

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

IMUNOHISTOQUÍMICA EM ÓRGÃOS DE TILÁPIAS-DO-NILO
IMUNIZADAS COM ANTÍGENO INSOLÚVEL DE
Streptococcus agalactiae

Paulo Fernandes Marcusso
Médico Veterinário

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

IMUNOHISTOQUÍMICA EM ÓRGÃOS DE TILÁPIAS-DO-NILO
IMUNIZADAS COM ANTÍGENO INSOLÚVEL DE
Streptococcus agalactiae

Paulo Fernandes Marcusso
Orientador: Prof. Dr. Flávio Ruas de Moraes

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária, Área: Patologia Animal.

M322i Marcusso, Paulo Fernandes
Imunohistoquímica em órgãos de tilápias-do-Nilo imunizadas com
antígeno insolúvel de *Streptococcus agalactiae* / Paulo Fernandes
Marcusso. – – Jaboticabal, 2015
xiv, 56 p. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015

Orientador: Flávio Ruas de Moraes

Banca examinadora: João Batista Kochenborger Fernandes,
Rogério Salvador, Marcello Pardi de Castro, Sergio Henrique Canello
Schalch

Bibliografia

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

CDU 619:639.3.09

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

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Paulo Fernandes Marcusso – Nascido dia 30 de abril de 1988 em Porto Feliz Estado de São Paulo. Graduado Medicina Veterinária em julho de 2011 pela Universidade Estadual do Norte do Paraná. Realizou estágio de aperfeiçoamento técnico na área de microbiologia e imunopatologia de peixes no Laboratório de Imunopatologia de Peixes da Uenp – *Campus* Luiz Meneghel na cidade de Bandeirantes estado do Paraná. Durante a graduação de 2007 à 2009 foi bolsista do Programa Ciências Sem Fronteiras, categoria Extensão Universitária, no Laboratório de Imunopatologia de Peixes da Uenp – *Campus* Luiz Meneghel, onde desenvolveu trabalhos relacionados a vacinas de peixes e ictiosanidade. Em Janeiro de 2010 obteve bolsa da Fundação Araucária, categoria Iniciação Científica, para desenvolver o projeto intitulado “Influência da temperatura na sobrevivência de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) infectadas com *Streptococcus agalactiae*”. Em março de 2012 ingressou no programa de pós-graduação em medicina veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp, Departamento de Patologia Veterinária, *Campus* de Jaboticabal, sob a orientação do Prof. Dr. Flávio Ruas de Moraes. No mesmo período obteve bolsa de mestrado da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp), defendeu a dissertação no início de 2014, obtendo o título de Mestre em Patologia Animal. Seu mestrado deu origem o um processo de patente de uma vacina contra estreptococose para utilização em peixes (BR1020140228934). Em março de 2014 iniciou seu doutorado dando continuidade a pesquisa com a vacina na mesma instituição e sob mesma orientação. No mesmo período obteve bolsa de doutorado da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp), que só foi cancelada em maio de 2015, após a aprovação do pós-graduando para o cargo de Docente no curso de Medicina Veterinária da Unidade de Ensino Superior Ingá – Uningá, Maringá, Paraná, onde atua até o presente momento nas disciplinas de Patologia Especial e Patologia Clínica.

Dedico este trabalho

Antônia Picco Marcusso
A quem serei eternamente grato.

EPÍGRAFE

SÚPLICA

O corpo a morte leva
A voz some na brisa
A dor sobe pra'as trevas
O nome a obra imortaliza
A morte benze o espírito
A brisa traz a música
Que na vida é sempre a luz mais forte
Ilumina a gente além da morte
Venha a mim, óh, música
Vem no ar
Ouve de onde estás a minha súplica
Que eu bem sei talvez não seja a única
Venha a mim, oh, música
Vem secar do povo as lágrimas
Que todos já sofrem demais
E ajuda o mundo a viver em paz

João Nogueira e Paulo César Pinheiro (1994)

AGRADECIMENTOS

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

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

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

A Banca Examinadora pelas observações e correções que acrescentaram e melhoraram o trabalho.

