

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Estratégias profiláticas contra estreptococose
mediante diferentes metodologias de inativação,
adjuvantes e suplementação com
Mananoligossacarídeos em tilápias-do-nilo**

Fernando Carlos Ramos Espinoza

Jaboticabal, São Paulo

2021

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

**Estratégias profiláticas contra estreptococose
mediante diferentes metodologias de inativação,
adjuvantes e suplementação com
Mananoligossacarídeos em tilápias-do-nilo**

Fernando Carlos Ramos Espinoza

Orientador: Dra. Julieta Rodini Engrácia de Moraes

Tese apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Aquicultura
do Centro de Aquicultura da
UNESP - CAUNESP, como parte
dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Aquicultura.

Jaboticabal, São Paulo

2021

R175e Ramos Espinoza, Fernando Carlos
Estratégias profiláticas contra estreptococose mediante diferentes metodologias de inativação, adjuvantes e suplementação com mananoligossacarídeos em tilápias-do-nilo / Fernando Carlos Ramos Espinoza. – – Jaboticabal, 2020
xvi, 115 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2020
Orientadora: Julieta Rodini Engrácia de Moraes
Banca examinadora: Geovana Dotta Tamashiro, Jaqueline Dalbello Biller, Marcelo Pardi de Castro, Gustavo da Silva Claudiano
Bibliografia

1. Formaldeído. 2. Peróxido de hidrogênio. 3. Tilápia-do-nilo. 4. Vacina. 5. Eficácia. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Estratégias profiláticas contra estreptococose mediante diferentes metodologias de
Inativação, adjuvantes e suplementação com MOS em tilápias-do-nilo

AUTOR: FERNANDO CARLOS RAMOS ESPINOZA

ORIENTADORA: JULIETA RODINI ENGRACIA DE MORAES

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em
AQUICULTURA, pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. JULIETA RODINI ENGRACIA DE MORAES (Participação Presencial)

Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP – Jaboticabal



Profa. Dra. GEOVANA DOTTA (Participação Virtual)

Departamento de Medicina Veterinária / Universidade Federal da Bahia, UFBA, Salvador-BA



Profa. Dra. JAQUELINE DALBELLO BILLER (Participação Virtual)

Departamento de Produção Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena –
UNESP



Prof. Dr. MARCELLO PARDI DE CASTRO (Participação Virtual)

Depo de Medicina Veterinária / Centro Universitário Barão de Mauá, Ribeirão Preto-SP



Prof. Dr. GUSTAVO DA SILVA CLAUDIANO (Participação Virtual)

Instituto de Biodiversidade e Floresta, Câmpus Tapajós / Universidade Federal do Oeste do Pará,
Santarém-PA

Jaboticabal, 16 de dezembro de 2020.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Fernando Belisario Ramos Calle e Gloria Luz Espinoza Ponce por sempre estarem presentes, além do suporte, conselho e apoio emocional incondicional que me deram;

Às minhas irmãs Silvia e Cecilia e aos meus sobrinhos Ana Claudia, Juan Ignacio e Luana;

À Professora Dra. Julieta Rodini Engrácia de Moraes, pela oportunidade e confiança que depositou em mim desde o começo e pela grande contribuição na minha formação como profissional e pessoa;

Ao Professor Dr. Flávio Ruas de Moraes pela confiança e contribuição no início do meu doutorado;

À minha família, por sempre terem confiado em mim;

Ao Jefferson Yunis Aguinaga, Victor Alexander Cueva Quiroz, Norquis Caled Alvarez Rubio e Nicoli Paganoti de Mello pela amizade, parceria e solidariedade ao longo do meu percurso no doutorado;

Aos membros da minha banca examinadora Dr. Marcello Pardi de Castro, Dr. Gustavo da Silva Claudiano, Dra. Geovana Dotta Tamashiro e Dra. Jaqueline Dalbello Biller pelas valiosas sugestões ao trabalho, tanto na qualificação como na defesa;

A CAPES pela bolsa de doutorado concedida;

Aos professores e funcionários do Caunesp, especialmente ao Valdecir, pela confiança e ajuda;

Aos professores e funcionários do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV da Unesp, especialmente à Mabel, pela confiança e ajuda;

Às demais pessoas que contribuíram direta ou indiretamente na elaboração deste trabalho, e que, por ventura, eu tenha me esquecido de agradecer;

Ao Carlos, Erick, Daniel, David, Erika, Maicon, Bruno, Jesaias, Fernanda, Letícia, Dayanne, Valentina, Yuli, Ediana, Manuel, Angela, Valdinete, Caroline, Andrés, Valeria e Elu pela amizade e parceria;

Ao Brasil, que me deu amigos maravilhosos, experiências incríveis e muitos aprendizados como profissional e pessoa.

APOIO FINANCEIRO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradeço também à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo Auxílio à Pesquisa (Processos 18/06137-1 e 19/02339-1) e ao *Conselho Nacional* de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela Bolsa de doutorado Victor Alexander Cueva Quiroz (141835/2018-4).

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	v
APOIO FINANCEIRO	vi
SUMÁRIO	vii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS	xiv
RESUMO GERAL	1
GENERAL ABSTRACT	2
INTRODUÇÃO GERAL	3
REVISÃO DE LITERATURA	6
Tilápia-do-nilo <i>Oreochromis niloticus</i>	6
Imunidade em peixes	7
<i>Streptococcus agalactiae</i>	9
Vacinas inativadas.....	10
Adjuvantes para vacinas.....	12
Mananoligosacarídeos	14
Referências.....	15
CAPÍTULO 1: Comparação de três métodos de inativação na produção de uma vacina contra <i>Streptococcus agalactiae</i> em tilápias-do-nilo.....	25
RESUMO	25
INTRODUÇÃO.....	26
MATERIAL E MÉTODOS.....	28
RESULTADOS	36
DISCUSSÃO	41
REFERÊNCIAS	46
CAPÍTULO 2: Imunogenicidade de dois adjuvantes em uma vacina inativada com peróxido de hidrogênio contra <i>Streptococcus agalactiae</i> em tilápias-do-nilo.....	52
RESUMO	52
INTRODUÇÃO.....	53
MATERIAL E MÉTODOS.....	54
RESULTADOS	61
DISCUSSÃO	71
REFERÊNCIAS	79

CAPÍTULO 3: Efeito da suplementação com mananoligossacarídeos na eficácia de uma vacina experimental contra <i>Streptococcus agalactiae</i> em tilápias-do-nilo.....	86
RESUMO	86
INTRODUÇÃO.....	87
MATERIAL E MÉTODOS.....	88
RESULTADOS	94
DISCUSSÃO	103
REFERÊNCIAS	110

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

Figura 1. Diagrama do desenho experimental. 28 dias após vacinação os grupos G3, G4, G5 e G6, foram desafiados com *S. agalactiae* e monitorados por 21 dias. Três repetições foram adicionadas nos grupos G2, G4, G5 e G6 para a determinação das proteínas séricas totais e anticorpos IgM anti-*Streptococcus agalactiae*.

Figura 2. Taxa de sobrevivência de grupos de peixes vacinados e não vacinados após o desafio com *S. agalactiae*. G1: controle naïve, não vacinados nem desafiados; G2: controle, não vacinados (injetados com PBS estéril) nem desafiados (injetados com PBS estéril); G3: controle, não vacinados (injetados com PBS estéril) e desafiados; G4: vacinados com bactéria total inativada com peróxido de hidrogênio e desafiados; G5: vacinados com bactéria total inativada com formaldeído e desafiados; G6: vacinados com bactéria total inativada por lise celular mediante pH e posteriormente com formaldeído e desafiados. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre grupos ($P < 0.05$).

Figura 3. Detecção de anticorpos IgM anti-*Streptococcus agalactiae* em tilápias vacinadas com três metodologias de inativação ($N=5$). As barras verticais representam o erro padrão da média. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre tempos (1, 2, 4 e 6 semanas) no mesmo grupo ($P < 0.05$). G3: controle, não vacinados (injetados com PBS estéril); G4: vacinados com bactéria total inativada com peróxido de hidrogênio; G5: vacinados com bactéria total inativada com formaldeído; G6: vacinados com bactéria total inativada por lise celular mediante pH e posteriormente com formaldeído.

Figure 4. Valores médios de proteínas totais do soro em tilápias-do-nilo vacinadas contra *S. agalactiae* com três metodologias de inativação. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre tempos (1, 2, 3, 4, 5 e 6 semanas) no mesmo grupo ($P < 0.05$). Os resultados foram expressos em forma de média $\pm$ desvio padrão. G3: controle, não vacinados (injetados com PBS estéril); G4: vacinados com bactéria total inativada com peróxido de hidrogênio; G5: vacinados com bactéria total inativada com formaldeído; G6: vacinados com bactéria total inativada por lise celular mediante pH e posteriormente com formaldeído.

Figure 5. Análise morfológica de suspensões de *S. agalactiae* mediante microscopia eletrônica de varredoura. (A) Bactéria viva. Barra de escala = 1 μ (B) Bactéria inativada por formaldeído. Barra de escala = 200nm (C) Bactéria inativada por peróxido de hidrogênio. Barra de escala = 1 μ (D) Bactéria inativada por manipulação de pH. Barra de escala = 1 μ

Capítulo II

Figura 1. Diagrama do desenho experimental. 28 dias após vacinação os grupos G3, G4, G5, G6, G7 e G8 foram com desafiados com *S. agalactiae* e monitorados por 21 dias. Duas repetições foram adicionadas nos grupos G2, G4, G5; G6, G7 e G8 para a determinação do hemograma, atividade respiratória dos leucócitos, proteínas séricas totais, albumina e globulina no soro e anticorpos IgM anti-*Streptococcus agalactiae*.

Figura 2. Taxa de sobrevivência (Kaplan-Meier) de tilápias-do-nylo após 21 dias do desafio com *S. agalactiae*. G1: controle não vacinado, não desafiado; G2: controle, não vacinado (injetado com PBS estéril) nem desafiado (injetado com PBS estéril); G3: controle não vacinado (injetado com PBS estéril) e desafiado; G4: controle não vacinado (injetado com hidróxido de alumínio em combinação com PBS estéril) e desafiado; G5: controle não vacinado (injetado com adjuvante incompleto de Freund em combinação com PBS estéril) e desafiado; G6: vacinado com bactéria total inativada com peróxido de hidrogênio e desafiado; G7: vacinado em combinação com hidróxido de alumínio e desafiado e G8: vacinado em combinação com adjuvante incompleto de Freund e desafiado. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre grupos ($P < 0.05$).

Figura 3. Detecção de anticorpos IgM anti-*Streptococcus agalactiae* em tilápias-do-nylo vacinadas com e sem adjuvantes ($N=5$). As barras verticais representam o erro padrão da média. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre grupos no mesmo tempo e letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre tempos (2 e 4 semanas) no mesmo grupo ($P < 0.05$). G3: controle não vacinado (injetado com PBS estéril); G4: controle não vacinado (injetado com hidróxido de alumínio em combinação com PBS estéril); G5: controle não vacinado (injetado com AIF em combinação com PBS estéril); G6: vacinado com bactéria total inativada com peróxido de hidrogênio; G7: vacinado em combinação com hidróxido de alumínio e G8: vacinado em combinação com AIF.

Figura 4. Série branca (média $\pm$ erro padrão) de tilápia-do-nilo duas semanas e quatro semanas após vacinação contra *S. agalactiae*. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre grupos no mesmo tempo e letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre tempos no mesmo grupo ($P < 0.05$). A. Leucócitos e trombócitos. B. Linfócitos, monócitos e granulócitos (neutrófilos, células granulocíticas especiais, basófilos e eosinófilos). G3: controle não vacinados (injetados com PBS estéril); G4: controle não vacinados (injetados com hidróxido de alumínio em combinação com PBS estéril); G5: controle não vacinados (injetados com AIF em combinação com PBS estéril); G6: vacinados com bactéria total inativada com peróxido de hidrogênio; G7: vacinados em combinação com hidróxido de alumínio e G8: vacinados em combinação com AIF.

Figura 5. Atividade respiratória dos leucócitos sanguíneos após vacinação. As barras verticais representam o erro padrão da média. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre grupos no mesmo tempo e letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre tempos (2 e 4 semanas) no mesmo grupo ($P < 0.05$). G3: controle não vacinados (injetados com PBS estéril); G4: controle não vacinados (injetados com hidróxido de alumínio em combinação com PBS estéril); G5: controle não vacinados (injetados com AIF em combinação com PBS estéril); G6: vacinados com bactéria total inativada com peróxido de hidrogênio; G7: vacinados em combinação com hidróxido de alumínio e G8: vacinados em combinação com AIF.

Figura 6. (A) Peixe injetado com PBS duas semanas pós-vacinação. (B) Peixe vacinados em combinação com hidróxido de alumínio quatro semanas pós-vacinação. (C) e (D) Peixes vacinados em combinação com AIF, apresentando depósitos de adjuvante e aderências leves dos órgãos à parede abdominal quatro semanas pós-vacinação. (E) Peixes vacinados em combinação com AIF, apresentando depósitos de adjuvante duas semanas pós-vacinação. (F) Peixe vacinados em combinação com AIF, apresentando depósitos de adjuvante e aderências à parede abdominal quatro semanas pós-vacinação. Aderências (seta verde), depósitos de adjuvante (seta branca).

Capítulo III

Figura 1. Taxa de sobrevivência (Kaplan-Meier) de tilápias-do-nilo após 21 dias do desafio com *S. agalactiae*. G6: alimentação normal (adição de óleo de canola), não vacinados (injetados com PBS estéril) e não desafiados (PBS); G7: alimentação normal (adição de

óleo de canola), não vacinados (injetados com PBS estéril) e desafiados; G8: alimentação normal (adição de óleo de canola), vacinados e desafiados; G9: suplementação com MOS, não vacinados (injetados com PBS) e desafiados; G10: suplementação com MOS, vacinados e desafiados. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre grupos ($P < 0.05$).

Figura 2. Detecção de anticorpos IgM anti-*Streptococcus agalactiae* em tilápias-do-nilo vacinadas com e sem suplementação (N=5). As barras verticais representam o erro padrão da média. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre grupos no mesmo tempo e letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre tempos (2 e 4 semanas) no mesmo grupo ($P < 0.05$). G1: alimentação normal e não vacinados; G2: alimentação normal (adição de óleo de canola) e não vacinados (injetados com PBS estéril); G3: alimentação normal (adição de óleo de canola) e vacinados; G4: suplementação com MOS e não vacinados (injetados com PBS estéril); G5: suplementação com MOS e vacinados.

Figura 3. Atividade respiratória dos leucócitos sanguíneos após vacinação. As barras verticais representam o erro padrão da média. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre grupos no mesmo tempo e letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre tempos (2 e 4 semanas) no mesmo grupo ($P < 0.05$). G1: alimentação normal e não vacinados; G2: alimentação normal (adição de óleo de canola) e não vacinados (injetados com PBS estéril); G3: alimentação normal (adição de óleo de canola) e vacinados; G4: suplementação com MOS e não vacinados (injetados com PBS estéril); G5: suplementação com MOS e vacinados.

Figura 4. Atividade da mieloperoxidase após vacinação. As barras verticais representam o erro padrão da média. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre grupos no mesmo tempo e letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre tempos (2 e 4 semanas) no mesmo grupo ($P < 0.05$). G1: alimentação normal e não vacinados; G2: alimentação normal (adição de óleo de canola) e não vacinados (injetados com PBS estéril); G3: alimentação normal (adição de óleo de canola) e vacinados; G4: suplementação com MOS e não vacinados (injetados com PBS estéril); G5: suplementação com MOS e vacinados.

Figura 5. Glicose no plasma após vacinação. As barras verticais representam o erro padrão da média. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre

grupos no mesmo tempo e letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre tempos no mesmo grupo ($P < 0.05$). G1: alimentação normal e não vacinados; G2: alimentação normal (adição de óleo de canola) e não vacinados (injetados com PBS estéril); G3: alimentação normal (adição de óleo de canola) e vacinados; G4: suplementação com MOS e não vacinados (injetados com PBS estéril); G5: suplementação com MOS e vacinados.

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1. Contagem de bactérias e densidade óptica em diferentes tempos realizados em suspensões bacterianas de *S. agalactiae* submetidas a três metodologias de inativação.

Tabela 2. Desenho experimental, mortalidade, taxa de sobrevivência e PRS em tilápia-do-nylo vacinadas contra três tipos de vacinas inativadas contra *S. agalactiae*.

Capítulo II

Tabela 1. Desenho experimental, mortalidade, taxa de sobrevivência e PRS em tilápia-do-nylo vacinados contra *S. agalactiae* inativada com peróxido de hidrogênio, dois diferentes adjuvantes e as suas combinações.

Tabela 2. Série vermelha (média $\pm$ erro padrão) de tilápia-do-nylo duas semanas e quatro semanas após vacinação contra *S. agalactiae*.

Tabela 3. Variáveis bioquímicas (média $\pm$ erro padrão) de tilápia-do-nylo duas semanas e quatro semanas após vacinação contra *S. agalactiae*.

Capítulo III

Tabela 1. Formulação e composição proximal nas dietas dos grupos experimentais.

Tabela 2. Desenho experimental, mortalidade, taxa de sobrevivência e PRS em tilápia-do-nylo vacinados contra *S. agalactiae* inativada com peróxido de hidrogênio sem e com suplementação com MOS.

Tabela 3. Valores médios¹ dos índices esplênico-somático (ISS) e hepático-somático (IHS) (média $\pm$ erro padrão) de tilápia-do-nylo duas semanas e quatro semanas após vacinação contra *S. agalactiae*.

Tabela 4. Série vermelha (média $\pm$ erro padrão) de tilápia-do-nylo duas semanas e quatro semanas após vacinação contra *S. agalactiae*.

Tabela 5. Série branca (média $\pm$ erro padrão) de tilápia-do-nilo duas semanas e quatro semanas após vacinação contra *S. agalactiae*.

Tabela 6. Variáveis bioquímicas (média $\pm$ erro padrão) de tilápia-do-nilo duas semanas, quatro e seis semanas após vacinação contra *S. agalactiae*.

RESUMO GERAL

O presente estudo teve como objetivo desenvolver estratégias profiláticas contra *Streptococcus agalactiae* mediante distintas metodologias de inativação, adjuvantes e suplementação com mananoligossacarídeos (MOS) em tilápias-do-nilo. Para isto, no primeiro experimento foram comparadas três vacinas inativadas, usando três metodologias: formaldeído, peróxido de hidrogênio e manipulação de pH. Seguido, foi realizado um segundo experimento avaliando o efeito de dois adjuvantes na vacina selecionada e finalmente um terceiro experimento avaliando o efeito de MOS durante o período pós- vacinação. Vinte oito dias após vacinação, os peixes foram desafiados com cepa homóloga de *S. agalactiae*. Além disso, se avaliou o efeito da vacinação nos níveis de anticorpos IgM anti-*Streptococcus agalactiae*, nas variáveis hematológicas e na resposta imune inata. Os resultados revelaram não houve diferença significativa entre as três metodologias e uma eficácia moderada das vacinas. Adicionalmente, a vacina inativada com peróxido de hidrogênio e administrada principalmente com adjuvante incompleto de Freund, conferiu ótima proteção contra *S. agalactiae* e a inclusão de MOS na dieta pós-vacinação até o desafio não interferiu na eficácia da vacina experimental e confirmou a alta eficácia da nova vacina inativada com peróxido de hidrogênio.

Palavras chave: formaldeído, peróxido de hidrogênio, adjuvante incompleto de Freund, vacina, eficácia.

GENERAL ABSTRACT

The aim of the present study was to develop prophylactic strategies against *Streptococcus agalactiae* by using different inactivation methods, adjuvants and supplementation with mannan oligosaccharides (MOS) in Nile tilapias. For that, in the first trial were compared three inactivated vaccines by using three methods: formaldehyde, hydrogen peroxide and pH manipulation. The second trial compared the effect of two adjuvants on the hydrogen peroxide-inactivated vaccine and finally, the third trial investigated the effect of dietary supplementation with MOS after vaccination. Twenty-eight days after vaccination, fish were challenged with a homologous strain of *S. agalactiae*. In addition, were determined the anti-*Streptococcus agalactiae* IgM antibodies, hematological parameters and innate immune response. The results revealed no significant difference between the three methods and a moderate efficacy of the vaccines. Also, the results in this study demonstrated that hydrogen peroxide-inactivated vaccine administered with either aluminum hydroxide or FIA induce optimal levels of protection, with a superior performance for FIA vaccine and the dietary inclusion of MOS after vaccination for a period of 28 days had no influence on vaccine efficacy and confirmed the high efficacy of the novel hydrogen peroxide-inactivated vaccine.

Key words: formaldehyde, hydrogen peroxide, Freund's incomplete adjuvant, vaccine, efficacy.

INTRODUÇÃO GERAL

A produção pesqueira mundial, proveniente tanto da pesca quanto da aquicultura, alcançou em 2018 aproximadamente 179 milhões de toneladas, com valor total de venda primária de 401 bilhões de dólares estadunidenses (USD), sendo o volume produzido pela aquicultura 82 milhões de toneladas representando 250 bilhões de USD (FAO, 2020a). A China é o principal produtor, sendo responsável pelo 58% do volume de produção (FAO, 2020a). A produção total da piscicultura brasileira é de 529,6 mil toneladas de peixes, sendo Paraná, o maior estado produtor, e as principais espécies cultivadas segundo volume de produção: a tilápia, tambaqui e seus híbridos, carpa, entre outros (IBGE, 2019). A tilápia-do-nilo é a espécie, mas criada na piscicultura brasileira, alcançando em 2019 as 323,7 mil toneladas (61,1% da produção total de peixe no país) (IBGE, 2019).

A tilápia é uma espécie onívora, aceita vários tipos de alimento, sendo dócil em várias fases do cultivo e tendo rusticidade, com domínio da sua reprodução e bom rendimento de carcaça (SCHULTER e VIEIRA-FILHO, 2017). O sistema de produção de tilápias mais utilizado no Brasil é o sistema intensivo em tanques-rede ou viveiros escavados (SCHULTER e VIEIRA-FILHO, 2017). Nestes sistemas empregam-se elevadas densidades de estocagem com o objetivo de aumentar a produção e obter maior retorno sobre os investimentos em infraestrutura e equipamentos (MARCUSO et al., 2017). Com a intensificação da aquicultura, principalmente nos sistemas de produção de tilápias, o adensamento aliado ao manejo inadequado, além de outros fatores que desencadeiam estresse favorecendo o surgimento de enfermidades infecciosas (MORAES e MARTINS, 2004; COLQUHOUN e DUODU, 2011), dentre as quais as bacterioses são consideradas as principais responsáveis pelas perdas econômicas e impedimento para o desenvolvimento da tilapicultura brasileira (LEIRA et al., 2017).

A maioria das bactérias que causam doenças nos peixes são bactérias Gram negativas, no entanto, algumas bactérias Gram positivas são patogênicas, incluindo aquelas do gênero *Streptococcus* (YANG e LI, 2009). *S. agalactiae*,

também designada como estreptococo do grupo B (GBS), é um coco Gram-positivo (YE et al., 2011). Esta bactéria é responsável por severas infecções em humanos e animais (LIU et al., 2016; CAI et al., 2017). Os GBS causam alta mobilidade e mortalidade entre uma variedade de peixes de água doce e salgada, incluindo a tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus* (YI et al., 2014; LUISIASTUTI et al., 2014) e surtos de enfermidade em várias regiões do mundo incluindo Europa, Ásia, Estados Unidos, América e Austrália (MISHRA et al., 2018). Na América Latina, a estreptococose tem sido reportada na Colômbia (HERNÁNDEZ et al., 2009; BARATO et al., 2015) e Peru (ORTEGA et al., 2016). No Brasil, apresenta alta prevalência e encontra-se amplamente distribuída geograficamente, sendo detectado em quase todos os estados como Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Santa Catarina, Bahia, Ceará, Mato Grosso, Pernambuco Goiás e Espírito Santo (SALVADOR et al., 2005; MIAN et al., 2009; BARONY et al., 2017). A enfermidade é caracterizada por septicemia e severa meningoencefalite (YE et al., 2011). A estreptococose tem causado elevados prejuízos para a produção de peixes de água doce e salgada e grande impacto econômico (LONGUI et al., 2012), os quais devem-se as altas taxas de infecção e mortalidade que podem atingir de 50,0% a 90,0% do lote (YE et al., 2011). Nas fazendas brasileiras, surtos de *S. agalactiae* têm ocorrido quando a temperatura da água é $\geq 27^{\circ}\text{C}$ e em peixes juvenis de 54 g até adultos com peso acima de 1000 g (MIAN et al., 2009).

As principais medidas utilizadas no controle da estreptococose são aquelas relacionadas ao manejo, alimentação, utilização de antimicrobianos (LONGUI et al., 2012). Os antibióticos são ferramentas úteis para controlar as infecções bacterianas, incluindo aquelas associadas com o patógeno *S. agalactiae* (YI et al., 2014). Porém o uso indiscriminado de antibióticos e produtos químicos pode causar poluição e danos ao meio ambiente aquático (SCHALCH et al., 2009), além de seleção de cepas resistentes e risco à saúde do consumidor pelos resíduos na carne (FIGUEIREDO e LEAL, 2008; MILLER e HARBOTTLE, 2018). Assim, é necessário procurar alternativas para a prevenção das enfermidades nos peixes. Atualmente, a aquicultura sustentável não é possível sem a prevenção de doenças, por conseguinte a vacinação tem se convertido na ferramenta mais importante (EVENSEN et al., 2016), sendo amplamente aceita e eficaz para controlar a infecção por *S. agalactiae* e prevenir

mortalidade em massa de tilápias (LIU et al., 2016). No entanto, poucas vacinas comerciais estão disponíveis para *S. agalactiae*.

As vacinas inativadas são os tipos mais comuns de vacinas utilizadas na prevenção e controle de doenças na aquicultura, apresentando-se menos laboriosas na produção, seguras para o meio ambiente e menos onerosas (MUNANG'ANDU et al., 2016) sendo utilizadas amplamente para proteção contra *S. agalactiae* (LIU et al., 2016). As primeiras vacinas foram desenvolvidas com células inativadas de *S. agalactiae* e concentrados de produtos extracelulares (ELDAR et al., 1995; EVANS et al., 2004). Posteriores estudos em vacinas inativadas pela via intraperitoneal relataram porcentagem relativa de sobrevivência (PRS) de 46 a 100% em tilápias acima de 20g (EVANS et al. 2004, PASNIK et al. 2005, PRETTO-GIORDANO et al. 2010, CHEN et al. 2012). Pasnik et al., (2014) testou metodologia de vacinação inativando as células bacterianas de *S. agalactiae* mediante micro-ondas obtendo níveis de proteção (PRS = 56,0%) pela via intraperitoneal e baixa eficácia por banhos de imersão (PRS = 24,0%).

Recentemente, novas metodologias para a produção de vacinas inativadas foram desenvolvidas utilizando peróxido de hidrogênio (H₂O₂) para inativação de bactérias em estudos *in vitro* com *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* e *in vivo* vacinando camundongos (FAN et al., 2019), conferindo vigorosa proteção vacinal produzindo incremento da resposta imune adaptativa (PINTO et al., 2013; ABD-ELGHAFFAR et al., 2016; POORE et al., 2017). Porém, para estes patógenos de peixes a técnica ainda não foi testada. Adicionalmente, estudos sobre inativação de *Yersinia ruckeri* submetidas à lise celular em pH 9,8 por 60 a 120 min demonstraram ter eficácia quando usadas como vacinas em salmão do Atlântico (NGUYEN et al., 2018)

Os adjuvantes são usados para a melhora da eficácia das vacinas, incrementando a magnitude da resposta imune adaptativa (COFFMAN et al., 2010; ZHENG et al., 2012; TAFALLA et al., 2014; DALMO et al., 2016). Na atualidade, os adjuvantes são classificados como facilitadores de sinal 1 e facilitadores de sinal 2 (SCHIJNS, 2001). Entre os adjuvantes de sinal 1 mais

utilizados encontram-se as emulsões oleosas (TAFALLA et al., 2014), incluindo o adjuvante completo de Freund (ACF), o adjuvante incompleto de Freund (AIF) e Montanide, entre os mais utilizados na aquicultura. Entre os adjuvantes de sinal 2, encontram-se os compostos de alumínio, hidróxido de alumínio e fosfato de alumínio. Contudo, poucos estudos foram feitos com adjuvantes de alumínio em vacinas em peixes (TAFALLA et al., 2014).

A suplementação oral com imunoestimulantes demonstrou melhora na eficácia vacinal (VETVICKA, 2013). Dentre deles, os mananoligossacarídeos (MOS) são carboidratos complexos derivados da parede celular de leveduras, contendo manose como principal carboidrato (MOMENI-MOGHADDAM et al., 2015). Numerosos benefícios são atribuídos à suplementação com MOS tais como a melhora da conversão alimentar, fortalecimento do epitélio do trato digestivo anterior e médio e do sistema imune em diversas espécies de peixes de produção incluindo tilápias-do-nilo (TORRECILLAS et al., 2014). A maioria das pesquisas avaliam o efeito imunoestimulante da suplementação com MOS na dieta em peixes (TORRECILLAS et al., 2014; SOARES et al., 2018). No entanto, pesquisas avaliando o efeito da administração oral com MOS na resposta imune pós vacinação em tilápias-do-nilo ainda não foram desenvolvidas.

O objetivo do presente trabalho foi selecionar uma vacina experimental contra *S. agalactiae* comparando três metodologias de inativação, avaliar o efeito de dois adjuvantes (AIF e hidróxido de alumínio) na eficácia da vacina selecionada e o efeito da suplementação com mananoligossacarídeos durante o período pós-vacinação.

REVISÃO DE LITERATURA

Tilápia-do-nilo *Oreochromis niloticus*

Tilápias é o nome comum para várias espécies da família Cichlidae, sendo os gêneros *Oreochromis*, *Sarotherodon* e *tilapia* os mais conhecidos (TREWAVAS, 1982). As tilápias são originárias da África (excluindo Madagascar) e Palestina (vale Jordan e rios da costa) (PHILIPPART e RUWET,

1982). Possuem corpo lateralmente comprimido, coberto com grandes escamas cicloides, nadadeiras dorsais e anal com espinhos duros e raios suaves, coloração prata com estrias verticais que variam de verde oliva a cinza e com pouco contraste sobre as cores do corpo (EL-SAYED, 2019). A tilápia caracteriza-se por ter hábito alimentar herbívoro-omnívoro, e no caso do *O. niloticus* alimenta-se de fitoplâncton, perifíton, plantas aquáticas, pequenos invertebrados, detritos e biofilme, além disso possuem capacidade de tolerar ampla gama de condições ambientais tais como temperatura, salinidade, oxigênio dissolvido e amônio (EL-SAYED, 2019).

Imunidade em peixes

O sistema imunológico dos teleósteos é composto pelo sistema imune inato e adaptativo (SECOMBES e BELMONTE, 2016). O sistema imune inato atua como a primeira linha de defesa do organismo e disponível para combater os patógenos (JØRGENSEN, 2014). Por outro lado, o sistema imune adaptativo é caracterizado por mecanismos baseados no reconhecimento antigênico específico prévio, que facilita a resposta mais acentuada e rápida na segunda exposição ao mesmo patógeno (CASTRO e TAFALLA, 2015), sendo um componente importante na resposta à vacinação (SECOMBES e BELMONTE, 2016).

Estes sistemas não funcionam isolados, senão interatuam dinamicamente. A resposta inata precede à resposta adaptativa e modula o tipo e grau de resposta, sendo participantes destas inter-relações os linfócitos, células “natural killers”, receptores do complexo maior de histocompatibilidade, entre outros (RAUTA et al., 2012). As descobertas da última década comprovaram que a interação entre os componentes imunes inatos e adaptativos é muito mais complexa do que pensado, e muitas das células e moléculas atribuídas à imunidade inata também têm funções na imunidade adquirida (CASTRO e TAFALLA, 2015). A resposta imune em peixes pode ser influenciada por fatores externos tais como temperatura, luz, oxigênio, pH, salinidade ou agentes estressantes (BOWDEN, 2008). A resposta imune inata em peixes, em comparação com mamíferos, é mais importante para o

organismo, e exibe funcionalidade potencialmente aprimorada, produto da falta de desenvolvimento do sistema imune adaptativo nessas espécies (RAUTA et al., 2012).

Os componentes da imunidade inata em peixes são classificados em barreiras físicas, humorais e celulares (MAGNADOTTIR, 2010). As físicas são integradas pelo epitélio e mucosa da pele, brânquias e trato digestório (MAGNADOTTIR, 2010). Dentre as defesas humorais foram identificados lectinas, lisozimas, inibidores de proteases, inibidores de crescimento, proteínas do sistema complemento, pentraxinas, precipitinas, peptídeos antimicrobianos, imunoglobulinas naturais, citocinas e quimiocinas (MAGNADOTTIR et al., 2006). A defesa celular inata é desempenhada pelas células fagocíticas como neutrófilos, monócitos e macrófagos (MAGNADOTTIR, 2010), além das células citotóxicas não específicas e células “natural killers” (FISCHER et al. 2013) e responde a biomoléculas presentes em vários grupos de patógenos conhecidas como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), os quais são reconhecidos pelo hospedeiro mediante receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), sendo o receptor tipo toll like (TLR) o mais estudado (LIESCHKE e TREDE, 2009; JØRGENSEN, 2014).

A imunidade adaptativa está composta por células B responsáveis pela produção de anticorpos e células T que mediam a imunidade mediada por células, sendo estas últimas subdivididas em células T citotóxicas que diretamente reagem contra células infectadas e anormais; e em células T colaboradoras que modulam a resposta imune mediante secreção de citocinas (MUTOLOKI et al., 2014). Os linfócitos são responsáveis pelo reconhecimento de antígenos, no caso das células T, o receptor de antígenos (RCT) requer apresentação do antígeno na forma de peptídeos processados da proteína original pelo complexo maior de histocompatibilidade, e no caso das células B, reconhecem antígenos solúveis e se ligam diretamente através do receptor de antígenos da célula B (RCB), além de apresentarem uma forma solúvel deste receptor (imunoglobulinas), o qual pode reagir diretamente com o patógeno (SECOMBES e BELMONTE, 2016). Nos teleósteos, tem-se identificado três

isotipos de imunoglobulinas, sendo a mais abundante na circulação sistêmica a imunoglobulina M (IgM) (MUTOLOKI et al., 2014).

Streptococcus agalactiae

As bactérias do gênero *Streptococcus* que afetam principalmente os peixes são *S. iniae*, *S. agalactiae*, *S. agalactiae*, *S. parauberis*, *S. difficile*, *S. shiloi* e *S. dysgalactiae* (ELDAR et al., 1994; MIAN et al., 2009; NETTO et al., 2011; FIGUEIREDO et al., 2012; HAINES et al., 2013; COSTA et al., 2014). Dentre as infecções por *Streptococcus*, a bactéria *S. agalactiae* é considerada uma das mais patogênicas para uma variedade de peixes de água doce e salgada, incluindo a tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus* (YI et al., 2014; LUISIASTUTI et al., 2014), além de atingir um amplo rango de hospedeiros, infectando animais terrestres e aquáticos e produzindo meningite neonatal em humanos, mastite em bovinos e sendo relacionada a infecções sistêmicas em numerosas espécies de mamíferos e peixes (GENG et al., 2011).

O *Streptococcus agalactiae* é uma das bactérias mais comuns na piscicultura mundial (LIU et al., 2016) e brasileira (MIAN et al., 2009), sendo ameaça para o desenvolvimento da indústria aquícola (YI et al., 2014). O *S. agalactiae* é um coco Gram-positivo (YE et al., 2011), também designado como estreptococo do grupo B (GBS). Na atualidade, 10 sorotipos de GBS (Ia, Ib e II – IX) foram caracterizados com base em seus antígenos polissacarídeos capsulares (cps) (IMPERI et al., 2010). Em animais aquáticos três sorotipos de *S. agalactiae* são os mais frequentes: Ia, Ib e III (LI et al., 2013). No Brasil, os surtos por *S. agalactiae* em tilápias estão associados em grande parte ao sorotipo Ib e em menor grau ao Ia (EVANS et al., 2008; GODOY et al., 2013).

A transmissão da estreptococose é pela via horizontal mediante o contato direto entre peixes sadios e doentes, canibalismo dos peixes moribundos ou através da água pela contaminação bacteriana nos sistemas de cultivo (MIAN et al., 2009, AMAL et al., 2013). Evidência de transmissão vertical foi demonstrada em tilápias vermelha infectadas naturalmente (PRADEEP et al., 2015). Os principais sinais clínicos observados na estreptococose são letargia, anorexia,

hemorragia nos olhos e na pele, coloração escura, exoftalmia uni ou bilateral, opacidade de córnea, ascite e natação errática (SU et al., 2016). No Brasil, Salvador et al. (2003, 2005), Figueiredo et al. (2006), Pretto-Giordano et al. (2010), e Firdaus-nawi et al., (2012) também relataram sinais semelhantes em tilápias com infecção natural ou experimental. Dentre as alterações anatomopatológicas foram descritas meningite, infiltração de linfócitos e macrófagos em órgãos internos em tilápias desafiadas com *S. agalactiae* (CHEN et al., 2007).

Vacinas inativadas

As vacinas inativadas são os tipos mais comuns de vacinas utilizadas na prevenção e controle de doenças na aquicultura, sendo fáceis de realizar, seguras para o meio ambiente e menos caras (MUNANG'ANDU et al., 2016), sendo produzidas por multiplicação ou replicação dos patógenos em grandes quantidades e posteriormente submetidos a agentes inativadores, que tornam o patógeno incapaz de causar doença enquanto preserva a estrutura conformacional, não alterando a capacidade de indução da imunidade (MUNANG'ANDU et al., 2014; DADAR et al., 2016). A inativação tem como alvo componentes externos dos micro-organismos tais como a membrana celular ou bicamada lipídica dos vírus, ou componentes internos tais como ácidos nucléicos, com o objetivo de impedir a capacidade de se replicar dos patógenos (MUNANG'ANDU et al., 2014). A inativação pode ser realizada mediante métodos químicos, como a formaldeído, ou métodos físicos, como o calor, luz ultravioleta, entre outros (MUNANG'ANDU et al., 2014).

