. Recentemente, uma vacina oleosa bivalente (*Aeromonas hydrophyla* x *Lactococcus garvieae*) intraperitoneal desenvolvida para truta arco-íris apresentou 100% de RPS quando os animais foram desafiados contra *Lactococcus garvieae* (Bastardo et al., 2012).

Considerando a última estatística aquícola (MPA, 2012), a mortalidade evidenciada no presente estudo poderia representar perda de cerca de 1.000 toneladas anuais no cultivo de surubins, sem considerar as perdas econômicas inerentes à utilização de antimicrobianos para conter surtos, bem como a possibilidade de embargo das exportações pela presença de resíduos de antibióticos nas carcaças. Adicionalmente, esta mortalidade provavelmente poderia ser mais acentuada no campo, já que surtos da doença estão associados a mudanças nas condições ambientais, elevada densidade, mudança repentina de temperatura, transferência de peixes, manejo incorreto, baixa qualidade e elevada temperatura da água (Kav e Ergans, 2008) com consequente estresse. Neste sentido, Fukuda et al. (1997) demonstraram que a mortalidade acumulada do *Seriola quinqueradiata* após desafio com *L. garvieae* variou de 20 a 60% dependendo da concentração de oxigênio dissolvido na água.

As manifestações clínicas da lactococose em surubins híbridos foram caracterizadas por exoftalmia, hemorragia na área periocular, septicemia hemorrágica e distensão abdominal. A mortalidade dos animais foi iniciada após 24 horas e perdurou 17 dias, sendo que as primeiras horas da infecção, o sistema imune dos animais vacinados revelou-se mais eficaz que dos animais não imunizados. Estes dados corroboram com estudos realizados com truta arco íris (Vendrell et al., 2007; Bastardo et al., 2012), tilápia (Evans et al., 2009) e *S. quinqueradiata* (Ooyama et al., 2002), cujos estudos demonstraram que o período de incubação da doença é muito curto e este patógeno atua com elevada virulência, com observação de sinais clínicos característicos da infecção em todos animais mortos independente dos tratamentos de vacina avaliados.

Vacinas contendo óleo adjuvante possuem duas vantagens: aumento do tempo de proteção e elevado título de anticorpos específicos (Brudeseth et al., 2013). O uso de adjuvantes oleosos é combinado com sucesso com bacterinas injetáveis para peixes (Vendrell et al., 2006). O mecanismo dos óleos adjuvantes é o efeito de armazenagem, que permite que o antígeno seja liberado vagarosamente no tecido ou sangue, acentuando a resposta humoral (Anderson, 1997). Nos últimos anos, preparações oleosas têm sido utilizadas para prevenir grande número de doenças bacterianas (Newman, 1993; Anderson, 1997; Rahman et al., 2000; Romalde et al., 2003).

O período de incubação de uma doença e a rapidez com que os anticorpos protetores são desenvolvidos influenciam a eficácia da vacinação. Após desafio experimental com a *L. garvieae* os melhores níveis de sobrevivência e níveis de anticorpos estiveram presentes nos animais imunizados com bacterina oleosa. A utilização do óleo adjuvante melhorou a imunogenicidade da vacina, acentuando a resposta humoral na produção de anticorpos após a imunização. Os níveis de anticorpos dos surubins contra *L. garvieae* corroboraram com estudos prévios contra essa mesma bactéria, onde foi demonstrado que o título de aglutinação máximo verificado após desafio com bactéria capsulada foi de 1:8, suficiente para produzir proteção adequada em *Seriola quinqueradiata* (Ooyama et al.,

2002). Estes resultados são as primeiras evidências sobre a viabilidade do estímulo do sistema imunológico adaptativo de surubins híbridos, e estão em concordância com outros estudos que demonstraram o efeito de intensificação imunitária do adjuvante e que o uso de óleos adjuvantes combinados com bacterina injetável melhorou a proteção dos peixes contra *L. garvieae* (Bastardo et al., 2012; Kubilay et al., 2008; Ravelo et al., 2006; Romalde et al., 2005).