A Professora Doutora Rosimeri de Oliveira Vasconcelos pela atenção.

A pós graduanda Mayara Caroline Rosolem pela amizade e companheirismo científico, essenciais para a realização do trabalho.

A equipe de trabalho; Dayanne, Fausto, Gustavo, Isabela, Jefferson, Lygia, Silas, Thalita. Obrigado pela ajuda e parceria, sem vocês tudo seria mais difícil.

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

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

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

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

A seção técnica de Pós-graduação, especialmente a Marcia Luciana Natareli dos Santos, Branca Rochidali e Diego Mafra Dongo, pela atenção, disposição e ajuda.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo apoio financeiro e por acreditar no trabalho (processo 2013/24852-6).

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

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
	2.1 Piscicultura no Brasil	16
	2.2 Tilapicultura	17
	2.3 Características do <i>S. agalactiae</i> em peixes	17
	2.4 Sistema imune em teleósteos	19
	2.5 Centros de melanomacrófagos (CMM's)	22
	2.6 Vacinação em peixes	23
	2.7 Métodos de inativação bacteriana	25
	2.8 Técnica de imunohistoquímica	26
3	OBJETIVOS	26
	3.1 Objetivo geral	26
	3.2 Objetivos específicos	26
4	MATERIAL E MÉTODOS	27
	4.1 Local, animais e acondicionamento	27
	4.2 Isolamento e identificação do <i>S. agalactiae</i> para confecção da vacina	28
	4.3 Determinação do inóculo vacinal e da CL50	29
	4.4 Padronização do inóculo vacinal	29
	4.5 Delineamento experimental	30
	4.6 Técnica Histológica	31
	4.7 Técnica de Imunohistoquímica	31
	4.8 Contagem das células positivas para marcação com anticorpo anti-IgM e dos centros de melanomacrófagos	32
	4.9 Análise estatística	32
5	RESULTADOS	33
6	DISCUSSÃO	37
7	CONCLUSÃO	42
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

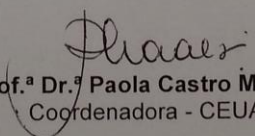


CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 05197/14 do trabalho de pesquisa intitulado "**Avaliação histológica e imunohistoquímica de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*) vacinadas contra *Streptococcus agalactiae***", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Flávio Ruas de Moraes está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 02 de abril de 2014.

Jaboticabal, 02 de abril de 2014.



Prof.ª Dr.ª Paola Castro Moraes
Coordenadora - CEUA

LISTA DE ABREVIATURAS

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

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fotomicrografia do baço de um animal do grupo controle 90 dias após a imunização, evidenciando a proliferação de linfócitos. (v) veia, (a) artéria, (*) centro de melanomacrófagos (hematoxilia e eosina, 400x, barra = 20µm)..33
- Figura 2.** Fotomicrografia do baço de um animal do grupo vacinado 90 dias após a imunização, evidenciando a proliferação de linfócitos. (v) veia, (a) artéria, (*) centro de melanomacrófagos (hematoxilia e eosina, 400x, barra = 20µm)...34
- Figura 3.** Fotomicrografia do baço no grupo vacinado após 60 dias do estímulo, evidenciando as células marcadas por meio da técnica de imunohistoquímica com anticorpo policlonal anti-Ig M (hematoxilina de Harris, 400x, barra = 20µm).....35
- Figura 4.** Fotomicrografia do baço no grupo controle após 60 dias do estímulo, evidenciando as células marcadas por meio da técnica de imunohistoquímica com anticorpo policlonal anti-Ig M (hematoxilina de Harris, 400x, barra = 20µm).....36
- Figura 5.** Aspecto estrutural do baço de peixes, evidenciando os centros de melanomacrófagos (*) de um animal do grupo vacinado 60 dias após o estímulo (hematoxilia e eosina, 200x, barra = 50µm).....37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número médio de células positivas para marcação com o anticorpo anti-Ig M pela técnica imunohistoquímica no fígado, rim e baço das tilápias-do-Nilo dos grupos controle e vacinado, durante o período experimental.....	34
Tabela 2. Número médio de centros de melanomacrófagos observados no baço, rim e fígado das tilápias-do-Nilo dos grupos controle e vacinado, durante o período experimental	36

