



República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102014022893-4 A2



(22) Data do Depósito: 16/09/2014

(43) Data da Publicação: 03/05/2016

(RPI 2365)

(54) Título: VACINA PARA PEIXES E USO DA MESMA

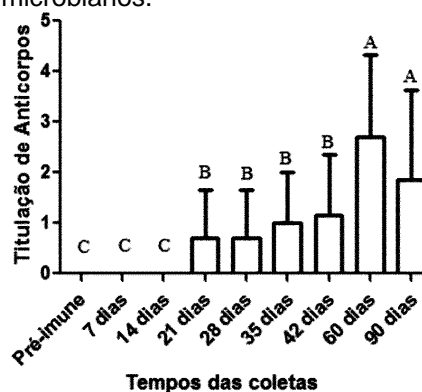
(51) Int. Cl.: A61K 39/09; A61P 37/04

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO

(72) Inventor(es): FLÁVIO RUAS DE MORAES, PAULO FERNANDES MARCUSSO, ROGÉRIO SALVADOR

(74) Procurador(es): FABÍOLA DE MORAES SPIANDORELLO

(57) Resumo: VACINA PARA PEIXES E USO DA MESMA . A presente invenção provê uma vacina inativada contra *Streptococcus agalactiae* para peixes, mais especificamente, tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). Adicionalmente, a invenção se refere ao uso desta vacina para a imunização de peixes contra estreptococose, sendo a mesma aplicada em sistemas intensivos de produção pesqueira, com o objetivo de diminuir as chances de infecção e mortalidade provocada pelo microrganismo e, assim, evitar os prejuízos causados aos produtores e diminuir o uso de antibióticos e outros antimicrobianos.



**VACINA PARA PEIXES E USO DA MESMA****Campo da invenção:**

[001] Esta invenção se insere no campo da piscicultura, mais especificamente no que diz respeito à imunização de peixes, e descreve uma vacina inativada contra *Streptococcus agalactiae* para peixes, mais especificamente, tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*).

[002] Adicionalmente, a invenção se refere ao uso desta vacina para a imunização de peixes contra estreptococose, sendo a mesma aplicada em sistemas intensivos de produção pesqueira.

**Fundamentos da invenção:**

[003] Atualmente, existe uma tendência crescente de intensificação e fortalecimento de integração entre os setores pesqueiros, em decorrência da demanda crescente por produtos com elevado valor nutritivo. Desta forma, torna-se necessária a realização de pesquisas direcionadas para obtenção de uma produção cada vez mais eficiente e sustentável.

[004] A piscicultura é o setor da produção de alimentos de maior expansão mundial, sendo a tilápia uma das espécies de peixe mais cultivada, devido à elevada produtividade, precocidade, fácil adaptabilidade em condições ambientais diversas, pouca susceptibilidade a doenças parasitárias, excelente conversão alimentar e alta resistência a baixas concentrações de oxigênio.

[005] O ciclo de produção da tilápia inicia-se com os alevinos até atingirem em média 30-50 gramas, em seguida, passam para a fase de engorda e finalmente são abatidos com peso entre 800 g e 1 kg, variando em função do mercado

consumidor.

[006] Os peixes estão, ainda, sujeitos a vários fatores estressantes, os quais debilitam suas defesas naturais e facilitam a instalação e disseminação de enfermidades (como elevada densidade nos tanques, manejo intensivo, qualidade da água, temperatura e aspectos nutricionais).

[007] Outra problemática refere-se ao tratamento destas enfermidades. Substâncias tais como agrotóxicos e drogas veterinárias são utilizados de forma indiscriminada e sem critérios, colocando em situação de risco toda a cadeia trófica, o meio ambiente e a saúde humana.

[008] Assim, é necessário buscar medidas preventivas que aperfeiçoem a produção e, ao mesmo tempo, garantam a sanidade do plantel, promovendo uma produção sustentável e um produto final com qualidade para o consumidor.