Os resultados dos níveis de anticorpos circulantes obtidos neste estudo sugerem que os animais utilizados tiveram um contato prévio natural com a *L. garvieae* evidenciado pelos níveis basais de anticorpos específicos ao patógeno nos peixes não vacinados (DO= 0,272). No momento do desafio não foi observada diferença entre os níveis de anticorpos nos tratamentos não vacinados e vacinados com bacterina aquosa, bem como não foi observado poder de aglutinação dos anticorpos frente a *L. garvieae* em ambos tratamentos, contudo, apesar disto, foram verificadas proteção e erradicação da lactococose dos animais vacinados com bacterina aquosa ao final do experimento. Este resultado pode indicar memória imunológica e provável ativação o sistema imune adaptativo celular dos surubins híbridos pela vacinação. Alguns estudos que avaliaram as células T em *Dicentrarchus labrax* reportaram que após a imunização dos animais a atividade destas células é aumentada (Buonocore e Scapigliati, 2009). Estudos conduzidos com vacinação de truta arco-íris (Bastardo et al., 2012), linguado (Toranzo et al., 1995) e tilápia (Eldar et al., 1995) contra *L. garvieae*, e outras bactérias Gram positivas *Streptococcus difficile* e *S. parauberis*, também reportaram baixos níveis de anticorpos e bons níveis de proteção, contudo, não já relatos sobre o efeito da vacinação na imunidade celular de peixes devido a ausência de marcadores disponíveis para avaliação de células T (Buonocore e Scapigliati, 2009).

O sistema imune inato dos peixes tem gerado aumento de interesse, e atualmente é considerada ferramenta primária na defesa e no direcionamento do sistema imune adaptativo (Whyte, 2007). Neste contexto, o estudo das variáveis hematológicas assume importância como

meio auxiliar de diagnóstico e estado de saúde dos peixes (Tavares Dias e Moraes, 2004). Os eritrócitos são as células mais numerosas no sangue e sua função consiste no transporte de oxigênio e gás carbônico, desempenhado pelo seu componente principal, a hemoglobina (Tavares Dias e Moraes, 2004). Apesar da tendência do aumento do número de eritrócitos circulantes após a infecção dos animais, observou-se que a lactococose gerou um quadro de anemia microcítica nos animais não imunizados. Garcia e Moraes (2009) observaram o mesmo sintoma em pacus após desafio bacteriano. As quantidades de eritrócitos circulantes bem como os valores de hematócrito e VCM antes do desafio bacteriano estão de acordo com outros estudos realizados com *Pseudoplatystoma corruscans* em cativeiro (Ranzani Paiva et al., 2000).

O número de células brancas no sangue é um frequente indicador de doenças (Miller et al., 2010). A resposta inflamatória aguda dos surubins frente a lactococose foi caracterizada por um quadro de leucocitose. Estas células identificam e eliminam os patógenos, além de serem importantes mediadores da ativação do sistema imune adaptativo. A reação inflamatória inespecífica e a resposta imunológica nas quais ocorre a fagocitose são de extrema importância nos mecanismo de defesa do hospedeiro (Sasaki et al., 2002; Vale et al., 2002; Lamas et al., 1994), já que, as respostas adquiridas funcionam conjuntamente com estes componentes da defesa inata para erradicação dos patógenos.

No presente estudo, verificou-se menor quantidade do número de monócitos na circulação dos surubins híbridos imunizados com bacterina aquosa e oleosa antes e após desafio bacteriano quando comparados ao tratamento controle. Estes resultados podem indicar a interação entre sistema imune inato e adaptativo, já que os anticorpos produzidos em resposta ao antígeno os remove via ativação das dos macrófagos e pela via do complemento. Este processo pode provocar redução dos monócitos circulantes por conta da diferenciação destas células em macrófagos e consequente migração para os órgãos linfóides e tecidos conjuntivos para atuar como células fagocíticas e células apresentadoras de antígenos (Fijan, 2002; Pellizon et al. 2002; Miller et al., 2010). Após o desafio



bacteriano, as médias das contagens das células leucocitárias circulantes dos surubins híbridos aumentaram independente do tratamento de vacina e observamos uma tendência de neutrofilia, linfocitose e monocitose no sangue dos animais infectados. A mesma tendência de aumento das células leucocitárias após infecção bacteriana está relatada para diversas espécies de peixes (Bailone, 2010; Garcia e Moraes 2009; Lamas et al., 1994; Bruno e Munro, 1986; Secombes, 1996; Roberts, 1989).