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Número médio de células positivas para marcação com o anticorpo anti-Ig M pela técnica imunohistoquímica no rim das tilápias-do-Nilo do grupo vacinado, durante o período experimental 39
- Gráfico 2.** Número médio de células positivas para marcação com o anticorpo anti-Ig M pela técnica imunohistoquímica no baço das tilápias-do-Nilo do grupo vacinado, durante o período experimental 40

IMUNOHISTOQUÍMICA EM ÓRGÃOS DE TILÁPIAS-DO-NILO IMUNIZADAS COM ANTÍGENO INSOLÚVEL DE *Streptococcus agalactiae*

RESUMO - A infecção causada por *Streptococcus agalactiae* provoca grandes perdas em sistemas de criação intensiva de tilápias no Brasil e uma das soluções para minimizar estas perdas é a utilização de vacinas. Assim, este estudo avaliou a partir da marcação de células por meio da imunohistoquímica com anticorpo Ig M as respostas e participação do rim, baço e fígado na resposta imune humoral induzida pela vacina contra *S. agalactiae*. Para tanto foram utilizadas 166 tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) com peso médio de 200 ± 25 g. Foi determinada a concentração bacteriana letal para 50,0% dos peixes (DL50) forma utilizados 40 tilápias distribuídas em 4 caixas de fibra de vidro de 250 L, 10 animais/. Os animais foram inoculados com doses crescentes de *S. agalactiae* (1×10^2 ; 1×10^4 ; 1×10^6 e 1×10^8), obtendo a DL50 estimada em $1 \times 10^{7,71}$ e com o limite inferior e superior em $1 \times 10^{6,52}$ e $1 \times 10^{7,98}$, respectivamente. Posteriormente foi realizado o ensaio para coleta dos órgãos para posterior avaliação histológica e imunohistoquímica. Para tanto foram utilizados dois grupos (n= 63), sendo eles; grupo injetado com 200 μ L salina 0,65% (controle) e grupo imunizado com a vacina contendo a porção insolúvel do produto da sonicação do *S. agalactiae* adicionado ao adjuvante incompleto de Freund (1:1), com volume final de 200 μ L. A vacina e a salina foram aplicadas por via intracelomática (i.c) e em todos os grupos foram realizada a coleta dos órgãos pré imunização e coletas seriadas pós imunização nos tempos de 7, 14, 21, 28, 35, 42, 60 e 90 dias, para avaliação da dinâmica da resposta imune humoral por meio da imunohistoquímica com o anticorpo Ig M e avaliação histológica na coloração de hematoxilina e eosina. Os resultados foram comparados por meio de análise de variância (ANOVA) ao nível de 5% de probabilidade e a diferença entre as médias foi comparada pelo teste de Tukey. A imunização de tilápias-do-Nilo com antígeno insolúvel de *S. agalactiae* induziu a proliferação de linfócitos esplênicos, levando ao aumento significativo de células produtoras da imunoglobulina M no baço e rim dos animais vacinados, a partir de 14 e 28 dias após o estímulo, respectivamente, mantendo-se elevados até 90 dias. Também apresentaram maior quantidade de centro de melanomacrófagos no baço a partir de 21 dias pós-estímulo quando comparadas as tilápias do grupo controle.

Palavra-chave: anticorpos, bacteriose, estreptococose, histopatologia, peixe

IMMUNOHISTOCHEMISTRY IN BODIES THE NILE TILAPIA IMMUNIZED OF ANTIGEN INSOLUBLE *Streptococcus agalactiae*