[009] O *Streptococcus agalactiae* é um patógeno que provoca surtos infecciosos com altas taxas de morbidade e mortalidade, especialmente na tilapicultura. A mortalidade em criação de cativeiro atinge taxas de até 90% na idade pré-comercialização, quando volumes substanciais de ração já foram consumidos.

[010] Os estreptococos patogênicos apresentam várias características que contribuem para sua virulência, como a aderência às superfícies epiteliais, capacidade de invasão de epitélio e endotélio e injúria direta aos tecidos.

[011] A principal via de transmissão é a horizontal, pelo contato com peixes e/ou alimentos contaminados, como também pelo contato indireto mediado pela água dos sistemas de criação. A bactéria é excretada pelas fezes de peixes infectados e pode permanecer viva na coluna de água,

umentando a possibilidade de transmissão fecal-oral.

[012] Outra via é a oral, através do canibalismo de animais mortos ou moribundos. A transmissão vertical do *S. agalactiae* não foi constatada, já que não foram detectadas bactérias nas larvas oriundas dos peixes progenitores infectados.

[013] A doença em tilápias está relacionada a fatores tais como a estirpe do *S. agalactiae*, dose infectante, temperatura da água, biomassa e manejo zootécnico.

[014] Entretanto, condições de alto adensamento, baixa qualidade da água e manejo inadequado induzem os animais ao estresse, que impõe alta exigência energética e leva ao esgotamento das reservas de glicogênio, o que parece favorecer a diminuição da resistência aos patógenos.

[015] Para minimizar tais efeitos é comum a utilização de drogas antimicrobianas, as quais podem ser adicionadas à ração. Esta prática, porém, provoca a seleção de bactérias resistentes, além de provocar desequilíbrio da flora bacteriana intestinal dos peixes.

[016] A vacinação dos peixes de cativeiro é uma alternativa ao uso de antibióticos e outros fármacos na prevenção de infecções. No entanto, a habilidade dos peixes em desenvolver imunidade contra determinado microrganismo depende da idade do peixe, da temperatura da água, do agente de imunização e do método de vacinação.

[017] A aplicação de vacinas pela via intra-celomática é o método mais confiável e eficaz, quando comparado à via oral e imersão. As desvantagens desta via incluem estresse extra para os peixes, custos, segurança e tempo requerido para administração da vacina e para o desenvolvimento de

imunidade.

[018] Inúmeras vacinas contra estreptococose de peixes foram testadas, entretanto, os métodos de inativação são relativamente comuns e/ou semelhantes, fazendo uso do calor ou do formol.

[019] Sendo assim, a presente invenção provê uma vacina inativada contra *Streptococcus agalactiae* para peixes, mais especificamente, tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*).

[020] Adicionalmente, a invenção se refere ao uso desta vacina para a imunização de peixes contra estreptococose, sendo a mesma aplicada em sistemas intensivos de produção pesqueira, para diminuir chances de infecção e mortalidade provocada pelo *S. agalactiae*, evitando, assim, os prejuízos aos produtores e diminuindo o uso de antibióticos e outros antimicrobianos para fornecer proteína de alto valor nutricional em condições mais seguras ao consumidor.

**Estado da técnica:**

[021] Alguns documentos do estado da técnica descrevem vacinas contra *Streptococcus agalactiae* para peixes.

[022] Em KR 20130091301 A, é provida uma vacina para prevenir 3 tipos de doenças bacterianas em uma única administração, a qual inclui um antígeno derivado de uma cepa de *Streptococcus parauberis* alfa-hemolítico. Em CN 102740878 A e KR 20110111154 A faz-se referência a uma vacina estreptocócica combinada.

[023] O documento JP 2012184226 A descreve uma vacina inativada para cultura de peixes de água salgada contra infecções causadas por *Streptococcus agalactiae*.

[024] Nenhum dos documentos do estado da técnica provê uma vacina tal como a vacina descrita na presente invenção.

**Breve descrição da invenção:**

[025] Esta invenção descreve uma vacina inativada contra *Streptococcus agalactiae* para peixes, mais especificamente, tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). Adicionalmente, a invenção se refere ao uso desta vacina para a imunização de peixes contra estreptococose.