As vacinas inativadas geralmente são utilizadas para proteção contra *S. agalactiae* (LIU et al., 2016). Eldar et al (1995) desenvolveram vacinas com células de *S. agalactiae* inativadas com formol aplicadas pela via intraperitoneal em híbridos de tilápias de 150 a 180 g obtendo 100,0% de proteção. Posteriormente, Evans et al. (2004) utilizaram células de *S. agalactiae* inativadas com formaldeído adicionando concentrados de produtos extracelulares da bactéria em tilápias-do-nilo de 5 a 30 g, obtendo alta eficácia em peixes de 30 g (PRS=80,0%) e baixa eficácia em peixes de 5 g (PRS=25,0%) pela via

intraperitoneal, além de baixos níveis de proteção pela via de imersão em peixes de 5 e 30 g (PRS= 34,0 e 35,0%, respectivamente).

Pasnik et al. (2005) obtiveram valores de PRS de 61,0; 55,0; 47,0% aos 47, 90 e 180 dias após vacinação, respectivamente, utilizando células de *S. agalactiae* inativadas com formaldeído adicionando concentrados de produtos extracelulares em tilápias-do-nilo de 45,5 g, e adicionalmente a concentração média específica de anticorpos dos peixes vacinados foi alta quando comparada aos controles, havendo correlação entre as densidades ópticas obtidas no ELISA e os níveis de proteção da vacina.

No Brasil, Pretto-Giordano et al. (2010) testaram vacinas contra *S. agalactiae* inativadas com formaldeído em tilápias-do-nilo de 20g, aplicando em um grupo uma dose e no outro grupo duas doses (21 dias de intervalo), obtendo 83.6 e 96.4% de PRS, respectivamente. Chen et al. (2012) utilizaram a metodologia da inativação por formaldeído em estudo para desenvolver vacinas contra *S. agalactiae* baseado em genótipos tipados por PFGE.

Pasnik et al. (2014) testaram uma metodologia de vacinação em tilápias-do-nilo de 5,0 g, inativando as células bacterianas de *S. agalactiae* mediante micro-ondas, obtendo níveis de proteção (PRS = 56,0%) pela via intraperitoneal e baixa eficácia por banhos de imersão (PRS = 24,0%), além de não apresentar diferença significativa nas porcentagens de mortalidade acumulada nas vacinas testadas quando comparadas à metodologia da inativação pela formaldeído tanto na via intraperitoneal como nos banhos de imersão.

Atualmente, no Brasil é comercializada apenas uma vacina contra *S. agalactiae*, preparada a partir de bactérias inativadas do sorotipo Ib (AQUAVAC® Strep Sa e AQUAVAC® Strep Sa1) <https://www.aquavac-vaccines.com/products/>

Recentemente, novas metodologias para a produção de vacinas inativadas foram desenvolvidas utilizando peróxido de hidrogênio (H₂O₂) para inativação de bactérias em estudos *in vitro* com *Staphylococcus aureus* e

Pseudomonas auruginosa e in vivo vacinando camundongos (Fan et al., 2019), vírus da coriomeningite linfocítica em camundongos (AMANNA et al., 2012), vírus da raiva em camundongos (ABD-ELGHAFAR et al., 2016), vírus do oeste do Nilo em macacos Rhesus e camundongos (PINTO et al., 2013; POORE et al., 2017), que mostrou proteção vacinal produzindo incremento da resposta imune adaptativa (PINTO et al., 2013; ABD-ELGHAFAR et al., 2016; POORE et al., 2017). Fan et al. (2019) mencionou que a inativação pelo H₂O₂ retém epítomos mais completos e exibe menor toxicidade quando comparado ao formaldeído. Adicionalmente, o H₂O₂ inativa o RNA e o DNA, com mínimo dano na estrutura antigênica ou imunogenicidade e demonstrou ser um método altamente eficaz quando comparado à inativação convencional com formaldeído ou b-propiolactona (AMANNA et al., 2012), além de mostrar proteção vacinal produzindo o incremento da resposta imune adaptativa (PINTO et al., 2013; ABD-ELGHAFAR et al., 2016; POORE et al., 2017). Amanna et al., (2012) mencionaram que o peróxido de hidrogênio tem habilidade para inativar ampla gama de patógenos incluindo bactérias, parasitas e esporas bacterianas. Porém, para patógenos de peixes a técnica ainda não foi testada.

Finalmente, estudos sobre inativação de *Yersinia ruckeri* submetidas à lise celular em pH 9,8 por 60 a 120 min demonstraram ter eficácia quando usadas como vacinas em peixes (AMEND et al., 1983). Nguyen et al., (2018) utilizaram esta metodologia prévia na elaboração de vacinas contra *Yersinia ruckeri* em salmão do Atlântico (*Salmon salar*) com bons resultados na eficácia.

Adjuvantes para vacinas

Os adjuvantes são usados para a melhora da eficácia das vacinas, incrementando a magnitude da resposta imune adaptativa (COFFMAN et al., 2010; ZHENG et al., 2012; TAFALLA et al., 2014; DALMO et al., 2016), Ellis et al. (1988) mencionou que os adjuvantes fortalecem a resposta imune aos antígenos da vacina e estimulam os mecanismos de defesa não específicos, os quais incrementam a proteção contra um amplo número de patógenos. Na atualidade, os adjuvantes são classificados como facilitadores de sinal 1 e facilitadores de sinal 2 (SCHIJNS, 2001), influenciando na apresentação do

antígeno e nos sinais adicionais secundárias respectivamente; necessárias para ativação de células específicas T e B da resposta imune adaptativa (RIBEIRO e SCHIJNS, 2010).

Entre os adjuvantes de sinal 1 mais utilizados encontram-se as emulsões oleosas (TAFALLA et al., 2014), tendo bons resultados e incrementado a eficácia das vacinas na aquicultura (HOARE et al., 2017). Os adjuvantes de óleo mineral são usados nas vacinas comerciais inativadas contra *S. agalactiae* (AQUAVAC® Strep Sa e AQUAVAC® Strep Sa1). <https://www.aquavac-vaccines.com/products/>. As emulsões oleosas incluem o adjuvante completo de Freund (ACF), o adjuvante incompleto de Freund (AIF) e Montanide, entre os mais utilizados na aquicultura.

O ACF é uns dois mais potentes adjuvantes, estimulando a resposta imune de células Th1 e Th17 (DALMO et al., 2016). Porém, o seu uso está associado à presença de granulomas e necrose no lugar de injeção, causando estresse no animal vacinado (JIAO et al., 2010; DALMO et al., 2016). No entanto, devido à sua alta toxicidade, o ACF tem sido substituído pelo AIF, o qual não possui os componentes micobacterianos da emulsão (DALMO et al., 2016). O AIF é uma emulsão de água em óleo (A/O), estimulando a resposta imune humoral em tilápia vermelha quando usado em vacinas inativadas incorporadas na ração contra *Streptococcus agalactiae* (FIRDAUS-NAWI et al., 2013) e em linguado japonês quando usado em vacinas inativadas multivalentes contra *Edwardsiella tarda* e *Vibrio anguillarum* (SUN et al., 2011). Zhang et al. (2017) desenvolveram potenciais vacinas baseadas em antígenos de *Streptococcus agalactiae*, utilizando AIF e Montanide. A vacinação com AIF tem induzido a expressão de genes possivelmente relacionados com a resposta imune humoral e a resposta inata celular em linguado japonês vacinados contra *Edwardsiella tarda* (JIAO et al., 2010). Além disso, vacinas inativadas contra *Lactococcus garvieae* em truta arco-íris usando AIF amostraram uma porcentagem relativa de sobrevivência maior (PRS = 85,0%) do que aquela sem adjuvante (PRS = 54,0%) (KUBILAY et al. 2008).

Os adjuvantes de sinal 2 ativam citocinas e regulam moléculas co-estimulantes durante a fase de reconhecimento de antígenos incrementando a resposta imune (DALMO et al., 2016). Entre os adjuvantes de sinal 2, encontram-se os compostos de alumínio, hidróxido de alumínio e fosfato de alumínio. Contudo, poucos estudos foram feitos com adjuvantes de alumínio em vacinas em peixes. Jiao et al. (2010) encontrou níveis elevados de títulos de anticorpos testando uma vacina contra *Edwardsiella tarda* em linguado japonês, utilizando adjuvantes de alumínio. Adicionalmente, Noia et al. (2014) constatou menos lesões intra-abdominais em peixes vacinados usando adjuvantes de alumínio.

Mananoligosacarídeos

Dentre dos imunoestimulantes, os mananoligosacarídeos (MOS) são carboidratos complexos derivados da parede celular de leveduras, contendo manose como principal carboidrato (MOMENI-MOGHADDAM et al., 2015). O principal benefício atribuído à suplementação com MOS são os relacionados ao bloqueio da colonização de patógenos e à estimulação do sistema imune, além disso, são atribuídos melhora da conversão alimentar e fortalecimento do epitélio do trato digestivo anterior e médio em diversas espécies de peixes de produção incluindo tilápias-do-nilo (TORRECILLAS et al., 2014). O efeito do bloqueio da colonização de patógenos está relacionado ao conceito do uso de carboidratos como inibidores da adesão de patógenos às células intestinais (BAVINGTON e PAGE, 2005) e o efeito na modulação da resposta imune é provavelmente baseado na ativação de receptores de reconhecimento de padrões (PRR) desencadeando a resposta imune inata frente a substâncias estranhas, no entanto, embora alguns estudos tenham evidenciado modulação dos parâmetros relacionados ao sistema imune, em outros estudos estes parâmetros não foram alterados (TORRECILLAS et al., 2014). Algumas pesquisas avaliaram o efeito da suplementação com MOS na dieta sobre a sobrevivência e resistência a bactérias patogênicas em peixes tais como *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus agalactiae*, *Edwardsiella ictaluri*, e *Vibrio anguillarum*, utilizando doses desde 0,024% até 4,0% por períodos de tempo desde um mês até dez meses prévio ao desafio, porém, a duração da suplementação prévia ao desafio, o tipo de MOS usados ou o processo de fabricação da ração são fatores determinantes na hora

de obter altas taxas de sobrevivência quando desafiados (TORRECILLAS et al., 2014).

Referências

- ABD-ELGHAFFAR, A. A.; ALI, A. E.; BOSEILA, A. A.; AMIN, M. A. Inactivation of rabies virus by hydrogen peroxide. **Vaccine**, v. 34, n. 6, p. 798-802, 2016.
- AMAL, M. N. A.; ZAMRI-SAAD, M.; SITI-ZAHRAH, A.; ZULKAFI, A. R. Transmission of *Streptococcus agalactiae* from a hatchery into a newly established red hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) × *Oreochromis mossambicus* (Peters), farm. **Journal of Fish Diseases**, v. 36, n.8, p. 735-739, 2013.
- AMANNA, I. J.; RAUÉ, H.; SLIFKA, M. K. Development of a new hydrogen-peroxide-based vaccine platform. **Nature Medicine**, v. 18, n. 6, p. 974-980, 2012.
- AMEND, D. F.; JOHNSON, K. A.; CROY, T. R.; MCCARTHY, D. H. Some factors affecting the potency of *Yersinia ruckeri* bacterins. **Journal of Fish Diseases**, v. 6, n.4, p. 337-344, 1983.
- BAVINGTON, C.; PAGE, C. Stopping bacterial adhesion: a novel approach to treating infections. **Respiration**, v. 72, n. 4, p. 335-344, 2005.
- BARATO, P.; MARTINS, E. R.; MELO-CRISTINO, J.; IREGUI, C. A.; RAMIREZ, M. Persistence of a single clone of *Streptococcus agalactiae* causing disease in tilapia (*Oreochromis* sp.) cultured in Colombia over 8 years. **Journal of Fish Biology**, v. 38, n. 12, p. 1083-1012, 2015.
- BARONY, G. M.; TAVARES, G. C.; PEREIRA, F. L.; CARVALHO, A. F.; DORELLA, F. A.; LEAL, C. A.; FIGUEIREDO, H. C. Large-scale genomic analyses reveal the population structure and evolutionary trends of *Streptococcus agalactiae* strains in Brazilian fish farms. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 13538, 2017.
- Bowden, T. J. Modulation of the immune system of fish by their environment. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 25, n. 4, 373-383, 2008.
- CAI, J.; WANG, B.; PENG, Y.; LI, Y.; LU, Y.; HUANG, Y.; JIAN, J.; WU, Z. Construction of a *Streptococcus agalactiae* phoB mutant and evaluation of its

- potential as an attenuated modified live vaccine in golden pompano, *Trachinotus ovatus*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 63, p. 405-416, 2017.
- CASTRO, R.; TAFALLA, C. **Overview of fish immunity**. In: BECK, B; PEATMAN, E (Eds.). Mucosal health in aquaculture. Academic Press, 408 p, 2015.
- CHEN, C. Y.; CHAO, C. B.; BOWSER, P. R. Comparative histopathology of *Streptococcus iniae* and *Streptococcus agalactiae*-infected tilapia. **Bulletin of the European Association of Fish Pathologists**, v. 27, n. 1, p. 1-9, 2007.
- CHEN, M.; WANG, R.; LI, L.; LIANG, W.; LI, J.; HUANG, Y.; LEI, A.; HUANG, W.; GAN, X. Screening vaccine candidate strains against *Streptococcus agalactiae* of tilapia based on PFGE genotype. **Vaccine**, n. 30, 6088-6092, 2012.
- COFFMAN, R. L.; SHER, A.; SEDER, R. A. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. **Immunity**, v. 33, n. 4, p. 492-503, 2010
- COLQUHOUN, D. J.; DUODU, S. *Francisella* infections in farmed and wild aquatic organism. **Veterinary Research**, v. 42, n. 1, p. 1-15, 2011.
- COSTA, F. A.; LEAL, C. A.; LEITE, R. C.; FIGUEIREDO, H. C. Genotyping of *Streptococcus dysgalactiae* strains isolated from Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). **Journal of Fish Diseases**, v. 37, n. 5, p. 463-469, 2014.
- DADAR, M.; DHAMA, K.; VAKHARIA, V.; HOSEINIFAR, S.; KARTHIK, K.; TIWARI, R.; KHANDIA, R.; MUNJAL, A.; SALGADO-MIRANDA, C.; JOSHI, S. Advances in Aquaculture Vaccines Against Fish Pathogens: Global Status and Current Trends. **Reviews in Fisheries Science & Aquaculture**, DOI: 10.1080/23308249.2016.1261277
- DALMO, R.; BØGWALD, J.; TAFALLA, C. Adjuvants and delivery methods: current and novel. In: ADAMS A. (Eds.). Fish Vaccines. Springer Basel, 180 p, 2016.
- ELDAR, A.; BEJERANO, Y.; BERCOVIER, H. *Streptococcus shiloi* and *Streptococcus difficile*: Two New Streptococcal Species Causing a Meningoencephalitis in Fish. **Current Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 139-143, 1994.
- ELDAR, A.; BEJERANO, Y.; BERCOVIER, H. Vaccination with whole-cell vaccine and bacterial protein extract protects tilapia against *Streptococcus difficile* meningoencephalitis. **Vaccine**, v. 13, n. 9, p. 867-70, 1995.

- ELLIS, A. E. Current aspects of fish vaccination. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 4, n. 2, p. 159-64, 1988.
- EVANS, J. J.; KLESIUS, P. H.; SHOEMAKER, C. A. Efficacy of *Streptococcus agalactiae* (group B) vaccine in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by intraperitoneal and bath immersion administration. **Vaccine**, v. 22, p. 3769-3773, 2004.
- EVANS, J. J.; BOHNSACK, J. F.; KLESIUS, P. H.; WHITING, A. A.; GARCIA, J. C.; SHOEMAKER, C. A.; TAKAHASHI, S. Phylogenetic relationships among *Streptococcus agalactiae* isolated from piscine, dolphin, bovine and human sources: a dolphin and piscine lineage associated with a fish epidemic in Kuwait is also associated with human neonatal infections in Japan. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, n. 11, p. 1369-1376, 2008.
- EVENSEN, Ø. **Development of fish vaccines: focusing on methods**. In: ADAMS A. (Eds.). Fish Vaccines. Springer Basel, 180 p, 2016.
- FAN, Y.; MU, Y.; LU, L.; TIAN, Y.; YUAN, F.; ZHOU, B.; YU, C.; WANG, Z.; LI, X.; LEI, S.; XU, Y. WU, D.; YANG, L. Hydrogen peroxide-inactivated bacteria induces potent humoral and cellular immune responses and releases nucleic acids. **International Immunopharmacology**, v. 69, p. 389-307, 2019.
- FIGUEIREDO, H. C.; CARNEIRO, D. O.; FARIA, F. C.; COSTA, G. M. *Streptococcus agalactiae* associado à meningoencefalite e infecção sistêmica em tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 4, p. 678-680, 2006
- FIGUEIREDO, H. C.; LEAL, C. A. Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 8-14, 2008.
- FIGUEIREDO, H. C.; NETTO, L. N.; LEAL, C. A.; PEREIRA, U. P.; MIAN, G. F. *Streptococcus iniae* outbreaks in Brazilian Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) farms. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 576–580, 2012.
- FIRDAUS-NAWI, M.; YUSOFF, S. M.; YUSOF, H.; ABDULLAH, S.; ZAMRI-SAAD, M. Efficacy of feed-based adjuvant vaccine against *Streptococcus agalactiae* in *Oreochromis* spp. in Malaysia. **Aquaculture Research**, v. 45, n. 1, p. 87-96, 2012.

- FISCHER, U.; KOPPANG, E. O.; NAKANISHI, T. Teleost T and NK cell immunity. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 35, n. 2, p. 197-206, 2013.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **The state of world fisheries and aquaculture: Sustainability in action**. Rome: FAO, 2020, 222 p.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **FAO Yearbook: Fishery and Aquaculture Statistics 2018**. Rome: FAO, 2020, 108 p.
- GENG, Y.; WANG, K. Y.; HUANG, X. L.; CHEN, D. F.; LI, C. W.; REN, S. Y.; LIAO, Y. T.; ZHOU, Z. Y.; LIU, Q. F.; DU, Z. J.; LAI, W. M. *Streptococcus agalactiae*, an emerging pathogen for cultured ya-fish, *Schizothorax prenanti*, in China. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 59, n. 4, p. 369-375, 2011.
- GODOY, D. T.; CARVALHO-CASTRO, G. A.; LEAL, C. A. G.; PEREIRA, U. P.; LEITE, R. C.; FIGUEIREDO, H. C. P. Genetic diversity and new genotyping scheme for fish pathogenic *Streptococcus agalactiae*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 57, n. 6, p. 476-483, 2013.
- HAINES, A. N.; GAUTHIER, D. T.; NEBERGALL, E. E.; COLE, S. D.; NGUYEN, K. M.; RHODES, M. W.; VOGELBEIN, W. K. First report of *Streptococcus parauberis* in wild finfish from North America. **Veterinary Microbiology**, v. 166, n. 1-2, p. 270-275, 2013.
- HERNÁNDEZ, E.; FIGUEROA, J.; IREGUI, C. Streptococcosis on a red tilapia, *Oreochromis* sp., farm: a case study. **Journal of Fish Diseases**. v. 32, n. 3, p. 247-252, 2009.
- HOARE, R.; JUNG, S. J.; NGO, T. P.; BARTIE, K.; BAILEY, J.; THOMPSON, K. D., ADAMS, A. Efficacy and safety of a non-mineral oil adjuvanted injectable vaccine for the protection of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against *Flavobacterium psychrophilum*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 85, p. 44-51, 2017.
- IMPERI, M.; PATARACCHIA, M.; ALFARONE, G.; BALDASSARRI, L.; OREFICI, G.; CRETI, R. A multiplex PCR assay for the direct identification of the capsular type (Ia to IX) of *Streptococcus agalactiae*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 80, n. 2, p. 212-214, 2010.

- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Produção da pecuária municipal 2019**. Rio de Janeiro: IBGE, v. 46, p. 1-12, 2019.
- JØRGENSEN, J. **The Innate Immune Response in Fish**. In: GUDDING R; LILLEAGUG, A.; EVENSEN, Ø (Eds.). Fish vaccination. UK, Wiley Blackwell, 383 p, 2014.
- KUBILAY, A.; ALTUN, S.; ULUKOY, S., EKICI, S.; DILER, O. Immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against *Lactococcus garvieae* using vaccine mixtures. **The Israeli Journal of Aquaculture**, v. 60, n. 4, p. 268-273, 2008.
- LEIRA, M. H.; REGHIM, L. S.; CIACCI, L. S.; CUNHA, L. T.; BOTELHO, H. A.; BRAZ, M. S.; DIAS N. P.; MELO, C. C. V. Problemas sanitários das pisciculturas brasileiras. **PUBVET**, v. 11, n. 6, p. 538-645, 2017.
- LI, L.; WANG, R.; LIANG, W.; GAN, X.; HUANG, T.; HUANG, Y.; LI, J.; SHI, Y.; CHEN, M.; LUO, H. Rare serotype occurrence and PFGE genotypic diversity of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia in China. **Veterinary Microbiology**, v. 167, n. 3-4, p. 719-724, 2013.
- LIESCHKE, G. J.; TREDE, N. S. Fish immunology. **Current Biology**, v. 19, n. 16, p. 678-682, 2009.
- LIU, G.; ZHU, J.; CHEN, K.; GAO, T.; YAO, H.; LIU, Y.; ZHANG, Q.; LU, C. Development of *Streptococcus agalactiae* vaccines for tilapia. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 122, n. 2, p. 163-170, 2016.
- LONGHI, E., PRETTO-GIORDANO, L. G., & MÜLLER, E. E. Effectiveness of homologous inactivated *Streptococcus agalactiae* vaccine by immersion bath in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Semina: Ciências Agrárias*, v. 33, n. 6, p. 3191-3200, 2012.
- LUSIASTUTI A.; TEXTOR, M.; SEEGER, H.; AKINEDEN, O.; ZSCHOCK, M. The occurrence of *Streptococcus agalactiae* sequence type 261 from fish disease outbreaks of tilapia *Oreochromis niloticus* in Indonesia. **Aquaculture Research**, v. 45, p. 1260–1263, 2014.
- MAGNADOTTIR, B. Innate immunity of fish (overview). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 20, n. 2, p. 137-151, 2006.
- MAGNADOTTIR, B. Immunological control of fish diseases. **Marine Biotechnology**, v. 12, n. 4, p. 361-379, 2010.

- MARCUSSO, P. F.; SALVADOR, R.; DE ALMEIDA, MARINHO-NETO, F. Infecção por *Streptococcus agalactiae* em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 16, n. 2, p. 165-169, 2017.
- MIAN, G. F.; GODOY, D. T.; LEAL, C. A. G.; YUHARA, T. Y.; COSTA, G. M.; FIGUEIREDO, H. C. P. Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia. **Veterinary Microbiology**, v. 136, n. 1-2, p. 180-183, 2009.
- MILLER, R. A.; HARBOTTLE, H. Antimicrobial Drug Resistance in Fish Pathogens. **Microbiology Spectrum**, v. 6, n., 1, 2018.
- MISHRA, A.; NAM, G. H.; GIM, J. A.; LEE, H. E.; JO, A.; KIM, H. S. Current Challenges of Streptococcus Infection and Effective Molecular, Cellular, and Environmental Control Methods in Aquaculture. **Molecules and Cells**, v. 41, n. 6, p. 495-505, 2018.
- MOMENI-MOGHADDAM, P.; KEYVANSHOKOOH, S.; ZIAEI-NEJAD, S., SALATI, A. P., PASHA-ZANOOSI, H. Effects of mannan oligosaccharide supplementation on growth, some immune responses and gut lactic acid bacteria of common carp (*Cyprinus Carpio*) fingerlings. **Veterinary Research Forum**, v. 6, n. 3, p. 239-44, 2015.
- MORAES, F. R.; MARTINS, M. L. **Condições predisponentes e principais enfermidades de teleósteos em piscicultura intensiva**. In: CYRINO, J.E.P. et al. (Eds.). Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. São Paulo, Tecart, p. 343-386, 2004.
- MUNANG'ANDU, H. M.; MUTOLOKI, S.; EVENSEN, Ø. **Non-replicating vaccines**. In: GUDDING R; LILLEAGUG, A.; EVENSEN, Ø (Eds.). Fish vaccination. UK, Wiley Blackwell, 383 p, 2014.
- MUNANG'ANDU, H. M., PAUL, J., EVENSEN, Ø. An overview of vaccination strategies and antigen delivery systems for *Streptococcus agalactiae* vaccines in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Vaccines**, v. 4, n. 48, p. 1-13, 2016.
- MUTOLOKI, S.; JØRGENSEN, J.; EVENSEN, Ø. **The Adaptive Immune Response in Fish**. In: GUDDING R; LILLEAGUG, A.; EVENSEN, Ø (Eds.). Fish vaccination. UK, Wiley Blackwell, 383 p, 2014.

- NETTO, L. N.; LEAL, C. A.; FIGUEIREDO, H. C. *Streptococcus dysgalactiae* as an agent of septicemia in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). **Journal of Fish Diseases**, v. 34, n. 3, p. 251-254, 2011.
- NGUYEN, T. D.; CROSBIE, P. B. B.; NOWAK, B. F.; BRIDLE, A. R. The effects of inactivation methods of *Yersinia ruckeri* on the efficacy of single dip vaccination in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Journal of Fish Diseases**, v. 41, n. 7, p. 1173-1176, 2018.
- ORTEGA, Y.; BARREIRO, F.; BUENO, H.; HUANCARÉ, K.; OSTOS, H.; MANCHEGO, A.; PEREIDA, M. A.; GÓMEZ, W.; BELO, M.; SANDOVAL, N. First report of *Streptococcus agalactiae* isolated from *Oreochromis niloticus* in Piura, Peru: Molecular identification and histopathological lesions. **Aquaculture Reports**, v. 4, p. 74-79, 2016.
- PASNIK, D. J.; EVANS, J. J.; PANANGALA, V. S.; KLESIUS, P. H.; SHELBY, R. A.; SHOEMAKER, C. A. Antigenicity of *Streptococcus agalactiae* extracellular products and vaccine efficacy. **Journal of Fish Diseases**, v. 28, p. 205-212, 2005.
- PASNIK, D. J.; EVANS, J. J.; KLESIUS, P. H. Duration of protective antibodies and correlation with survival in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* following *Streptococcus agalactiae* vaccination. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 66, n. 2, p. 129-134, 2005.
- PASNIK, D. J.; EVANS, J. J.; KLESIUS, P. H. A microwave-irradiated *Streptococcus agalactiae* vaccine provides partial protection against experimental challenge in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. **World Journal of Vaccines**, v. 4, p. 184-189, 2014.
- PINTO, A. K.; RICHNER, J. M.; POORE, E. A.; PATIL, P. P.; AMANNA, I. J.; SLIFKA, M. K.; DIAMOND, M. S. A hydrogen peroxide-inactivated virus vaccine elicits humoral and cellular immunity and protects against Lethal West Nile Virus infection in aged mice. **Journal of Virology**, v. 87, n. 4, p. 1926-1936, 2013.
- POORE, E. A.; SLIFKA, D. K.; RAUÉ, H. P.; THOMAS, A.; HAMMARLUND, E.; QUINTEL, B. K.; TORREY, L. L.; SLIFKA, A. M.; RICHNER, J. M.; DUBOIS, M. E.; JOHNSON, L. P.; DIAMOND, M. S.; SLIFKA, M. K.; AMANNA, I. J. Pre-clinical development of a hydrogen peroxide-inactivated West Nile virus vaccine. **Vaccine**, v. 35, n. 2, p. 283-292, 2017.

- PRADEEP, P. J.; SUEBSING, R.; SIRTHAMMAJAK, S.; KAMPEERA, J.; JITRAKORN, S.; SAKSMERPROME, V.; TURNER, W.; PALANG, I.; VANICHVIRIYAKIT, R.; SENAPIN, S.; JEFFS, A.; KIATPATHOMCHAI, W.; WITHYACHUMANARNKUL, B. Evidence of vertical transmission and tissue tropism of Streptococcosis from naturally infected red tilapia (*Oreochromis spp.*). **Aquaculture Reports**, v. 3, p. 58-66, 2016.
- PHILIPPART, J. C. L.; RUWET, J. C. L. Ecology and distribution of tilapias. In: PULLIN, R. S.; LOWE-McCONNELL, R. H. (Eds.). The biology and culture of Tilapias. ICLARM Conference Proceedings, n. 7, ICLARM, Manila, Filipinas, 1982, pp. 15-59.
- PRETTO-GIORDANO, L. G.; MULLER, E. E.; KLESIOUS, P.; SILVA, V. G. Efficacy of an experimentally inactivated *Streptococcus agalactiae* vaccine in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in Brazil. **Aquaculture Research**, v. 41, p. 1539-1544, 2010.
- RAUTA, P. R.; NAYAK, B.; DAS, S. Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: a model for higher organisms. **Immunology Letters**, v. 148, n. 1, p. 23-33, 2012.
- RIBEIRO, C. M.; SCHIJNS, V. E. **Immunology of vaccine adjuvants**. In: Davies, G. (Eds.). Vaccine adjuvants, (pp. 1-14). Humana Press, Totowa, NJ, p. 1-14, 2010.
- SALVADOR, R.; MÜLLER, E.; LEONHARDT, J.; PRETTO-GIORDANO, L.; DIAS, J.; FREITAS, J.; MORENO, A. M. Isolamento de *Streptococcus* spp de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*) e qualidade da água de tanques rede na Região Norte do Estado do Paraná, Brasil. **Ciências Agrárias**, v. 24, n. 1, p. 35-42, 2003.
- SALVADOR, R.; MULLER, E.; FREITAS, J.; LEONHARDT, J.; PRETTO-GIORDANO, L.; DIAS, J. Isolamento e caracterização de *Streptococcus* spp. do grupo B em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) criadas em tanques rede e em viveiros de terra na região norte do Estado do Paraná, Brasil. **Ciência Rural**, v. 35, n. 6, p. 1374-1378, 2005.
- SCHALCH, S. H. C.; TAVARES-DIAS, M.; ONAKA, E. M. **Principais métodos terapêuticos para peixes em cultivo**. In: TAVARES-DIAS, M. (Eds.). Manejo e sanidade de peixes em cultivo. Embrapa Amapá. 2009, 723 p.

- SCHIJNS, V. E. Induction and direction of immune responses by vaccine adjuvants. **Critical Reviews in Immunology**, v. 21, p. 75–85, 2001.
- SCHULTER, E. P.; VIEIRA-FILHO, J. E. R. **Evolução da piscicultura no Brasil: Diagnóstico e desenvolvimento da cadeia produtiva de tilápia, Texto para Discussão**, N°. 2328, Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA), Brasília, p. 1-35, 2017.
- SECOMBES, C.; BELMONTE, R. **Overview of Fish Vaccines: Focusing on Methods**. In: ADAMS A. (Eds.). *Fish Vaccines*. Springer Basel, 180 p, 2016.
- SOARES, M. P.; OLIVEIRA, F. C.; CARDOSO, I. L.; URBINATI, E. C.; DE CAMPOS, C. M.; HISANO, H. Glucan-MOS® improved growth and innate immunity in pacu stressed and experimentally infected with *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 73, p. 133-140, 2018.
- SU, Y. L.; FENG, J.; LI, Y. W.; BAI, J. S.; LI, A. X. Development of a quantitative PCR assay for monitoring *Streptococcus agalactiae* colonization and tissue tropism in experimentally infected tilapia. **Journal of Fish Disease**. V. 39, n. 2, p. 229-38, 2016.
- TAFALLA, C.; BØGWALD, J.; DALMO, R.; MUNANG'ANDU, H. M.; EVENSEN, Ø. **Adjuvants in fish vaccines**. In: GUDDING R; LILLEAGUG, A.; EVENSEN, Ø (Eds.). *Fish vaccination*. UK, Wiley Blackwell, 383 p, 2014.
- TREWAVAS, E. Tilapias: taxonomy and speciation. In: PULLIN, R. S.; LOWE-McCONNELL, R. H. (Eds.). *The biology and culture of Tilapias*. ICLARM Conference Proceedings, n. 7, ICLARM, Manila, Filipinas, 1982, pp. 3-13.
- TORRECILLAS, S.; MONTERO, D.; IZQUIERDO, M. Improved health and growth of fish fed mannan oligosaccharides: potential mode of action. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 36, n. 2, 525-544, 2014.
- VETVICKA, V.; VANNUCCI, L.; SIMA, P. The effects of β -glucan on fish immunity. **North American Journal of Medical Sciences**, v. 5, n.10, p. 580, 2013.
- YANG, W.; LI, A. Isolation and characterization of *Streptococcus dysgalactiae* from diseased *Acipenser schrenckii*. **Aquaculture**, v. 294, n. 1-2, p. 14-17, 2009.
- YE, X.; LI, J.; LU, M.; DENG, G.; JIANG, X.; TIAN, Y.; QUAN, Y.; JIAN, Q. Identification and molecular typing of *Streptococcus agalactiae* isolated from

- pond-cultured tilapia in China. **Fisheries Science**, v. 77, n. 4, p. 623-632, 2011.
- YI, T.; LI, Y.; LIU, L.; XIAO, X.; LI, A. Protection of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) against *Streptococcus agalactiae* following immunization with recombinant FbsA and α -enolase. **Aquaculture**, v. 428-429, p. 35–40, 2014.
- ZHENG, Z.; YINGENG, W.; QINGYIN, W.; NANNAN, D.; MEIJIE, L.; JIANGBO, Q.; BIN, L.; LAN, W. Study on the immune enhancement of different immunoadjuvants used in the pentavalent vaccine for turbot. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 32, n. 3, p. 391-395, 2012.

CAPÍTULO 1: Comparação de três métodos de inativação na produção de uma vacina contra *Streptococcus agalactiae* em tilápias-do-nilo

RESUMO

O presente estudo comparou a eficácia de três vacinas inativadas contra *S. agalactiae*, usando três metodologias: formaldeído, peróxido de hidrogênio e manipulação de pH. Tilápias-do-nilo foram distribuídas em seis grupos experimentais: G1: naïve; G2: controle, não vacinados; G3: controle, não vacinados e desafiados com uma cepa homóloga de *S. agalactiae*; G4: vacinados com bactéria total inativada com formaldeído e desafiados; G5: vacinados com bactéria total inativada com peróxido de hidrogênio e desafiados; G6: vacinados com bactéria total inativada por lise celular mediante manipulação no pH e desafiados. Vinte oito dias após vacinação, os grupos G3, G4, G5 e G6 foram desafiados com 0.1 mL de *S. agalactiae* e a mortalidade foi avaliada por 21 dias. Para a determinação de proteínas séricas totais e anticorpos IgM anti-*Streptococcus agalactiae* foram adicionadas repetições não desafiadas. A taxa de sobrevivência foi 100,0%, 100,0% 62,5% 80,0% 75,0% e 85,0% nos grupos G1, G2, G3, G4, G5 e G6, respectivamente. Os resultados mostraram uma taxa de sobrevivência significativamente maior no grupo G6 comparado ao grupo controle G3. Contudo, não houve diferenças significativas entre os grupos vacinados. A porcentagem relativa de sobrevivência (PRS) apresentou valores de 46.6%, 33.3% e 60,0% para os grupos G4, G5 e G6 respectivamente. Adicionalmente, entre tempos no mesmo grupo não houve diferenças significativas entre grupos vacinados e o grupo controle G3 na avaliação de proteínas totais do soro e anticorpos IgM anti-*Streptococcus agalactiae*. Os resultados observados neste estudo são promissórios para o uso destas metodologias como alternativa à inativação convencional utilizando formaldeído.

Palavras-chave: formaldeído, peróxido de hidrogênio, inativação bacteriana, aquicultura, eficácia vacinal.

INTRODUÇÃO

S. agalactiae, também designada como estreptococo do grupo B (GBS), é um coco Gram-positivo (YE et al., 2011). Os GBS causam alta mobilidade e mortalidade entre peixes de água doce e salgada, incluindo a tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus* (YE et al., 2011; LUISIASTUTI et al., 2014). A enfermidade é caracterizada por septicemia e severa meningoencefalite (YE et al., 2011). *S. agalactiae* é responsável pelos surtos de enfermidade em várias regiões do mundo incluindo Europa, Ásia, Estados Unidos, América e Austrália (MISHRA et al., 2018). No Brasil, apresenta alta prevalência e encontra-se amplamente distribuído geograficamente, sendo detectado em quase todos os estados como Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Santa Catarina, Bahia, Ceará, Mato Grosso, Pernambuco Goiás e Espírito Santo (SALVADOR et al., 2005; MIAN et al., 2009; BARONY et al., 2017).

A vacinação é amplamente aceita e eficaz método para controlar a infecção por *S. agalactiae* e prevenir mortalidade em massa de tilápia (LIU et al., 2016). No entanto, poucas vacinas comerciais estão disponíveis para *S. agalactiae* (DADAR et al., 2016). As vacinas inativadas são os tipos mais comuns de vacinas utilizadas na prevenção e controle de doenças na aquicultura, sendo menos laboriosas de realizar, seguras para o meio ambiente e menos onerosas (MUNANG'ANDU et al., 2016). Neste tipo de vacina, o patógeno torna-se incapaz de se multiplicar e causar doença, preservando sua conformação estrutural a qual estimula a resposta imune protetora (MUNANG'ANDU et al., 2014; DADAR et al., 2016). A inativação pode ser realizada mediante métodos químicos, como a formaldeído, ou métodos físicos, como o calor, luz ultravioleta, entre outros (MUNANG'ANDU et al., 2014).

Geralmente, as vacinas inativadas são utilizadas amplamente para proteção contra *S. agalactiae* (LIU et al., 2016). As primeiras vacinas foram desenvolvidas com células inativadas de *S. agalactiae* e concentrados de produtos extracelulares (ELDAR et al., 1995; EVANS et al., 2004). Eldar et al. (1995) testaram pela primeira vez uma vacina inativada com formaldeído pela via intraperitoneal em híbridos de tilápias, obtendo 100,0% de proteção. Evans

et al. (2004) utilizaram células de *S. agalactiae* inativadas com formaldeído adicionando concentrados de produtos extracelulares da bactéria em tilápias-do-nilo 30 g, obtendo alta eficácia em peixes de 30 g (PRS=80,0%) pela via intraperitoneal, além de baixos níveis de proteção pela via de imersão em peixes de 30 g (PRS= 35,0%). No entanto, o formaldeído tem a capacidade de alterar as propriedades intra e extracelulares de diferentes microrganismos (MUNANG'ANDU et al 2014). Novos estudos indicam que o formaldeído afeta a capacidade de antigenicidade dos vírus (ABD-ELGHAFAR et al., 2016) e poderia causar polimerização, bloqueio de epítomos e induzir toxicidade e outros efeitos adversos (DELGADO et al., 2009). Adicionalmente, outra desvantagem desta metodologia é o longo período de incubação requerido para o sucesso da inativação, o qual poderia incrementar a concentração do formaldeído (Stauffer et al., 2006). Portanto torna-se necessário e premente buscar alternativas de agentes inativadores economicamente viáveis, seguros e disponíveis.