ABSTRACT - The infection caused by *Streptococcus agalactiae* causes heavy losses in intensive farming of tilapia systems in Brazil and one of the solutions to minimize these losses is the use of vaccines. Thus, this study evaluated the tag from the cells by immunohistochemistry Ig M antibody responses and participate in the kidney, spleen and liver in the humoral immune response induced by the vaccine against *S. agalactiae*. Therefore, we analyzed 166 of the tilapia (*Oreochromis niloticus*) with an average weight of 200 ± 25 g. It determined the bacterial concentration lethal to 50.0% of the fish (LD50) 40 tilapias used medium 4 distributed in 250 L glass fiber boxes 10 animals. The animals were inoculated with increasing doses of *S. agalactiae* (1×10^2 , 1×10^4 , 1×10^6 and 1×10^8), getting the LD50 estimated at $1 \times 10^{7.71}$ and the lower and upper limit in $1 \times 10^{6.52}$ and $1 \times 10^{7.98}$ respectively. Later the test was carried out to collect the bodies for subsequent histological and immunohistochemical evaluation. Therefore, we used two groups (n = 63), namely; group injected with 200 uL saline 0.65% (control) and group immunized with the vaccine containing the insoluble portion of the product of sonication *S. agalactiae* added to Freund's incomplete adjuvant (1:1) with final volume of 200 uL. The vaccine and saline were applied via intracelomic (i.c) and in all the groups were made to collect the pre immunization organs and graded post immunization collected on days 7, 14, 21, 28, 35, 42, 60 and 90 days to evaluate the dynamics of humoral immune response by immunohistochemistry with the Ig M antibody and histological evaluation in the coloring hematoxilia and eosin. The results were compared using analysis of variance (ANOVA) at 5% probability and the difference between the means were compared by Tukey test. Immunization of the Nile tilapia with *S. agalactiae* insoluble antigen-induced proliferation of splenic lymphocytes, leading to significant increases in immunoglobulin-producing cells in the spleen and kidney M of the vaccinated animals from 14 and 28 days after challenge respectively, remaining elevated for up to 90 days. Also exhibit increased melanomacrophages center in the spleen from 21 days post-stimulation when compared to the control group tilapia.

Keywords: antibodies, bacteriosis, estreptococosis, fish, histopathology

1. INTRODUÇÃO

A carne de peixe é uma importante fonte de proteína, com alto valor nutritivo para consumo humano, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda um consumo anual de 12 kg/habitante. Em uma década (2003 a 2013) o consumo nacional de pescado aumentou mais de 100%, atingindo um consumo médio de 14,5 kg habitante/ano em 2013. Ademais não só o consumo interno, mas também o mundial continuam a crescer, tornando a carne cada vez mais procurada pelos consumidores (MPA, 2014^a).

Para atender a demanda nacional e externa muitos produtores veem intensificando cada vez mais sua produção, imprimindo altas densidades e níveis de arraçoamento que levam à deterioração da qualidade da água, que associada aos fatores de manejo induzem o estresse nos animais, tornando-os mais susceptíveis às doenças oportunistas, como a infecção provocada pelo *Streptococcus agalactiae*.

O *S. agalactiae* é um microrganismo que esta normalmente presente no ambiente, no corpo e mesmo nas vísceras dos peixes (ROBERTS & BULLOCK, 1980), dessa forma, qualquer fator que diminua a resistência do hospedeiro ou favoreça a proliferação do agente agressor, é capaz de produzir enfermidade, levando a grandes perdas econômicas em pisciculturas (SALVADOR et al., 2005; 2012), onde a prática da vacinação ainda não é rotineira.

Para minimizar tais efeitos é comum a utilização de drogas antimicrobianas que podem ser adicionadas à ração. No entanto esta prática seleciona bactérias resistentes e provoca um desequilíbrio da flora bacteriana intestinal dos peixes. Além de serem potenciais poluidores ambientais (SERRANO, 2005; BELEM-COSTA; CYRINO, 2006; YOUSEFIAN; AMIRI, 2009).

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

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Piscicultura no Brasil

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) a produção nacional de peixes em 2013 foi de 392,5 mil toneladas. Onde a região Centro-Oeste foi a principal produtora, com 105 mil toneladas (26,8% do total) e o Estado Mato Grosso foi o que mais produziu com 19,3% da produção brasileira.