**Breve descrição das figuras:**

[026] Para obter uma total e completa visualização do objeto desta invenção, são apresentadas as figuras as quais se faz referências, conforme se segue.

[027] A Figura 1 representa graficamente os valores médios e os desvios-padrão da titulação de anticorpos do grupo vacinado por meio da soroglutinação direta em microplaca nos tempos pré-estabelecidos das coletas.

**Descrição detalhada da invenção:**

[028] Esta invenção descreve uma vacina inativada contra *Streptococcus agalactiae* para peixes, mais especificamente, tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*).

[029] Para a obtenção da vacina da invenção, amostras de *S. agalactiae* foram isoladas de tilápias infectadas naturalmente (foram selecionados os animais com sinais de meningoencefalite, posteriormente identificados segundo as suas características culturais, morfológicas, tintoriais e bioquímicas).

[030] Em seguida, a identificação foi realizada pela técnica convencional de reação em cadeia da polimerase (PCR). Para isso, extraiu-se e quantificou-se o DNA das colônias isoladas, sendo as quantidades ajustadas para a reação de PCR (50-100 µg/µl) e o DNA armazenado à -20 °C até a realização das reações de PCR.

[031] O DNA genômico bacteriano foi submetido à amplificação por PCR com dois *primers* específicos para *S. agalactiae*, amplificando uma sequência específica do gene 16S rDNA, que é um fragmento de 220 pb.

[032] Os *primers* utilizados foram:

- F1 5'GAGTTTGATCATGGCTCAG3'; e
- IMOD 5'ACCAACATGTGTTAATTACTC3'.

[033] O sequenciamento dos isolados identificados como *S. agalactiae* foi realizado a partir do gene 16S rDNA. As sequências resultantes foram comparadas com sequências bacterianas depositadas na base de dados do *National Center for Biotechnology Information* NCBI, apresentando 99,6% de homologia com a cepa de *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813 cepa JCM 5671.

[034] A determinação da concentração bacteriana letal para 50% dos peixes (CL<sub>50</sub>) foi testada e resultou em uma concentração bacteriana de 10<sup>8</sup> UFC/mL.

[035] Para obtenção do inóculo vacinal, o microrganismo foi semeado em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) e, após 5 dias de incubação a 29 °C em aerofilia, o meio foi centrifugado à 4000G (4 °C), durante 20 minutos.

[036] O sobrenadante foi desprezado, a massa bacteriana foi ressuspensa em PBS (tampão fosfato-salino), a fim de conter a quantidade adequada de unidades formadoras de colônias, obtidas pela determinação prévia da CL<sub>50</sub>.

[037] A seguir, foi novamente centrifugada e a operação foi repetida por mais três vezes.

[038] Após a obtenção do extrato, um bloqueador de proteinase foi adicionado e a solução final foi submetida à sonicação (5 pulsos em uma potência de 7 por 1 minuto), com

intervalos de 1 minuto entre as sonicações e mantidos no gelo durante todo o processo.

[039] Para a confirmação da inativação, o produto final foi semeado em meio sólido BHI adicionado 5% de sangue de ovino e incubados a 29 °C, durante 7 dias em aerofilia. Após confirmada a inativação, padronizou-se a concentração dos inóculos (solúvel e insolúvel) por espectrofotometria.

[040] Ainda, mensurou-se a concentração de DNA e pureza determinadas por leituras em absorbância de 260 nm.

[041] Foi incorporado o adjuvante incompleto de Freund, na fração 1:1 em relação à vacina.

[042] A mistura foi emulsionada, sendo mantida em gelo até o momento da imunização, na qual os animais são posicionados em decúbito dorsal para inoculação da vacina na cavidade celomática.

[043] Assim, a vacina proposta pode ser usada para a imunização de peixes contra estreptococose, sendo a mesma aplicada em sistemas intensivos de produção pesqueira.