A lisozima sérica é utilizada como indicador de respostas imunes não específicas em peixes (Tort et al., 2003). No presente estudo, independente do tratamento avaliado, a intensidade de resposta desta enzima foi a mesma antes e após a infecção experimental. A lisozima é uma enzima bacteriolítica do sistema imune inato encontrada em várias espécies de peixes marinhos e de água doce (Lie et al., 1989) e cuja concentração no sangue eleva-se rapidamente após infecção, como verificado após infecção dos surubins híbridos. Esta enzima é produzida principalmente pelos macrófagos e neutrófilos (Uribe et al., 2011) e é capaz de degradar a camada de peptidoglicano da parede celular de bactérias, resultando em sua lise.

O presente estudo demonstrou que a imunização dos surubins híbridos preveniu a mortalidade e o quadro de anemia, desencadeados pela lactococose. Adicionalmente, os animais não imunizados que sobreviveram ao desafio com *L. garvieae* tornaram-se portadores assintomáticos e futuros distúrbios na homeostase destes animais poderiam acarretar em novos surtos em toda a população, sendo a vacinação uma medida eficaz para erradicação da lactococose nos surubins, além de também poder gerar um impacto positivo na redução do uso de antibióticos ao longo do cultivo. Contudo, embora algumas vezes a imunização reduza a incidência de uma doença para níveis bem baixos, os programas de imunizações eficientes requerem a prática de outras medidas sanitárias.

## 5. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a imunidade dos surubins pode ser estimulada com emprego de vacinas. A bacterina oleosa melhorou a resistência à lactococose 30 dias após a vacinação e tem potencial para, no futuro, fazer parte de uma medida estratégia de manejo para o controle da lactococose. Contudo, estudos posteriores são necessários para verificar a potência da vacina com desafios bacterianos em longo prazo.

## 6. AGRADECIMENTOS

À Fapesp pelo apoio financeiro ao projeto (201207852-0; 201016149-5). A Embrapa Centro Oeste pela doação das cepas para identificação e formulação das vacinas e a Empresa Mar e Terra pela doação dos animais para realização do experimento.

## 7. REFERENCIAS

AKHLAGHI, M.; MUNDAY, B.L.; WHITTINGTON, R.J. Comparison of passive and active immunization of fish against streptococcosis (enterococcosis). **Journal of Fish Diseases**, v.19, n 3, p.251-258.25, 1996.

AMEND, D.F. Potency testing of fish vaccines. International Symposium on Fish Biologics: Serodiagnostics and Vaccines, **Developments in Biological Standardization**, v. 49, p. 447– 454, 1981.

ANDERSON, D.P. 1997. Adjuvants and immunostimulants for enhancing vaccine potency in fish. In: Gudding, R., Lillehaug, A., Midlyng, P.J., Brown, F. (Eds.), **Fish Vaccinology**. Karger, Basilea, Suiza, p. 257– 265.

BAILONE, R. L. **Parâmetros hematológicos e imunológicos de tilápia do Nilo imunizada com vacina polivalente e desafiada com *Aeromonas hydrophila***. 2010. Tese de Doutorado. Universidade Federal De Santa Catarina.

BASTARDO, A.; RAVELO, C.; CASTRO, N.; CALHEIROS, J.; ROMALDE, J.L. Effectiveness of bivalent vaccines against *Aeromonas hydrophila* and *Lactococcus garvieae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Fish and Shellfish Immunology**, v.32, p.756–761, 2012.

BERCOVIER, H., GHITTINO, C., ELDAR, A. In: GUDDING, R., LILLEHAUG, A., MIDTLYNG, P.J., BROWN, F. (Eds.), **Fish Vaccinology**, Developmental Biology Standard, Karger, Basel, p. 153. 1997.