Em relação aos municípios, o maior produtor de peixes foi Sorriso (MT), com 21,5 mil toneladas de peixes em 2013, seguido de Jaguaribara (CE), com 14,6 mil toneladas e Nossa Senhora do Livramento (MT), com 14,1 mil toneladas (IBGE, 2013).

A tilápia foi a espécie mais criada no país com 43,1% da produção, seguida pelo tambaqui (22,6%) e pelos tambacu e tambatinga (15,4%). O município de Jaguaribara (CE) foi o maior produtor de tilápia, com 8,6% da produção nacional da espécie (IBGE, 2013).

Todas as unidades da Federação registraram produção de alevinos (formas jovens de peixes, que são medidas em múltiplos de mil unidades), totalizando 818,9 mil milheiros. O Paraná foi o estado com maior parcela (26,9%) e com cinco municípios nas dez primeiras posições do ranking municipal. Maringá foi o principal município produtor, com 7,3% do total nacional e 27,2% da produção paranaense (IBGE, 2013; MPA, 2014^b).

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

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

2.2 Tilapicultura

A tilápia é a espécie mais criada no Brasil e isso se deve a uma série de características da espécie e do mercado consumidor que viabilizam e consolidam economicamente sua produção.

A espécie apresenta elevada produtividade, precocidade, adaptabilidade em diversas condições ambientais, excelente conversão alimentar e pouca susceptibilidade a doenças parasitárias (FIGUEIREDO; VALENTE, 2008; FITZSIMMONS; MARTINEZ-GARCIA; GONZALES-ALANIS, 2011).

Sua carne é de boa qualidade, branca e de textura firme, ausência de espinhas intramusculares em “Y”, bom rendimento de filé, sabor delicado e agradável, qualidades muito apreciadas pelos consumidores (CONTE, 2002; PEREIRA; GAMEIRO, 2007; SILVIA et al, 2009).

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

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

2.3 Características do *Streptococcus agalactiae* em peixes

O *S. agalactiae* são bactérias pertencentes ao grupo B de Lancefield, são Gram-positivas de morfologia de cocos, esféricos ou ovóides que se crescem aos pares ou em cadeias no meio líquido. São imóveis, não esporulam, anaeróbias facultativas e fermentam carboidratos como a glicose, maltose, ribose, sacarose e trealose, que resulta na maior parte em ácido lático (HARDIE e WHILEY, 1997; KILLIAN, 1998; NIZET, 2002).

O *Streptococcus agalactiae* é um patógeno cosmopolita (EVANS; KLESZIUS; SHOEMAKER, 2006) que provoca surtos infecciosos com altas taxas de morbidade e mortalidade, especialmente na tilapicultura. A mortalidade em criação de cativeiro atinge taxas de até 90% na idade pré-comercialização, quando volumes substanciais de ração já foram consumidos (SALVADOR et al., 2005, 2012; ABUSELIANA et al., 2010; ZAMRI-SAAD et al., 2010).

O *S. agalactiae* foi relatado em seis países de três diferentes continentes, sendo; Estados Unidos da América, Israel, Kuwait, Taiwan, Japão e Brasil, responsável por significantes taxas de morbidade e mortalidade de peixes de água doce e salgada (EVANS; KLESIUS; SHOEMAKER, 2006).

Estratégias de controle incluem medidas sanitárias de manejo, como a retirada de animais mortos e moribundos, para o tratamento usualmente utilizam a antibioticoterapia adicionada à ração e para prevenção realiza-se a vacinação, especialmente por injeção intracelomática do patógeno inativado (DUMRONGPHOL et al., 2009; SHOEMAKER et al., 2010).

No Brasil no ano 2003 foi realizado o primeiro isolamento da bactéria em peixes em uma tilapicultura no Norte do Estado do Paraná (SALVADOR et al., 2003; 2005), seguidos por isolamentos em Minas Gerais, Espírito Santo (FIGUEIREDO et al., 2006) e segundo Pereira (2008) a bactéria já foi isolada em casos de surtos em tilapiculturas de 10 Estados brasileiros.