[044] Assim, as chances de infecção e de mortalidade provocada pelo *S. agalactiae* diminuem e evitam-se prejuízos aos produtores, além de fornecer uma proteína de alto valor nutricional em condições mais seguras ao consumidor.

#### **Testes realizados:**

[045] Nos testes, foram utilizadas 362 tilápias *Oreochromis niloticus* do mesmo lote e revertidas sexualmente, com peso médio de 200±25 g. Os peixes foram aclimatados por um período de 10 dias, em caixas fibra de 250 L, abastecidas com água corrente, proveniente de poço artesiano, com vazão de um litro por minuto, com aeração suplementar.

[046] Após o período de acondicionamento, os animais foram conduzidos ao infectório e dispostos em grupos de acordo com o modelo experimental. Durante o experimento, os peixes foram alimentados pela manhã e tarde com ração comercial, correspondendo a 3% da biomassa. Os parâmetros da água foram determinados por meio de um analisador portátil multiparâmetros. Durante todo o experimento, as variáveis físico-químicas mantiveram-se em zona de conforto para a espécie.

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

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

- Grupo 1 (G1) injetado com PBS via intra-celomática (i.c.) (controle)

- Grupo 2 (G2) injetado com PBS e adjuvante incompleto de Freund 1:1, i.c.

- Grupo 3 (G3) imunizado com a fração solúvel do antígeno de *S. agalactiae* + adjuvante incompleto de Freund 1:1, i.c.

- Grupo 4 (G4) imunizado com a fração insolúvel do antígeno de *S. agalactiae* + adjuvante incompleto de Freund 1:1, i.c.

[048] Depois de 21 dias da imunização, os peixes foram desafiados com inóculo de *S. agalactiae* capaz de produzir a mortalidade em 50% dos peixes (CL<sub>50</sub>).

[049] Após o desafio, os peixes foram observados por 15 dias para determinação da porcentagem relativa de sobrevivência (PRS), em que:

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

[050] Os peixes que apresentaram sinais clínicos compatíveis com a infecção estreptocócica e tornaram-se excessivamente debilitados ou moribundos, foram submetidos à eutanásia por anestesia profunda.

[051] De posse deste resultado, foi escolhida a fração do antígeno sonicado capaz de proporcionar a maior porcentagem de sobrevivência para os experimentos seguintes.

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

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

- Grupo 5 (G5) injetado com salina 0,65% (controle)

- Grupo 6 (G6) imunizado com a fração insolúvel do antígeno de *S. agalactiae* + adjuvante incompleto de Freund

[053] Nos grupos 5 e 6, foi realizada uma coleta de sangue para determinações hematológicas e bioquímicas séricas por punção do vaso caudal, antes da imunização e em coletas seriadas pós-vacinais depois de 7, 14, 21, 28, 35, 42, 60 e 90 dias.

**Resultados obtidos:**

- Avaliação da porcentagem relativa de sobrevivência de tilápias vacinadas com duas diferentes frações de antígenos

de *S. agalactiae* obtidos por sonicação:

[054] A fração solúvel demonstrou a quantidade de 8 mg/dL de proteínas totais. Para a padronização dos inóculos, a fração insolúvel foi diluída até atingir mesma concentração.

[055] O grupo controle apresentou uma porcentagem de mortalidade de 60%, essa foi utilizada para o cálculo da PRS dos grupos a seguir, onde o grupo imunizado com a fração insolúvel apresentou maior PRS na ordem de 100%, seguido dos grupos imunizado com fração solúvel com PRS de 50% e inoculado com adjuvante, que foi de 16,67%.

[056] Portanto os testes foram realizados com a imunização da fração insolúvel da bactéria.

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

[057] O grupo vacinado apresentou titulação de anticorpos positiva no 21° dia após a vacinação, que se manteve até o 28° dia e aumentou progressivamente aos 35 e 42 dias, para atingir o máximo após 60 dias. Embora tenha diminuído no 90° dia, a diferença não foi significativa em relação à observação anterior.

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

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

[060] Os valores da concentração de globulinas no grupo controle não se alteraram significativamente entre os

diferentes tempos de avaliação.