Adicionalmente, Pasnik et al. (2014) testou metodologia de vacinação inativando as células bacterianas de *S. agalactiae* mediante micro-ondas obtendo níveis de proteção (PRS = 56,0%) pela via intraperitoneal e baixa eficácia por banhos de imersão (PRS = 24,0%). Adicionalmente, outros agentes inativadores foram desenvolvidos para *S. agalactiae*. Recentemente, Nguyen et al. (2018) utilizaram esta metodologia prévia na elaboração de vacinas contra *Yersinia ruckeri* em salmão do Atlântico (*Salmon salar*) com bons resultados na eficácia. Estudos sobre inativação de *Yersinia ruckeri* submetidas à lise celular em pH 9.8 por 60 a 120 min demonstraram ter eficácia quando usadas como vacinas em peixes (AMEND et al., 1983).

Recentemente, novas metodologias para a produção de vacinas inativadas foram desenvolvidas utilizando peróxido de hidrogênio (H₂O₂) para inativação do vírus da coriomeningite linfocítica em camundongos (AMANNA et al., 2012), vírus da raiva em camundongos (ABD-ELGHAFAR et al., 2016), vírus do oeste do Nilo em macacos Rhesus e camundongos (PINTO et al., 2013; POORE et al., 2017). Fan et al. (2019) mencionaram que a inativação pelo H₂O₂ retém epítomos mais completos e exibe menor toxicidade quando comparado ao formaldeído. Adicionalmente, o H₂O₂ inativa o RNA e o DNA, com mínimo dano

na estrutura antigênica ou imunogenicidade e demonstrou ser um método altamente eficaz quando comparado à inativação convencional com formaldeído ou b-propiolactona (AMANNA et al., 2012), além de mostrar proteção vacinal produzindo incremento da resposta imune adaptativa (PINTO et al., 2013; ABD-ELGHAFAR et al., 2016; POORE et al., 2017). Amanna et al., (2012) mencionaram que o peróxido de hidrogênio tem habilidade para inativar vários patógenos incluindo bactérias, parasitas e esporos bacterianas. Porém, para patógenos de peixes a técnica ainda não foi testada.

Assim, esta proposta teve como objetivo comparar a eficácia de bacterinas de *S. agalactiae* utilizando três metodologias de inativação: bactéria total inativada com formaldeído, bactéria total inativada com peróxido de hidrogênio e bactéria total inativada por manipulação do pH. A eficácia vacinal foi determinada mediante PRS e níveis de anticorpos IgM anti-*Streptococcus agalactiae*.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e condições experimentais

Foram utilizadas 440 tilápias-do-nilo, adquiridas de piscicultura comercial sem histórico de mortalidade por estreptococos, 5,0 % do lote foi utilizado para detecção de *S. agalactiae* mediante isolamento bacteriano. Os animais foram aclimatados por seis semanas em caixas de fibra de 250 L (20 peixes em cada), abastecidas com água corrente proveniente de poço artesiano, vazão de 1 L.min⁻¹ e aeração suplementar constante. Antes do início do experimento, os peixes foram confirmados negativos para *S. agalactiae* mediante análises bacteriológica de amostras de cérebro, rim e baço. Durante todo o experimento, os peixes receberam ração comercial peletizada (Laguna, Brasil: Proteína bruta 36,0%), duas vezes ao dia (8:00 e 16:00), correspondendo a 3,0% da biomassa. As caixas foram sifonadas cada dois dias e a qualidade físico-química da água determinada semanalmente, mediante sonda multiparâmetros (Horiba, modelo U-50, Japão) para determinação de temperatura, oxigênio dissolvido e pH. Durante o experimento, a temperatura foi mantida com média de 29,20 ± 0,98 °C, o oxigênio dissolvido com média de 5,58 ± 1,78 mg⁻¹ e o pH com média 7,23

$\pm 0,16$. Os valores médios mantiveram-se dentro da faixa considerada adequada para qualidade da água em esta espécie (El-SAYED, 2019).

O desenvolvimento do experimento preservou os princípios éticos envolvidos na experimentação animal definidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, SP (Nº de protocolos: 018955/17).

Delineamento experimental

Após período de aclimação de seis semanas e jejum prévio de 24 h, 440 tilápias-do-nilo com peso médio de $25,01 \pm 8,01$ g foram utilizadas para o desenvolvimento do experimento. Primeiramente, os peixes foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos experimentais em duplicata (20 peixes). G1: naïve, não vacinados nem desafiados; G2: controle, não vacinados (injetados com PBS estéril) nem desafiados (injetados com PBS estéril); G3: controle, não vacinados (injetados com PBS estéril) e desafiados com uma cepa homóloga de *S. agalactiae*; G4: vacinados com bactéria total inativada com formaldeído e desafiados; G5: vacinados com bactéria total inativada com peróxido de hidrogênio e desafiados; G6: vacinados com bactéria total inativada por lise celular mediante manipulação no pH e desafiados (Figura 1).

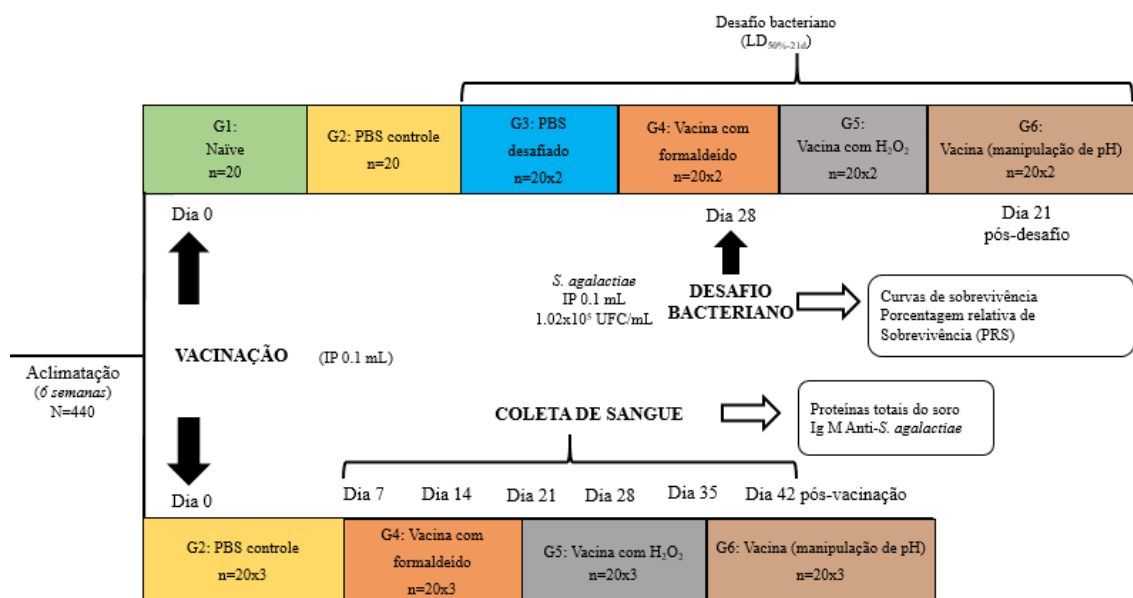


Figura 1. Diagrama do desenho experimental. 28 dias após vacinação os grupos G3, G4, G5 e G6, foram desafiados com *S. agalactiae* e monitorados por 21 dias. Três repetições foram adicionadas nos grupos G2, G4, G5 e G6 para a determinação das proteínas séricas totais e anticorpos IgM anti-*Streptococcus agalactiae*.

Os diferentes grupos experimentais foram anestesiados com Benzocaína (100 mg.L^{-1}) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU) (Neiffer & Stamper, 2009) e posteriormente vacinados via intraperitoneal com 0,1 mL das vacinas. No caso dos grupos controles G2 e G3 foram injetados com o mesmo volume de PBS estéril (falsa vacinação). Vinte oito dias após vacinação, os grupos G3, G4, G5 e G6 foram anestesiados e desafiados com 0,1 mL de dose de uma cepa homóloga de *S. agalactiae* calculada previamente para produzir 50% de mortalidade. No caso do grupo controle G2 foi injetado com o mesmo volume de PBS estéril (falso desafio). Durante o período de infecção, o fluxo contínuo da água foi interrompido, e as variáveis físico-químicas da água foram monitoradas diariamente.

Após o desafio, os peixes foram observados diariamente durante 21 dias para determinar a PRS. Foram anotados os sinais clínicos e a mortalidade duas vezes ao dia. Amostras de tecidos (cérebro, fígado, rim cranial e baço) de animais moribundos, mortes recentes e dos sobreviventes foram coletadas para isolamento bacteriano em ágar Infusão de Cérebro-Coração (BHI). A PRS foi calculada segundo a fórmula descrita por Amend (1981):

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

Para a determinação de proteínas séricas totais e anticorpos IgM anti-*Streptococcus agalactiae* foram adicionadas em triplicatas (20 peixes cada) nos grupos G2, G4, G5 e G6, as quais não foram desafiadas.

Obtenção da bactéria

A bactéria *S. agalactiae* do sorotipo Ib, utilizada no presente trabalho foi isolada da região norte do Paraná em tilápias-do-nilo naturalmente infectadas com sinais clínicos compatíveis com estreptococose (MARCUSO et al., 2015). Os peixes foram necropsiados e fragmentos do cérebro, rim e baço foram coletados para isolamento bacteriano. Logo após, os isolados bacterianos foram semeados em BHI a 28 °C por 48 h. A identificação das colônias e classificação sorológica realizadas segundo o descrito por Salvador et al. (2005) e a confirmação molecular dos isolados mediante amplificação do gene 16S-23S rRNA segundo o descrito por Delannoy et al. (2013). Finalmente, as bactérias foram mantidas congeladas em ultrafreezer (-80°C) em caldo Infusão de Cérebro-Coração (BHI) suplementados com glicerol a 15% (v/v).

Preparação das vacinas

Bactéria total inativada com formaldeído

Bactérias mantidas congeladas em ultrafreezer (-80°C) em caldo (BHI) suplementados com glicerol a 15% (v/v) foram reativadas em ágar (BHI) a 28 °C por 48-72 h. Além disso, as bactérias foram reativadas *in vivo* mediante três passagens prévias em tilápias. Para a inativação, a vacina foi elaborada seguindo o protocolo proposto pelo Gallage et al., (2017). Brevemente, colônias características de *S. agalactiae* foram semeadas em 300 mL de caldo BHI e incubadas com agitador orbital a 150 rpm (C24 Classic Series, New Brunswick Scientific, New Jersey, EEUU) a 28 °C por 48-72 h. A seguir, a suspensão foi diluída em 200 mL de tampão fosfato salino (PBS) estéril para garantir completa inativação prévio à adição de formaldeído (até obter uma concentração final de 3% na suspensão) e posteriormente mantidas 24 h em refrigeração a 4 °C. Logo

após, foi centrifugada a 10.000 g (Scorvall Legend Mach 1.6R, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EEUU) por 10 min a 4°C e lavadas com PBS estéril, três vezes, o sobrenadante desprezado e a massa bacteriana precipitada foi diluída em PBS estéril e ajustada até obter um inóculo padronizado por contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) em placas e por espectrofotometria (SP-22, Biospectro, Brazil), o qual foi equivalente a $5,28 \times 10^9$ UFC.mL⁻¹, DO_{540nm} de 1,256. A dose vacinal escolhida esteve dentro de concentrações utilizadas para *S. agalactiae* segundo estudos previamente realizados (EVANS et al., 2004; PASNIK et al., 2005; PRETTO-GIORDANO et al., 2010; CHEN et al., 2012). A inativação e esterilidade da vacina foram confirmadas semeando 0.1 mL da suspensão bacteriana em ágar (BHI) e incubando a 28°C por 72 h. Finalmente, a vacina foi armazenada em frascos estéreis a 4 °C por 24h antes da vacinação.

Bactéria total inativada com peróxido de hidrogênio

A vacina foi elaborada segundo a metodologia descrita por Amanna et al. (2012) com modificações. Brevemente, suspensões bacterianas de *S. agalactiae* foram tratadas com peróxido de hidrogênio (Labsynth, Brasil) até obter concentração final de 5,0% na suspensão e posteriormente mantidas 6 h em refrigeração a 4°C. A seguir, foram centrifugadas a 10.000 g por 10 min a 4°C e lavadas com PBS estéril três vezes, o sobrenadante desprezado e a massa bacteriana precipitada foi diluída em PBS estéril e ajustada até obter um inóculo padronizado equivalente a $1,54 \times 10^9$ UFC.mL⁻¹, DO_{540nm} de 1,256. A inativação e esterilidade da vacina foram realizadas segundo as técnicas microbiológicas supracitadas para a vacina inativada com formaldeído. Finalmente, foi armazenada em frascos estéreis a 4 °C por 24h antes da vacinação.

Inativação por lise celular mediante manipulação de pH

A vacina foi elaborada segundo a metodologia descrita por Nguyen et al. (2018) com modificações. Brevemente, suspensões bacterianas de *S. agalactiae* foram tratadas com hidróxido de sódio (NaOH) 1 M até obter um pH de 10 e mantidas a temperatura ambiente por 3 h. Posteriormente, as suspensões foram tratadas com ácido clorídrico (HCl) 1 M até obter pH de 7. A seguir, as suspensões foram diluídas em PBS estéril prévio à adição de formaldeído segundo o supracitado e posteriormente mantidas 24 h em refrigeração a 4 °C.

Finalmente, foram seguidos os mesmos passos realizados para as outras vacinas supracitadas, utilizando um inoculo equivalente a $5,28 \times 10^9$ UFC.mL⁻¹, DO_{540nm} de 1,266.

Cinética da inativação

Alíquotas das suspensões inativadas pelas três metodologias foram coletadas às 0, 2, 4 e 6h (para peróxido de hidrogênio) às 0, 3, 6, 9, 12 e 24 h (para formaldeído) e às 0, 1, 2, 3, 3, 6, 9, 12 e 24 h (manipulação de pH-formaldeído) para medição da densidade óptica por espectrofotometria e para contagem de UFC em placas.

Desafio experimental

O desafio foi realizado com a mesma cepa utilizada na produção das vacinas, utilizando uma dose letal 50% (DL_{50-21dias}) previamente calculada. Brevemente, as bactérias mantidas congeladas em ultrafreezer foram reativadas, semeadas em 300 caldo BHI e incubadas sob as mesmas condições detalhadas na preparação. A seguir, o material foi centrifugado a 10.000 g por 10 min a 4°C e lavado com PBS estéril duas vezes, o sobrenadante desprezado e a massa bacteriana precipitada diluída PBS estéril até obter um inóculo padronizado por contagem de UFC em placas e por espectrofotometria (SP-22, Biospectro, Brazil) com comprimento de onda de 540nm, o qual foi equivalente a $1,02 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹, OD de 0,069. A determinação das UFC foi feita em triplicata, através do plaqueamento de 0,1 mL de diluições seriadas do inóculo inicial em placas petri com ágar BHI.

Coleta de amostras

Os peixes foram anestesiados, utilizando benzocaína, 100 mg.L⁻¹ por 5 min em um recipiente com 10 L de água, onde os peixes foram considerados anestesiados quando estivessem quase sem movimento e com diminuição dos movimentos operculares. Amostras de sangue de sete peixes por grupo (aproximadamente 0,8 mL) foram coletadas com seringas contendo EDTA a 10% ou não da veia caudal nas repetições não desafiadas G3, G4, G5 e G6 aos 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias após a vacinação. As amostras de sangue foram colocadas em microtubos de 1,5 mL e deixadas a 25 °C por 1 h. Após a

coagulação, foram centrifugadas a 5000 rpm por 5 min (Prism Microcentrifuge, Labnet International, Inc, USA). Finalmente o soro obtido foi armazenado em ultrafreezer (-80°C) para posterior medição dos níveis de anticorpos anti-*Streptococcus agalactiae* e das proteínas totais.

Determinação de anticorpos IgM anti-*Streptococcus agalactiae*

Para detecção de anticorpos anti-*Streptococcus agalactiae* foi utilizado o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), seguindo a metodologia descrita por Shelby (2002) e Soto et al. (2014) com algumas modificações. Brevemente, suspensões bacterianas de *S. agalactiae* foram tratadas com formalina tamponada até obter concentração final de 0.5% na suspensão e mantidas 24 h em refrigeração a 4°C. Posteriormente, foi lavada duas vezes em PBS e suspensa em tampão de carbonato (coating buffer) em concentração de 10^8 UFC.mL⁻¹. A seguir, microplacas estéreis de 96 poços (ThermoLabsystems, Franklin, MA, USA) foram recobertas com 100 µL da suspensão contendo 10^7 UFC em cada poço e incubadas a noite toda a 4 ° C.

Logo após, os poços foram lavados três vezes com PBS contendo 0,05% Tween-20 (PBST) e bloqueados por 1 h a temperatura ambiente com albumina de soro bovino (BSA) a 1,0% (INLAB, Brasil) em PBST. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com PBST. Soros dos peixes controle (altos títulos de anticorpos induzidos por repetidas imunizações sucessivas prévias) e dos peixes vacinados foram adicionados às placas na diluição 1/25 em PBST. As placas foram incubadas a 25 °C por 3 h e imediatamente lavada três vezes com PBST. O anticorpo monoclonal de camundongo anti-IgM de tilápia (Aquatic Diagnostics Ltd, Stirling, UK) foi diluído 1/33 em PBST e 100 µL desta solução foi adicionada a cada poço por 1 h a 25°C. A placa foi lavada três vezes com PBST. O conjugado de cabra anti-IgG de camundongo com peroxidase (Sigma-Aldrich, A4416, St. Louis, EEUU) foi diluído 1/3000 em PBST e adicionado (100 µL) a cada poço e incubado por 1 h a 25 °C. Após incubação, a placa foi lavada três vezes em PBST e 100 µL de Substrato TMB (Tetramethylbenzidine) (Sigma-Aldrich, TA4444, St. Louis, EEUU) foram transferidos a cada poço. A reação de ELISA foi parada após 15 min com 50 µL de 2 M H₂SO₄. As reações imunoenzimáticas foram lidas a 450 nm em leitora de microplacas de ELISA

(EzRead 2000 Microplate Reader, Biochrom). A quantidade relativa de anticorpos específicos foi mensurada como o valor da DO.

Determinação de proteínas séricas totais

As proteínas séricas totais foram determinadas pelo método Biuret, utilizando o kit comercial (Labtest, Minas Gerais, Brasil), seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, a água destilada foi usada como branco e adicionou-se reagente de Biureto (1 mL) aos tubos contendo o branco, o padrão de proteína e as amostras de soro. A seguir, os tubos foram incubados em banho maria a 37 °C por 10 min. Logo após, foi aferida a absorbância das amostras e do padrão contra o branco a 545 nm e finalmente as proteínas do soro foram calculadas de acordo com a seguinte fórmula: Proteínas totais = (densidade ótica das amostras de soro/densidade ótica do padrão) x 4g/dL.

Microscopia eletrônica

As características morfológicas das suspensões bacterianas para cada método de inativação foram examinadas mediante microscopia eletrônica de varredura seguindo a metodologia descrita por Aoki et al. (2007) com modificações. Brevemente, os “pellets” bacterianos obtidos das suspensões inativadas e das suspensões controles (bactéria não inativada) foram fixados em glutaraldeído a 5,0%, em seguida, uma gota de bactéria foi dispensada em uma lamínula estéril revestida com poli-L-lisina a 0,1% (Sigma-Aldrich, P8920, St. Louis, EEUU) e, finalmente, as amostras foram desidratadas em etanol, secadas usando ponto crítico em carbono líquido, revestidas em ouro e examinadas usando microscópio Zeiss EVO 10.

Análises estatísticas

Foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, San Diego, EEUU). Primeiro, foi testada a normalidade (teste Shapiro-Wilk) e posteriormente foi feita análise de variância (ANOVA) com teste post-hoc de Tukey ou Kruskal Wallis com teste post-hoc de Dunn para identificar diferenças estatísticas entre os grupos e teste t de student ou teste Mann Whitney U para identificar diferenças estatísticas entre os tempos de amostragem. Todos os resultados foram expressos em forma de média ± desvio

padrão. As curvas de sobrevida foram avaliadas pelos testes de Kaplan-Meier, Log-rank e Bonferroni.

RESULTADOS

Os resultados da verificação da inativação pelas três metodologias revelaram total inativação nos dois primeiros tratamentos após adição de peróxido de hidrogênio e formaldeído. Porém, no terceiro tratamento houve diminuição gradual do crescimento bacteriano após adição de hidróxido de sódio e total inativação após adição do ácido clorídrico e formaldeído. Os valores na densidade óptica nas vacinas inativadas por peróxido de hidrogênio e manipulação de pH revelaram diminuição gradativa após adição de componentes químicos. No caso da vacina inativada por formaldeído os valores diminuíram rapidamente após adição de PBS e formaldeído (Tabela 1).

Tabela 1. Contagem de bactérias e densidade óptica em diferentes tempos realizados em suspensões bacterianas de *S. agalactiae* submetidas a três metodologias de inativação.

Vacina	Tempo de incubação (horas após procedimento de inativação)	Contagem de bactérias (UFC.mL ⁻¹)	Densidade óptica (horas após procedimento de inativação)
Tratamento com peróxido de hidrogênio	0 ^I	2.09x10 ⁹	0.875
	0	ND	0.867
	2	0	0.877
	4	0	0.855
	6	0	0.850
Tratamento com formaldeído	0 ^{II}	2.09x10 ⁹	0.875
	0	ND	0.535
	3	0	0.545
	6	0	0.546
	9	0	0.549
	12	0	0.499
	24	0	0.549
Tratamento por lise celular mediante manipulação de pH	0 ^{III}	3.60x10 ⁷	0.810
	0	ND	0.807
	1	1.30x10 ⁵	0.797
	2	Incontáveis	0.783
	3	2.30x10 ³	0.482
	3 ^{IV}	0	0.506
	6	0	0.507
	9	0	0.504
	12	0	0.501
	24	0	0.515

^IPrévio à adição de peróxido de hidrogênio, ^{II} Prévio à adição de PBS e formaldeído, ^{III} Prévio à adição de hidróxido de sódio, ^{IV} 3h após adição de ácido clorídrico e formaldeído, ND Não determinado.

Os grupos G1 e G2 não apresentaram mortalidade durante o experimento. As mortalidades no grupo controle (G3) e nos vacinados (G4, G5 e G6) começaram às 72h após o desafio. Os sinais clínicos no grupo G3 incluíram coloração escura, exoftalmia, opacidade da córnea, anorexia, letargia e natação errática (rodopio). Nos grupos vacinados os sinais clínicos somente incluíram coloração escura, anorexia e letargia. As mortalidades nos grupos ocorreram durante os primeiros onze dias após o desafio.

A taxa de sobrevivência (Figura 2), foi 100,0% nos grupos G1 e G2, 62,5% no grupo G3, 80,0% no G4, 75,0% no G5 e 85,0% no G6. Os resultados mostraram taxa de sobrevivência significativamente maior no grupo G5 ($p < 0,05$) comparado ao grupo controle. A PRS foi calculada 21 dias após o desafio e apresentou valores de 46,6%, 33,3% e 60,0% para os grupos G4, G5 e G6 respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2. Desenho experimental, mortalidade, taxa de sobrevivência e PRS em tilápia-do-nilo vacinadas contra três tipos de vacinas inativadas contra *S. agalactiae*.

Grupo	Dose de desafio (UFC mL ⁻¹)	N	Mortalidade	Taxa de sobrevivência (%)	PRS (%)
G1	-	20	0	100.0	-
G2	-	40	0	100.0	-
G3	1,02x10 ⁵	40	15	62.5	-
G4	1,02x10 ⁵	40	8	80.0	46.6
G5	1,02x10 ⁵	40	10	75.0	33.3
G6	1,02x10 ⁵	40	6	85.0	60.0

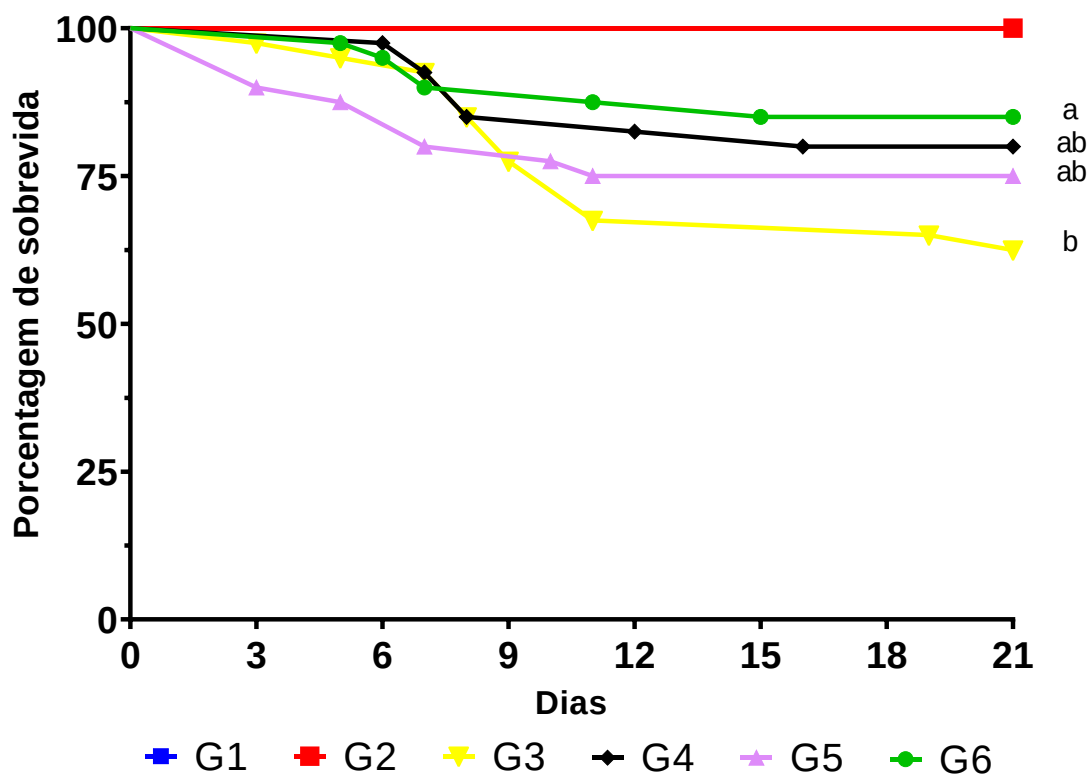


Figura 2. Taxa de sobrevivência (Kaplan-Meier) de tilápias-do-nilo. G1: controle naïve, não vacinados nem desafiados; G2: controle, não vacinados (injetados com PBS estéril) nem desafiados (injetados com PBS estéril); G3: controle, não vacinados (injetados com PBS estéril) e desafiados; G4: vacinados com bactéria total inativada com peróxido de hidrogênio e desafiados; G5: vacinados com bactéria total inativada com formaldeído e desafiados; G6: vacinados com bactéria total inativada por lise celular mediante pH e posteriormente com formaldeído e desafiados. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre grupos ($P < 0.05$).

No teste de ELISA para a determinação de anticorpos IgM anti-*Streptococcus agalactiae* (Figura 3), os resultados evidenciaram que os níveis anticorpos de IgM anti-*Streptococcus agalactiae* no grupo G2 aumentaram significativamente ($P < 0.05$) na quarta semana quando comparado à segunda semana, no G5 aumentaram significativamente na segunda semana quando comparado à primeira semana, e no grupo G6 os níveis de anticorpos aumentaram significativamente na segunda semana quando comparado à primeira semana. Adicionalmente, os resultados não evidenciaram diferenças significativas no mesmo tempo entre os grupos vacinados (G4, G5 e G6) e o grupo controle (G2) na primeira, segunda quarta e sexta semana após vacinação.

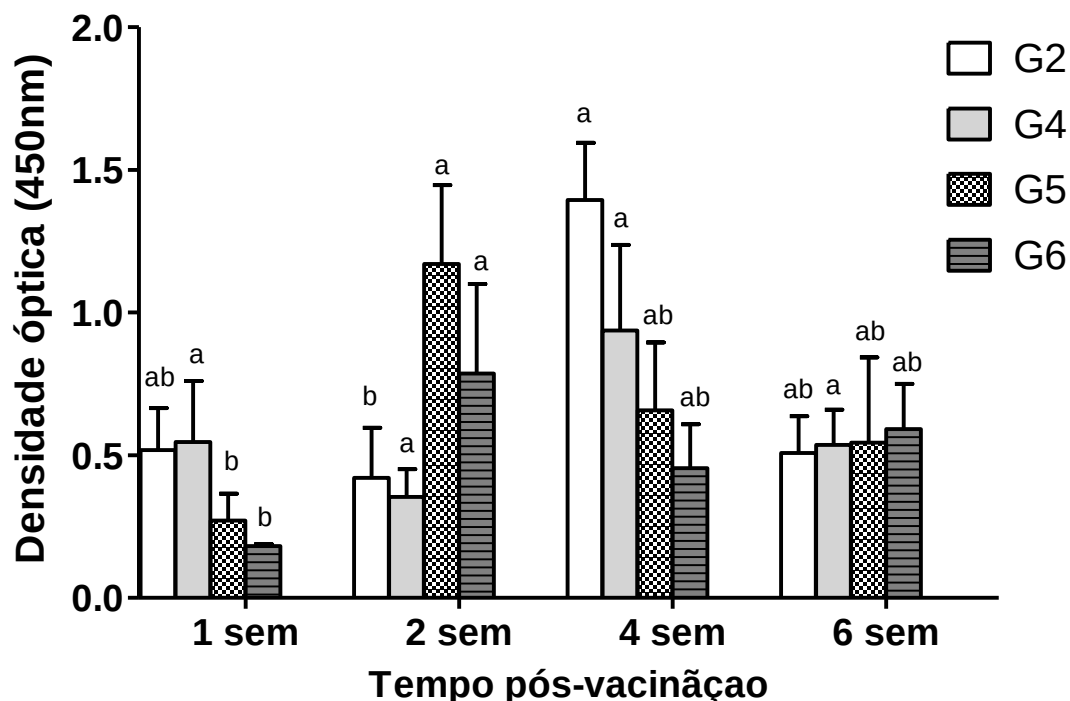


Figura 3. Detecção de anticorpos IgM anti-*Streptococcus agalactiae* em tilápias vacinadas com três metodologias de inativação. As barras verticais representam o erro padrão da média (N=5). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre tempos (1, 2, 4 e 6 semanas) no mesmo grupo (P<0.05). G2: controle, não vacinados (injetados com PBS estéril); G4: vacinados com bactéria total inativada com peróxido de hidrogênio; G5: vacinados com bactéria total inativada com formaldeído; G6: vacinados com bactéria total inativada por lise celular mediante pH e posteriormente com formaldeído.

Na avaliação das proteínas totais do soro (Figura 4), entre tempos no mesmo grupo, os resultados evidenciaram diferenças estatísticas significativas ($P < 0.05$) entre a segunda e quarta semana, quarta e quinta semana e quarta e sexta semana no caso do G2, entre a quarta e sexta semana no caso de G4, entre a segunda e quarta semana e quarta e quinta semana no caso de G5, e finalmente entre a segunda e terceira semana e terceira e sexta semana no caso de G6. Adicionalmente, os resultados não evidenciaram diferenças significativas no mesmo tempo entre os grupos vacinados (G4, G5 e G6) e o grupo controle (G2) na primeira, segunda, terceira, quarta, quinta e sexta semana após vacinação.

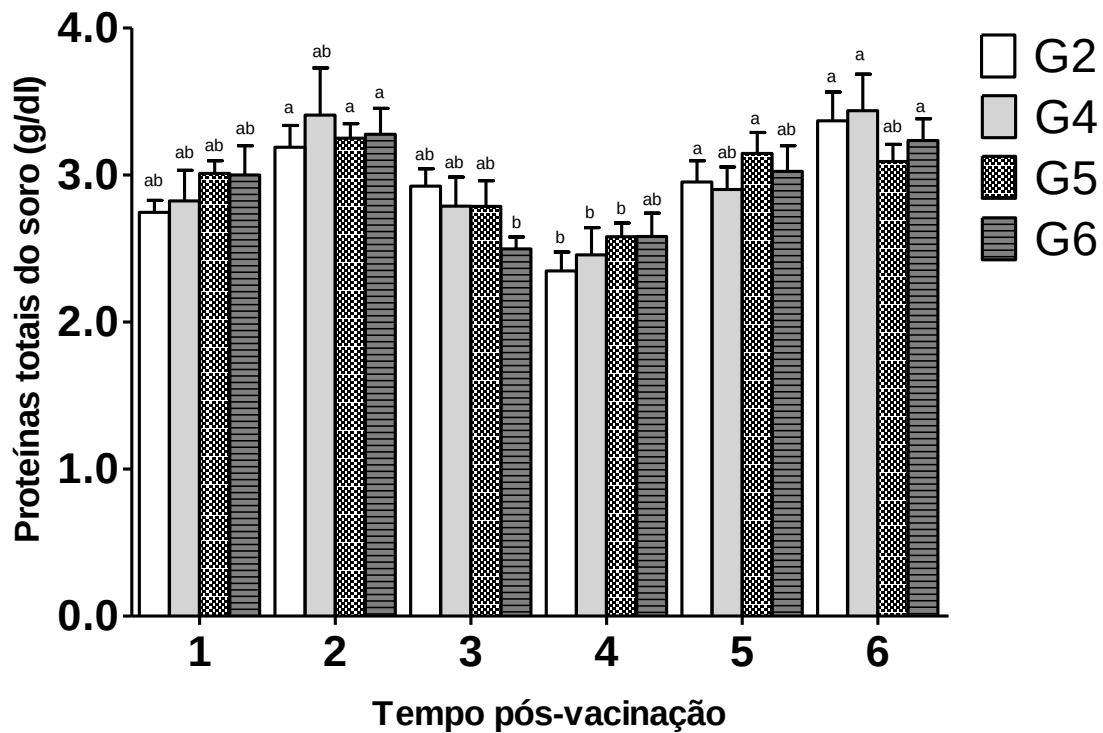


Figure 4. Valores médios de proteínas totais do soro em tilápias-do-nilo vacinadas contra *S. agalactiae* com três metodologias de inativação. As barras verticais representam o erro padrão da média (N=7). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre tempos (1, 2, 3, 4, 5 e 6 semanas) no mesmo grupo ($P<0.05$). G2: controle, não vacinados (injetados com PBS estéril); G4: vacinados com bactéria total inativada com peróxido de hidrogênio; G5: vacinados com bactéria total inativada com formaldeído; G6: vacinados com bactéria total inativada por lise celular mediante pH e posteriormente com formaldeído.

Na microscopia eletrônica (Figura 5), alterações no envoltório celular foram detectadas em algumas células inativadas por manipulação de pH. No entanto, não houve alterações na morfologia das células inativadas por formaldeído e peróxido de hidrogênio.

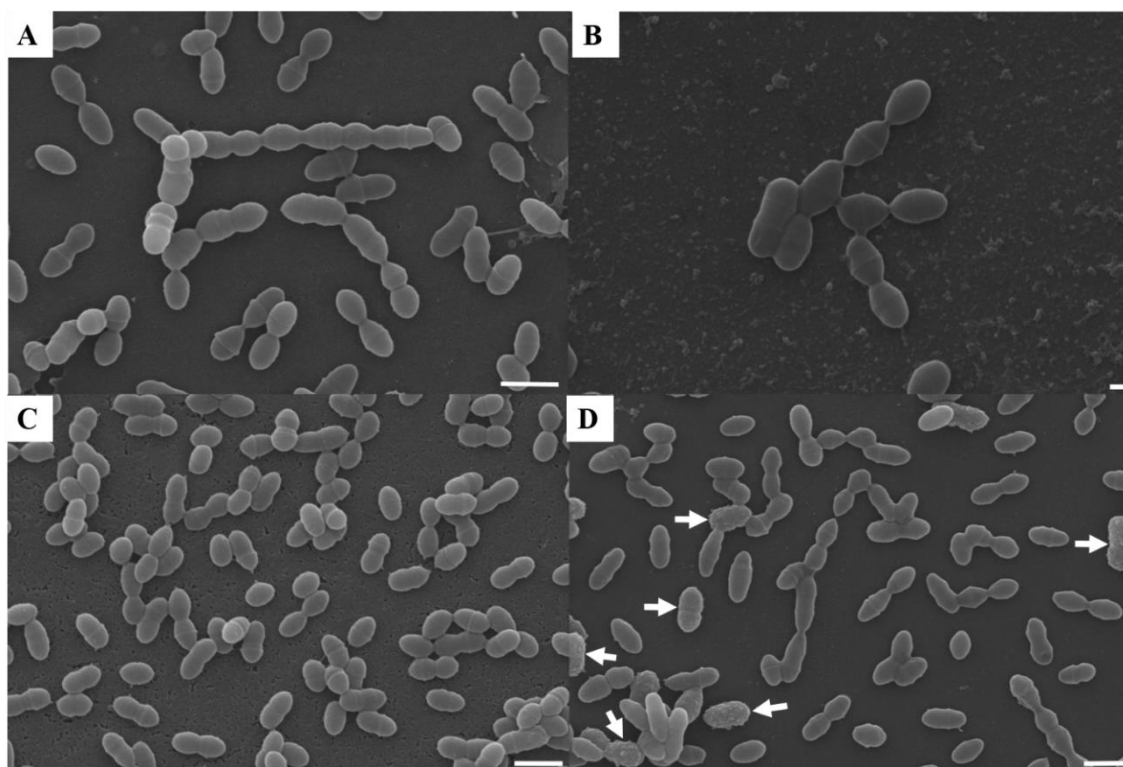


Figure 5. Análise morfológica de suspensões de *S. agalactiae* mediante microscopia eletrônica de varredura. (A) Bactéria viva. Barra de escala = 1 μ (B) Bactéria inativada por formaldeído. Barra de escala = 200nm (C) Bactéria inativada por peróxido de hidrogênio. Barra de escala = 1 μ (D) Bactéria inativada por manipulação de pH. Barra de escala = 1 μ

DISCUSSÃO

O presente estudo testou a eficácia de vacinas elaboradas com diferentes metodologias de inativação. A maioria dos estudos de vacinação em peixes utilizam formaldeído como metodologia de inativação das bactérias (EVANS et al., 2004; PASNIK et al., 2005; PRETTO-GIORDANO et al., 2010; CHEN et al., 2012), porém, o formaldeído poderia ter efeito negativo ao influenciar as características físico-químicas dos antígenos de superfície e a resposta imune (TU et al., 2010; AMANNA et al., 2012). Adicionalmente, Fan et al. (2019) reportaram que o formaldeído apesar de ser potente agente inativador, pode alterar a integridade dos epítomos.