BRUDESETH, B.E.; WIULSROD, R.; FREDRIKSEN, B.N.; LINDMO, K.; LOKLING, K.; BORDEVIK, M.; STEINE, N.; KLEVAN, A.; GRAVNINGEN, K. Status and future perspectives of vaccines for industrialised fin-fish farming. **Fish and Shellfish Immunology**, v.35, p.1-10, 2013.

BRUNO, D. W.; MUNRO, L. S. Haematological assessment of rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson, and Atlantic salmon, *Salmo salar* L., infected with *Renibacterium salmoninarum*. **Journal of Fish Diseases**, v. 9, p. 195-204, 1986.

BUONOCORE, F.; SCAPIGLIATI, G. 2009. **Immune Defense Mechanisms in Sea Bass *Dicentrarchus labrax* L.** In: Fish Defenses Volume 1: Immunology , Ed Science Publishers, p. 195-219.

CAMPOS, J.L. 2005. **O cultivo do pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* (Spix e Agassiz, 1829).** In: Baldisseroto, B., Gomes, L.C. (Eds.) Espécies nativas com potencial para a piscicultura. Editora U.F.S.M., pp. 327–343.

ELDAR A, HOROVITCZ A, BERCOVIER H. Development and efficacy of a vaccine against *Streptococcus iniae* infection in farmed rainbow trout. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 56, p.175–83, 1997.

ELDAR, A.; SHAPIRO, O.; BAJERANO, Y.; BERCOVIER, H. Vaccination with whole cell vaccine and bacterial protein extract protects tilapia against *Streptococcus difficile* meningoencephalitis. **Vaccine**, v.13, p.867-870, 1995.

ELLIS, A. E. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. **Development e Comparative Immunology**, v. 25, p. 827-839, 2001.

EVENSEN, O.; BRUDESETH, B.; MUTULOKI, S. The vaccine formulation and its role in inflammatory processes in fish – effects and adverse effects. In: Midtlyng P., editor. **Progress in Fish Vaccinology**, p.117-127, 2005.

EVANS, J.J.; KLESIUS, F.H.; SHOEMAKER, C.A. First isolation and characterization of *Lactococcus garvieae* from Brazilian Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), and pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* (Spix e Agassiz). **Journal of Fish Diseases**, v.32, p.943–951, 2009.

FIJAN, N. Morphogenesis of blood cell lineages in channel catfish. **Journal Fish Biology**, v. 64, p. 999-1014, 2002.

FUKUDA, Y.; MAITA, M.; SATOH, K.; OKAMOTO, N. Influence of dissolved oxygen concentration on the mortality of yellowtail experimentally infected with *Enterococcus seriolicida*. **Fish Pathology**, v. 32, p. 129-130, 1997.

GARCIA, F.; MORAES, F. R. Hematologia e sinais clínicos de *Piaractus mesopotamicus* infectados experimentalmente com *Aeromonas hydrophila*. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 31, p. 17-21, 2009.

GOLDENFARB, P. B.; BOWYER, F. P.; HALL, E.; BROSIUS, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 56, p. 35, 1971.

HOSSENI, M. H.; AKHLAGHI, M. H.; MOAZZENI JULA, M.; Gh. Experimental vaccine against lactococcosis in cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Archives of Razi Institute**, v. 66, p. 51-57, 2011.

HRUBEC, T. C. e SMITH, S. A. **Hematology of fishes**. In: FELDMAN, B. F.; ZINK, J. G.; JAIN, M. C. (Ed.) *Veterinary Hematology*, 5<sup>th</sup> Edition Blackwell, p. 994-1003, 1998.

KAV, K.; ERGANIS, O. Antibiotic susceptibility of *Lactococcus garviae* in rainbow trout (*Oncorhynchus mikiss*) farms. **Bulletim of Veterinary Institute of Pulawy**, v.52, p.223-226, 2008.

KIM, D. H. e AUSTIN, B. Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) induced by probiotics. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 21, p. 513-524, 2006.

KIRON, V. Fish immune system and nutritional modulation for preventive health care. **Animal Feed Science and Technology**, v. 172; p. 111-123, 2012.