[061] As avaliações hematológicas demonstraram que no grupo controle não houve diferença significativa entre os valores de linfócitos do grupo controle durante o experimento, diferente do ocorrido no grupo vacinado, no qual ocorreu aumento significativo no número dessas células nos vacinados a partir do 14º dia, diferindo até o fim do experimento, aos 90 dias após a vacinação. O número de leucócitos totais se diferiu entre os tratamentos nos tempos de 14, 21 e 35 dias após a vacinação.

[062] Sendo assim, os resultados demonstraram que a vacina contra *S. agalactiae* utilizando a fração insolúvel do antígeno apresentou alta eficiência na proteção de tilápias contra o desafio com a cepa homóloga, ao se considerar o percentual relativo de sobrevivência.

[063] A fração insolúvel do *S. agalactiae* sonicado e adjuvante incompleto de Freund (vacina) demonstrou proteção de longa duração, com titulação máxima aos 60 dias pós vacinação.

[064] A função do adjuvante incompleto de Freund é manter o imunógeno entre os glóbulos de óleo após a injeção, permitindo liberação prolongada e lenta dos antígenos no tecido de animais vacinados para permitir o aumento da formação de anticorpos e favorecer a proteção dos peixes contra a infecção.

[065] Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidas no escopo das reivindicações anexas.

### REIVINDICAÇÕES

1. Vacina para peixes caracterizada pelo fato de compreender uma suspensão bacteriana de *S. agalactiae* em PBS e adjuvante incompleto de Freund, em uma proporção de 1:1.

2. Vacina para peixes, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a suspensão bacteriana de *S. agalactiae* apresenta concentração equivalente a  $10^8$  UFC/mL.

3. Vacina para peixes, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que a suspensão bacteriana de *S. agalactiae* é inativada por sonicação.

4. Uso da vacina para peixes, conforme definida nas reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de ser para a imunização de peixes contra estreptococose, em que os peixes são tilápias, preferencialmente tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*).

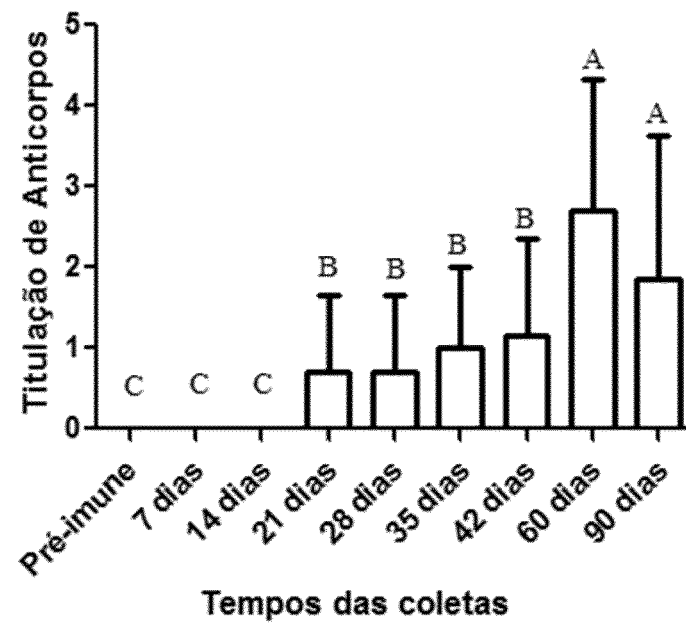


FIGURA 1

Resumo**VACINA PARA PEIXES E USO DA MESMA**

A presente invenção provê uma vacina inativada contra *Streptococcus agalactiae* para peixes, mais especificamente, tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). Adicionalmente, a invenção se refere ao uso desta vacina para a imunização de peixes contra estreptococose, sendo a mesma aplicada em sistemas intensivos de produção pesqueira, com o objetivo de diminuir as chances de infecção e mortalidade provocada pelo microrganismo e, assim, evitar os prejuízos causados aos produtores e diminuir o uso de antibióticos e outros antimicrobianos.