Os resultados da verificação da inativação pelas diferentes metodologias demonstraram que tanto o peróxido de hidrogênio quanto o formaldeído foram efetivos na inativação completa da bactéria *S. agalactiae*. No caso do formaldeído, este composto tem a capacidade de alterar as propriedades extra

e intracelulares dos micro-organismos (MUNANG'ANDU et al., 2014). Em relação à metodologia da manipulação de pH, observou-se diminuição gradual do crescimento após a adição de hidróxido de sódio, o que poderia se relacionar à lise celular da bactéria pelo aumento do pH. Vários químicos inibem o crescimento bacteriano devido ao dano na membrana celular, especialmente ácidos e álcalis (PARK et al., 2016). Após a adição do ácido clorídrico, não houve crescimento bacteriano, confirmando assim o dano na membrana. Adicionalmente, os valores da densidade óptica nas bactérias inativadas por manipulação de pH diminuíram pelo incremento de hidróxido de sódio, ácido clorídrico e PBS adicionados durante o processo de inativação.

A DL_{50} foi calculada previamente com os peixes do mesmo lote utilizados durante o experimento. A dose escolhida para o desafio foi de $1,02 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹, a qual esteve dentro dos valores utilizados para *S. agalactiae* ($1,0 \times 10^3$ - $1,0 \times 10^{10}$ UFC.mL⁻¹) segundo estudos previamente realizados (ELDAR et al., 1995; EVANS et al., 2004; PASNIK et al., 2005; PRETTO-GIORDANO et al., 2010; CHEN et al., 2012; NORAINI, et al., 2013; PASNIK et al., 2014). No presente estudo, o grupo controle não vacinado e desafiado (G3) apresentou porcentagem de mortalidade menor a 50,0%. Pretto-Giordano et al. (2010) mencionaram que as concentrações utilizadas no desafio podem influenciar na eficácia vacinal. Midtlyng (2016) demonstrou porcentagens de mortalidade maiores ou iguais a 60,0% no grupo controle não vacinado e desafiado nas provas de eficácia. Por outro lado, Aasjord e Slinde (1994) demonstraram porcentagens de 50,0% a 90,0% para ensaios vacinais. Porém, quando utilizada no desafio experimental a mortalidade foi menor (37,5%). As diferenças entre mortalidade esperada e mortalidade obtida nos peixes não vacinados e desafiados foi provavelmente pelo crescimento, o qual poderia influenciar na resposta imune, uma vez que os peixes eram menores no experimento da DL_{50} . Tort et al. (2003) mencionaram que a imunocompetência nos peixes depende do peso, principalmente devido à necessidade de um mínimo número de células imunocompetentes. A PRS depende principalmente da mortalidade dos peixes não vacinados e desafiados, portanto poderia se supor que a eficácia obtida neste estudo houvesse melhorado se dose maior no desafio houvesse sido usada.

As taxas de sobrevida das três vacinas testadas apresentaram valores maiores a 70,0%. Apesar de não haver diferença significativa na sobrevida entre os grupos vacinados, no presente estudo foi observado que as vacinas inativadas por peróxido de hidrogênio e por lise celular mediante pH apresentaram sobrevidas maiores do que a vacina inativada pelo método convencional com formaldeído. Estudos realizados com vacinas inativadas contra *S. agalactiae* usando formaldeído reportaram valores de 85,0% e 68,0% de sobrevida (mortalidades no grupo controle: 76,0% e 45,0%, respectivamente) após desafios em tilápias aos 30 e 21 dias pós vacinação, respectivamente (EVANS et al.; 2004; PASNIK et al.; 2005).

Os valores de porcentagem de sobrevivência relativa (PSR) nas vacinas inativadas por peróxido de hidrogênio e por lise celular mediante pH (46,66% e 60,0%), foram maiores quando comparadas ao grupo controle injetado com PBS. Midtlyng (2016) mencionou porcentagens de sobrevivência relativa ótimos aqueles maiores ou iguais a 60,0%. Os resultados obtidos no presente estudo mostraram níveis de proteção moderado nas três vacinas testadas contra a cepa homologa de *S. agalactiae*, sendo os da vacina por lise celular mediante pH, os que apresentaram maior performance.

A metodologia por inativação por peróxido de hidrogênio, não foi utilizada até agora no estudo de vacinas contra bactérias em peixes. Os resultados nas vacinas demonstraram serem efetivos. Estudos em vacinas contra o vírus da raiva em camundongos (ABD-ELGHAFAR et al., 2016), e em vacinas contra o vírus do oeste do Nilo em camundongos e macacos Rhesus apresentaram curvas de sobrevidas de 80 a 100% (PINTO et al., 2013; POORE et al., 2017) e em vacinas contra o vírus da coriomeningite linfocítica em camundongos 100% de eficácia (AMANNA et al., 2012). Por outro lado, não foram descritas vacinas inativadas contra *S. agalactiae* por lise celular. No entanto, estudos sobre inativação mediante lise celular mediante manipulação do pH antes da adição de formaldeído, demonstraram ter eficácia maior a 80,0% quando usadas em vacinas contra *Yersinia ruckeri* em salmão do Atlântico (*Salmon salar*) (NGUYEN et al., 2018). Neste estudo, as metodologias foram efetivas inativando o patógeno e apresentaram moderado nível de proteção sem evidenciar

diferenças significativas quando comparado à metodologia convencional com formaldeído.

Os níveis séricos de anticorpos IgM anti-*Streptococcus agalactiae* no grupo controle (G2) e nos grupos vacinados experimentais (G4, G5 e G6) não mostraram diferenças estatísticas significativas entre si no mesmo tempo, o que pode ser explicado devido a exposição prévia a *Streptococcus agalactiae* antes da vacinação. Além disso, cepas bacterianas e espécies do gênero *Streptococcus* têm presença global (TAVARES et al., 2019) e caráter enzoótico no Brasil (BARONY et al., 2017). Crosbie e Nowak (2004) mencionaram prévia exposição ao patógeno, reatividade cruzada dos anticorpos existentes aos antígenos da bactéria e imprecisões ou falta de especificidade do ELISA como possíveis causas de atividade de anticorpos anti-*V. harveyi* encontrada nos controles não vacinados em um estudo desenvolvido em barramundis *lates calcarifer* vacinados contra *Vibrio harveyi*. É possível que algumas espécies desconhecidas de *Streptococcus* possam ter causado o aumento da ligação não específica no ensaio ELISA.

Embora seja conhecido que o nível de anticorpos é importante para a imunoproteção, ainda não foi claramente definido se os anticorpos podem ser usados como uma medida de eficácia em comparação com a porcentagem de sobrevivência relativa (MUNANG'ANDU et al., 2016). No grupo vacinado e inativado com formaldeído (G5) e no grupo vacinado e inativado por lise celular mediante pH (G6) os níveis de anticorpos incrementaram significativamente na segunda semana quando comparado à primeira semana após vacinação, o que poderia indicar aumento da resposta imune humoral por causa da vacina. Porém, o fato de ter no grupo não vacinado (G2) níveis de anticorpos elevados significativamente na quarta semana em relação à segunda semana após vacinação, indicam possível exposição prévia nos diferentes grupos.

As proteínas totais do soro desempenham papel significativo na manutenção da função normal e da atividade metabólica normal, como pressão osmótica coloidal no plasma e transporte de substâncias (ZHU et al., 2017). Os valores médios de proteína no soro obtidos neste estudo foram similares aos

valores obtidos em estudos prévios com tilápias (AL-ASGAH et al., 2015). No presente estudo, os níveis de proteínas totais no soro nos grupos foram muito variáveis apresentando valores aumentados nas três vacinas durante a quinta e sexta semana, o que poderia estar relacionado ao aumento da resposta imune inespecífica nas três vacinas durante esse período. Elevadas concentrações de proteínas totais estão relacionadas à maior produção de moléculas envolvidas na resposta imune inespecífica tais como o complemento, lisozima, lectinas ou citocinas (HOLLAND e LAMBRIS, 2002; SAURABH e SAHOO, 2008; JØRGENSEN, 2014). A resposta imune inata é importante na ativação da resposta imune adaptativa mediante estimulação de fagócitos, ativação de citocinas, complemento e receptores celulares, estimulação de células T e B e apresentação de antígenos (Magnadóttir, 2006).

Finalmente, a microscopia eletrônica revelou alteração no envoltório celular nas células inativadas por manipulação de pH, o que pode ser devido a alterações causadas pelo aumento do pH. Schwartzman et al., 2019 mencionaram que o pH ácido pode promover alterações na membrana celular. Além disso, a ausência de alterações nas células inativadas por peróxido de hidrogênio reforça o fato de que este método de inativação não modifica os epítomos (FAN et al., 2019). O impacto de tais modificações superficiais na antigenicidade e eficácia da vacina ainda precisa ser elucidado.

Os resultados observados neste estudo demonstraram eficácia similar nestas duas metodologias como alternativa à inativação convencional utilizando formaldeído. Adicionalmente, o uso do peróxido de hidrogênio para inativação requereu menos tempo do que a metodologia com formaldeído, o que permitiria que o processo de inativação nas vacinas fosse mais rápido. Estudos no futuro devem-se focar na inclusão de adjuvantes para aumentar a eficácia vacinal e no uso de vias alternativas de administração, além de tamanhos amostrais maiores.

REFERÊNCIAS

- AASJORD, P. M.; SLINDE, E. **Fish vaccine: Development, production and use of bacterial vaccines, with special reference to salmon**. In: Martins, A. M. (Eds.). *Fisheries Processing* (pp. 432-465). Springer, Boston, MA, 1994.
- ABD-ELGHAFFAR, A. A.; ALI, A. E.; BOSEILA, A. A.; AMIN, M. A. Inactivation of rabies virus by hydrogen peroxide. **Vaccine**, v. 34, n. 6, p. 798-802, 2016.
- AL-ASGAH; N. A.; ABDEL-WARITH, A. W. A.; YOUNIS, E. S. M.; ALLAM, H. Y. Haematological and biochemical parameters and tissue accumulations of cadmium in *Oreochromis niloticus* exposed to various concentrations of cadmium chloride. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 22, n. 5, p. 543-550, 2015.
- AMANNA, I. J.; RAUÉ, H.; SLIFKA, M. K. Development of a new hydrogen-peroxide-based vaccine platform. **Nature Medicine**, v. 18, n. 6, p. 974-980, 2012.
- AMEND, D. F. Potency testing of fish vaccines. Fish biologics: serodiagnostics and vaccines, **Developments in Biological Standardization**, v. 49, p. 447-454, 1981.
- AMEND, D. F.; JOHNSON, K. A.; CROY, T. R.; MCCARTHY, D. H. Some factors affecting the potency of *Yersinia ruckeri* bacterins. **Journal of Fish Diseases**, v. 6, n.4, p. 337-344, 1983.
- AOKI, M.; KONDO, M.; NAKATSUKA, Y.; KAWAI, K.; OSHIMA, S. Stationary phase culture supernatant containing membrane vesicles induced immunity to rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* fry syndrome. **Vaccine**, v. 25, p. 561-569, 2007.
- BARONY, G. M.; TAVARES, G. C.; PEREIRA, F. L.; CARVALHO, A. F.; DORELLA, F. A.; LEAL, C. A.; FIGUEIREDO, H. C. Large-scale genomic analyses reveal the population structure and evolutionary trends of *Streptococcus agalactiae* strains in Brazilian fish farms. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 13538, 2017.
- CHEN, M.; WANG, R.; LI, L.; LIANG, W.; LI, J.; HUANG, Y.; LEI, A.; HUANG, W.; GAN, X. Screening vaccine candidate strains against *Streptococcus agalactiae* of tilapia based on PFGE genotype. **Vaccine**, n. 30, 6088-6092, 2012.

- CROSBIE, P. B. B.; NOWAK, B. F. Immune responses of barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch), after administration of an experimental *Vibrio harveyi* bacterin by intraperitoneal injection, anal intubation and immersion. **Journal of Fish Diseases**, v. 27, n. 11, p. 623-632, 2004.
- DADAR, M.; DHAMA, K.; VAKHARIA, V.; HOSEINIFAR, S.; KARTHIK, K.; TIWARI, R.; KHANDIA, R.; MUNJAL, A.; SALGADO-MIRANDA, C.; JOSHI, S. Advances in Aquaculture Vaccines Against Fish Pathogens: Global Status and Current Trends. **Reviews in Fisheries Science & Aquaculture**, DOI: 10.1080/23308249.2016.1261277
- DADAR, M.; DHAMA, K.; VAKHARIA, V.; HOSEINIFAR, S.; KARTHIK, K.; TIWARI, R.; KHANDIA, R.; MUNJAL, A.; SALGADO-MIRANDA, C.; JOSHI, S. Advances in Aquaculture Vaccines Against Fish Pathogens: Global Status and Current Trends. **Reviews in Fisheries Science & Aquaculture**, v. 25, n. 3., p. 184-217.
- DELANNOY, C.; CRUMLISH, M.; FONTAINE, M.; POLLOCK, J.; FOSTER, G.; DAGLEISH, M.; TURNBULL, J.; ZADOKS, R. Human *Streptococcus agalactiae* strains in aquatic mammals and fish. **BMC Microbiology**, v. 13, n. 41, p.1-9, 2013.
- DELGADO, M. F., COVIELLO, S.; MONSALVO, A. C.; MELENDI, G. A.; HERNANDEZ, J. Z.; BATALLE, J. P.; DIAZ, L.; TRENTO A.; CHANG, H.; MITZNER, W.; RAVETCH, J.; MELERO, J.; IRUSTA, P.; POLACK, P. Lack of antibody affinity maturation due to poor Toll-like receptor stimulation leads to enhanced respiratory syncytial virus disease. **Nature medicine**, v. 15, n. 1, p. 34-41, 2009.
- ELDAR, A.; BEJERANO, Y.; BERCOVIER, H. Vaccination with whole-cell vaccine and bacterial protein extract protects tilapia against *Streptococcus difficile* meningoencephalitis. **Vaccine**, v. 13, n. 9, p. 867-70, 1995.
- EL-SAYED, A. F. M. **Tilapia culture**. CABI, Wallingford, UK, 2019, 358 p.
- EVANS, J. J.; KLESIOUS, P. H.; SHOEMAKER, C. A. Efficacy of *Streptococcus agalactiae* (group B) vaccine in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by intraperitoneal and bath immersion administration. **Vaccine**, v. 22, p. 3769-3773, 2004.
- FAN, Y.; MU, Y.; LU, L.; TIAN, Y.; YUAN, F.; ZHOU, B.; YU, C.; WANG, Z.; LI, X.; LEI, S.; XU, Y. WU, D.; YANG, L. Hydrogen peroxide-inactivated

- bacteria induces potent humoral and cellular immune responses and releases nucleic acids. **International Immunopharmacology**, v. 69, p. 389-307, 2019.
- FAN, Y.; MU, Y.; LU, L.; TIAN, Y.; YUAN, F.; ZHOU, B.; YU, C.; WANG, Z.; LI, X.; LEI, S.; XU, Y. WU, D.; YANG, L. Hydrogen peroxide-inactivated bacteria induces potent humoral and cellular immune responses and releases nucleic acids. **International Immunopharmacology**, 69: 389-307, 2019.
- GALLAGE, S.; KATAGIRI, T.; ENDO, M.; MAITA, M. Comprehensive evaluation of immunomodulation by moderate hypoxia in *S. agalactiae* vaccinated Nile tilapia. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 66, p. 445-454, 2017.
- HOLLAND, M. C. H.; LAMBRIS, J. D. The complement system in teleosts. **Fish & Shellfish Immunology**, v.12, n. 5, p. 399-420, 2002.
- JØRGENSEN, J. **The Innate Immune Response in Fish**. In: GUDDING R; LILLEAGUG, A.; EVENSEN, Ø (Eds.). Fish vaccination. UK, Wiley Blackwell, 383 p, 2014.
- LIU, G.; ZHU, J.; CHEN, K.; GAO, T.; YAO, H.; LIU, Y.; ZHANG, Q.; LU, C. Development of *Streptococcus agalactiae* vaccines for tilapia. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 122, n. 2, p. 163-170, 2016.
- LUSIASTUTI A.; TEXTOR, M.; SEEGER, H.; AKINEDEN, O.; ZSCHOCK, M. The occurrence of *Streptococcus agalactiae* sequence type 261 from fish disease outbreaks of tilapia *Oreochromis niloticus* in Indonesia. **Aquaculture Research**, v. 45, p. 1260–1263, 2014.
- MAGNADÓTTIR, B. Innate immunity of fish (overview). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 20, n. 2, p. 137-151, 2006.
- MARCUSSO, P. F.; ETO, S. F.; CLAUDIANO, G. S.; VIEIRA, F. C. F.; SALVADOR, R., MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R. Isolamento de *Streptococcus agalactiae* em diferentes órgãos de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*) criadas em tanques-rede. **Bioscience Journal**, v. 31, n. 2, p. 549-554, 2015.
- MIAN, G. F.; GODOY, D. T.; LEAL, C. A. G.; YUHARA, T. Y.; COSTA, G. M.; FIGUEIREDO, H. C. P. Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia. **Veterinary Microbiology**, v. 136, n. 1-2, p. 180-183, 2009.

- MIDTLYNG, P. J. **Methods for Measuring Efficacy, Safety and Potency of Fish Vaccines**. In: ADAMS A. (Eds.). Fish Vaccines. Springer Basel, 180 p, 2016.
- MISHRA, A.; NAM, G. H.; GIM, J. A.; LEE, H. E.; JO, A.; KIM, H. S. Current Challenges of Streptococcus Infection and Effective Molecular, Cellular, and Environmental Control Methods in Aquaculture. **Molecules and Cells**, v. 41, n. 6, p. 495-505, 2018.
- MUNANG'ANDU, H. M.; MUTOLOKI, S.; EVENSEN, Ø. **Non-replicating vaccines**. In: GUDDING R; LILLEAGUG, A.; EVENSEN, Ø (Eds.). Fish vaccination. UK, Wiley Blackwell, 383 p, 2014.
- MUNANG'ANDU, H. M., PAUL, J., EVENSEN, Ø. An overview of vaccination strategies and antigen delivery systems for *Streptococcus agalactiae* vaccines in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Vaccines**, v. 4, n. 48, p. 1-13, 2016.
- NEIFFER, D. L.; STAMPER, M. A. Fish sedation, analgesia, anesthesia, and euthanasia: considerations, methods, and types of drugs. **ILAR J.** v. 50, n. 4, p. 343-60, 2009.
- NGUYEN, T. D.; CROSBIE, P. B. B.; NOWAK, B. F.; BRIDLE, A. R. The effects of inactivation methods of *Yersinia ruckeri* on the efficacy of single dip vaccination in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Journal of Fish Diseases**, v. 41, n. 7, p. 1173-1176, 2018.
- NORAINI, O.; SABRI, M. Y.; SITI-ZAHRAH, A. Efficacy of Spray Administration of Formalin-Killed *Streptococcus agalactiae* in Hybrid Red Tilapia. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 25, n. 2, p. 142-8, 2013.
- PARK, H.; OH, S.; VINOD, N.; JI, S.; NOH, H.; KOO, J.; KOO, J.; LEE, S.; KIM, S.; LEE, K.; CHOI, C. Characterization of chemically-Induced bacterial ghosts (BGs) using sodium hydroxide-induced *Vibrio parahaemolyticus* ghosts (VPGs). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 11, 1904, 2016.
- PASNIK, D. J.; EVANS, J. J.; PANANGALA, V. S.; KLESIUS, P. H.; SHELBY, R. A.; SHOEMAKER, C. A. Antigenicity of *Streptococcus agalactiae* extracellular products and vaccine efficacy. **Journal of Fish Diseases**, v. 28, p. 205-212, 2005.
- PASNIK, D. J.; EVANS, J. J.; KLESIUS, P. H. A microwave-irradiated *Streptococcus agalactiae* vaccine provides partial protection against

- experimental challenge in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. **World Journal of Vaccines**, v. 4, p. 184-189, 2014.
- PINTO, A. K.; RICHNER, J. M.; POORE, E. A.; PATIL, P. P.; AMANNA, I. J.; SLIFKA, M. K.; DIAMOND, M. S. A hydrogen peroxide-inactivated virus vaccine elicits humoral and cellular immunity and protects against Lethal West Nile Virus infection in aged mice. **Journal of Virology**, v. 87, n. 4, p. 1926-1936, 2013.
- POORE, E. A.; SLIFKA, D. K.; RAUÉ, H. P.; THOMAS, A.; HAMMARLUND, E.; QUINTEL, B. K.; TORREY, L. L.; SLIFKA, A. M.; RICHNER, J. M.; DUBOIS, M. E.; JOHNSON, L. P.; DIAMOND, M. S.; SLIFKA, M. K.; AMANNA, I. J. Pre-clinical development of a hydrogen peroxide-inactivated West Nile virus vaccine. **Vaccine**, v. 35, n. 2, p. 283-292, 2017.
- PRETTO-GIORDANO, L. G.; MULLER, E. E.; KLESIUS, P.; SILVA, V. G. Efficacy of an experimentally inactivated *Streptococcus agalactiae* vaccine in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in Brazil. **Aquaculture Research**, v. 41, p. 1539-1544, 2010.
- SALVADOR, R.; MULLER, E.; FREITAS, J.; LEONHARDT, J.; PRETTO-GIORDANO, L.; DIAS, J. Isolamento e caracterização de *Streptococcus* spp. do grupo B em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) criadas em tanques rede e em viveiros de terra na região norte do Estado do Paraná, Brasil. **Ciência Rural**, v. 35, n. 6, p. 1374-1378, 2005.
- SAURABH, S.; SAHOO, P. K. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. **Aquaculture research**, v. 39, n. 3, p. 223-239, 2008.
- SCHWARTZMAN, J. A.; LYNCH, J. B.; FLORES, S.; ZHOU, L.; APICELLA, M. A.; YEW, J. Y.; RUBY, E. G. 2019. Acidic pH promotes lipopolysaccharide modification and alters colonization in a bacteria–animal mutualism. **Molecular microbiology**, v. 112, p. 1326-1338, 2019.
- SHELBY, R. A.; KLESIUS, P. H.; SHOEMAKER, C. A.; Evans, J. J. Passive immunization of tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), with anti-*Streptococcus iniae* whole sera. **Journal of Fish Diseases**, v. 25, p. 1-6, 2002.
- SOTO, E.; BROWN, N.; GARDENFORS, Z. O.; YOUNT, S.; REVAN, F.; FRANCIS, S.; KEARNEY, M. T.; CAMUS, A. Effect of size and temperature at vaccination on immunization and protection conferred by a live attenuated

- Francisella noatunensis* immersion vaccine in red hybrid tilapia. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 41, n. 2, p. 593-599, 2014.
- STAUFFER, F.; EL-BACHA, T.; DA POIAN, A. T. Advances in the development of inactivated virus vaccines. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, v. 1, p. 291-296, 2006.
- TAVARES, G. C.; PEREIRA, F. L.; BARONY, G. M.; REZENDE, C. P.; DA SILVA, W. M.; DE SOUZA, G. H.; VERANO-BRAGA, T.; DE CARVALHO, V.A.; LEAL, C.A.; FIGUEIREDO, H. C. Delineation of the pan-proteome of fish-pathogenic *Streptococcus agalactiae* strains using a label-free shotgun approach. **BMC Genomics**, v. 20, n. 1, p. 11, 2019.
- TORT, L.; BALASCH, J. C.; MACKENZIE, S. Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. **Inmunología**, v. 2, n. 3, 277-286, 2003.
- TU, F. P.; CHU, W. H.; ZHUANG, X. Y.; LU, C. P. Effect of oral immunization with *Aeromonas hydrophila* ghosts on protection against experimental fish infection. **Letters in Applied Microbiology**, v. 50, 13-17, 2010.
- YE, X.; LI, J.; LU, M.; DENG, G.; JIANG, X.; TIAN, Y.; QUAN, Y.; JIAN, Q. Identification and molecular typing of *Streptococcus agalactiae* isolated from pond-cultured tilapia in China. **Fisheries Science**, v. 77, n. 4, p. 623-632, 2011.
- ZHU, L.; YANG, Q.; HUANG, L.; WANG, K.; WANG, X.; CHEN, D.; LAI, W. Effectivity of oral recombinant DNA vaccine against *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 77, p. 77-87, 2017.

CAPÍTULO 2: Imunogenicidade de dois adjuvantes em uma vacina inativada com peróxido de hidrogênio contra *Streptococcus agalactiae* em tilápias-do-nilo.

RESUMO

O presente estudo comparou a eficácia de dois adjuvantes (Adjuvante incompleto de Freund e hidróxido de alumínio) em vacina contra *Streptococcus agalactiae* inativada com peróxido de hidrogênio. Tilápias-do-nilo foram distribuídas em oito grupos experimentais: G1: naïve; G2: controle, não vacinados; G3: controle não vacinados e desafiados; G4: controle hidróxido de alumínio e desafiados; G5: controle AIF e desafiados; G6: vacinados com bactéria total inativada com peróxido de hidrogênio e desafiados; G7: vacinados + hidróxido de alumínio e desafiados e G8: vacinados + AIF e desafiados. Vinte oito dias após vacinação, os grupos G3, G4, G5, G6, G7 e G8 foram anestesiados e desafiados com 0,1 mL de *S. agalactiae* e a mortalidade foi avaliada por 21 dias. Para a determinação de anticorpos IgM anti-*Streptococcus agalactiae*, hemograma, atividade respiratória dos leucócitos, proteínas séricas totais, albumina e globulina no soro foram adicionadas repetições não desafiadas. O PRS apresentou valores de 40,7%, 59,3% e 77,8% para os grupos G6, G7 e G8 respectivamente. Entre grupos no mesmo, níveis de anticorpos no grupo G7 foram significativamente maiores quando comparados ao grupo G3 quatro semanas após vacinação. Linfócitos apresentaram diminuição nos grupos vacinados em relação ao grupo G3, sugerindo migração de células brancas aos tecidos por causa da vacinação. Peixes com vacina com adjuvante AIF exibiram persistência da vacina na área de injeção. Os resultados demonstraram que a vacina inativada com peróxido de hidrogênio e administrada principalmente com AIF conferiu ótima proteção contra a infecção por *S. agalactiae*.

Palavras-chave: adjuvante incompleto de Freund, hidróxido de alumínio, vacina, eficácia.

INTRODUÇÃO

A aquicultura sustentável não é possível sem a prevenção de doenças, por conseguinte a vacinação tem se convertido na ferramenta mais importante (EVENSEN et al., 2016), sendo a amplamente aceita e eficaz método para controlar a infecção por *S. agalactiae* e prevenir mortalidade em massa de tilápias (LIU et al., 2016). As vacinas vivas atenuadas têm o risco da reversão da virulência e propagação no meio ambiente (Gudding et al., 1999). Por esse motivo, o uso antígenos inativados ou purificados são viáveis quando comparados às vacinas vivas atenuadas (MUNANG'ANDU et al., 2014).

Recentemente, novas metodologias para a produção de vacinas inativadas para camundongos foram desenvolvidas utilizando peróxido de hidrogênio (H₂O₂) para inativação de bactérias em estudos com *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (FAN et al., 2019) e vírus da raiva (ABD-ELGHAFAR et al., 2016). Adicionalmente, vacinas inativadas utilizando peróxido de hidrogênio foram testadas em camundongos e macacos rhesus contra o vírus do oeste do Nilo (PINTO et al., 2013; POORE et al., 2017), reportando alta eficácia e melhora da resposta imune. Fan et al. (2019) mencionaram que a inativação pelo H₂O₂ retém epítomos mais completos e exibe menor toxicidade quando comparado à formaldeído. Porém, para patógenos de peixes a técnica ainda não foi testada

As vacinas inativadas são menos imunogênicas quando comparadas às vacinas vivas (VINAY et al., 2014). O uso de adjuvantes é essencial para a melhora das vacinas, provendo adequada e longa proteção no caso das vacinas inativadas (BRUDESETH et al., 2013). Os adjuvantes são usados para a melhora da eficácia das vacinas, incrementando a magnitude da resposta imune adaptativa (COFFMAN et al., 2010; ZHENG et al., 2012; TAFALLA et al., 2014; DALMO et al., 2016), sendo classificados como facilitadores de sinal 1 e facilitadores de sinal 2 (SCHIJS, 2001).

Entre os adjuvantes de sinal 1 mais utilizados encontram-se as emulsões oleosas (TAFALLA et al., 2014). As emulsões oleosas incluem o adjuvante

completo de Freund (ACF), o adjuvante incompleto de Freund (AIF) e Montanide, entre os mais utilizados na aquicultura (DALMO et al., 2016).

O AIF é uma emulsão de água em óleo (A/O), estimulando a resposta imune humoral em tilápia vermelha quando usado em vacinas inativadas incorporadas na ração contra *Streptococcus agalactiae* (FIRDAUS-NAWI et al., 2013) e em linguado japonês quando usado em vacinas inativadas multivalentes contra *Edwardsiella tarda* e *Vibrio anguillarum* obtendo PRS de 70.9% e 67.4%, respectivamente (SUN et al., 2011).

Os adjuvantes de sinal 2 ativam citocinas e regulam moléculas co-estimulantes durante a fase de reconhecimento de antígenos incrementando a resposta imune (DALMO et al., 2016). Entre os adjuvantes de sinal 2, encontram-se os compostos de alumínio, hidróxido de alumínio e fosfato de alumínio (DALMO et al., 2016). Contudo, poucos estudos são feitos com adjuvantes de alumínio em vacinas em peixes. Jiao et al. (2010) encontraram PRS de 53,0% e 69,0%, além de níveis elevados de títulos de anticorpos testando vacina contra *Edwardsiella tarda* em linguado japonês, utilizando adjuvantes de hidróxido e fosfato alumínio.

Assim, esta proposta teve como objetivo avaliar o efeito de dois adjuvantes (AIF e hidróxido de alumínio) na eficácia de uma vacina contra *Streptococcus agalactiae* inativada com peróxido de hidrogênio. A eficácia vacinal foi determinada mediante a porcentagem relativa de sobrevivência (PRS) e níveis de anticorpos IgM anti-*Streptococcus agalactiae*.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e condições experimentais

Foram utilizadas 520 tilápias-do-nilo, adquiridas de piscicultura comercial sem histórico de mortalidade por estreptococos. Os animais foram aclimatados por seis semanas e mantidos nas mesmas condições descritas no capítulo 1. Durante o experimento, a temperatura foi mantida com média de $28,19 \pm 0,54$

°C. Os valores médios mantiveram-se dentro da faixa considerada adequada para qualidade da água para esta espécie (EL-SAYED, 2019).

O desenvolvimento do experimento foi de acordo aos princípios éticos envolvidos na experimentação animal pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, SP (Nº de protocolo: 014772/19).

Delineamento experimental

Após o período de aclimação de seis semanas e jejum prévio de 24 h, 520 tilápias-do-nylo com peso médio de $22,39 \pm 1,71$ g e comprimento total de $8,24 \pm 0,16$ cm, foram utilizadas e distribuídas aleatoriamente em oito grupos experimentais em duplicata (20 peixes cada) e G1 e G2 apresentaram só 20 peixes. G1: naïve, não vacinados nem desafiados; G2: controle, não vacinados (injetados com PBS estéril) nem desafiados (injetados com PBS estéril); G3: controle não vacinados (injetados com PBS estéril) e desafiados; G4: controle hidróxido de alumínio e desafiados; G5: controle AIF e desafiados; G6: vacinados com bactéria total inativada com peróxido de hidrogênio e desafiados; G7: vacinados + hidróxido de alumínio e desafiados e G8: vacinados + AIF e desafiados (Figura 1).

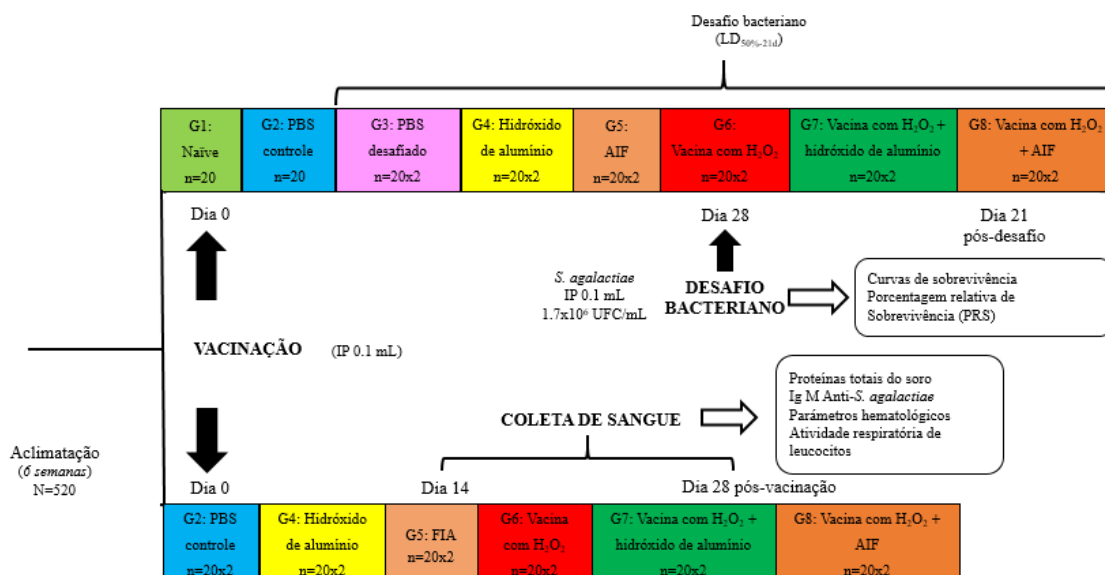


Figura 1. Diagrama do desenho experimental. 28 dias após vacinação os grupos G3, G4, G5, G6, G7 e G8 foram desafiados com *S. agalactiae* e monitorados por 21 dias. Duas repetições foram adicionadas nos grupos G2, G4, G5; G6, G7 e G8 para a determinação do hemograma, atividade respiratória dos leucócitos, proteínas séricas totais, albumina e globulina no soro e anticorpos IgM anti-*Streptococcus agalactiae*.

Os diferentes grupos experimentais foram anestesiados com Benzocaina (100 mg.L⁻¹) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU) (Neiffer & Stamper, 2009) e posteriormente vacinados via intraperitoneal com 0,1 mL das vacinas. No caso dos grupos controles G4 e G5 foram injetados com o mesmo volume de hidróxido de alumínio e adjuvante incompleto de Freund, respectivamente. Os grupos controles G2 e G3 foram injetados só com PBS estéril. Vinte oito dias após vacinação, os grupos G3, G4, G5, G6, G7 e G8 foram anestesiados e desafiados com 0,1 mL de dose de uma cepa homologa de *S. agalactiae* calculada previamente para produzir 50% de mortalidade. No caso do grupo controle G2 foi injetado com o mesmo volume de PBS estéril (falso desafio). Durante o período de infecção, o fluxo contínuo da água foi interrompido, e as variáveis físico-químicas da água foram monitoradas diariamente.

Após o desafio os peixes foram observados diariamente durante 21 dias para determinar a porcentagem relativa de sobrevivência (PRS). Foram anotados os sinais clínicos e a mortalidade duas vezes ao dia. Amostras de tecidos (cérebro, fígado, rim cranial e baço) de animais moribundos, mortes recentes e dos sobreviventes foram coletadas para reisolamento bacteriano. A PRS foi calculada segundo a fórmula descrita por Amend (1981):

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

Para a determinação do hemograma, atividade respiratória dos leucócitos, proteínas séricas totais, albumina e globulina no soro e anticorpos IgM anti-*Streptococcus agalactiae* foram adicionadas mais duas repetições (20 peixes cada) nos grupos G2, G4, G5, G6, G7 e G8, as quais não foram desafiadas. Amostras de sangue foram coletadas destes últimos grupos aos 14 e 28 dias após a vacinação.

Obtenção da bactéria

No presente trabalho foi utilizada a bactéria *Streptococcus agalactiae*, isolada, identificada e classificada sorologicamente, além de confirmação molecular, segundo as metodologias descritas no capítulo 1.

Preparação das vacinas

Vacina inativada com peróxido de hidrogênio

A vacina foi elaborada segundo a metodologia descrita por Amanna et al., (2012) com modificações e descritas no capítulo 1. O inóculo padronizado foi equivalente a $2,6 \times 10^{10}$ UFC.mL⁻¹, DO_{540nm} de 1,260. A inativação e esterilidade da vacina foram realizadas segundo as técnicas microbiológicas supracitadas também no capítulo 1. Finalmente, foi armazenada em frascos estéreis a 4 °C até o momento da vacinação.

Vacina inativada com peróxido de hidrogênio contendo adjuvante incompleto de Freund

Previamente, foi preparado uma vacina inativada com peróxido de hidrogênio segundo as técnicas supracitadas, equivalente a $5,2 \times 10^{10}$ UFC.mL⁻¹. A seguir, a vacina foi emulsificada com AIF (Sigma-Aldrich, F5506, St. Louis, EEUU) na proporção 1:1. Finalmente, foi armazenada em frascos estéreis a 4 °C até o momento da vacinação.