KUBILAY, A., ALTUN, S., ULUKOY, S., EKICI, S. e DILER, O. Immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against *Lactococcus garvieae* using vaccine mixtures. **The Israeli Journal of Aquaculture**, v. 60, p. 268-273, 2008.

LABARRERE, C.R. **Perfil sanguíneo de híbridos de surubim (*Pseudoplatystoma reticulatum* X *P. corruscans*) criados em diferentes densidade estocagem**. Dissertação: Universidade Federal de Minas Gerais, Medicina e Cirurgia Veterinária, Lavras, 63p. 2011.

LAMAS, J.; SANTOS, Y.; BRUNO, D. W.; TORANZO, A. E.; ANADON, R. Non-specific cellular responses of rainbow trout to *Vibrio anguillarum* and its extracellular products (ECPs). **Journal of Fish Biology**, v. 45, p. 839-854, 1994.

LIE, O. **Improving famed fish quality and safety**. Ed. Woodhead Publishing Ltda, 648p, 2008.

LIE, O.; EVENSEN, O.; SORENSEN, A.; FROYSADAL, E. Study of lysozyme activity in some fish species. **Disease of Aquatic Organisms**, v. 6, p. 1-5, 1989.

MILLER, F. P.; VANDOME, A. F.; McBREWSTER, J. **Fish Diseases and Parasites**. Ed.: Alphascript Publishing, 218 p. 2010.

MPA, MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura**. Governo Federal: Brasília, fev. 2012. Disponível em: <[http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes\\_e\\_Estatisticas/Boletim%20Estat%C3%ADstico%20MPA%202010.pdf](http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20Estat%C3%ADstico%20MPA%202010.pdf)>. Acesso em: 2 out. 2012.

NEWMAN, S.G. Bacterial vaccines for fish. **Annual Review of Fish Disease**, v.3, p.145– 185, 1993.

OOYAMA, T., HIROKAWA, Y., MINAMI, T., YASUDA, H., NAKAI, T., ENDO, M., RUANGPAN, L.; YOSHIDA, T. Cell-surface properties of *Lactococcus garvieae* strains and their immunogenicity in the yellowtail *Seriola quinqueradiata*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.51, p.169–177, 2002.

OOYAMA, T.; KERA, A.; OKADA, T.; INGLIS, V.; YOSHIDA, T. The protective immune response of yellowtail to the bacterial fish pathogen *Lactococcus garvieae*. **Disease of Aquatic Organisms**, v.37,121–126, 1999.

PELLIZON, C. H.; NAKAGHI, L. S. O.; AZEVEDO, A.; CASALETTO, L.; LUNARDI, L. O. Localization of peroxidase activity in blood mononuclear phagocytes in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, v. 34, p. 377-379, 2002.

PLANT, K.P.; LaPATRA, S.E. Advances in fish vaccine delivery. **Developmental and Comparative Immunology**, v.35, p.1256-1262, 2011.

RAHMAN, M.H.; OTOTAKE, M.; IIDA, Y.; YOKOMIZO, Y.; NAKANISHI, T. Efficacy of oil-adjuvanted vaccine for coldwater disease in ayu *Plecoglossus altivelis*. **Fish Pathology**, v.35, p.199–203, 2000.

RANZANI-PAIVA, M.J.T.; PÁDUA, S.B.; TAVARES-DIAS, M.; EGAMI, M.I. **Métodos de Análise Hematológica em Peixes**, Ed. Eduem, Maringá, 140p. 2013.

RANZANI PAIVA, M.J.T.; SILVA-SOUZA, A.T.; PAVANELLI, G.C.; TAKEMOTO, R.M.; EIRAS, A.C. Hematological evaluation in commercial fish species from the floodplain of the upper Paraná River, Brazil. **Acta Scientiarum**, v. 22, p. 507-513, 2000.

RAVELO, C.; MAGARIÑOS, B.; HERRERO, M.C.; COSTA, L.; TORANZO, A.E.; ROMALDE, J.L. Use of adjuvanted vaccines to lengthen the protection against lactococcosis in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v.251, p.153-158, 2006.

ROBERTS, R. J. **Patología de los peces**. Madrid: Ed. Mundi-Prensa, 1989.

ROMALDE, J.L.; RAVELO, C.; LOPEZ-ROMALDE, S.; MAGARIÑOS, B.; BARJA, J.L.; TORANZO, A.E. Vaccination strategies to prevent important emerging diseases for Spanish aquaculture. 3rd. Int. Symp. of Fish Vaccinology. **International Association of Biological Standardization**. Norway, Bergen, p. 38, 2003.

ROMALDE, J.L.; LUZARDO-ALVÁREZ, A.; RAVELO, C.; TORANZO, A.E.; BLANCO MÉNDEZ, J. Oral immunization using alginatte microparticules as a useful strategy for booster vaccination against fish lactococcosis. **Aquaculture**, v.41, p.119-129, 2004.

ROMALDE, J.L.; RAVELO, C.; LÓPEZ-ROMALDE, S.; AVENDAÑO-HERRERA, R.; MAGARIÑOS, B.; TORANZO, A.E. 2005. **Vaccination strategies to prevent emerging diseases for Spanish aquaculture**. In: Midtlyng PJ, editor. Progress in fish vaccinology, Basel: Karger, p.85-95.

ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May-Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 20, p. 329-334, 1947.

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

SECOMBES, C. J. **The fish immune system: the nonspecific immune system – cellular defenses**. London: Academic Press, 1996.

SOMMERSET, I.; KROSSOY, B.; BIERING, E.; FROST, P. Vaccines for fish in aquaculture. **Expert Review of Vaccines**, v. 4, p.89-101, 2005.



TANRIKUL, T.T. Vibriosis as an epizootic disease of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) in Turkey. **Pak Journal Biol Science**, v.10, p.1733-1737, 2012.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. **Hematologia de peixes teleósteos**. Ribeirão Preto: Villimpress Complexo Gráfico, 2004.

THORARINSON, R.; POWELL, D.B. Effects of disease risk, vaccine efficacy, and market price on the economics of fish vaccination. **Aquaculture**, v.256, p. 2336-2340, 2006.

TORANZO, A.E.; DEVESA, S.; ROMALDE, J.L.; LAMAS, J.; RIAZA, A.; LEIRO, J. Efficacy of intraperitoneal and immersion vaccination against *Enterococcus* sp. Infections in turbot. **Aquaculture**, v.134, p.17-27, 1995.

TORANZO, A.E., ROMALDE, J.V., MAGARIÑOS, B.E. e BARJA, J.L. Present and future of aquaculture vaccines against fish bacterial diseases. **Options Méditerranéés**, v.86, p.155–176, 2009.

TORT, L.; BALASCH, J. C.; MACKENZIE, S. Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. **Imunologia**, v. 22, p. 277-286, 2003.

URIBE, C.; FOLCH, H.; ENRIQUEZ, R.; MORGAN, G. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Veterinarian Medicina*, v.56, p. 486-503, 2011.

VALE, A.; AFONSO, A.; SILVA, M.T. The professional phagocytes of sea bass (*Dicertrarchus labrax*) cytochemical characterization of neutrophils and macrophages in the normal and inflamed peritoneal cavity. **Fish and shellfish immunology**, v. 13, p. 183-198, 2002.

VENDRELL, D.; BALCÁZAR, J.L.; RUIZ-ZARZUELA, I.; BLAS, I.; GIRONÉS, O.; MÚZQUIZ, J.L. *Lactococcus garvieae* in fish: A review. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 29, p. 177-198, 2006.

VENDRELL, D.; BALCÁZAR, J.L.; RUIZ-ZARZUELA, I.; BLAS, I.; GIRONÉS, O.; MÚZQUIZ, J. L. Safety and efficacy of an inactivated vaccine against *Lactococcus garvieae* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Preventive Veterinary Medicine**, v. 80, p. 222-229, 2007.

WHYTE, S. K. The innate immune response of finfish – A review of current knowledge. **Fish and Shellfish Immunology**, v.23, p.1127-1151, 2007.