Vacina inativada com peróxido de hidrogênio contendo com hidróxido de alumínio

Previamente, foi preparado uma vacina inativada com peróxido de hidrogênio segundo as técnicas supracitadas, a qual foi equivalente a $5,2 \times 10^{10}$ UFC.mL⁻¹. A seguir, a vacina foi combinada com hidróxido de alumínio (Sigma-Aldrich, 239186, St. Louis, EEUU) a 0.5 % (w/v) na proporção 1:1. Finalmente, foi armazenada em frascos estéreis a 4 °C até o momento da vacinação.

Desafio experimental

O desafio foi realizado com a mesma cepa utilizada na produção das vacinas, utilizando dose letal 50% (DL_{50-21dias}) previamente calculada. A bactéria foi preparada utilizando as técnicas microbiológicas supracitadas no capítulo 1, até obter um inóculo padronizado equivalente a $1,7 \times 10^6$ UFC.mL⁻¹, DO_{540nm} de 0,575.

Coleta de amostras

Os peixes das repetições não desafiadas foram anestesiados, sob as mesmas condições descritas no capítulo 1. Amostras de sangue (aproximadamente 0,8 mL) da veia caudal de sete peixes por grupo foram coletadas com seringas contendo EDTA a 10,0% ou não aos 14 e 28 dias após a vacinação e foram colocadas e homogeneizadas em microtubos de 1,5 mL para os ensaios hematológicos e atividade respiratória dos leucócitos e em microtubos sem anticoagulante para a obtenção de soro, seguindo estas últimas amostras o mesmo protocolo descrito no capítulo 1, para posterior medição dos níveis de anticorpos anti-*Streptococcus agalactiae* e as variáveis bioquímicas.

Determinação de anticorpos IgM anti-Streptococcus agalactiae

A detecção de anticorpos anti-*Streptococcus agalactiae* foi utilizando o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), seguindo a metodologia descrita por Shelby et al. (2002) e Soto et al. (2014) com algumas modificações detalhadas no capítulo 1.

Determinação do hemograma

A contagem das células totais foi feita em câmara de Neubauer usando a solução de Natherrick (Impralab, Ribeirão Preto, Brasil). Para a contagem diferencial de leucócitos (linfócitos, monócitos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos) foram confeccionados esfregaços sanguíneos sem o uso de anticoagulantes, que posteriormente foram corados pancromaticamente pelo método de Rosenfeld (1947), e contados 200 leucócitos em cada extensão sanguínea, e foi estabelecido o percentual de cada componente celular. No mesmo esfregaço sanguíneo usado na diferencial de leucócitos, foi quantificado o número de leucócitos e trombócitos totais por μL , utilizando-se as seguintes fórmulas:

Leucócitos totais = (número de leucócitos na extensão x número de células totais contadas na câmara Neubauer) / 2000 células totais contadas na extensão.

Trombócitos totais = (número de trombócitos na extensão x número de células totais contadas na câmara Neubauer) / 2000 células totais contadas na extensão.

Finalmente, a contagem de eritrócitos foi feita restando das células totais sanguíneas os valores totais de leucócitos e trombócitos. O hematócrito ou empacotado do volume celular (PCV) foi determinado pela técnica do microhematócrito de acordo com Goldenfarb *et al.*, 1971. A hemoglobina foi determinada segundo o método pelo método de cianeto de hemoglobina (Drabkin e Austin, 1935) utilizando o kit comercial (Labtest, Minas Gerais, Brasil), seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, tubos de vidro contendo reagente de Drabkin (5 mL) foram adicionados com 0.02 mL dos padrões de hemoglobina e das amostras de sangue total. Água destilada foi usada como branco. Após serem homogeneizados e deixados por 5 min, foi aferida a absorbância das amostras e do padrão contra o branco a 540 nm. Finalmente a taxa de hemoglobina foi calculada de acordo com a seguinte fórmula: Hemoglobina = (densidade ótica das amostras de soro/densidade ótica do padrão) x 10g/dL.

A partir da determinação do hematócrito, contagem de eritrócitos e taxa de hemoglobina total foram determinados os índices hematimétricos, utilizando-se as seguintes formulações estabelecidas por Wintrobe (1934):

Volume corpuscular médio (VCM) = [hematócrito (%) / número de eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$)] = fL

Hemoglobina corpuscular média (HCM) = [Hemoglobina (g/dL) / número de eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$)] = pg/célula

Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) = [Hemoglobina (g/dL) / hematócrito (%)] = g/dL

Atividade respiratória de leucócitos no sangue

A atividade respiratória dos leucócitos foi determinada segundo a metodologia de Biller-Takahashi et al., (2013). Brevemente, 100 μL de sangue heparinizado foi adicionado em 100 μL do corante 0,2% NBT (nitrobluetetrazolium) (Sigma-Aldrich, N5514, St. Louis, EEUU), cuja mistura foi incubada por 30 minutos a 25 ° C na escuridão. A seguir, 50 μL da mistura foi adicionada em 1000 μL de DMF (N, N- dimetilformamida) (Sigma-Aldrich, D4551, St. Louis, EEUU) e posteriormente centrifugada a 3000g por 5 minutos em tubos de vidro. Finalmente, o sobrenadante foi transferido para cubetas de quartzo e a densidade óptica da solução foi determinada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm.

Determinação de proteína, albumina e globulina sérica total

As proteínas séricas totais foram determinadas pelo método Biuret, utilizando o kit comercial (Labtest, Minas Gerais, Brasil), seguindo as instruções do fabricante, as quais são detalhadas no capítulo 1. A albumina total foi determinada pelo método de verde de bromocresol, utilizando kit comercial (Labtest, Minas Gerais, Brasil), seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, adicionou-se o reagente de cor (1 mL) aos tubos contendo o padrão de albumina e as amostras de soro. A seguir, os tubos foram misturados e após 2 min foi aferida a absorbância das amostras e do padrão contra o branco

a 630 nm e finalmente as albuminas do soro foram calculadas de acordo com a seguinte formula: Albumina total = (densidade ótica das amostras de soro/densidade ótica do padrão) x3.8g/dL. A determinação dos valores de globulinas foi realizada através da diferença entre proteínas totais e albumina.

Análises estatísticas

Foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, San Diego, EEUU). Primeiro, foi testada a normalidade (teste Shapiro-Wilk) e posteriormente foi feita análise de variância (ANOVA) com teste post-hoc de Tukey ou Kruskal Wallis com teste post-hoc de Dunn para identificar diferenças estatísticas entre os grupos e teste t de Student ou teste Mann Whitney U para identificar diferenças estatísticas entre os tempos de amostragem. Finalmente todos os resultados foram expressos em forma de média $\pm$ desvio padrão. As curvas de sobrevida foram avaliadas pelos testes de Kaplan-Meier, Log-rank e Bonferroni.

RESULTADOS

Os grupos G1 e G2 não apresentaram mortalidade durante o experimento. As mortalidades nos grupos controles desafiados (G3, G4 e G5) começaram aos 6, 5 e 2 dias, respectivamente, após o desafio; e nos grupos vacinados e desafiados começaram aos 5 dias (G6 e G7) e aos 4 dias (G8). Os sinais clínicos nos grupos controles desafiados incluíram coloração escura, exoftalmia, opacidade da córnea, anorexia, letargia e natação errática (rodopio). Nos grupos vacinados os sinais clínicos somente incluíram coloração escura, anorexia e letargia.

A porcentagem de sobrevida foi 60,0% no grupo G6, 72,5% no G7, 85,0% no G8, 27,5% no G4, 22,5% no G5, 32,5% no G3 e 100,0% nos grupos G2 e G1 (Figura 2). Os resultados amostraram uma porcentagem de sobrevida maior nos grupos vacinados quando comparados aos grupos controle desafiados (G3, G4 e G5). Adicionalmente, houve diferenças significativas ($P < 0.05$) entre os dois grupos de vacinas com adjuvantes (G7 e G8) quando comparados ao controle não vacinado (G3). No entanto, não se evidenciou diferença significativa ($P >$

0.05) entre o grupo vacinado com bactéria total inativada (G6) quando comparado ao grupo controle não vacinado (G3). Na avaliação da sobrevivência, as três vacinas (G6, G7 e G8) não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si. A PRS foi calculada 21 dias após o desafio e apresentou valores de 40,7%, 59,3% e 77,8% para os grupos G6, G7 e G8 respectivamente (Tabela 1).

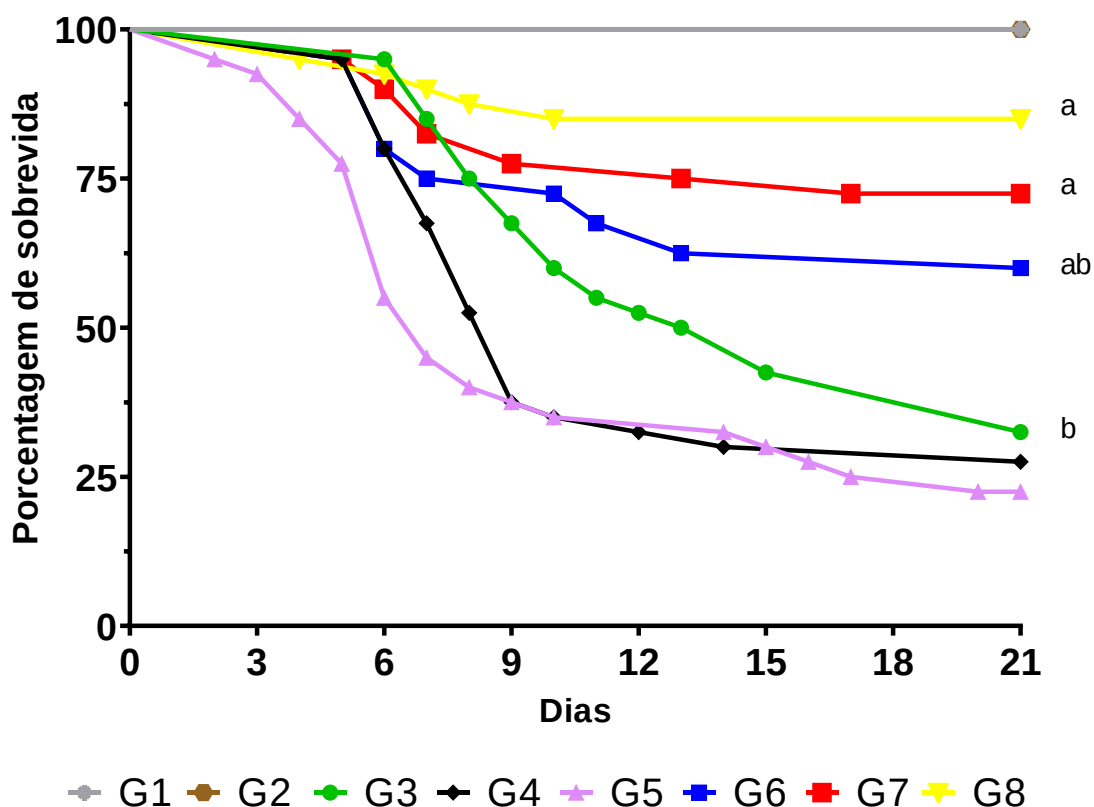


Figura 2. Taxa de sobrevivência (Kaplan-Meier) de tilápias-do-nilo. G1: controle naïve, não vacinados nem desafiados; G2: controle, não vacinados (injetados com PBS estéril) nem desafiados (injetados com PBS estéril); G3: controle não vacinados (injetados com PBS estéril) e desafiados; G4: controle não vacinados (injetados com hidróxido de alumínio em combinação com PBS estéril) e desafiados; G5: controle não vacinados (injetados com adjuvante incompleto de Freund em combinação com PBS estéril) e desafiados; G6: vacinados com bactéria total inativada com peróxido de hidrogênio e desafiados; G7: vacinados em combinação com hidróxido de alumínio e desafiados e G8: vacinados em combinação com adjuvante incompleto de Freund e desafiados. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre grupos ($P < 0.05$).

Tabela 1. Desenho experimental, mortalidade, taxa de sobrevivência e PRS em tilápia-do-nilo vacinados contra *S. agalactiae* inativada com peróxido de hidrogênio, dois diferentes adjuvantes e as suas combinações.

Grupo	Dose de desafio (UFC mL ⁻¹)	n	Mortalidade	Taxa de sobrevivência (%)	PRS (%)
G1	-	20	0	100.0	-
G2	-	20	0	100.0	-
G3	1,65x10 ⁶	40	27	32.5	-
G4	1,65x10 ⁶	40	29	27.5	-
G5	1,65x10 ⁶	40	31	22.5	-
G6	1,65x10 ⁶	40	16	60.0	40.7
G7	1,65x10 ⁶	40	11	72.5	59.3
G8	1,65x10 ⁶	40	6	85.0	77.8

No teste de ELISA para a determinação de anticorpos IgM anti-*Streptococcus agalactiae* (Figura 3), entre grupos no mesmo tempo, os níveis de anticorpos foram significativamente maiores ($P < 0.05$) no grupo vacinado com hidróxido de alumínio (G7) quando comparado ao grupo controle não vacinado (G2) quatro semanas após vacinação. No entanto, não houve diferença significativa duas semanas após vacinação. Adicionalmente, entre tempos no mesmo grupo, os resultados evidenciaram incrementos significativos no caso de G4 e G6 às duas semanas após vacinação quando comparados às quatro semanas após vacinação.

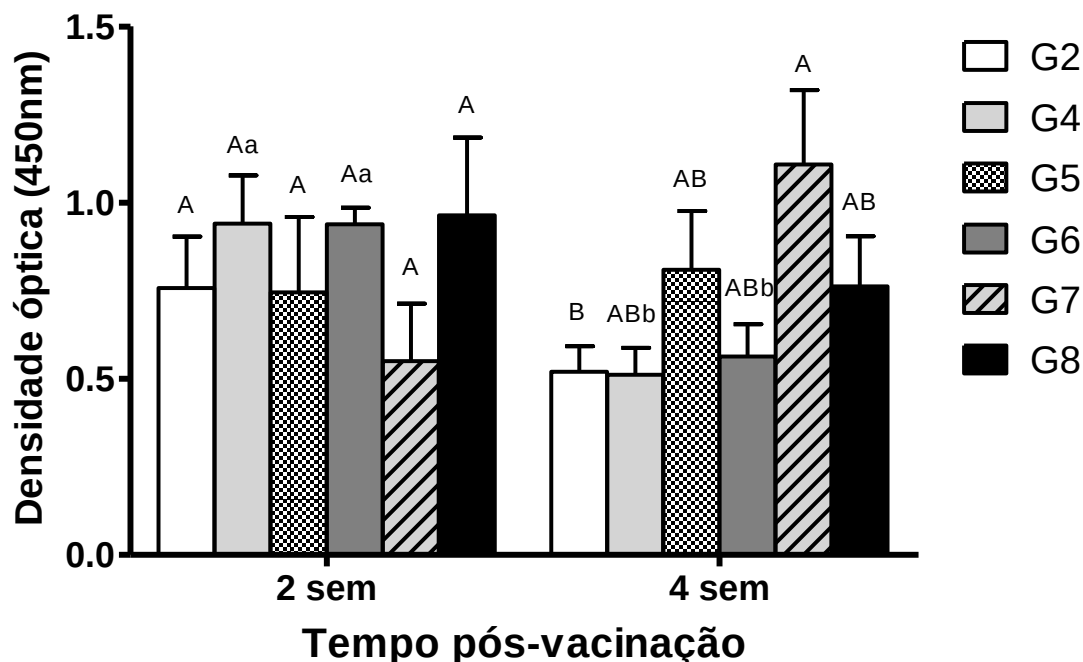


Figura 3. Detecção de anticorpos IgM anti-*Streptococcus agalactiae* em tilápias-do-nilo vacinadas com e sem adjuvantes (N=5). As barras verticais representam o erro padrão da média. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre grupos no mesmo tempo e letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre tempos (2 e 4 semanas) no mesmo grupo ($P < 0.05$). G2: controle não vacinados (injetados com PBS estéril); G4: controle não vacinados (injetados com hidróxido de alumínio em combinação com PBS estéril); G5: controle não vacinados (injetados com AIF em combinação com PBS estéril); G6: vacinados com bactéria total inativada com peróxido de hidrogênio; G7: vacinados em combinação com hidróxido de alumínio e G8: vacinados em combinação com AIF.

No hemograma, não se registraram diferenças significativas ($P > 0.05$) entre grupos vacinados quando comparados ao controle. Além disso, houve diferença significativa entre grupos no mesmo tempo, revelando valores significativamente maiores para hemoglobina no grupo G6 quando comparado ao grupo G7 e valores significativamente maiores para concentração de hemoglobina corpuscular média no grupo G5 quando comparado ao grupo G7 duas semanas após vacinação, mas não se registrou diferença significativa entre grupos no mesmo tempo quatro semanas após vacinação. Adicionalmente, entre tempos no mesmo grupo, registrou-se valores significativamente maiores duas semanas após vacinação para hemoglobina no caso de G5, G7 e G8, para volume corpuscular médio no caso de G7 e para concentração de hemoglobina corpuscular média no caso de G2 e G7 em relação às quatro semanas após vacinação (Tabela 2).

Tabela 2. Série vermelha (média $\pm$ erro padrão) de tilápia-do-nilo duas semanas e quatro semanas após vacinação contra *S. agalactiae*.

Grupo	G2	G4	G5	G6	G7	G8
Duas semanas após vacinação						
Hemoglobina (g dL⁻¹)	6.65 $\pm$ 0.47AB	6.48 $\pm$ 0.48AB	6.34 $\pm$ 0.63ABb	6.97 $\pm$ 1.04A	5.57 $\pm$ 0.60Bb	5.97 $\pm$ 0.70ABb
Hematócrito (%)	31.57 $\pm$ 4.32	33.50 $\pm$ 1.47	28.86 $\pm$ 7.55	33.42 $\pm$ 5.45	34.60 $\pm$ 6.83	30.80 $\pm$ 4.30
Eritrócitos totais (x10⁶ uL⁻¹)	2.02 $\pm$ 0.33	1.82 $\pm$ 0.18	1.60 $\pm$ 0.90	1.45 $\pm$ 0.48	1.55 $\pm$ 0.38	2.18 $\pm$ 0.82
VCM (fL)	165.24 $\pm$ 33.83	184.66 $\pm$ 11.62	228.27 $\pm$ 124.43	266.47 $\pm$ 160.58	226.02 $\pm$ 22.03a	152.97 $\pm$ 43.79
HCM (pg/cel)	34.86 $\pm$ 3.39	35.86 $\pm$ 4.93	61.12 $\pm$ 40.76	54.14 $\pm$ 24.57	36.90 $\pm$ 4.70	29.52 $\pm$ 7.54
CHCM (g dL⁻¹)	19.65 $\pm$ 1.10ABb	19.38 $\pm$ 1.92AB	23.63 $\pm$ 2.73A	21.73 $\pm$ 5.73AB	16.37 $\pm$ 1.87Bb	19.47 $\pm$ 1.31AB
Quatro semanas após vacinação						
Hemoglobina (g dL⁻¹)	7.53 $\pm$ 0.85	7.25 $\pm$ 0.71	7.43 $\pm$ 0.46a	7.97 $\pm$ 2.04	6.85 $\pm$ 0.84a	7.32 $\pm$ 0.61a
Hematócrito (%)	33.67 $\pm$ 2.62	35.50 $\pm$ 3.57	32.64 $\pm$ 1.75	34.50 $\pm$ 2.55	33.86 $\pm$ 2.48	35.79 $\pm$ 4.85
Eritrócitos totais (x10⁶ uL⁻¹)	1.91 $\pm$ 0.32	1.92 $\pm$ 0.46	1.96 $\pm$ 0.37	1.80 $\pm$ 0.43	2.14 $\pm$ 0.52	1.83 $\pm$ 0.50
VCM (fL)	173.30 $\pm$ 22.41	187.46 $\pm$ 44.53	171.98 $\pm$ 36.65	198.60 $\pm$ 40.30	164.57 $\pm$ 34.75b	208.41 $\pm$ 62.71
HCM (pg)	40.01 $\pm$ 5.09	38.75 $\pm$ 10.11	38.92 $\pm$ 7.30	45.46 $\pm$ 11.70	33.04 $\pm$ 6.45	42.68 $\pm$ 12.71
CHCM (g dL⁻¹)	22.35 $\pm$ 1.51 ^a	20.53 $\pm$ 0.94	22.77 $\pm$ 1.33	23.11 $\pm$ 5.80	20.18 $\pm$ 1.32a	20.77 $\pm$ 3.44

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre grupos no mesmo tempo e letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre tempos no mesmo grupo ($P < 0.05$). VCM- Volume Corpuscular Médio, HCM-Hemoglobina Corpuscular Média, CHCM-Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média. G2: controle não vacinados (injetados com PBS estéril); G4: controle não vacinados (injetados com hidróxido de alumínio em combinação com PBS estéril); G5: controle não vacinados (injetados com AIF em combinação com PBS estéril); G6: vacinados com bactéria total inativada com peróxido de hidrogênio; G7: vacinados em combinação com hidróxido de alumínio e G8: vacinados em combinação com AIF.

No leucograma, o número de linfócitos dos grupos G5, G6, G7 e G8 foram significativamente menores ($P < 0.05$) (Figura 4) quando comparados ao controle (G2), duas semanas após vacinação. Além disso, entre grupos no mesmo tempo, o grupo G4 apresentou valores significativamente maiores quando comparado ao grupo G6 para leucócitos totais, valores significativamente maiores no grupo G2 quando comparado aos grupos G5, G6, G7 e G8 para linfócitos, e valores significativamente menores no grupo G6 quando comparado aos grupos G7 e G8 para monócitos duas semanas após vacinação. Adicionalmente, o número de granulócitos e monócitos no grupo G6 em relação ao controle (G2) quatro semanas após vacinação foram significativamente maiores. O número de leucócitos totais no grupo G4 foram significativamente maiores quando comparado aos grupos G5 e G8, granulócitos no grupo G6 foram significativamente maiores quando comparado aos grupos G2, G5, G7 e G8, linfócitos no grupo G4 foram significativamente maiores quando comparados aos grupos G6 e G8 e finalmente monócitos no grupo G6 foram significativamente maiores quando comparado aos grupos G2, G4, G5, G7 e G8 quatro semanas após vacinação. Entre tempos no mesmo grupo, registrou-se valores significativamente menores às duas semanas após vacinação no caso de G6 e G7 quando comparado às quatro semanas após vacinação para leucócitos totais e linfócitos. Para valores de granulócitos às duas semanas após vacinação, no caso do grupo G6 e G7, os valores foram significativamente menores e maiores respectivamente quando comparados às quatro semanas após vacinação. Os valores de monócitos nos grupos G2, G4, G5, G7 e G8 as duas semanas foram significativamente maiores quando comparados às quatro semanas após vacinação. Finalmente os valores de trombócitos nos grupos G2, G4 e G8 às duas semanas foram significativamente maiores quando comparados às quatro semanas após vacinação.

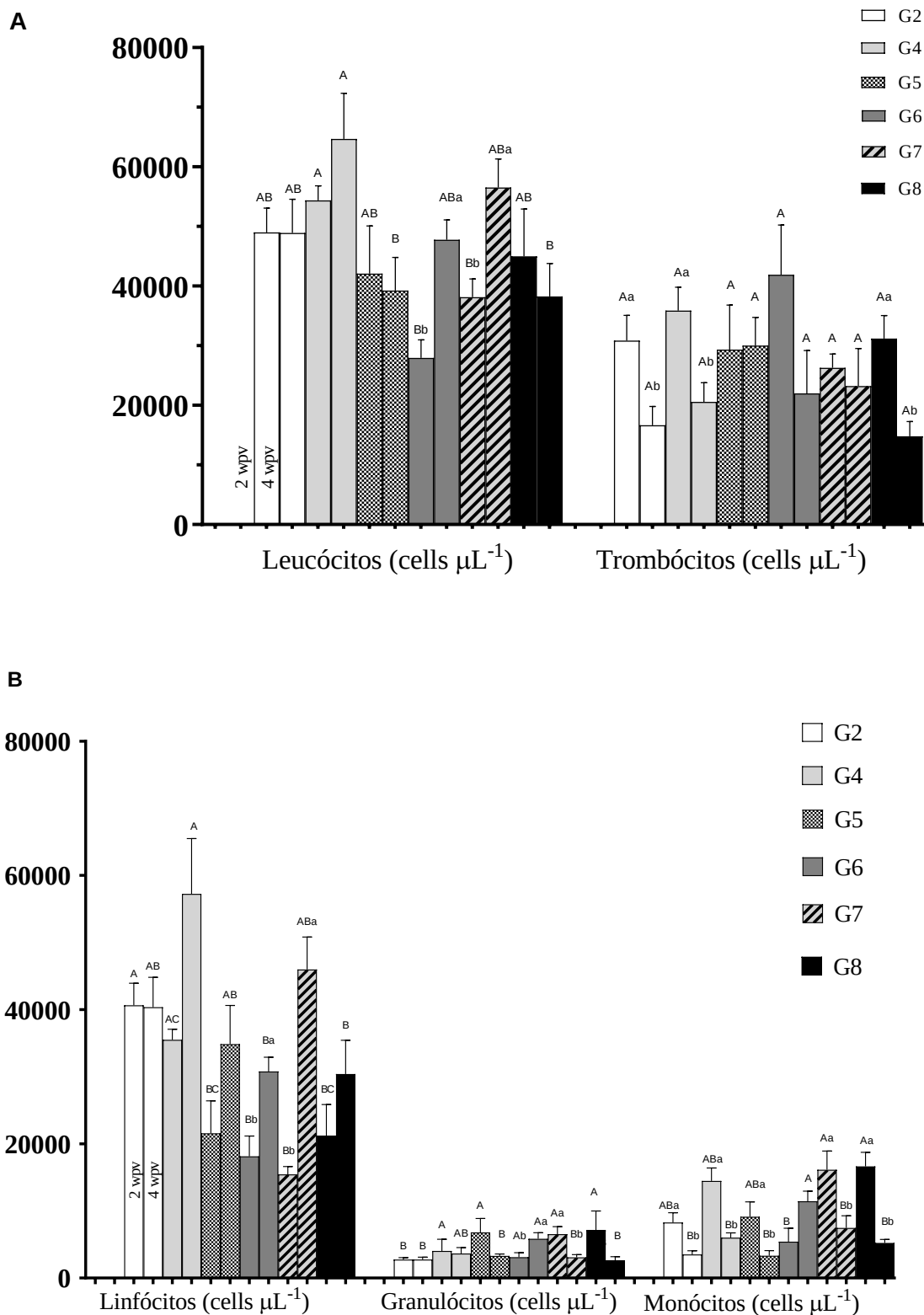


Figura 4. Série branca (média $\pm$ erro padrão) de tilápia-do-nilo duas semanas e quatro semanas após vacinação contra *S. agalactiae*. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre grupos no mesmo tempo e letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre tempos no mesmo grupo ($P < 0.05$). A. Leucócitos e trombócitos. B. Linfócitos, monócitos e granulócitos (neutrófilos, células granulocíticas especiais, basófilos e eosinófilos). G2: controle não vacinados (injetados com PBS estéril); G4: controle não vacinados (injetados com hidróxido de alumínio em combinação com PBS estéril); G5: controle não vacinados (injetados com AIF em combinação com PBS estéril); G6: vacinados com bactéria total inativada com peróxido de hidrogênio; G7: vacinados em combinação com hidróxido de alumínio e G8: vacinados em combinação com AIF.

No teste de atividade respiratória de leucócitos (Figura 5), entre grupos no mesmo, houve diferença significativa ($P < 0.05$) entre os grupos G2, G4, G6 e G7 quando comparados aos grupos G5 e G8 quatro semanas após vacinação, sendo observado nos primeiros uma maior atividade respiratória. No entanto, não houve diferença significativa duas semanas após vacinação. Adicionalmente, entre tempos no mesmo grupo, os resultados evidenciaram uma diminuição significativa às quatro semanas nos grupos G5 e G8 quando comparados às duas semanas.

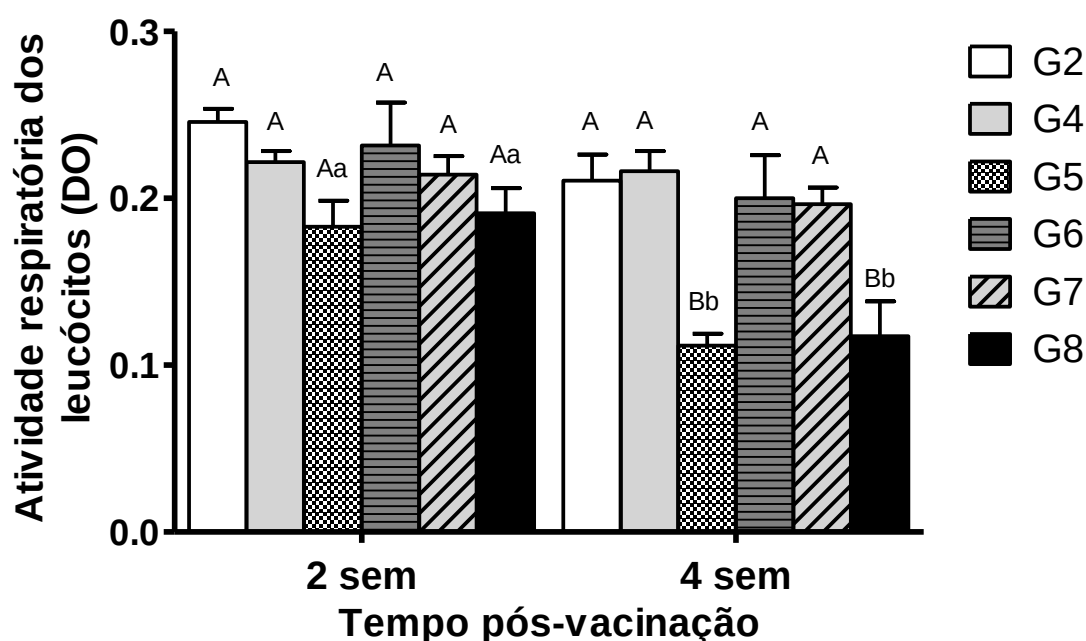


Figura 5. Atividade respiratória dos leucócitos sanguíneos após vacinação. As barras verticais representam o erro padrão da média. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre grupos no mesmo tempo e letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre tempos (2 e 4 semanas) no mesmo grupo ($P < 0.05$). G2: controle não vacinados (injetados com PBS estéril); G4: controle não vacinados (injetados com hidróxido de alumínio em combinação com PBS estéril); G5: controle não vacinados (injetados com AIF em combinação com PBS estéril); G6: vacinados com bactéria total inativada com peróxido de hidrogênio; G7: vacinados em combinação com hidróxido de alumínio e G8: vacinados em combinação com AIF.

Na avaliação das proteínas totais do soro, entre grupos no mesmo tempo, os valores foram significativamente maiores ($P < 0.05$) no grupo G4 quando comparado ao grupo G7 duas semanas após vacinação e significativa menores entre no grupo G4 quando comparado ao grupo G7 quatro semanas após vacinação. Adicionalmente, entre tempos no mesmo grupo, os valores no grupo G4 às duas semanas foram significativamente maiores quando comparados às

quatro semanas (Tabela 3). Os níveis de albumina no soro, entre grupos no mesmo tempo, foram significativamente menores ($P < 0.05$) no grupo G6 quando comparado aos grupos G8 e G2, e significativamente menores no grupo G5 quando comparado ao grupo G8 duas semanas após vacinação. Adicionalmente, entre tempos no mesmo grupo, os valores no grupo G6 e G8 às duas semanas incrementaram e diminuíram, respectivamente, quando comparado às quatro semanas após vacinação (Tabela 3). Os níveis de globulina no soro, entre grupos no mesmo tempo, foram significativamente menores ($P < 0.05$) no grupo G2 quando comparado ao grupo G4 duas semanas após vacinação. As quatro semanas após vacinação, o grupo G4 apresentou valores menores quando comparado ao grupo G7. Adicionalmente, entre tempos no mesmo grupo, níveis de globulinas nos grupos G2 e G4 às duas semanas incrementaram e diminuíram, respectivamente, quando comparados às quatro semanas após vacinação (Tabela 3). A relação albumina-globulina, entre grupos no mesmo tempo, foi significativamente menor ($P < 0.05$) no grupo G6 quando comparado aos grupos G2 e G8 duas semanas após vacinação. Adicionalmente, entre tempos no mesmo grupo, a relação nos grupos G2 e G8 às duas semanas foi significativamente maior quando comparado às quatro semanas após vacinação. Contudo, no caso do grupo G6, a relação incrementou entre as duas e quatro semanas após vacinação (Tabela 3).

Tabela 3. Variáveis bioquímicas (média $\pm$ erro padrão) de tilápia-do-nylo duas semanas e quatro semanas após vacinação contra *S. agalactiae*.

Grupo	G2	G4	G5	G6	G7	G8
Duas semanas após vacinação						
Proteínas totais (gdL⁻¹)	2.80 $\pm$ 0.23AB	3.45 $\pm$ 0.43Aa	2.76 $\pm$ 0.44AB	2.76 $\pm$ 0.30AB	2.50 $\pm$ 0.19B	3.03 $\pm$ 0.48AB
Albumina (gdL⁻¹)	0.90 $\pm$ 0.18AC	0.70 $\pm$ 0.17AB	0.70 $\pm$ 0.18BC	0.53 $\pm$ 0.10Bb	0.63 $\pm$ 0.09AB	0.97 $\pm$ 0.19Aa
Globulinas (gdL⁻¹)	1.90 $\pm$ 0.13Bb	2.75 $\pm$ 0.59Aa	2.06 $\pm$ 0.46AB	2.23 $\pm$ 0.22AB	1.87 $\pm$ 0.12AB	2.06 $\pm$ 0.33AB
Relação A:G (gdL⁻¹)	0.48 $\pm$ 0.10Aa	0.27 $\pm$ 0.10AB	0.35 $\pm$ 0.12AB	0.24 $\pm$ 0.03Bb	0.34 $\pm$ 0.04AB	0.47 $\pm$ 0.06Aa
Quatro semanas após vacinação						
Proteínas totais (gdL⁻¹)	2.98 $\pm$ 0.28AB	2.62 $\pm$ 0.30Bb	2.94 $\pm$ 0.31AB	2.77 $\pm$ 0.33AB	3.24 $\pm$ 0.50A	3.09 $\pm$ 0.15AB
Albumina (gdL⁻¹)	0.77 $\pm$ 0.06	0.63 $\pm$ 0.07	0.72 $\pm$ 0.11	0.68 $\pm$ 0.11a	0.82 $\pm$ 0.28	0.76 $\pm$ 0.11b
Globulinas (gdL⁻¹)	2.21 $\pm$ 0.24ABa	1.99 $\pm$ 0.26Bb	2.23 $\pm$ 0.20AB	2.09 $\pm$ 0.24AB	2.42 $\pm$ 0.37A	2.33 $\pm$ 0.16AB
Relação A:G (gdL⁻¹)	0.35 $\pm$ 0.04b	0.32 $\pm$ 0.05	0.32 $\pm$ 0.03	0.33 $\pm$ 0.04a	0.35 $\pm$ 0.12	0.33 $\pm$ 0.06b

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre grupos no mesmo tempo e letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre tempos no mesmo grupo ($P < 0.05$). G2: controle não vacinados (injetados com PBS estéril); G4: controle não vacinados (injetados com hidróxido de alumínio em combinação com PBS estéril); G5: controle não vacinados (injetados com AIF em combinação com PBS estéril); G6: vacinados com bactéria total inativada com peróxido de hidrogênio; G7: vacinados em combinação com hidróxido de alumínio e G8: vacinados em combinação com AIF.

As observações macroscópicas durante abertura da cavidade abdominal (Figura 6) evidenciaram depósitos do adjuvante na superfície do esôfago posterior, fígado, vesícula biliar e intestino nos 14 e 28 dias após vacinação nos grupos G5 (controle não vacinados e injetados com AIF em combinação com PBS estéril) e G8 (vacinados em combinação com AIF). Os depósitos de adjuvante apresentavam coloração esbranquiçada, consistência oleosa, tamanho de 1 a 5 mm e formato oval ou redondo. Adicionalmente, aderências leves na cavidade abdominal foram observadas nos mesmos grupos. Os grupos G4 (controle não vacinados e injetados com hidróxido de alumínio em combinação com PBS estéril) e G7 (vacinados em combinação com hidróxido de alumínio) não apresentaram depósitos de adjuvantes nem aderências.

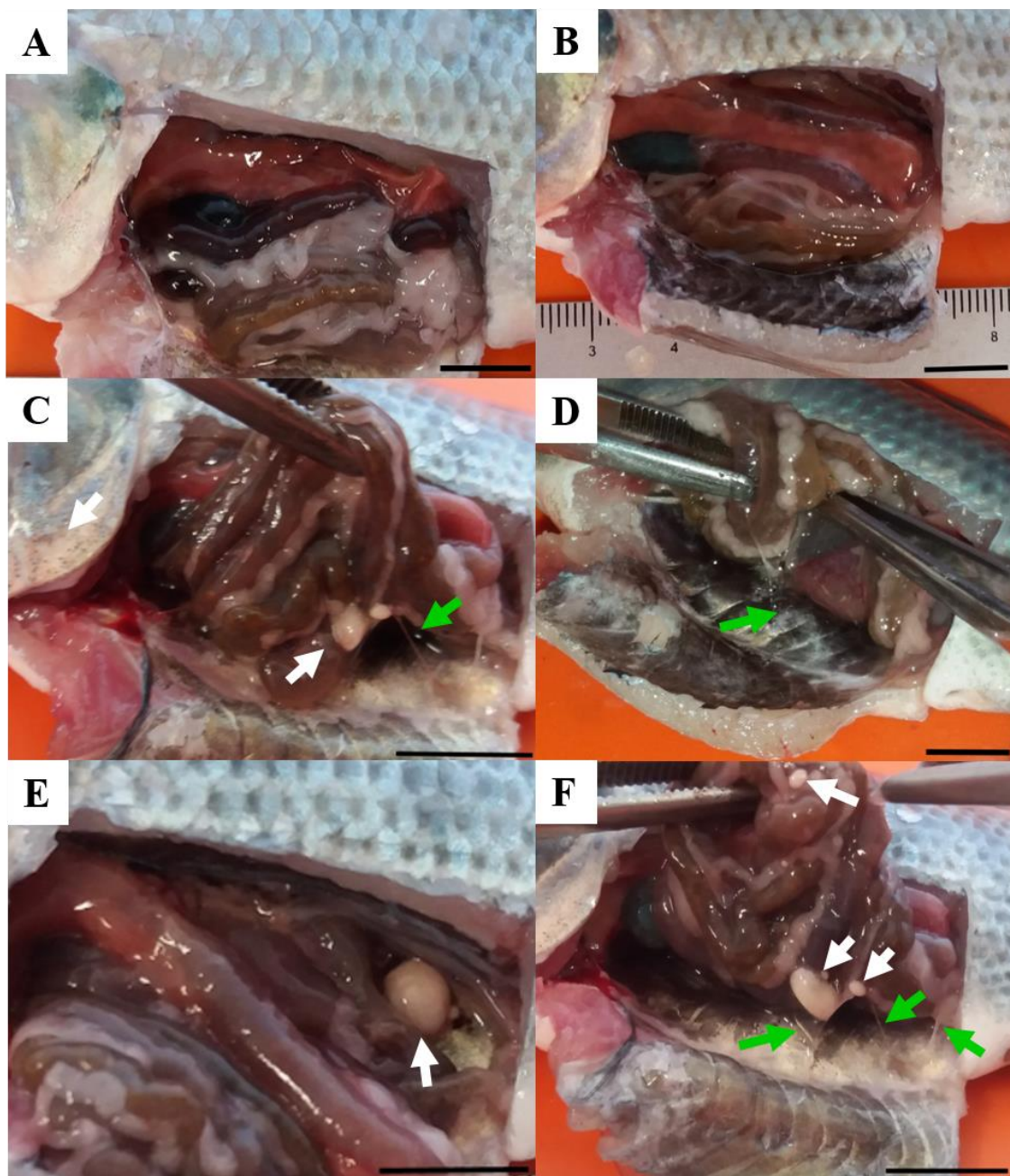


Figura 6. (A) Peixe injetado com PBS duas semanas pós-vacinação. (B) Peixe vacinados em combinação com hidróxido de alumínio quatro semanas pós-vacinação. (C) e (D) Peixes vacinados em combinação com AIF, apresentando depósitos de adjuvante e aderências leves dos órgãos à parede abdominal quatro semanas pós-vacinação. (E) Peixes vacinados em combinação com AIF, apresentando depósitos de adjuvante duas semanas pós-vacinação. (F) Peixe vacinados em combinação com AIF, apresentando depósitos de adjuvante e aderências à parede abdominal quatro semanas pós-vacinação. Aderências (seta verde), depósitos de adjuvante (seta branca).

DISCUSSÃO

A taxa de sobrevivência da vacina inativada com peróxido de hidrogênio (G6) apresentou valor de 60,0%, uma porcentagem menor do que o estudo prévio desenvolvido no capítulo 1 (80,0%), não se evidenciando diferença significativa

quando comparado ao grupo controle não vacinado (G3). Liu et al. (2016) mencionaram alguns fatores a serem considerados no desenvolvimento de vacinas tais como temperatura, tamanho dos peixes, dose de desafio ou duração do processo de vacinação. No presente trabalho foi utilizado um novo lote de peixes, a dose de desafio foi maior ($1,7 \times 10^6$ UFC.mL⁻¹) e a média do peso no momento da vacinação foi menor (22,39 g) quando comparados ao estudo no capítulo 1, o que poderia ter influenciado nos valores de sobrevivência e PRS, sendo o menor peso dos peixes no momento da vacinação possivelmente determinante na estimulação da resposta imune gerada pela vacina inativada. Soto et al (2014) mencionaram o tamanho do peixe no tempo da vacinação como importante fator no desenvolvimento da imunidade pós-vacinal. Tort et al. (2003) relataram que a imunocompetência nos peixes depende do peso, principalmente devido à necessidade de um mínimo número de células imunocompetentes. As taxas de sobrevivência nos grupos vacinais contendo Al (OH)₃ e AIF foram maiores do que a vacina sem adjuvantes (G7: 72,5% e G8: 85,0%), entretanto, sem mostrar diferença significativa entre os três grupos vacinais. Além disso, houve diferença significativa nos grupos G7 e G8 quando comparados ao controle não vacinado (G3), indicando que a inclusão dos adjuvantes melhorou a resposta imune. Estes resultados são similares aos descritos por Jiao et al. (2010) no caso da vacina com AIF, a qual conseguiu uma taxa de sobrevivência de 82,0%, não obstante diferem no caso da vacina com Al (OH)₃, a qual conseguiu uma porcentagem de 55,0%, sendo o estudo desenvolvido em linguado japonês vacinados contra *Edwardsiella tarda*. Em relação aos valores de PRS, a vacina com Al (OH)₃ e AIF apresentaram valores de 59,3% e 77,8% respectivamente e foram maiores quando comparados ao grupo sem adjuvante (40,7%). Níveis iguais ou maiores a 60,0% de PRS são considerados ótimos (MIDTLYNG, 2016). Os resultados obtidos no presente estudo evidenciaram altos níveis de proteção na vacina inativada com peróxido de hidrogênio quando utilizada com adjuvantes e testada contra uma cepa homóloga de *S. agalactiae* sob condições experimentais. Estes resultados são parecidos aos relatados no mesmo estudo por Jiao et al. (2010) os quais mostraram valores de 53,0 e 81,0% para Al (OH)₃ e AIF respectivamente, quando comparados ao grupo sem adjuvante (34,0%). A literatura menciona efeito altamente imunoestimulante do AIF na vacinação, além de apresentar uma redução significativa na toxicidade (TAFALLA et al.,

2014), o que poderia explicar os maiores valores de sobrevivência e de PRS para o grupo vacinado com AIF quando comparado ao Al (OH)₃. No caso do Al(OH)₃, o valor de PRS foi maior do que a vacina inativada sem adjuvante mas não alcançando os valores da vacina com AIF. Tafalla et al. (2014) mencionaram que não era adjuvante efetivo quando utilizado para doenças onde predominava uma resposta imune mediada por células, além de ter menor “efeito depósito” quando comparado às vacinas oleosas. Contudo, alguns resultados foram promissórios utilizando Al (OH)₃ em combinação com escaleno em vacinas inativadas contra o vírus da septicemia hemorrágica viral em linguado japonês (VINAY et al., 2013).

No caso da metodologia por inativação por peróxido de hidrogênio, esta não tem sido utilizada até agora no estudo de vacinas contra bactérias em peixes. Os resultados nas vacinas demonstraram ser altamente efetivos quando usados com adjuvantes. Resultados prévios similares foram obtidos utilizando esta metodologia para inativação das bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* vacinando camundongos, os quais induziram um incremento da resposta imune humoral e celular (FAN et al., 2019). Estudos em vacinas contra o vírus do oeste do Nilo em camundongos e macacos Rhesus apresentaram curvas de sobrevivência de 80 a 100% (PINTO et al., 2013; POORE et al., 2017) e em vacinas contra o vírus da coriomeningite linfocítica em camundongos 100% de eficácia (AMANNA et al., 2012).

Após quatro semanas da vacinação os níveis de anticorpos IgM anti-*Streptococcus agalactiae* no grupo vacinado com hidróxido de alumínio (G7) foram maiores do que o grupo controle não vacinado (G2), encontrando-se diferença significativa. Estes valores confirmam o caráter promotor da resposta imune humoral deste adjuvante, o qual estimula os linfócitos Th2 (TAFALLA et al., 2014). Em contraposição, o valor de PRS (59.3%) foi moderado, o que poderia indicar que a resposta imune humoral não foi suficiente para induzir imunidade protetiva eficaz, o qual poderia estar relacionado aos mecanismos de sobrevivência intracelular de *S. agalactiae* nos macrófagos (CORNACCHIONE et al., 1998), evadindo assim a resposta imune. Embora o grupo vacinado com AIF (G8) não tenha evidenciado diferenças significativas nos níveis de anticorpos

às quatro semanas após vacinação quando comparado aos outros grupos, este grupo evidenciou alta eficácia, possivelmente pela melhora da resposta imune celular devido ao AIF (DALMO et al., 2019). Duas semanas após vacinação, os níveis de anticorpos não amostraram diferenças significativas entre grupos vacinados e não vacinados, o que poderia ser explicado pela prévia exposição do lote utilizado à bactéria, devido ao caráter enzoótico da bactéria no Brasil (BARONY et al., 2017). Crosbie e Nowak (2004) mencionaram prévia exposição ao patógeno, reatividade cruzada dos anticorpos existentes aos antígenos da bactéria e imprecisões ou falta de especificidade do ELISA como possíveis causas de atividade de anticorpos anti-*V. harveyi* encontrada nos controles não vacinados em um estudo desenvolvido em barramundis vacinados contra *Vibrio harveyi*. Os títulos de anticorpos como medidas de proteção imune para vacinas em peixes podem ser considerados sub-ótimas ou protetivos de acordo à correlação de proteção (Munang'andu e Øystein, 2019). Os níveis de anticorpos no grupo vacinado sem adjuvante (G6) e no grupo injetado com hidróxido de alumínio em combinação com PBS (G4) diminuíram às quatro semanas quando comparados às duas semanas após vacinação. Estes resultados revelaram que a vacina sem adjuvante neste estudo não conseguiu manter os níveis de anticorpos elevados na quarta semana após vacinação, o qual diferiu dos resultados no experimento do capítulo 1. Lillehaug. (2014) mencionaram alguns fatores que podem influenciar na duração da imunidade após vacinações tais como temperatura, procedimentos vacinais utilizados, características da vacina (inativada ou atenuada, uso de adjuvantes, entre outros). No presente estudo, o peso médio foi menor (22,39 g) do que o primeiro experimento (25,01 g), o que poderia ter influenciado na estimulação da resposta imune pela vacina inativada sem adjuvante. No caso do grupo G4, os níveis poderiam ter diminuído devido ao fato que este grupo não foi vacinado.

No hemograma, não se registraram diferenças significativas entre grupos vacinados quando comparados ao controle. Duas semanas após vacinação, os valores para hemoglobina foram significativamente maiores no grupo G6 quando comparados ao grupo G7, o que poderia indicar uma estimulação maior na resposta imune no grupo G6. Bishlawy et al. (1999) hipotetizou uma relação entre eritrócitos, hemoglobina e resposta imune, sugerindo uma participação ativa na

resposta imune contra patógenos, além disso, estudos desenvolvidos no molusco *Tegillarca granosa* reportaram participação da hemoglobina na resposta imune contra patógenos (BAO et al., 2011). Adicionalmente, entre tempos no mesmo grupo, os valores de hemoglobina incrementaram significativamente quatro semanas após vacinação no caso dos grupos G5, G7 e G8 e os de concentração de hemoglobina corpuscular média no caso de G2 e G7, o que poderia estar relacionado a um incremento na resposta imune, inclusive no grupo controle. Os valores hematológicos são considerados indicadores de saúde nos peixes (ABU-ELALA et al., 2019). O valor de volume corpuscular médio diminuiu no caso de G7, possivelmente relacionado ao incremento de eritrócitos totais neste grupo após quatro semanas.

No leucograma, o número de linfócitos dos grupos G5, G6, G7 e G8 foram significativamente menores quando comparados ao controle e o grupo G6 apresentou valores de leucócitos totais significativamente menores do que o grupo G4 duas semanas após vacinação. Similarmente, Pereira et al. (2016) reportou valores diminuídos de linfócitos em híbridos de surubim vacinados contra *Aeromonas hydrophila* aos 21 dias após vacinação. Neste caso, a diminuição destas células poderia ser explicada pela migração dos linfócitos aos tecidos onde ocorre a apresentação de antígenos (MUTOLOKI et al., 2014). No caso dos monócitos os grupos G7 e G8 apresentaram valores significativamente maiores quando comparado ao grupo G6 duas semanas após vacinação, o que poderia evidenciar que as duas vacinas com adjuvantes provocaram maior estimulação na resposta imune do que a vacina sem adjuvante. Os monócitos são células que conectam a resposta imune inata com a resposta imune adaptativa secretando citocinas para a ativação das células dendríticas e migração aos órgãos linfoides para apresentarem antígenos aos linfócitos (MUTOLOKI et al., 2014). Quatro semanas após vacinação os leucócitos totais foram significativamente maiores no grupo G4 quando comparado aos grupos G5 e G8 e o grupo vacinado sem adjuvante G6 foi significativamente maior nos valores de granulócitos quando comparado aos grupos G2, G5, G7 e G8 sugerindo participação maior na resposta imune inata. Alguns estudos recentes demonstraram que, após vacinação ou infecção, células pertencentes à resposta imune inata exibem mudanças ao longo prazo que melhoram a resposta após

estímulos por patógenos (NETEA et al., 2016; GARCÍA-VALTANEN et al., 2017). Resultados similares foram descritos nos valores de neutrófilos aos 7 e 21 dias após vacinação intraperitoneal e por imersão, respectivamente, e valores elevados de monócitos aos 7 dias após vacinação quando comparados ao controle não vacinado em tilápias-do-nilo vacinadas contra *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus duran* (SILVA et al., 2009). Os neutrófilos são componentes da primeira linha de defesa contra patógenos invasores (HAVIXBECK e BARREDA, 2015). Ao contrário destes resultados, Kozinska e Guz (2004) reportaram diminuição de neutrófilos 30 dias após imunização contra *Aeromonas bestiarum* em carpa. Finalmente no caso dos linfócitos valores maiores no grupo G4 quando comparados aos grupos G6 e G8, poderia ser explicado por uma maior migração dos linfócitos aos órgãos linfoides nos grupos vacinados segundo o reportado pelo Mutoloki et al., 2014. Adicionalmente, os grupos vacinados sem adjuvante (G6) e vacinados com hidróxido de alumínio (G7) incrementaram significativamente o número de leucócitos totais, granulócitos e linfócitos quatro semanas após vacinação quando comparados às duas semanas o que poderia indicar maior aumento da resposta imune inata e adaptativa nesses dois grupos. Mutoloki (2014) descreveu aos linfócitos como as células-chave na resposta imune adaptativa. Nesse estudo, todos os grupos, com exceção do G6, aumentaram os valores de monócitos às quatro semanas após vacinação, similar ao reportado pelo Silva et al. (2009) no estudo descrito anteriormente. Não obstante, ao contrário do estudo, os valores no grupo controle (G2) também aumentaram. Finalmente os peixes do grupo vacinado com AIF (G8), do grupo controle injetado com adjuvante hidróxido de alumínio (G4) e do grupo controle injetado com PBS (G2) mostraram valores diminuídos de trombócitos às quatro semanas após vacinação. No caso do grupo G8 a diminuição dos valores de trombócitos são contrários aos encontrados por Silva et al. (2009) em tilápias-do-nilo imunizadas com vacinas polivalentes e por Martins et al. (2011) em bagre do canal vacinados com terontes de *Ichthyophthirius multifiliis*. No caso dos grupos G4 e G2, os resultados também foram opostos aos estudos mencionados anteriormente, enfatizando-se que estes dois últimos grupos não foram vacinados. Estes valores diminuídos na quantidade total de trombócitos poderiam estar

relacionados também ao possível erro na contagem diferencial de células brancas, por causa da semelhança aos linfócitos (FAZIO, 2019).

A atividade respiratória dos leucócitos é uma reação oxigênio-dependente utilizada pelos fagócitos para eliminar patógenos (DAN et al., 2013) e considerada parte da resposta imune inata mediada por células (ELLIS, 1999). Quatro semanas após vacinação houve maior atividade respiratória nos grupos G2, G4, G6 e G7 quando comparados aos grupos G5 e G8. Adicionalmente, no presente estudo, foi observado diminuição significativa no grupo vacinado com AIF (G8) e no controle injetado com AIF (G5) quatro semanas após vacinação quando comparados às duas semanas. Provavelmente, os menores níveis da atividade respiratória dos leucócitos nos dois grupos, os quais incluíram a presença do AIF, estão relacionados com diminuição na migração dos monócitos nos tecidos, o qual coincide com maior quantidade de monócitos no sangue no grupo G8 quatro semanas após vacinação. Os monócitos se diferenciam em células fagocíticas sob condições inflamatórias e estão envolvidos no burst respiratório. Ao contrário deste estudo, os valores da atividade respiratória dos leucócitos foram significativamente maiores aos 21 e 42 dias após vacinação quando comparado ao controle em rohu *Labeo rohita* vacinados com nanopartículas de fosfato de cálcio transportadoras de antígeno (BEHERA e SWAIN, 2011).

No presente estudo, duas semanas após vacinação os níveis de proteínas foram maiores no grupo G4 quando comparado ao grupo G7. Porém, houve níveis de proteínas significativamente maiores no grupo G7 quando comparado ao grupo G4 quatro semanas após vacinação, o qual poderia ser pelo incremento em proteínas tais como aglutininas, lectinas ou lisozimas. Elevadas concentrações de proteínas totais estão relacionadas à maiores produções de moléculas envolvidas na resposta imune inespecífica tais como o complemento, lisozima, lectinas ou citocinas (HOLLAND e LAMBRIS, 2002; SAURABH e SAHOO, 2008; JØRGENSEN, 2014). Adicionalmente, alguns adjuvantes proveem sinais co-estimulantes durante a fase de reconhecimento de antígenos, ativando diferentes proteínas (DALMO et al., 2016).

Os níveis de albumina e a relação albumina-globulina nos diferentes grupos duas semanas após vacinação foram iguais em relação ao grupo controle (G2) com exceção do grupo G6, onde os valores foram menores. Estes resultados são contrários aos descritos por Harikrishnan et al. (2012), em *Epinephelus bruneus* vacinados contra *V. harveyi*, nos quais encontraram-se valores maiores. Níveis de albumina diminuídos poderiam estar relacionados à diminuição da relação albumina-globulina no grupo G6, possivelmente causada pelo aumento das globulinas, proteínas importantes para manter o sistema imune saudável (JHA et al., 2007). No caso das globulinas, mantiveram-se iguais em relação ao controle (G2) com exceção do grupo G4 duas semanas após vacinação, onde os níveis foram maiores, resultados que poderiam ser atribuídos a uma reação ao adjuvante. Quatro semanas após vacinação o grupo G7 apresentou valores elevados quando comparado ao grupo G4, o que poderia significar aumento da resposta humoral, característica dos adjuvantes de alumínio (TAFALLA et al., 2014).

As observações macroscópicas durante a abertura da cavidade abdominal não evidenciaram depósitos de hidróxido de alumínio nem aderências nos grupos G4 e G7 nos 14 e 28 dias pós-vacinação. No experimento, a dose aplicada foi de 1000ug. Contudo, Vinay et al. (2014), em um ensaio de toxicidade de hidróxido de alumínio em *Paralichthys olivaceus*, observaram depósitos do adjuvante quando aplicado nas doses de 500, 1600 e 5000µg aos 8 e 15 dias pós inoculação. Outros estudos realizados em *Scophthalmus maximus* avaliando efeitos adversos por adjuvantes nas vacinas encontraram aderências leves a moderadas na cavidade abdominal produzidas pelo hidróxido de alumínio (NOIA et al., 2014). O efeito do depósito foi provavelmente curto em vacinas com hidróxido de alumínio. No caso dos grupos G5 e G8, os depósitos de adjuvante encontrados na periferia dos órgãos internos e leves aderências à parede abdominal coincidem com os achados descritos pelo Vinay et al (2014), os quais descreveram 15 dias após inoculação depósitos esbranquiçados na superfície do fígado e no redor do intestino, mas em contraposição ao nosso estudo, não foram descritas aderências. Midtlyng et al. (1996) encontraram aderências principalmente em vacinas contra *Aeromonas salmonicida* injetadas com adjuvantes oleosos em salmão do atlântico as 6 semanas e 3 e 6 meses pós-

vacinação. Adicionalmente, Noia et al. (2014) avaliaram os efeitos adversos por adjuvantes nas vacinas em *Scophthalmus maximus*, encontrando aderências severas na cavidade abdominal no caso dos adjuvantes oleosos. As vacinas oleosas têm evidenciado uma persistência do antígeno no lugar de injeção, o qual é um pré-requisito para longa proteção, incrementando o tempo de exposição do antígeno ao sistema imune (TAFALLA, 2014). O fato de o adjuvante ter persistido nos órgãos viscerais por quatro semanas indica uma forte proteção nas vacinas com AIF.

Os resultados observados neste estudo são promissórios no uso da metodologia de inativação de bactérias pelo peróxido de hidrogênio. Adicionalmente, a vacina demonstrou ser altamente eficaz quando administrada principalmente com AIF, um dos mais comuns adjuvantes na aquicultura.

REFERÊNCIAS

- ABD-ELGHAFAR, A. A.; ALI, A. E.; BOSEILA, A. A.; AMIN, M. A. Inactivation of rabies virus by hydrogen peroxide. **Vaccine**, v. 34, n. 6, p. 798-802, 2016.
- ABU-ELALA, N; SAMIR, A; WASFY, M.; ELSAYED, M. Efficacy on injectable and immersion polyvalent vaccine against streptococcal infections in broodstock and offspring of Nile tilapia. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 2019, n. 88, p. 293-300, 2019.
- AMANNA, I. J.; RAUÉ, H.; SLIFKA, M. K. Development of a new hydrogen-peroxide-based vaccine platform. **Nature Medicine**, v. 18, n. 6, p. 974-980, 2012.
- AMEND, D. F. Potency testing of fish vaccines. Fish biologics: serodiagnostics and vaccines, **Developments in Biological Standardization**, v. 49, p. 447-454, 1981.
- BAO, Y.; WANG, Q.; LIN, Z. Hemoglobin of the bloody clam *Tegillarca granosa* (Tg-Hbl) is involved in the immune response against bacterial infection. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 31, n. 4, p. 517-523, 2011.
- BEHERA, T.; SWAIN, P. Antigen adsorbed calcium phosphate nanoparticles stimulate both innate and adaptive immune response in fish, *Labeo rohita* H. **Cellular Immunology**, v. 271, n. 2, p. 350-359, 2011.

- BILLER-TAKAHASHI, J.D.; TAKAHASHI, L.S.; SAITA, M.V.; GIMBO, R.Y.; URBINATI, E.C. Leukocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 73, n. 2, p. 425-429, 2013.
- BISHLAWY I. M. Red blood cells, hemoglobin and the immune system. **Medical Hypotheses**. v. 53, p 345-346, 1999.
- BRUDESETH, B. E.; WIULSRØD, R.; FREDRIKSEN, B. N.; LINDMO, K.; LØKLING, K. E.; BORDEVIK, M.; STEINE, N.; GRAVNINGEN, K. Status and future perspectives of vaccines for industrialized fin-fish farming. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 35, n. 6, p. 1759-1768, 2013.
- CORNACCHIONE, P; SCARINGI, L.; FETTUCCIARI, K.; ROSATI, E.; SABATINI, R.; OREFICI, G.; VON HUNOLSTEIN, C.; MODESTI, A.; MODICA, A.; MINELLI, F.; MARCONI, P. Group B streptococci persist inside macrophages. **Immunology**, v. 93, n. 1, p. 86-95, 1998.
- CROSBIE, P. B. B.; NOWAK, B. F. Immune responses of barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch), after administration of an experimental *Vibrio harveyi* bacterin by intraperitoneal injection, anal intubation and immersion. **Journal of Fish Diseases**, v. 27, n. 11, p. 623-632, 2004.
- COFFMAN, R. L.; SHER, A.; SEDER, R. A. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. **Immunity**, v. 33, n. 4, p. 492-503, 2010
- DALMO, R.; BØGWALD, J.; TAFALLA, C. Adjuvants and delivery methods: current and novel. In: ADAMS A. (Eds.). *Fish Vaccines*. Springer Basel, 180 p, 2016.
- DAN, X. M.; ZHANG, T. W.; LI, Y. W.; LI, A. X. Immune responses and immune-related gene expression profile in orange-spotted grouper after immunization with *Cryptocaryon irritans* vaccine. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 34, n. 3, p. 885-891, 2013.
- DRABKIN, D. L.; AUSTIN, J. H. Spectrophotometric studies II. Preparations from washed blood cells; nitric oxide hemoglobin and sulfhemoglobin. **Journal of Biological Chemistry**, 112(1), 51-65, 1935.
- ELLIS, A. E. Immunity to bacteria in fish. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 9, n. 4, p. 291-308, 1999.
- EL-SAYED, A. F. M. **Tilapia culture**. CABI, Wallingford, UK, 2019, 358 p.

- EVENSEN, Ø. **Development of fish vaccines: focusing on methods.**
In: ADAMS A. (Eds.). *Fish Vaccines*. Springer Basel, 180 p, 2016.
- FAN, Y.; MU, Y.; LU, L.; TIAN, Y.; YUAN, F.; ZHOU, B.; YU, C.; WANG, Z.; LI, X.; LEI, S.; XU, Y. WU, D.; YANG, L. Hydrogen peroxide-inactivated bacteria induces potent humoral and cellular immune responses and releases nucleic acids. **International Immunopharmacology**, v. 69, p. 389-307, 2019.
- FAZIO, F. Fish hematology analysis as an important tool of aquaculture: a review. **Aquaculture**, v. 500, p. 237-242, 2018.
- FIRDAUS-NAWI, M.; YUSOFF, S. M.; YUSOF, H.; ABDULLAH, S. Z.; ZAMRI-SAAD, M. Efficacy of feed-based adjuvant vaccine against *Streptococcus agalactiae* in *Oreochromis* spp. in Malaysia. **Aquaculture Research**, v. 45, n. 1, p. 87-96, 2013.
- GARCÍA-VALTANEN, P.; MARTÍNEZ-LÓPEZ, A.; LÓPEZ-MUÑOZ, A.; BELLO-PEREZ, M.; MEDINA-GALI, R. M.; ORTEGA-VILLAIZÁN, M. D. M.; VARELA, M.; FIGUERAS, A; MULERO, V; NOVOA, B; ESTEPA, A.; COLL, J. Zebra fish lacking adaptive immunity acquire an antiviral alert state characterized by upregulated gene expression of apoptosis, multigene families, and interferon-related genes. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. 121, 2017.
- 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, n. 1, p.35-39, 1971.
- GUDDING, R., LILLEHAUG, A., & EVENSEN, Ø. Recent developments in fish vaccinology. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 72, n. 1-2, p. 203-212, 1999.
- HARIKRISHNAN, R.; KIM, J. S.; BALASUNDARAM, C.; HEO, M. S. Vaccination effect of liposomes entrapped whole cell bacterial vaccine on immune response and disease protection in *Epinephelus bruneus* against *Vibrio harveyi*. **Aquaculture**, v. 342, 69-74, 2012.
- HAVIXBECK, J. J.; BARREDA, D. R. Neutrophil development, migration, and function in teleost fish. **Biology**, v. 4, n. 4, p. 715-734, 2015.
- HOLLAND, M. C. H.; LAMBRIS, J. D. The complement system in teleosts. **Fish & Shellfish Immunology**, v.12, n. 5, p. 399-420, 2002.

- JHA, A. K.; PAL, A. K.; SAHU, N. P.; KUMAR, S.; MUKHERJEE, S. C. Haemato-immunological responses to dietary yeast RNA, ω -3 fatty acid and β -carotene in *Catla catla* juveniles. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 23, n. 5, p. 917-927, 2007.
- JIAO, X. D.; CHENG, S.; HU, Y. H.; SUN, L. Comparative study of the effects of aluminum adjuvants and Freund's incomplete adjuvant on the immune response to an *Edwardsiella tarda* major antigen. **Vaccine**, v. 28, n. 7, p. 1832-1837, 2010.
- JØRGENSEN, J. **The Innate Immune Response in Fish**. In: GUDDING R; LILLEAGUG, A.; EVENSEN, Ø (Eds.). Fish vaccination. UK, Wiley Blackwell, 383 p, 2014.
- KOZINSKA, A.; GUZ, L. The effect of various *Aeromonas bestiarum* vaccines on non-specific immune parameters and protection of carp (*Cyprinus carpio* L.). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 16, n. 3, p. 437-445, 2004.
- LILLEHAUG, A. Vaccination Strategies and Procedures. In: Gudding, R; Lilleagug, A; Evensen, Ø, (Eds.). Fish vaccination. UK: Wiley Blackwell, 383 p, 2014.
- LIU, G.; ZHU, J.; CHEN, K.; GAO, T.; YAO, H.; LIU, Y.; ZHANG, Q.; LU, C. Development of *Streptococcus agalactiae* vaccines for tilapia. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 122, n. 2, p. 163-170, 2016.
- MARTINS, M. L.; XU, D. H.; SHOEMAKER, C. A.; KLESZIUS, P. H. Temperature effects on immune response and hematological parameters of channel catfish *Ictalurus punctatus* vaccinated with live theronts of *Ichthyophthirius multifiliis*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 31, n. 6, p. 774-780, 2011.
- MIDTLYNG, P. J.; REITAN, L. J.; SPEILBERG, L. Experimental studies on the efficacy and side-effects of intraperitoneal vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against furunculosis. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 6, n. 5, p. 335-350, 1996.
- MIDTLYNG, P. J. **Methods for Measuring Efficacy, Safety and Potency of Fish Vaccines**. In: Adams, A (Eds.). Fish Vaccines. Springer Basel, 180 p, 2016.
- MOHANTY, B. R.; SAHOO, P. K. Immune responses and expression profiles of some immune-related genes in Indian major carp, *Labeo rohita* to *Edwardsiella tarda* infection. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 28, n. 4, p. 613-621, 2010.

- MUNANG'ANDU, H.; ØYSTEIN, E. Correlates of protective immunity for fish vaccines. **Fish and Shellfish Diseases**, v. 85, p. 132-140, 2019.
- MUTOLOKI, S.; JØRGENSEN, J.; EVENSEN, Ø. **The Adaptive Immune Response in Fish**. In: GUDDING R; LILLEAGUG, A.; EVENSEN, Ø (Eds.). Fish vaccination. UK, Wiley Blackwell, 383 p, 2014.
- NETEA, M. G.; JOOSTEN, L. A.; KINGSTON, H. G.; NATOLI, G.; STUNNENBERG, H. G.; O'NEILL, L. A.; XAVIER, R. J. Trained immunity: a program of innate immune memory in health and disease. **Science**, v. 352, n. 6284, aaf1098, 2016.
- NOIA, M.; DOMÍNGUEZ, B.; LEIRO, J.; BLANCO-MÉNDEZ, J.; LUZARDO-ÁLVAREZ, A.; LAMAS, J. Inflammatory responses and side effects generated by several adjuvant-containing vaccines in turbot. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 38, n. 1, p. 244-254, 2014.
- PEREIRA, G. D. V.; JESUS, G. F. A.; VIEIRA, F. D. N.; PEREIRA, S. A.; USHIZIMA, T. T; MOURIÑO, J. L. P.; MARTINS, M. L. Probiotic supplementation in diet and vaccination of hybrid surubim (*Pseudoplatystoma reticulatum*♀ x *P. corruscans*♂). **Ciência Rural**, v. 46, n. 2, p. 348-353, 2016.
- PINTO, A. K.; RICHNER, J. M.; POORE, E. A.; PATIL, P. P.; AMANNA, I. J.; SLIFKA, M. K.; DIAMOND, M. S. A hydrogen peroxide-inactivated virus vaccine elicits humoral and cellular immunity and protects against Lethal West Nile Virus infection in aged mice. **Journal of Virology**, v. 87, n. 4, p. 1926-1936, 2013
- POORE, E. A.; SLIFKA, D. K.; RAUÉ, H. P.; THOMAS, A.; HAMMARLUND, E.; QUINTEL, B. K.; TORREY, L. L.; SLIFKA, A. M.; RICHNER, J. M.; DUBOIS, M. E.; JOHNSON, L. P.; DIAMOND, M. S.; SLIFKA, M. K.; AMANNA, I. J. Pre-clinical development of a hydrogen peroxide-inactivated West Nile virus vaccine. **Vaccine**, v. 35, n. 2, p. 283-292, 2017.
- ROSENFELD, G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue. Noções práticas sobre corantes pancrônicos e estudos de diversos fatores. **Memórias de Instituto Butantã**, v.20, p. 315-328, 1947.
- SAURABH, S.; SAHOO, P. K. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. **Aquaculture Research**, v. 39, n. 3, p. 223-239, 2008.
- SCHIJNS, V. E. Induction and direction of immune responses by vaccine adjuvants. **Critical Reviews in Immunology**, v. 21, p. 75–85, 2001.

- SHELBY, R. A.; KLESIUS, P. H., SHOEMAKER, C. A.; Evans, J. J. Passive immunization of tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), with anti-*Streptococcus iniae* whole sera. **Journal of Fish Diseases**, v. 25, p. 1-6, 2002.
- SILVA, B. C.; MARTINS, M. L.; JATOBÁ, A.; BUGLIONE NETO, C. C.; VIEIRA, F. N.; PEREIRA, G. V.; JERÔNIMO, G.; SEIFFERT, W.; MOURIÑO, J. L. P. Hematological and immunological responses of Nile tilapia after polyvalent vaccine administration by different routes. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 11, 874-880, 2009.
- SOTO, E.; BROWN, N.; GARDENFORS, Z. O.; YOUNT, S.; REVAN, F.; FRANCIS, S.; KEARNEY, M. T.; CAMUS, A. Effect of size and temperature at vaccination on immunization and protection conferred by a live attenuated *Francisella noatunensis* immersion vaccine in red hybrid tilapia. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 41, n. 2, p. 593-599, 2014.
- SUN, Y.; LIU, C. S.; SUN, L. A multivalent killed whole-cell vaccine induces effective protection against *Edwardsiella tarda* and *Vibrio anguillarum*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 31, n. 4, p. 595-599, 2011.
- TAFALLA, C.; BØGWALD, J.; DALMO, R.; MUNANG'ANDU, H. M.; EVENSEN, Ø. **Adjuvants in fish vaccines**. In: GUDDING R; LILLEAGUG, A.; EVENSEN, Ø. (Eds.). Fish vaccination. UK, Wiley Blackwell, 383 p, 2014.
- TORT, L.; BALASCH, J. C.; MACKENZIE, S. Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. **Inmunología**, v. 2, n. 3, 277-286, 2003.
- VINAY, T. N.; PARK, C. S., KIM, H. Y.; JUNG, S. J. Toxicity and dose determination of quillaja saponin, aluminum hydroxide and squalene in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 158, n. 1-2, p. 73-85, 2014.
- VINAY, T. N.; KIM, Y. J.; JUNG, M. H.; KIM, W. S.; KIM, D. H.; JUNG, S. J. Inactivated vaccine against viral hemorrhagic septicemia (VHS) emulsified with squalene and aluminum hydroxide adjuvant provides long term protection in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Vaccine**, v. 31, n. 41, p. 4603-4610, 2013.
- WINTROBE, M. M. Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. **Folia Haematologica**, v. 51, p. 32-49, 1934.

ZHENG, Z.; YINGENG, W.; QINGYIN, W.; NANNAN, D.; MEIJIE, L.; JIANGBO, Q.; BIN, L.; LAN, W. Study on the immune enhancement of different immunoadjuvants used in the pentavalent vaccine for turbot. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 32, n. 3, p. 391-395, 2012.

CAPÍTULO 3: Efeito da suplementação com mananoligossacarídeos na eficácia de uma vacina experimental contra *Streptococcus agalactiae* em tilápias-do-nilo.

RESUMO

O presente estudo avaliou o efeito da suplementação com mananoligossacarídeos durante o período pós-vacinação em vacina experimental. Tilápias-do-nilo foram divididas em dez grupos experimentais: G1: alimentação normal e não vacinados; G2: alimentação normal (adição de óleo de canola) e não vacinados (injetados com PBS estéril); G3: alimentação normal (adição de óleo de canola) e vacinados; G4: suplementação com MOS e não vacinados (injetados com PBS estéril); G5: suplementação com MOS e vacinados; G6: alimentação normal (adição de óleo de canola), não vacinados (injetados com PBS estéril) e não desafiados (PBS); G7: alimentação normal (adição de óleo de canola), não vacinados (injetados com PBS estéril) e desafiados; G8: alimentação normal (adição de óleo de canola), vacinados e desafiados; G9: suplementação com MOS, não vacinados (injetados com PBS) e desafiados; G10: suplementação com MOS, vacinados e desafiados. Vinte oito dias após vacinação, foram desafiados com 0.1 mL de *S. agalactiae* e a mortalidade foi avaliada por 21 dias. A porcentagem relativa de sobrevivência (PRS) apresentou valores de 98,1% e 100,0% para os grupos G8 e G10, respectivamente. Adicionalmente, entre tempos no mesmo grupo, na avaliação de anticorpos IgM anti-*Streptococcus agalactiae*, evidenciou-se níveis significativamente maiores nos grupos G3, G4 e G5 às duas e quatro semanas quando comparados às seis semanas após vacinação. Os resultados demonstraram que a inclusão de MOS na dieta pós-vacinação até o desafio não interferiu na eficácia da vacina experimental com peróxido de hidrogênio, e confirmaram ótima proteção desta vacina contra a infecção por *S. agalactiae*.

Palavras-chave: estreptococose, vacina inativada, adjuvante incompleto de Freund, imunoestimulante, eficácia.

INTRODUÇÃO

A estreptococose tem causado elevados prejuízos para a produção de peixes de água doce e salgada e grande impacto econômico (LONGUI et al., 2012), os quais devem-se as altas taxas de infecção e mortalidade que podem atingir até 50% e 90% do lote respectivamente (YE et al., 2011). No entanto, as vacinas inativadas são utilizadas amplamente para proteção contra *S. agalactiae* (LIU et al., 2016).

Recentemente, novas metodologias para a produção de vacinas inativadas foram desenvolvidas utilizando peróxido de hidrogênio (H₂O₂), conferindo vigorosa proteção vacinal e produzindo o incremento da resposta imune adaptativa (PINTO et al., 2013; ABD-ELGHAFAR et al., 2016). Além disso, adequada e longa proteção é obtida com a inclusão de adjuvantes no caso das vacinas inativadas (BRUDESETH et al., 2013). Os adjuvantes são usados para a melhora da eficácia das vacinas, incrementando a magnitude da resposta imune adaptativa (TAFALLA et al., 2014; DALMO et al., 2016). Dentre deles, o Adjuvante Incompleto de Freund (AIF) é uma emulsão de água em óleo (A/O), e tem demonstrado estimular a resposta imune humoral em tilápia vermelha quando usando em vacinas inativadas incorporadas na ração contra *Streptococcus agalactiae* (FIRDAUS-NAWI et al., 2013).

Na procura de maiores níveis de eficácia nas vacinas, a suplementação com imunoestimulantes tais como os β -glucanos demonstrou melhora na eficácia vacinal em alguns estudos (VETVICKA, 2013). Figueras et al. (1998) testaram a eficácia de β -glucanos pela via intraperitoneal antes, durante e após vacinação contra *Vibrio damsela* em *Scophthalmus maximus* L obtendo bons resultados quando aplicados após vacinação. No entanto, não houve efeito na sobrevivência após desafio em trutas arco-íris alimentadas com β -glucanos e vacinadas por imersão contra *Yersinia ruckeri* (SKOV et al., 2012) nem em tilápias-do-nilo alimentadas com diferentes dietas de β -glucanos e vacinadas intraperitonealmente contra *S. iniae*. (WHITTINGTON et al., 2005).

Dentre dos imunoestimulantes, os mananoligossacarídeos (MOS) são carboidratos complexos derivados da parede celular de leveduras, contendo manose como principal carboidrato (MOMENI-MOGHADDAM et al., 2015). Numerosos benefícios são atribuídos à suplementação com MOS tais como a melhora da conversão alimentar, fortalecimento do epitélio do trato digestivo anterior e médio e do sistema imune em diversas espécies de peixes de produção incluindo tilápias-do-nylo (TORRECILLAS et al., 2014). Algumas pesquisas têm avaliado o efeito da suplementação com MOS na dieta sobre a sobrevivência e resistência a bactérias patogênicas em peixes tais como *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus agalactiae*, *Edwardsiella ictaluri*, e *Vibrio anguillarum*, utilizando doses desde 0.024% até 4.0% por períodos de tempo desde um mês até dez meses prévio ao desafio, porém, a duração da suplementação prévio ao desafio, o tipo de MOS usados ou o processo de fabricação da ração são fatores determinantes na hora de obter altas taxas de sobrevivência quando desafiados (TORRECILLAS et al., 2014). Estes benefícios do MOS poderiam melhorar a eficácia das vacinas quando usados na ração prévio ou ao início da vacinação até o desafio. Um estudo testando o efeito da suplementação com *Saccharomyces cerevisiae* a 0.3% em combinação com uma vacina contra *S. agalactiae* protegeu 100% e melhorou a resposta inflamatória em tilápias-do-nylo (SALVADOR et al., 2012). Em relação às pesquisas avaliando o efeito da administração oral com MOS na resposta imune pós-vacinação em tilápias-do-nylo, ainda não foram desenvolvidas.

Esta proposta teve como objetivo avaliar o efeito da suplementação com mananoligossacarídeos durante o período pós-vacinação em uma vacina experimental. A eficácia vacinal foi determinada mediante PRS e níveis de anticorpos IgM anti-*Streptococcus agalactiae* e a resposta imune inata foi avaliada mediante atividade respiratória dos leucócitos e atividade da mieloperoxidase.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e condições experimentais

Foram utilizadas 560 tilápias-do-nylo, adquiridas de piscicultura comercial sem histórico de mortalidade por estreptococose. Os animais foram aclimatados por seis semanas e mantidos nas mesmas condições descritas no capítulo 1 e 2. Durante o experimento, a temperatura foi mantida com média de $30,02 \pm 0,66$ °C o pH com média $6,59 \pm 0,18$. Os valores médios mantiveram-se dentro da faixa considerada adequada para qualidade da água para esta espécie (EL-SAYED, 2019).

O desenvolvimento do experimento foi de acordo aos princípios éticos envolvidos na experimentação animal pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, SP (N° de protocolo: 014772/19).

Delineamento experimental

Após o período de aclimação de seis semanas e jejum prévio de 24 h, 560 tilápias-do-nylo com peso médio de $26,06 \pm 5.42$ g e comprimento total de $11,23 \pm 0,79$ cm, foram utilizadas e distribuídas aleatoriamente em dez grupos experimentais em triplicata (o grupo G6 apresentou só 20 peixes). G1: alimentação normal e não vacinados; G2: alimentação normal (adição de óleo de canola) e não vacinados (injetados com PBS estéril); G3: alimentação normal (adição de óleo de canola) e vacinados; G4: suplementação com MOS e não vacinados (injetados com PBS estéril); G5: suplementação com MOS e vacinados; G6: alimentação normal (adição de óleo de canola), não vacinados (injetados com PBS estéril) e não desafiados (PBS); G7: alimentação normal (adição de óleo de canola), não vacinados (injetados com PBS estéril) e desafiados; G8: alimentação normal (adição de óleo de canola), vacinados e desafiados; G9: suplementação com MOS, não vacinados (injetados com PBS) e desafiados; G10: suplementação com MOS, vacinados e desafiados. Os diferentes grupos experimentais foram alimentados com suplementação com MOS e a ração mais adição de óleo de canola desde um dia após vacinação até o dia prévio ao desafio.

Os diferentes grupos experimentais foram anestesiados com Benzocaina (100 mg.L⁻¹) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU) (NEIFFER e STAMPER, 2009) e posteriormente vacinados via intraperitoneal com 0,1 mL de vacina. No caso dos grupos G2, G4, G6, G7 e G9 foram injetados com o mesmo volume de PBS estéril. Vinte oito dias após vacinação, os grupos G7, G8, G9 e G10 foram anestesiados e desafiados com 0,1 mL de dose de uma cepa homologa de *S. agalactiae* calculada previamente para produzir 50% de mortalidade. No caso do grupo controle G6 foi injetado com o mesmo volume de PBS estéril (falso desafio). Durante o período de infecção, o fluxo contínuo da água foi interrompido, e as variáveis físico-químicas da água foram monitoradas diariamente.

Após o desafio os peixes foram observados diariamente durante 21 dias para determinar a porcentagem relativa de sobrevivência (PRS). Foram anotados os sinais clínicos e a mortalidade duas vezes ao dia. Amostras de tecidos (cérebro, fígado, rim cranial e baço) de animais moribundos, mortes recentes e dos sobreviventes foram coletadas para reisolamento bacteriano. A PRS foi calculada segundo a fórmula descrita por Amend (1981):

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

Os grupos G1, G2, G3, G4 e G5 foram utilizadas para a determinação dos anticorpos IgM anti-*Streptococcus agalactiae*, atividade respiratória dos leucócitos, atividade da mieloperoxidase, hemograma, proteínas séricas totais, albuminas, globulinas, e relação albumina/globulina, realizando coletas de sangue aos 14 e 28 dias após a vacinação. No caso dos grupos G6, G7, G8, G9 e G10 foram utilizadas para a determinação da porcentagem relativa de sobrevivência.

Obtenção da bactéria

No presente trabalho foi utilizada a bactéria *Streptococcus agalactiae*, isolada, identificada e classificada sorologicamente, além de confirmação molecular, segundo as metodologias descritas no capítulo 1.

Preparação das vacinas

Vacina inativada com peróxido de hidrogênio contendo adjuvante incompleto de Freund (AIF)

Previamente, foi preparado uma vacina inativada com peróxido de hidrogênio contendo AIF segundo as técnicas supracitadas no capítulo 2. Finalmente, foi armazenada em frascos estéreis a 4 °C até o momento da vacinação.

Adição de mananoligossacarídeos na ração

O alimento comercial peletizado foi suplementado com o composto comercial de mananoligossacarídeos (Actigen Alltech Inc., Nicholasville, USA), em dose de 1% (10g Kg⁻¹) dissolvida em 30 mL de óleo de canola (SKOV et al., 2012) a qual foi utilizada previamente em tilápias (SADO et al., 2008; SAMRONGPAN et al., 2008), sendo fornecida duas vezes ao dia (3,0% da biomassa). Brevemente, 6 mL de óleo de canola foi dispensado em sacolas de polipropileno contendo 200g de ração. Posteriormente, 2g de MOS foi adicionado e homogeneizado na ração. As rações com MOS foram preparadas 24h antes do início da vacinação, preparadas cada cinco dias e finalmente armazenadas sob refrigeração. A formulação e composição proximal é mostrada na tabela 1. A composição proximal foi realizada pela técnica de espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS) (CHEN et al., 2013).

Tabela 1. Formulação e composição proximal nas dietas dos grupos experimentais.

Composição proximal	Dietas		
	Alimentação normal (controle)	Alimentação normal (adição de óleo de canola)	Alimentação normal (adição de óleo de canola e MOS)
Matéria seca	92.05	92.17	92.06
Proteína bruta	36.3	35.77	35.89
Extrato etéreo	7.5	9.2	8.9
Fibra bruta	3.2	3.2	3.3
Cinza bruta	9.9	9.5	9.3
Amido	21.8	21.8	21.2
Fibra em detergente ácido	5.7	5.7	5.8
Fibra em detergente neutro	20.2	19.5	20.5
Açúcar	1.1	1.1	1.1
Fósforo (mg/Kg)	11183	10806	10821
Energia bruta (MJ/Kg)	18.176	18.641	18.613
Energia bruta (Kcal/Kg)	4341	4452	4446

Desafio experimental

O desafio foi realizado com a mesma cepa utilizada na produção das vacinas, utilizando dose letal 50% (DL_{50-21dias}) previamente calculada. A bactéria foi preparada utilizando as técnicas microbiológicas supracitadas no capítulo 1, até obter um inóculo padronizado equivalente a $1,1 \times 10^7$ UFC.mL⁻¹, DO_{540nm} de 0,575.

Coleta de amostras

Os peixes das repetições não desafiadas foram anestesiados, sob as mesmas condições descritas no capítulo 1. Amostras de sangue (aproximadamente 0,8 mL) da veia caudal de sete peixes por grupo foram coletadas com seringas contendo EDTA a 10,0% ou não aos 14 e 28 dias após a vacinação e foram colocadas e homogeneizadas em microtubos de 1,5 mL para os ensaios hematológicos e atividade respiratória dos leucócitos e em microtubos sem anticoagulante para a obtenção de soro, seguindo estas últimas amostras o mesmo protocolo descrito no capítulo 1, para posterior medição dos

níveis de anticorpos anti-*Streptococcus agalactiae*, atividade da mieloperoxidase e as variáveis bioquímicas. Amostras de plasma foram processadas imediatamente para teste de glicose.

Determinação do índice esplênico-somático e índice hepático-somático

O índice esplênico-somático e o índice hepático-somático foram calculados segundo as fórmulas: $IES = 100\%[\text{peso do baço (g)} / \text{peso total (g)}]$ e $IHS = 100\%[\text{peso do fígado (g)} / \text{peso total (g)}]$.

Determinação de anticorpos IgM anti-*Streptococcus agalactiae*

A detecção de anticorpos anti-*Streptococcus agalactiae* foi utilizando o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), seguindo a metodologia descrita por Shelby et al. (2002) e Soto et al. (2014) com algumas modificações detalhadas no capítulo 1.

Determinação do hemograma

A determinação dos índices hematimétricos foi realizada seguindo as metodologias descritas no capítulo 2.

Atividade respiratória de leucócitos no sangue

A atividade respiratória dos leucócitos foi determinada segundo a metodologia de Biller-Takahashi et al., (2013) descrita no capítulo 2.

Atividade da mieloperoxidase

A atividade da mieloperoxidase foi determinada segundo a metodologia de Behera et al. (2010). Microplacas estéreis de 96 poços (ThermoLabsystems, Franklin, MA, USA) foram recobertas com 125 µL solução salina balanceada de Hanks. A seguir, 25 µL de soro e 50 µL de cloridrato de 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina a 20 mM (Sigma-Aldrich, T2885, St. Louis, EEUU) e 50 µL de H₂O₂ a 5mM foram adicionados às placas. Após dois minutos, a reação foi parada adicionando 50 µL de com ácido sulfúrico a 4 M. Finalmente, a densidade óptica das soluções foram lidas a 450 nm em leitora de microplacas de ELISA (EzRead 2000Microplate Reader, Biochrom).

Determinação de proteína, albumina e globulina sérica total

As proteínas séricas totais foram determinadas pelo método Biuret, utilizando kit comercial (Labtest, Minas Gerais, Brasil), seguindo as instruções do fabricante, as quais são detalhadas no capítulo 1. A albumina total foi determinada pelo método de verde de bromocresol, utilizando kit comercial (Labtest, Minas Gerais, Brasil), seguindo as instruções do fabricante, as quais são detalhadas no capítulo 2. A determinação dos valores de globulinas foi realizada seguindo o detalhado no capítulo 2.

Determinação de glicose total

A glicose total foi determinada pelo método de ponto final, utilizando kit comercial (Labtest, Minas Gerais, Brasil), seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, adicionou-se o reagente (1 mL) aos tubos o padrão de glicose e as amostras de plasma. A seguir, os tubos foram incubados em banho maria a 37 °C por 10 min. Logo após, foi aferida a absorbância das amostras e do padrão contra o branco a 505 nm e finalmente a glicose do plasma foi calculada de acordo com a seguinte formula: Glicose total = (densidade ótica das amostras de soro/densidade ótica do padrão) x100mg/dL.

Análises estatísticas

Foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, San Diego, EEUU). Primeiro, foi testada a normalidade (teste Shapiro-Wilk) e posteriormente foi feito análise de variância (ANOVA) com teste post-hoc de Tukey ou Kruskal Wallis com teste post-hoc de Dunn para identificar diferenças estatísticas entre os grupos e teste t de student ou teste Mann Whitney U para identificar diferenças estatísticas entre os tempos de amostragem. Finalmente todos os resultados foram expressos em forma de média $\pm$ desvio padrão. As curvas de sobrevida foram avaliadas pelos testes de Kaplan-Meier, Log-rank e Bonferroni.

RESULTADOS

O grupo controle com alimentação normal, não vacinado e não desafiado (G6) não apresentou mortalidade durante o experimento. As mortalidades no

grupo controle não vacinado e desafiado (G7) e no controle suplementado com MOS, não vacinado e desafiado (G9) começaram às 24 e 72h após o desafio, respectivamente. Os sinais clínicos incluíram coloração escura, exoftalmia, opacidade da córnea, anorexia, letargia e natação errática (rodopio). O pico da mortalidade ocorreu no dia 6 no grupo G7 e nos dias 5 e 6 no grupo G9. Nos grupos vacinados G8 e G10 não houve sinais clínicos.

A taxa de sobrevivência (Figura 1) foi 100,0% no grupo G6, 18,1% no grupo G7, 98,4% no grupo G8, 21,2% no grupo G9 e 100,0% no G10. Os resultados mostraram uma taxa de sobrevivência maior nos grupos vacinados quando comparados ao grupo controles. Porém, a avaliação da sobrevivência, as vacinas sem e com suplementação de MOS (G8 e G10) não apresentaram diferença significativa ($P > 0.05$). Evidenciou-se diferença significativa ($P < 0.05$) entre os dois grupos vacinados (G8 e G10) quando comparados aos grupos controles não vacinados (G7 e G9). A PRS foi calculada 21 dias após o desafio e apresentou valores de 98,1% e 100,0% para os grupos G8 e G10, respectivamente (Tabela 2).

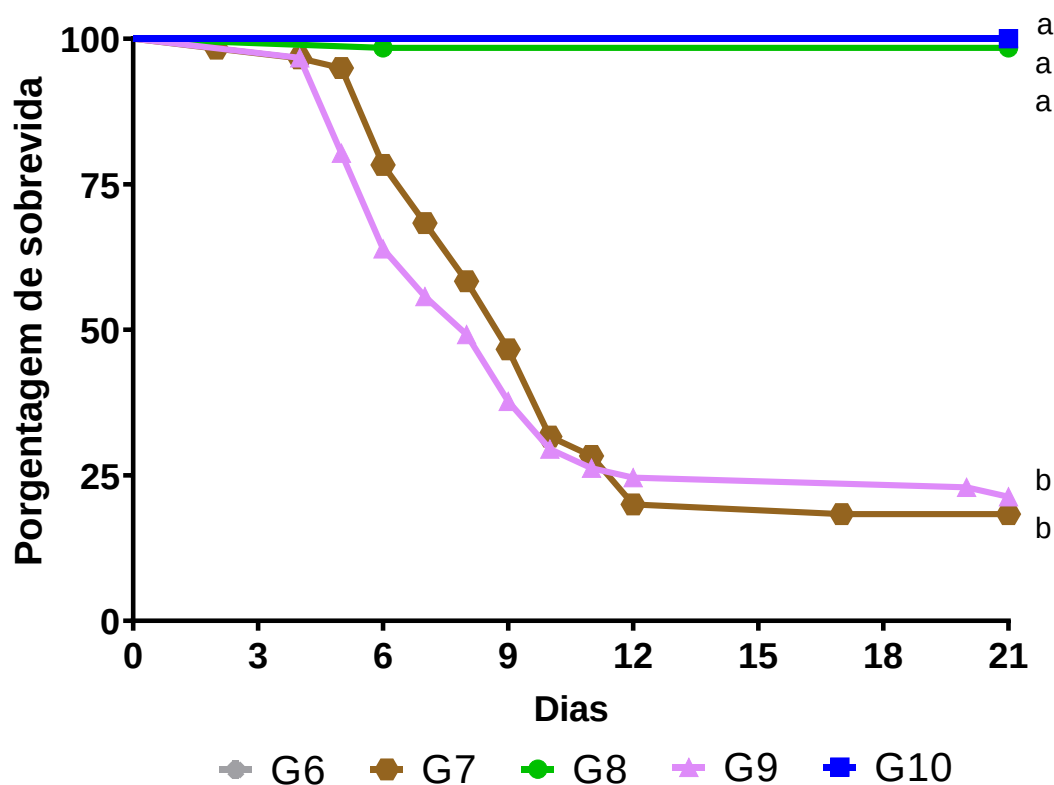


Figura 1. Taxa de sobrevivência (Kaplan-Meier) de tilápias-do-nilo. G6: alimentação normal (adição de óleo de canola), não vacinados (injetados com PBS estéril) e não desafiados (PBS); G7: alimentação normal (adição de óleo de canola), não vacinados (injetados com PBS estéril) e desafiados; G8: alimentação normal (adição

de óleo de canola), vacinados e desafiados; G9: suplementação com MOS, não vacinados (injetados com PBS) e desafiados; G10: suplementação com MOS, vacinados e desafiados. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre grupos ($P < 0.05$).

Tabela 2. Desenho experimental, mortalidade, taxa de sobrevivência e PRS em tilápia-do-nilo vacinados contra *S. agalactiae* inativada com peróxido de hidrogênio sem e com suplementação com MOS.

Grupo	Dose de desafio (CFU mL ⁻¹)	n	Mortalidade	Taxa de sobrevivência (%)	PRS (%)
G6	-	21	0	100.0	-
G7	1,1x10 ⁷	60	49	18.1	-
G8	1,1x10 ⁷	63	1	98.4	98.1
G9	1,1x10 ⁷	61	48	21.2	-
G10	1,1x10 ⁷	63	0	100.0	100.0

No índice esplênico-somático, entre grupos no mesmo tempo não houve diferença significativa ($P > 0.05$) duas semanas após vacinação, no entanto, o índice foi significativamente maior ($P < 0.05$) no grupo suplementado com MOS e não vacinado (G4) quando comparado ao grupo com alimentação normal (adição de óleo de canola) e não vacinados (G2) quatro semanas após vacinação. Adicionalmente, entre tempos no mesmo grupo, os índices foram significativamente maiores nos grupos com alimentação normal e não vacinados (G1) e suplementado com MOS e não vacinados (G4) às quatro semanas após vacinação. No índice hepático-somático, entre grupos no mesmo tempo não houve diferença significativa quatro semanas após vacinação (Tabela 3), no entanto, o índice foi significativamente menor no grupo suplementado com MOS e não vacinado (G4) quando comparado aos outros grupos duas semanas após vacinação. Adicionalmente, entre tempos no mesmo grupo, os índices diminuiram significativamente nos grupos com alimentação normal (adição de óleo de canola) e não vacinados (G2) e alimentação normal (adição de óleo de canola) e vacinados (G3) as quatro semanas após vacinação (Tabela 3).

Tabela 3. Valores médios dos índices esplênico-somático (ISS) e hepático-somático (IHS) (média $\pm$ erro padrão) de tilápia-do-nilo duas semanas e quatro semanas após vacinação contra *S. agalactiae*.

	G1	G2	G3	G4	G5
Duas semanas após vacinação					
ISS	0.032 $\pm$ 0.023Ab	0.051 $\pm$ 0.015Aa	0.078 $\pm$ 0.045Aa	0.083 $\pm$ 0.013Ab	0.081 $\pm$ 0.037Aa
IHS	1.263 $\pm$ 0.334Aa	1.210 $\pm$ 0.110Aa	1.315 $\pm$ 0.277Aa	0.083 $\pm$ 0.013Bb	1.112 $\pm$ 0.155Aa
Quatro semanas após vacinação					
ISS	0.079 $\pm$ 0.018ABa	0.044 $\pm$ 0.007Ba	0.074 $\pm$ 0.019ABa	0.107 $\pm$ 0.018Aa	0.059 $\pm$ 0.012ABa
IHS	1.020 $\pm$ 0.150Aa	1.001 $\pm$ 0.106Ab	0.963 $\pm$ 0.079Ab	1.125 $\pm$ 0.038Aa	0.960 $\pm$ 0.238Aa

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre grupos no mesmo tempo e letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre tempos no mesmo grupo ($P < 0.05$). G1: alimentação normal e não vacinados; G2: alimentação normal (adição de óleo de canola) e não vacinados (injetados com PBS estéril); G3: alimentação normal (adição de óleo de canola) e vacinados; G4: suplementação com MOS e não vacinados (injetados com PBS estéril); G5: suplementação com MOS e vacinados.

No teste de ELISA para a determinação de anticorpos IgM anti-*Streptococcus agalactiae*, os níveis foram significativamente maiores ($P < 0.05$) no grupo suplementado com MOS e vacinado (G5) quando comparado ao grupo controle com alimentação normal (adição de óleo de canola) e não vacinado (G2) quatro semanas após vacinação (Figura 2). Adicionalmente, entre tempos no mesmo grupo, os resultados evidenciaram níveis significativamente maiores nos diferentes grupos (G3, G4 e G5) às duas e quatro semanas quando comparados às seis semanas após vacinação. No caso do grupo com alimentação normal e não vacinado (G1) os níveis foram significativamente menores na sexta semana quando comparado às quatro semanas após vacinação e no caso do grupo G2 foram significativamente menores na sexta semana quando comparado às duas semanas após vacinação.

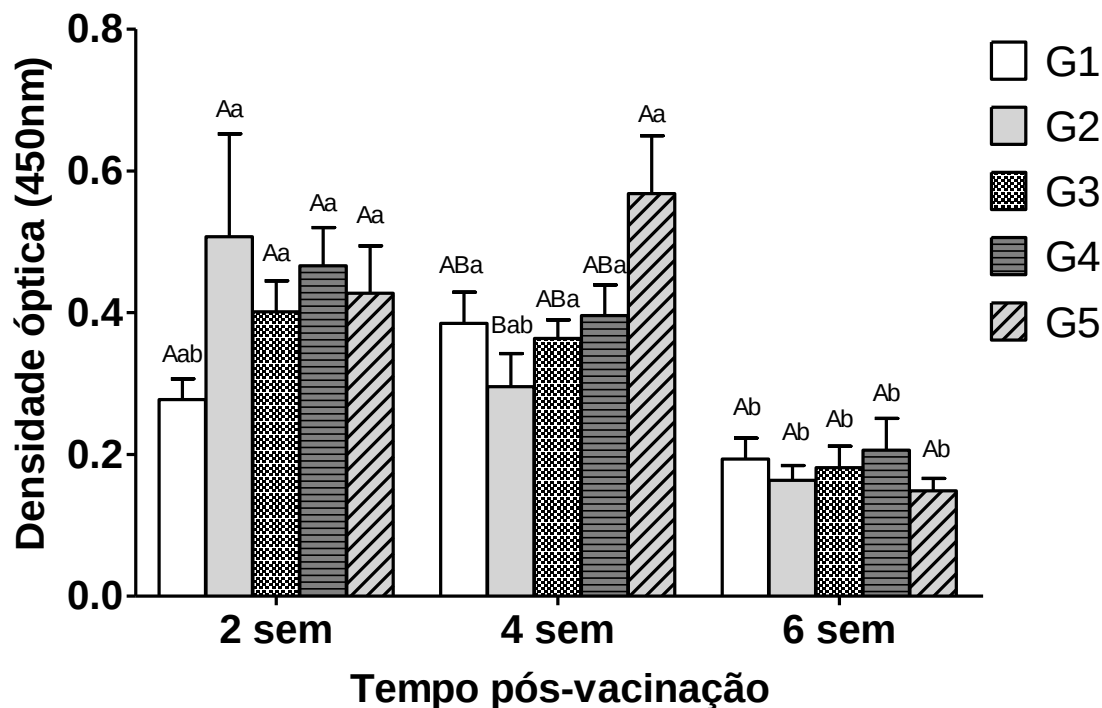


Figura 2. Detecção de anticorpos IgM anti-*Streptococcus agalactiae* em tilápias-do-nilo vacinadas com e sem suplementação (N=5). As barras verticais representam o erro padrão da média. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre grupos no mesmo tempo e letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre tempos (2 e 4 semanas) no mesmo grupo ($P < 0.05$). G1: alimentação normal e não vacinados; G2: alimentação normal (adição de óleo de canola) e não vacinados (injetados com PBS estéril); G3: alimentação normal (adição de óleo de canola) e vacinados; G4: suplementação com MOS e não vacinados (injetados com PBS estéril); G5: suplementação com MOS e vacinados.

No hemograma, os diferentes valores hematológicos foram muito variados apresentando diferenças significativas entre grupos no mesmo tempo e entre tempos no mesmo grupo, que se mostram na tabela 4.

Grupo	G1	G2	G3	G4	G5
Duas semanas após vacinação					
Hemoglobina (g dL ⁻¹)	6.99±0.64a	7.38±0.39b	6.43±1.20	7.51±1.03 ^a	6.47±0.61
Hematócrito (%)	30.50±2.04B	36.43±3.36A	33.33±5.06AB	34.64±4.69AB	31.50±2.86AB
Eritrócitos totais (x10 ⁶ uL ⁻¹)	1.81±0.18B	1.60±0.06Bb	1.83±0.25B	2.27±0.37Aa	1.75±0.20B
VCM (fL)	169.19±18.55B	230.62±25.81Aa	182.13±9.49B	153.78±13.36Bb	182.47±30.41B
HCM (pg/cel)	38.98±6.43AB	46.14±2.66Aa	35.21±5.29B	33.41±3.69B	37.33±5.31B
CHCM (g dL ⁻¹)	22.98±2.30Aa	20.39±2.01ABb	19.26±2.13B	21.76±1.97ABa	20.57±1.40AB
Quatro semanas após vacinação					
Hemoglobina (g dL ⁻¹)	5.77±0.83Bb	8.73±1.18Aa	6.81±0.39B	6.31±0.48Bb	6.74±1.24B
Hematócrito (%)	32.0±1.19	34.07±3.22	32.08±3.37	31.64±2.97	30.14±4.50
Eritrócitos totais (x10 ⁶ uL ⁻¹)	1.75±0.22	2.07±0.11a	1.74±0.12	1.83±0.30b	1.90±0.45
VCM (fL)	185.58± 22.68	156.60±17.32b	184.85± 21.10	175.18±17.95a	164.20±36.89
HCM (pg)	33.17±3.61	40.09±4.41b	39.37±4.39	35.00±4.02	36.27±5.94
CHCM (g dL ⁻¹)	18.04±2.51Bb	25.63±2.54Aa	21.43±2.70AB	19.97±0.83Bb	22.54±3.93AB

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre grupos no mesmo tempo e letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre tempos no mesmo grupo ($P < 0.05$). VCM- Volume Corpuscular Médio, HCM-Hemoglobina Corpuscular Média, CHCM-Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média. G1: alimentação normal e não vacinados; G2: alimentação normal (adição de óleo de canola) e não vacinados (injetados com PBS estéril); G3: alimentação normal (adição de óleo de canola) e vacinados; G4: suplementação com MOS e não vacinados (injetados com PBS estéril); G5: suplementação com MOS e vacinados.

Tabela 4. Série vermelha (média $\pm$ erro padrão) de tilápia-do-nylo duas semanas e quatro semanas após vacinação contra *S. agalactiae*.

No leucograma, os diferentes valores hematológicos foram muito variados apresentando diferenças significativas entre grupos no mesmo tempo e entre tempos no mesmo grupo, que se mostram na tabela 5.

Tabela 5. Série branca (média $\pm$ erro padrão) de tilápia-do-nylo duas semanas e quatro semanas após vacinação contra *S. agalactiae*.

Grupo	G1	G2	G3	G4	G5
Duas semanas após vacinação					
Leucócitos totais ($\times 10^3 \text{ uL}^{-1}$)	43.82 $\pm$ 12.44	41.66 $\pm$ 7.32	32.94 $\pm$ 9.55b	30.55 $\pm$ 4.80	44.16 $\pm$ 13.34
Granulócitos ($\times 10^3 \text{ uL}^{-1}$)	2.57 $\pm$ 1.74	0.96 $\pm$ 0.44	1.0 $\pm$ 0.58b	1.31 $\pm$ 0.81b	1.53 $\pm$ 0.89
Linfócitos ($\times 10^3 \text{ uL}^{-1}$)	35.09 $\pm$ 10.56	36.31 $\pm$ 7.02	28.34 $\pm$ 7.90b	26.46 $\pm$ 4.09	39.05 $\pm$ 13.11
Monócitos ($\times 10^3 \text{ uL}^{-1}$)	5.82 $\pm$ 1.98Aa	4.46 $\pm$ 2.13AB	3.60 $\pm$ 1.57AB	2.78 $\pm$ 0.84B	3.58 $\pm$ 0.22AB
Trombócitos ($\times 10^3 \text{ uL}^{-1}$)	34.26 $\pm$ 10.19	21.65 $\pm$ 7.35	15.51 $\pm$ 6.52	29.51 $\pm$ 15.12	32.21 $\pm$ 21.55
Quatro semanas após vacinação					
Leucócitos totais ($\times 10^3 \text{ uL}^{-1}$)	39.64 $\pm$ 7.03	60.86 $\pm$ 22.34	57.24 $\pm$ 15.52a	37.97 $\pm$ 8.41	54.17 $\pm$ 17.60
Granulócitos ($\times 10^3 \text{ uL}^{-1}$)	2.91 $\pm$ 0.93	1.60 $\pm$ 1.03	2.78 $\pm$ 1.46a	4.32 $\pm$ 2.26a	3.67 $\pm$ 2.79
Linfócitos ($\times 10^3 \text{ uL}^{-1}$)	32.93 $\pm$ 7.09B	56.20 $\pm$ 20.37A	49.57 $\pm$ 12.10ABa	30.30 $\pm$ 7.82B	46.20 $\pm$ 13.60AB
Monócitos ($\times 10^3 \text{ uL}^{-1}$)	3.29 $\pm$ 1.33b	3.06 $\pm$ 1.46	4.89 $\pm$ 2.92	3.34 $\pm$ 1.84	4.30 $\pm$ 2.48
Trombócitos ($\times 10^3 \text{ uL}^{-1}$)	24.10 $\pm$ 9.88	27.46 $\pm$ 19.66	18.17 $\pm$ 10.42	16.61 $\pm$ 5.07	19.16 $\pm$ 10.71

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre grupos no mesmo tempo e letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre tempos no mesmo grupo ($P < 0.05$). Granulócitos: constituídos de neutrófilos, células granulocíticas especiais, basófilos e eosinófilos. G1: alimentação normal e não vacinados; G2: alimentação normal (adição de óleo de canola) e não vacinados (injetados com PBS estéril); G3: alimentação normal (adição de óleo de canola) e vacinados; G4: suplementação com MOS e não vacinados (injetados com PBS estéril); G5: suplementação com MOS e vacinados.

No teste de atividade respiratória de leucócitos, entre grupos no mesmo tempo os níveis foram significativamente maiores ($P < 0.05$) no grupo com alimentação normal (adição de óleo de canola) e não vacinado (G2) quando comparado aos grupos com alimentação normal e não vacinado (G1), alimentação normal (adição de óleo de canola) e vacinado (G3) e suplementado com MOS e vacinado (G5) duas semanas após vacinação (Figura 3). Adicionalmente, entre tempos no mesmo grupo, os valores diminuíram significativamente no caso dos grupos G2, G4 e G5 às quatro semanas após vacinação.

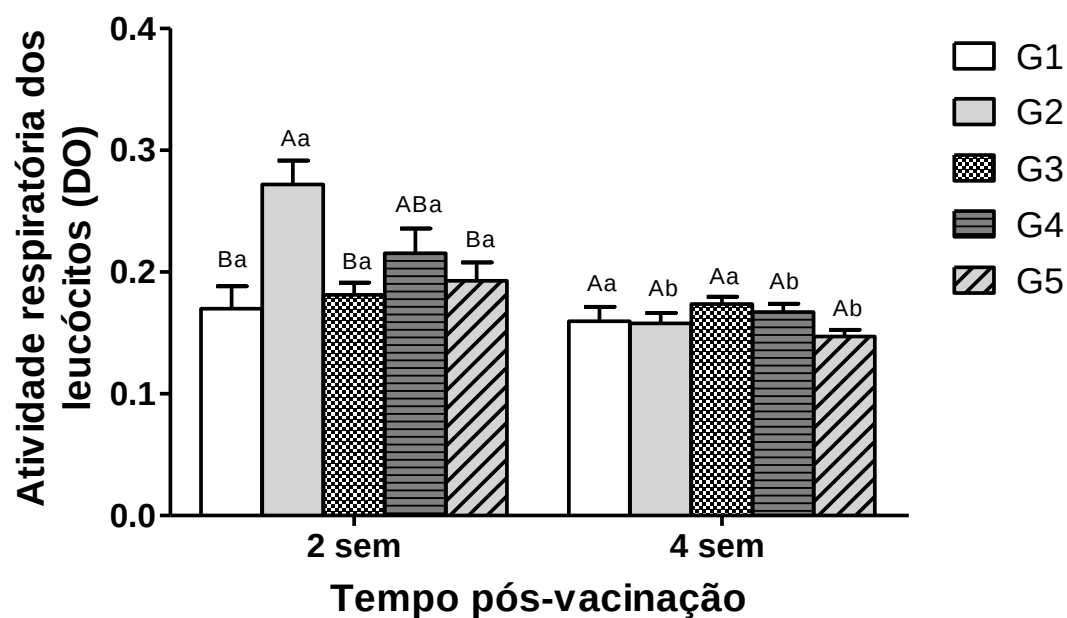


Figura 3. Atividade respiratória dos leucócitos sanguíneos após vacinação. As barras verticais representam o erro padrão da média. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre grupos no mesmo tempo e letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre tempos (2 e 4 semanas) no mesmo grupo ($P < 0.05$). G1: alimentação normal e não vacinados; G2: alimentação normal (adição de óleo de canola) e não vacinados (injetados com PBS estéril); G3: alimentação normal (adição de óleo de canola) e vacinados; G4: suplementação com MOS e não vacinados (injetados com PBS estéril); G5: suplementação com MOS e vacinados.

No teste de atividade da mieloperoxidase, entre tempos no mesmo grupo, os valores incrementaram significativamente ($P < 0.05$) no caso dos grupos G3 e G4 às quatro semanas (Figura 4).

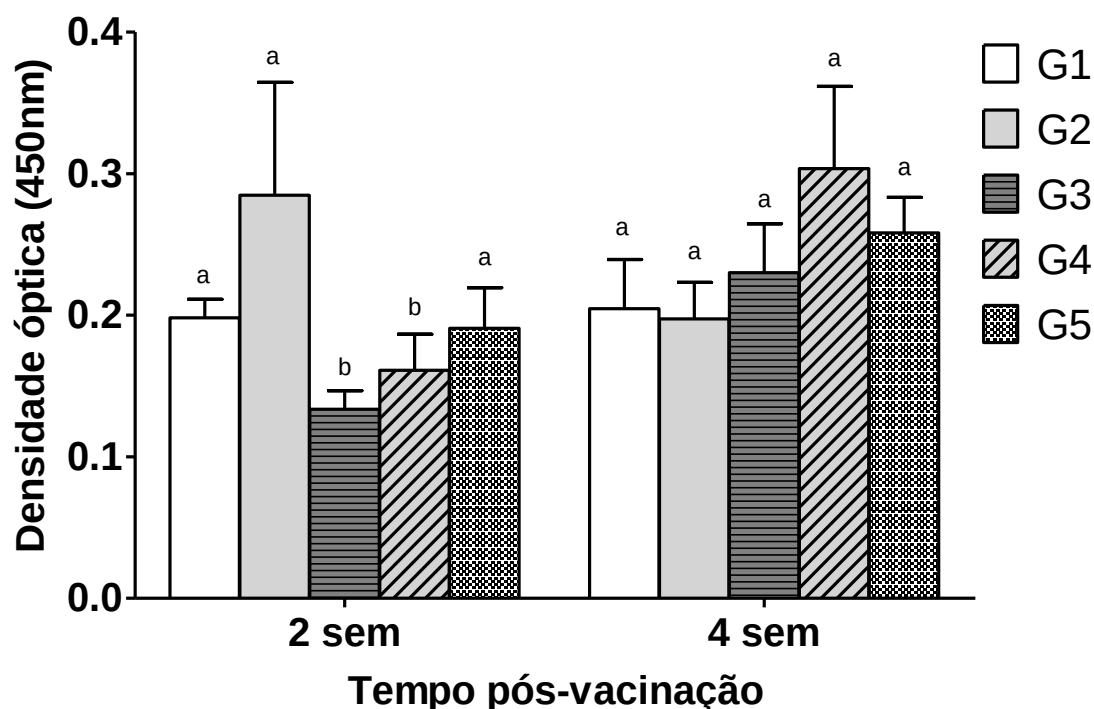


Figura 4. Atividade da mieloperoxidase após vacinação. As barras verticais representam o erro padrão da média. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre grupos no mesmo tempo e letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre tempos (2 e 4 semanas) no mesmo grupo ($P < 0.05$). G1: alimentação normal e não vacinados; G2: alimentação normal (adição de óleo de canola) e não vacinados (injetados com PBS estéril); G3: alimentação normal (adição de óleo de canola) e vacinados; G4: suplementação com MOS e não vacinados (injetados com PBS estéril); G5: suplementação com MOS e vacinados.

Na avaliação das proteínas totais do soro, entre grupos no mesmo tempo (Tabela 6), os valores foram significativamente maiores ($P < 0.05$) no grupo suplementado com MOS e não vacinado (G4) quando comparado ao grupo suplementado com MOS e vacinado (G5) duas semanas após vacinação. Adicionalmente, entre tempos no mesmo grupo, no grupo com alimentação normal (adição de óleo de canola) e não vacinado (G2) os valores diminuíram na quarta semana quando comparado à segunda semana, no caso do grupo com alimentação normal (adição de óleo de canola) e vacinado (G3) os valores diminuíram na quarta semana quando comparado à segunda semana, mas voltaram a aumentar novamente na sexta semana. Finalmente, no caso de G5, os valores aumentaram na sexta semana quando comparado à segunda semana.

Os níveis de albumina no soro, entre tempos no mesmo grupo, no caso de alimentação normal e não vacinado (G1) foram significativamente maiores (P

< 0.05) na sexta semana quando comparados às duas e quarta semanas após vacinação, e no caso de alimentação normal (adição de óleo de canola) e não vacinado (G2) os valores aumentaram significativamente às seis semanas após vacinação (Tabela 6).

Os níveis de globulina no soro, entre grupos no mesmo tempo, foram significativamente menores ($P < 0.05$) duas semanas após vacinação no grupo G5 quando comparado aos grupos G2 e G4. Além disso, entre tempos no mesmo grupo, no caso de G4 os valores diminuíram às seis semanas e finalmente no caso de G5 os valores aumentaram às seis semanas após vacinação (Tabela 6).

A relação albumina-globulina, entre grupos no mesmo tempo, foram significativamente menores ($P < 0.05$) duas semanas após vacinação entre no grupo G1 quando comparado aos grupos G3 e G5 (Tabela 6).

Tabela 6. Variáveis bioquímicas (média $\pm$ erro padrão) de tilápia-do-nilo duas semanas, quatro e seis semanas após vacinação contra *S. agalactiae*.

Grupo	G1	G2	G3	G4	G5
Duas semanas após vacinação					
Proteínas totais (gdL⁻¹)	2.68 $\pm$ 0.71AB	2.98 $\pm$ 0.38ABa	2.41 $\pm$ 0.38ABa	2.98 $\pm$ 0.82A	2.09 $\pm$ 0.23Bb
Albumina (gdL⁻¹)	0.55 $\pm$ 0.13b	0.70 $\pm$ 0.10ab	0.80 $\pm$ 0.33	0.72 $\pm$ 0.27	0.74 $\pm$ 0.17
Globulinas (gdL⁻¹)	2.13 $\pm$ 0.70ABa	2.28 $\pm$ 0.35Aa	1.61 $\pm$ 0.60AB	2.26 $\pm$ 0.72Aa	1.35 $\pm$ 0.14Bb
Relação A:G (gdL⁻¹)	0.28 $\pm$ 0.10Bb	0.31 $\pm$ 0.06ABb	0.60 $\pm$ 0.34A	0.34 $\pm$ 0.15AB	0.55 $\pm$ 0.14A
Quatro semanas após vacinação					
Proteínas totais (gdL⁻¹)	2.09 $\pm$ 0.46	2.10 $\pm$ 0.15b	1.71 $\pm$ 0.38b	2.24 $\pm$ 0.31	2.20 $\pm$ 0.48ab
Albumina (gdL⁻¹)	0.57 $\pm$ 0.13b	0.60 $\pm$ 0.12b	0.52 $\pm$ 0.16	0.62 $\pm$ 0.22	0.68 $\pm$ 0.18
Globulinas (gdL⁻¹)	1.53 $\pm$ 0.38ab	1.51 $\pm$ 0.07b	1.19 $\pm$ 0.42	1.62 $\pm$ 0.29ab	1.52 $\pm$ 0.37ab
Relação A:G (gdL⁻¹)	0.38 $\pm$ 0.09ab	0.40 $\pm$ 0.08ab	0.51 $\pm$ 0.28	0.40 $\pm$ 0.15	0.46 $\pm$ 0.12
Seis semanas após vacinação					
Proteínas totais (gdL⁻¹)	2.26 $\pm$ 0.21	2.57 $\pm$ 0.49ab	2.54 $\pm$ 0.69a	2.22 $\pm$ 0.68	2.58 $\pm$ 0.53a
Albumina (gdL⁻¹)	0.87 $\pm$ 0.21a	0.93 $\pm$ 0.33a	0.79 $\pm$ 0.45	0.84 $\pm$ 0.34	0.74 $\pm$ 0.18
Globulinas (gdL⁻¹)	1.40 $\pm$ 0.23b	1.64 $\pm$ 0.41b	1.75 $\pm$ 0.86	1.38 $\pm$ 0.48b	1.85 $\pm$ 0.62a
Relação A:G (gdL⁻¹)	0.66 $\pm$ 0.29a	0.60 $\pm$ 0.30a	0.68 $\pm$ 0.73	0.67 $\pm$ 0.38	0.44 $\pm$ 0.19

¹ Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre grupos no mesmo tempo e letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre tempos no mesmo grupo ($P < 0.05$). G1: alimentação normal e não vacinados; G2: alimentação normal (adição de óleo de canola) e não vacinados (injetados com PBS estéril); G3: alimentação normal (adição de óleo de canola) e vacinados; G4: suplementação com MOS e não vacinados (injetados com PBS estéril); G5: suplementação com MOS e vacinados.

No teste de glicose, entre grupos no mesmo, os valores foram significativamente maiores ($P < 0.05$) no grupo suplementado com MOS e não

vacinado (G4) quando comparado ao grupo alimentação normal (adição de óleo de canola) e não vacinado (G2) duas semanas após vacinação; no entanto não houve diferença significativa entre os grupos quatro semanas após vacinação (Figura 5).

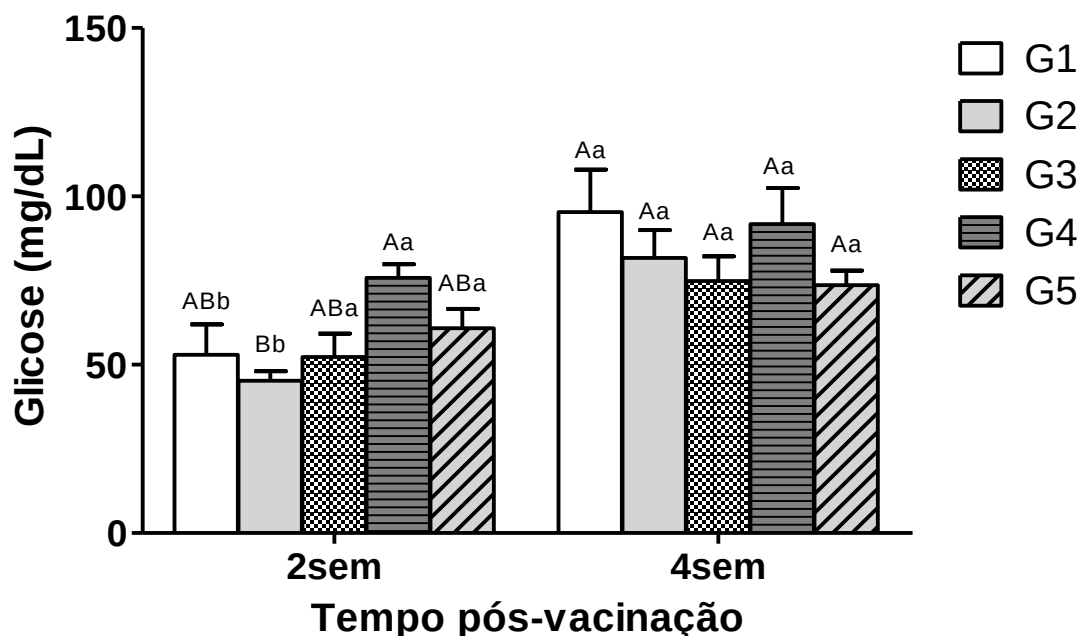


Figura 5. Glicose no plasma após vacinação. As barras verticais representam o erro padrão da média. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre grupos no mesmo tempo e letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre tempos no mesmo grupo ($P < 0.05$). G1: alimentação normal e não vacinados; G2: alimentação normal (adição de óleo de canola) e não vacinados (injetados com PBS estéril); G3: alimentação normal (adição de óleo de canola) e vacinados; G4: suplementação com MOS e não vacinados (injetados com PBS estéril); G5: suplementação com MOS e vacinados.

DISCUSSÃO

A taxa de sobrevivência no grupo vacinado e desafiado G8 apresentou valor de 98.4%, uma porcentagem maior do que os estudos prévios desenvolvidos nos capítulos 1 e 2 (80,0 e 60,0% respectivamente), evidenciando-se diferença significativa quando comparado ao grupo controle não vacinado e desafiado G7. No presente trabalho a dose de desafio foi maior ($1,1 \times 10^7$ UFC.mL⁻¹) o que poderia ter influenciado na menor sobrevivência (18,1%) no grupo com alimentação normal, não vacinado e desafiado (G7). Porém, a alta taxa de sobrevivência no grupo com alimentação normal, vacinado e desafiado (G8) indicou alta eficácia da

vacina inativada com peróxido de hidrogênio. Embora esta metodologia não tenha sido utilizada na vacinação em peixes, já demonstrou resultados similares em vacinas inativadas experimentais contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* em camundongos (FAN et al., 2019), em vacinas contra o vírus do oeste do Nilo em camundongos e macacos Rhesus apresentaram curvas de sobrevida de 80,0 a 100,0% (PINTO et al., 2013; POORE et al., 2017) e em vacinas contra o vírus da coriomeningite linfocítica em camundongos 100% de eficácia (AMANNA et al., 2012). A porcentagem de sobrevida no grupo suplementado com MOS, vacinado e desafiado G10 apresentou valor de 100,0%, evidenciando-se diferença significativa quando comparado ao grupo controle suplementado com MOS, não vacinado e desafiado G9 (21,2%), o que reafirmou a boa eficácia da vacina inativada com peróxido de hidrogênio. No entanto, não houve diferença significativa entre os grupos G8 e G10, evidenciando que a inclusão do MOS na dieta após vacinação até o desafio não influenciou na eficácia da vacina. Além disso, os resultados no grupo G9, evidenciaram que a inclusão de MOS na dieta quatro semanas prévio ao desafio não teve efeito na sobrevida das tilápias. Torrecillas et al. (2014) mencionaram alguns fatores determinantes na obtenção de altas taxas de sobrevida tais como o período da suplementação prévio ao desafio, o tipo de MOS usados ou o processo de fabricação. No nosso estudo o período de suplementação foi de quatro semanas prévio ao desafio. Welker et al. (2007) encontraram porcentagens maiores de sobrevida em bagres de canal *Ictalurus punctatus* de 10,6g alimentados com MOS (2g K⁻¹) quatro semanas prévio a um desafio por imersão com *Edwardsiella ictaluri*, mas o aumento não foi significativo em relação ao grupo controle. Pelo contrário, Samrongpan et al. (2008) encontraram maiores valores significativos de sobrevida quando comparado ao controle em tilápias-do-nilo de 13g suplementadas com MOS (2, 4 e 6g K⁻¹) por um período de três semanas antes de desafio por imersão com *S. agalactiae*. O uso de β -glucanos como imunoestimulante em estudos de sobrevida, revelou também resultados diversos na literatura. Whittington et al., (2005) concluíram que o suplemento com β -glucanos por 14 semanas não teve efeito na resistência contra o desafio contra *S. agalactiae* em tilápias-do-nilo. No entanto, Salvador et al. (2012) reportaram 100% de sobrevida em tilápias-do-nilo desafiadas contra *S. agalactiae* incluindo *Saccharomyces cerevisiae* a 0.3% na ração 77 dias antes

do desafio. Em relação aos valores de PRS, o grupo com alimentação normal, vacinado e desafiado (G8) e o grupo suplementado com MOS, vacinado e desafiado (G10) apresentaram valores altos (98,1% e 100,0%, respectivamente), os quais são promissórios no uso de esta metodologia de inativação para vacinas em peixes. Experimentos prévios no Brasil, testaram vacinas contra *S. agalactiae* inativadas com formaldeído em tilápias-do-nilo de 20g, obtendo PRS de 83,6 e 96,4%, quando aplicado com uma ou duas doses respectivamente (PRETTO-GIORDANO et al. 2010). O uso de AIF, o qual já tinha sido testado no experimento 2, também poderia ter melhorado a eficácia da vacina.

Os índices esplênicos-somáticos e hepáticos-somáticos são considerados como indicadores de saúde nos peixes (ABD-EL-RHMAN, 2009). Quatro semanas após vacinação, o índice esplênico-somático foi significativamente maior no grupo suplementado com MOS e não vacinado (G4) quando comparado ao grupo com alimentação normal e não vacinados (G2). Adicionalmente, entre tempos no mesmo grupo, o grupo suplementado com MOS e não vacinado (G4) aumentou também o índice esplênico-somático às quatro semanas após vacinação. Estes aumentos do índice esplênico-somático referidos no grupo G4 poderiam sugerir maior estimulação do sistema imune pelo efeito do MOS. Tavares-Dias et al. (2000) mencionaram que o aumento do tamanho do baço está relacionado ao desenvolvimento de respostas leucocitárias e reflete ativação do sistema imune. No caso do índice hepático-somático, os valores entre os tratamentos não apresentaram diferença significativa com exceção do grupo suplementado com MOS e não vacinado (G4), o qual seu valor foi significativamente menor duas semanas após vacinação. Estudos realizados em *Piaractus mesopotamicus* não apresentaram diferença significativa nos hepáticos-somáticos entre tratamentos incluindo diferentes concentrações de MOS e β -glucanos na dieta quando comparados ao controle (HISANO et al., 2018).

Os níveis de anticorpos no grupo com suplementação com MOS e vacinado (G5) apresentaram níveis significativamente maiores de anticorpos quando comparado ao grupo G2 quatro semanas após vacinação, o que poderia estar relacionado à vacina. O MOS, parece não terem influenciado na resposta

imune humoral quando incluso na dieta nos grupos não vacinados quanto vacinados. A estimulação do sistema imune inato é um dos principais benefícios atribuídos à suplementação com MOS (TORRECILLAS et al., 2014). WHITTINGTON et al., 2005 não reportaram efeitos na estimulação da resposta imune humoral em tilápias-do-nilo alimentadas 42 dias com diferentes dietas contendo β -glucanos antes da vacinação intraperitoneal contra *S. iniae*. Adicionalmente, os níveis de anticorpos no grupo com alimentação normal (adição de óleo de canola) e vacinado (G3), no grupo com suplementação com MOS não vacinado (G4) e no grupo com suplementação com MOS e vacinado (G5) diminuíram às seis semanas quando comparados às duas e quatro semanas após vacinação, o que indica aumento na resposta imune humoral. Estudos em vacinas experimentais contra vírus da raiva em camundongos (ABDELGHAFAR et al., 2016) e vírus do oeste do Nilo em macacos Rhesus e camundongos (PINTO et al., 2013; POORE et al., 2017) demonstraram vigorosa proteção vacinal produzindo incremento da resposta humoral e celular. Adicionalmente, o fato de ter adicionado AIF na vacina nos grupos G3 e G5 poderia ter contribuído no incremento na resposta.

No hemograma, entre grupos no mesmo tempo às duas semanas, os valores de eritrócitos totais foram significativamente maiores no grupo com suplementação com MOS não vacinado (G4) e os valores de volume corpuscular médio e hemoglobina corpuscular média foram maiores no grupo G2, o que poderia ser consequência de algum tipo de estresse não controlado durante o estudo. O aumento de hemácias, hemoglobina ou outras variáveis hematológicas sugerem altas demandas de oxigênio ante as situações adversas (Barros et al., 2014). No caso da concentração de hemoglobina corpuscular média, o grupo com alimentação normal e não vacinado (G1) apresentou valores maiores do que o grupo com alimentação normal (adição de óleo de canola) e vacinado (G3). Embora alguns dos valores sanguíneos tenham diminuído após quatro semanas, o grupo G2 apresentou valores maiores de hemoglobina e concentração de hemoglobina corpuscular média, quando comparado aos outros grupos às quatro semanas, o que poderia significar maior atividade imune no grupo. Bishlawy et al. (1999) hipotetizou uma relação entre eritrócitos, hemoglobina e resposta imune, sugerindo uma participação ativa na resposta

imune contra patógenos. Adicionalmente, os valores de hemoglobina e concentração de hemoglobina corpuscular média diminuíram significativamente após quatro semanas no grupo com alimentação normal e não vacinado G1 e no grupo com suplementação com MOS não vacinado (G4). Além disso, os valores de eritrócitos totais no grupo G4, e os valores de volume corpuscular médio e hemoglobina corpuscular média no grupo G2 diminuíram às quatro semanas. Shen et al. (2018) descobriram genes associados à imunidade e sugeriram uma participação dos eritrócitos na resposta imune em tilápia-do-nilo. Neste estudo, provavelmente os valores menores na quarta semana foram devido a diminuição na participação destas células na resposta imune. No entanto, houve aumento nos valores de hemoglobina, eritrócitos totais e concentração de hemoglobina corpuscular média no grupo G2, e no valor de volume corpuscular médio no grupo G4 às quatro semanas.

No leucograma, entre grupos no mesmo tempo duas semanas após vacinação, os valores de monócitos para o grupo com alimentação normal e não vacinado (G1) foram maiores quando comparados ao grupo com suplementação com MOS não vacinado (G4), evidenciando baixo efeito da incorporação do MOS na dieta. Além disso, o grupo G2 apresentou valores maiores de linfócitos quando comparado aos grupos G1 e G4 quatro semanas após vacinação, o que confirma a inatividade do MOS na dieta. Sado *et al.*, (2008) não encontraram diferenças significativas nos parâmetros sanguíneos em tilápias-do-nilo alimentadas com MOS quando comparadas ao controle. No entanto, no grupo com alimentação normal (adição de óleo de canola) e vacinado G3 os valores de linfócitos e neutrófilos aumentaram às quatro semanas, o que poderia indicar aumento da resposta imune inata e adaptativa por causa da vacina. Mutoloki (2014) descreveu os linfócitos como as células-chave na resposta imune adaptativa e Magnadottir (2006) descreveu os neutrófilos como células participantes da resposta imune inata. No grupo com suplementação com MOS e não vacinados (G4) os valores de neutrófilos aumentaram quando comparado ao grupo com suplementação com MOS e vacinado (G5), indicando possivelmente estimulação na resposta imune inespecífica.

Nesse estudo evidenciou-se maior atividade respiratória de leucócitos, entre tempos no mesmo grupo, na segunda semana quando comparada à quarta semana no grupo com suplementação com MOS e não vacinado (G4) e no grupo com suplementação com MOS e vacinados (G5), o que poderia significar estimulação da resposta imune inata nos grupos G4 e G5 nas primeiras duas semanas por causa do MOS. Sahoo et al. (2011) mencionaram que a atividade respiratória dos leucócitos é um dos maiores indicadores de função fagocítica nas células do sistema imune. Soares et al (2018) relataram níveis maiores de atividade dos leucócitos em pacus *Piaractus mesopotamicus* alimentados com produto combinado contendo β -glucanos e MOS e posteriormente estressados e desafiados experimentalmente com *Aeromonas hydrophila*. A administração de estimulantes baseados em β -glucanos fortaleceu a atividade respiratória de leucócitos em pargo rosa *Pagrus auratus* (COOK et al., 2003).

Mieloperoxidase é uma enzima presente nos grânulos de neutrófilos, monócitos e macrófagos dos peixes, tendo atividade bactericida utilizando peróxido de hidrogênio durante o Burst respiratório (GOBI et al., 2016). Nesse estudo, a atividade da mieloperoxidase, entre grupos no mesmo tempo não apresentou diferença significativa duas e quatro semanas após vacinação. Em contraste, níveis de atividade de mieloperoxidase foram maiores em estudo realizado em bagres *Clarias batrachus* alimentados com β -1,3 glucanos quando comparados ao controle (Kumari e Sahoo, 2006). Segundo o mencionado, poderia se sugerir que a magnitude da resposta imune em peixes alimentados com MOS estaria relacionada ao estímulo da duração da suplementação. Diferencias entre espécies poderia também explicar os diferentes reportes nos resultados.

As proteínas no soro, entre grupos no mesmo tempo, G4 e G5 mostraram diferença significativa, sendo os níveis de proteínas no grupo G4 maiores às duas semanas após vacinação. Alguns parâmetros no soro tais como proteínas, albuminas, e globulinas no soro mantiveram-se elevados após inclusão de *Saccharomyces cerevisiae* na dieta em tilápias-do-nilo e posteriormente desafiadas com *A. hydrophila* (ABDEL-TAWWAB et al., 2008). No entanto, as proteínas no soro diminuíram entre tempos no mesmo grupo no grupo com

alimentação normal (adição de óleo de canola) e vacinado (G3) na segunda semana quando comparado à quarta semana, o que indica que a vacina não influenciou nos níveis de proteínas. Melingen et al. (1995) não encontraram diferença significativa nos níveis de proteínas em salmão do atlântico vacinado contra *Aeromonas salmonicida*. Neste experimento, no grupo com suplementação com MOS e vacinados (G5) os valores de proteínas aumentaram na sexta semana, possivelmente pelo fato da inclusão do MOS na dieta. Em relação aos níveis de globulina no soro, entre grupos no mesmo tempo duas semanas após vacinação, o grupo G5 apresentou níveis menores quando comparado aos grupos G2 e G4. Entre tempos no mesmo grupo, o grupo com suplementação com MOS e não vacinado (G4) diminuiu à sexta semana quando comparado ao grupo G5, o qual foi vacinado, onde os níveis de globulina aumentaram à sexta semana, possivelmente pelo aumento das globulinas, proteínas importantes para manter o sistema imune saudável (JHA et al., 2007). Os valores da relação albumina-globulina entre grupos no mesmo tempo duas semanas após vacinação foram maiores nos grupos vacinados G3 e G5, possivelmente pelo aumento da produção de proteínas que participam na resposta imune inata. Exposições a patógenos produzem alterações nos níveis de proteínas no sangue devido aos diferentes estímulos (MOHANTY e SAHOO, 2010).

No presente estudo os níveis de glicose mantiveram-se na faixa de valores de referência para tilápia-do-nilo determinados por Bittencourt (2003). No entanto, entre grupos no mesmo tempo houve níveis maiores significativos no grupo com suplementação com MOS não vacinado (G4) quando comparado ao grupo com alimentação normal (adição de óleo de canola) e não vacinado (G2) duas semanas após vacinação, provavelmente devido a situação de estresse particular durante o experimento. Pottinger e Carrick (1999) mencionaram que os níveis de glicose aumentam em peixes expostos a estímulos estressantes.

Os resultados observados neste estudo demonstraram que a inclusão de MOS na dieta pós-vacinação até o desafio não interferiu na eficácia da vacina experimental. Adicionalmente, confirmaram ótima proteção desta vacina contra a infecção por *S. agalactiae* quando administrada com AIF.

REFERÊNCIAS

- ABD-ELGHAFFAR, A. A.; ALI, A. E.; BOSEILA, A. A.; AMIN, M. A. Inactivation of rabies virus by hydrogen peroxide. **Vaccine**, v. 34, n. 6, p. 798-802, 2016.
- ABDEL-TAWWAB, M.; ABDEL-RAHMAN, A. M.; ISMAEL, N. E. Evaluation of commercial live bakers' yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a growth and immunity promoter for Fry Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) challenged in situ with *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture**, v. 280, n. 1-4, p. 185-189, 2008.
- ABD-EL-RHMAN, A. M. Antagonism of *Aeromonas hydrophila* by propolis and its effect on the performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish & shellfish immunology**, v. 27, n.3, p. 454-459, 2009.
- AMANNA, I. J.; RAUÉ, H.; SLIFKA, M. K. Development of a new hydrogen-peroxide-based vaccine platform. **Nature Medicine**, v. 18, n. 6, p. 974-980, 2012.
- AMEND, D. F. Potency testing of fish vaccines. Fish biologics: serodiagnostics and vaccines, **Developments in Biological Standardization**, v. 49, p. 447-454, 1981.
- BARROS, M. M.; FALCON, D. R.; ORSI, RDE, O.; PEZZATO, L. E.; FERNANDES, A. C. JR.; GUIMARÃES, I. G.; FERNANDES, A. JR.; PADOVANI, C. R, SARTORI, M. M. Non-specific immune parameters and physiological response of Nile tilapia fed β -glucan and vitamin C for different periods and submitted to stress and bacterial challenge. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 39, n. 2, p. 188-195, 2014.
- BEHERA, T.; NANDA, P.K.; MOHANTY, C.; MOHAPATRA, D., SWAIN, P., DAS, B.K., ROUTRAY, P., MISHRA, B.K. SAHOO, S.K. Parenteral immunization of fish, *Labeo rohita* with Poly D, L-lactide-co-glycolic acid (PLGA) encapsulated antigen microparticles promotes innate and adaptive immune responses. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 28, n. 2, p. 320-325, 2010.
- BILLER-TAKAHASHI, J.D.; TAKAHASHI, L.S.; SAITA, M.V.; GIMBO, R.Y.; URBINATI, E.C. Leukocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 73, n. 2, p. 425-429, 2013.

- BISHLAWY I. M. Red blood cells, hemoglobin and the immune system. **Medical Hypotheses**, v. 53, p 345-346, 1999.
- BITTENCOURT, N.; MOLINARI, L.; SCOARIS, D.; PEDROSO, R.; NAKAMURA, C.; UEDA-NAKAMURA, T.; DE ABREU FILHO, B.; DIAS FILHO, B. Haematological and biochemical values for Nile tilapia *Oreochromis niloticus* cultured in semi-intensive system. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 25, n. 2, p. 385-389, 2003.
- BRUDESETH, B. E.; WIULSRØD, R.; FREDRIKSEN, B. N.; LINDMO, K.; LØKLING, K. E.; BORDEVIK, M.; STEINE, N.; GRAVNINGEN, K. Status and future perspectives of vaccines for industrialized fin-fish farming. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 35, n. 6, p. 1759-1768, 2013.
- CHEN, L.; YANG, Z.; HAN, L. A Review on the Use of Near-Infrared Spectroscopy for Analyzing Feed Protein Materials. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 48, p. 509–522, 2013.
- COOK, M. T.; HAYBALL, P. J.; HUTCHINSON, W.; NOWAK, B. F.; HAYBALL, J. D. 2003. Administration of a commercial immunostimulant preparation, EcoActiva™ as a feed supplement enhances macrophage respiratory burst and the growth rate of snapper (*Pagrus auratus*, Sparidae (Bloch and Schneider) in winter. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 14, n. 4, p. 333-345.
- EL-SAYED, A. F. M. **Tilapia culture**. CABI, Wallingford, UK, 2019, 358 p.
- DALMO, R.; BØGWALD, J.; TAFALLA, C. Adjuvants and delivery methods: current and novel. In: ADAMS A. (Eds.). *Fish Vaccines*. Springer Basel, 180 p, 2016.
- FAN, Y.; MU, Y.; LU, L.; TIAN, Y.; YUAN, F.; ZHOU, B.; YU, C.; WANG, Z.; LI, X.; LEI, S.; XU, Y. WU, D.; YANG, L. Hydrogen peroxide-inactivated bacteria induces potent humoral and cellular immune responses and releases nucleic acids. **International Immunopharmacology**, v. 69, p. 389-307, 2019.
- FIGUERAS, A.; SANTARÉM, M. M.; NOVOA, B. Influence of the sequence of administration of β -glucans and a *Vibrio damsela* vaccine on the immune response of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 64, n. 1, p. 59-68, 1998.
- FIRDAUS-NAWI, M.; YUSOFF, S. M.; YUSOF, H.; ABDULLAH, S. Z.; ZAMRI-SAAD, M. Efficacy of feed-based adjuvant vaccine against *Streptococcus*

- agalactiae* in *Oreochromis* spp. in Malaysia. **Aquaculture Research**, v. 45, n. 1, p. 87-96, 2013.
- GOBI, N.; RAMYA, C.; VASEHARAN, B.; MALAIKOZHUNDAN, B.; VIJAYAKIUMAR, S.; MURUGAN, K.; BENELLI, G. *Oreochromis mossambicus* diet supplementation with *Psidium guajava* leaf extracts enhance growth, immune, antioxidant response and resistance to *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 58, p. 572-583, 2016.
- HISANO, H.; SOARES, M.; LUIGGI, F.; ARENA, A. Dietary β -glucans and mannanoligosaccharides improve growth performance and intestinal morphology of juvenile pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). **Aquaculture International**, v. 26, p. 213-223, 2017.
- JHA, A. K.; PAL, A. K.; SAHU, N. P.; KUMAR, S.; MUKHERJEE, S. C. Haemato-immunological responses to dietary yeast RNA, ω -3 fatty acid and β -carotene in *Catla catla* juveniles. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 23, n. 5, p. 917-927, 2007.
- KUMARI, J., SAHOO, P.K. Non-specific immune response of healthy and immunocompromised Asian catfish (*Clarias batrachus*) to several immunostimulants. **Aquaculture**, v. 255, n. 1-4, p. 133-141, 2006.
- LIU, G.; ZHU, J.; CHEN, K.; GAO, T.; YAO, H.; LIU, Y.; ZHANG, Q.; LU, C. Development of *Streptococcus agalactiae* vaccines for tilapia. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 122, n. 2, p. 163-170, 2016.
- LONGHI, E., PRETTO-GIORDANO, L. G., & MÜLLER, E. E. Effectiveness of homologous inactivated *Streptococcus agalactiae* vaccine by immersion bath in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Semina: Ciências Agrárias*, v. 33, n. 6, p. 3191-3200, 2012.
- MAGNADÓTTIR, B. Innate immunity of fish (overview). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 20, n. 2, p. 137-151, 2006.
- MELINGEN, G. O.; STEFANSSON, S. O.; BERG, A.; WERGELAND, H. I. Changes in serum protein and IgM concentration during smolting and early post-smolt period in vaccinated and unvaccinated Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 5, p. 211-221, 1995.
- MOHANTY, B. R.; SAHOO, P. K. Immune responses and expression profiles of some immune-related genes in Indian major carp, *Labeo rohita* to *Edwardsiella tarda* infection. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 28, n. 4, p. 613-621, 2010.

- MOMENI-MOGHADDAM, P.; KEYVANSHOKOOH, S.; ZIAEI-NEJAD, S., SALATI, A. P., PASHA-ZANOOSI, H. Effects of mannan oligosaccharide supplementation on growth, some immune responses and gut lactic acid bacteria of common carp (*Cyprinus Carpio*) fingerlings. **Veterinary Research Forum**, v. 6, n. 3, p. 239-44, 2015.
- MUTOLOKI, S.; JØRGENSEN, J.; EVENSEN, Ø. **The Adaptive Immune Response in Fish**. In: GUDDING R; LILLEAGUG, A.; EVENSEN, Ø (Eds.). Fish vaccination. UK, Wiley Blackwell, 383 p, 2014.
- NETTO, L. N.; LEAL, C. A.; FIGUEIREDO, H. C. *Streptococcus dysgalactiae* as an agent of septicemia in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). **Journal of Fish Diseases**, v. 34, n. 3, p. 251-254, 2011.
- NEIFFER, D. L.; STAMPER, M. A. Fish sedation, analgesia, anesthesia, and euthanasia: considerations, methods, and types of drugs. **ILAR J.** v. 50, n. 4, p. 343-60, 2009.
- PINTO, A. K.; RICHNER, J. M.; POORE, E. A.; PATIL, P. P.; AMANNA, I. J.; SLIFKA, M. K.; DIAMOND, M. S. A hydrogen peroxide-inactivated virus vaccine elicits humoral and cellular immunity and protects against Lethal West Nile Virus infection in aged mice. **Journal of Virology**, v. 87, n. 4, p. 1926-1936.
- POORE, E. A.; SLIFKA, D. K.; RAUÉ, H. P.; THOMAS, A.; HAMMARLUND, E.; QUINTEL, B. K.; TORREY, L. L.; SLIFKA, A. M.; RICHNER, J. M.; DUBOIS, M. E.; JOHNSON, L. P.; DIAMOND, M. S.; SLIFKA, M. K.; AMANNA, I. J. Pre-clinical development of a hydrogen peroxide-inactivated West Nile virus vaccine. **Vaccine**, v. 35, n. 2, p. 283-292, 2017.
- POTTINGER, T. G.; CARRICK, T. R. A comparison of plasma glucose and plasma cortisol as selection markers for high and low stress-responsiveness in female rainbow trout. **Aquaculture**, v. 175, n. 3-4, p. 351-363, 1999.
- PRETTO-GIORDANO, L. G.; MULLER, E. E.; KLESIUS, P.; SILVA, V. G. Efficacy of an experimentally inactivated *Streptococcus agalactiae* vaccine in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in Brazil. **Aquaculture Research**, v. 41, p. 1539-1544, 2010.
- TAFALLA, C.; BØGWALD, J.; DALMO, R.; MUNANG'ANDU, H. M.; EVENSEN, Ø. **Adjuvants in fish vaccines**. In: GUDDING R; LILLEAGUG, A.; EVENSEN, Ø. (Eds.). Fish vaccination. UK, Wiley Blackwell, 383 p, 2014.

- TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M.; MORAES, F. Relação hepatossômica e esplenossômica em peixes teleósteos de cultivo intensivo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 17, n. 1, P. 273 - 281, 2000.
- TORRECILLAS, S.; MONTERO, D.; IZQUIERDO, M. Improved health and growth of fish fed mannan oligosaccharides: potential mode of action. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 36, n. 2, 525-544, 2014.
- SADO, R. Y.; BICUDO, Á. J. D. A.; CYRINO, J. E. P. Feeding dietary mannan oligosaccharides to juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, has no effect on hematological parameters and showed decreased feed consumption. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 39, n. 6, p. 821-826, 2008.
- SAHOO, P. K.; RAUTA, P. R.; MOHANTY, B. R.; MAHAPATRA, K. D.; SAHA, J. N.; RYE, M.; EKNATH, A. E. Selection for improved resistance to *Aeromonas hydrophila* in Indian major carp *Labeo rohita*: Survival and innate immune responses in first generation of resistant and susceptible lines. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 31, n. 3, p. 432-438, 2011.
- SALVADOR, R.; TOAZZA, C.; DE MORAES, J.; DE MORAES, F. Inflammatory responses of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* to *Streptococcus agalactiae*: effects of vaccination and yeast diet supplement. **Disease of Aquatic Organisms**, v. 98, p. 235-241, 2012.
- SAMRONGPAN, C.; AREECHON, N.; YOONPUNDH, R.; SIRSAPOOME, P. Effects of mannanoligosaccharides on growth, survival and disease resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus) fry. In: International symposium on tilapia in aquaculture, p. 345-53, 2008.
- SHEN, Y.; WANG, D.; ZHAO, J.; CHEN, X. Fish red blood cells express immune genes and responses. **Aquaculture and Fisheries**, v. 3, n. 1, p. 14-21, 2018.
- SKOV, J., KANIA, P. W.; HOLTEN-ANDERSEN, L.; FOUZ, B.; BUCHMANN, K. Immunomodulatory effects of dietary β -1, 3-glucan from *Euglena gracilis* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immersion vaccinated against *Yersinia ruckeri*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 33, n. 1, p. 111-120, 2012.
- SHELBY, R. A.; KLESIUS, P. H.; SHOEMAKER, C. A.; EVANS, J. J. Passive immunization of tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), with anti-*Streptococcus iniae* whole sera. **Journal of Fish Diseases**, v. 25, p. 1-6, 2002.

- SOARES, M. P.; OLIVEIRA, F. C.; CARDOSO, I. L.; URBINATI, E. C.; DE CAMPOS, C. M.; HISANO, H. Glucan-MOS® improved growth and innate immunity in pacu stressed and experimentally infected with *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 73, p. 133-140, 2018.
- SOTO, E.; BROWN, N.; GARDENFORS, Z. O.; YOUNT, S.; REVAN, F.; FRANCIS, S.; KEARNEY, M. T.; CAMUS, A. Effect of size and temperature at vaccination on immunization and protection conferred by a live attenuated *Francisella noatunensis* immersion vaccine in red hybrid tilapia. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 41, n. 2, p. 593-599, 2014.
- TORRECILLAS, S.; MONTERO, D.; IZQUIERDO, M. Improved health and growth of fish fed mannan oligosaccharides: potential mode of action. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 36, n. 2, 525-544, 2014.
- WELKER, T. L.; LIM, C.; YILDIRIM-AKSOY, M.; SHELBY, R.; KLESIOUS, P. H. Immune response and resistance to stress and *Edwardsiella ictaluri* challenge in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, fed diets containing commercial whole-cell yeast or yeast subcomponents. **Journal of the world Aquaculture Society**, v. 38, n. 1, p. 24-35, 2007.
- VETVICKA, V.; VANNUCCI, L.; SIMA, P. The effects of β -glucan on fish immunity. **North American Journal of Medical Sciences**, v. 5, n.10, p. 580-588, 2013.
- WHITTINGTON, R.; LIM, C.; KLESIOUS, P. H. Effect of dietary β -glucan levels on the growth response and efficacy of *Streptococcus iniae* vaccine in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, v. 248, n. 1-4, p. 217-225, 2005.
- YE, X.; LI, J.; LU, M.; DENG, G.; JIANG, X.; TIAN, Y.; QUAN, Y.; JIAN, Q. Identification and molecular typing of *Streptococcus agalactiae* isolated from pond-cultured tilapia in China. **Fisheries Science**, v. 77, n. 4, p. 623-632, 2011.
- YUSUF, A., HUANG, X.; CHEN, N.; A., APRAKU; WANG, W; CORNEL, M, RAHMAN. Impact of dietary vitamin c on plasma metabolites, antioxidant capacity and innate immunocompetence in juvenile largemouth bass, *Micropterus salmoides*. *Aquaculture Reports*, v. **Aquaculture Reports**, v. 17, 100383, 2020.