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

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

Os principais sinais clínicos são anorexia, escurecimento da pele, natação errática, rodopio, letargia, curvatura do corpo, exoftalmia acompanhada de opacidade de córnea e/ou hemorragia intraocular uni ou bilateral, sufusões no opérculo e base das nadadeiras, ulceração da epiderme e morte. As lesões internas são caracterizadas por congestão branquial, hepatomegalia e esplenomegalia acompanhadas de congestão, ascite, e encefalomalácea (SALVADOR et al., 2003; 2005; TRABULSI; ALTERTHUM, 2005; FIGUEIREDO et al., 2006; MARCUSSO et al., 2015).

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

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

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

O diagnóstico sugestivo de estreptococose é baseado na presença de sinais clínicos característicos da doença e na ocorrência de cocos Gram-positivos no cérebro, rim ou outros órgãos internos. Para realizar o diagnóstico definitivo faz-se o isolamento e subsequente verificação das características sorológicas e/ou moleculares das bactérias (PAVANELLI et al., 2008; MARCUSSO et al., 2015).

2.4 Sistema imune em teleósteos

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

Nos mamíferos, a inflamação aguda tem duração relativamente curta, perdurando por minutos, horas, por um ou dois dias, e se caracteriza por vasodilatação arteriolar, capilar e venular; aumento de permeabilidade vascular e instituição de edema; aumento da viscosidade sanguínea e marginação leucocitária, diapedese, quimiotaxia, acúmulo de leucócitos no foco lesado e fagocitose por células competentes (GARCIA LEME, 1989; KUMAR, 2004; MORAES; MORAES, 2009). Este quadro sofre

pequenas variações em função do tipo de tecido afetado, do agente causal, da intensidade da agressão e do nível de especificidade da resposta (GARCIA LEME, 1989). Independente da natureza do estímulo que a tenha iniciado, a inflamação aguda é estereotipada, isto é, obedece a um padrão semelhante de desenvolvimento (GARCIA LEME, 1989).

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

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

Em peixes a resposta inflamatória foi avaliada por diversos autores que utilizaram diversas metodologias e abordagens, nas mais variadas espécies de peixes, o que dificulta o conhecimento exato dos mecanismos envolvidos no processo inflamatório.

Ellis et al. (1976) por injeção de carvão coloidal, analisaram as propriedades fagocíticas do tecido linforreticular em *Pleuronectes platessa*, destacando a importante atividade fagocítica dos elipsóides do baço e discutindo a significância da associação de estruturas linfóides no contexto dos mecanismos de defesa dos peixes. Finn e Nielssen (1971) estudaram a resposta inflamatória em truta arco íris, por meio da inoculação de solução composta por adjuvante completo de Freund (ACF) e *Staphylococcus aureus*, demonstrando a existência de fenômenos vasculares como o aumento da permeabilidade vascular, marginação leucocitária, fagocitose por polimorfonucleares e macrófagos.

Claudiano et al. (2013) demonstraram o aumento de permeabilidade vascular em *Piaractus mesopotamicus* inoculados com *Aeromonas hydrophila* inativada utilizando o azul de Evans. Suzuki (1986) por meio da injeção de parafina líquida via i.p. destaca a atividade fagocítica dos neutrófilos no exsudado de *Cyprinus carpio* e *Oreochromis niloticus*. McArthur (1984) utilizou o *Vibrio alginolyticus*, para monitorar a cinética de aparecimento dos diferentes tipos celulares em *P. platessa*.

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

Bozzo et al. (2007) estudaram a composição celular do exsudato inflamatório na bexiga natatória de pacu após a injeção de tioglicolato, *A. hydrophila* inativada e endotoxina (LPS) de *Escherichia coli*, seis, 24 e 48 horas após os estímulos. Os resultados demonstraram que as células predominantes no foco da inflamação foram os trombócitos, acompanhados de menor quantidade de linfócitos, macrófagos e granulócitos, resultado obtido em todas as avaliações, independentemente da hora e do tipo de estímulo inflamatório.

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

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

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

O sistema imune adquirido dos peixes é subdividido em resposta imune humoral e celular, envolvendo os órgãos e tecidos linfóides (primários e secundários), células

apresentadoras de antígeno (APCs), linfócitos T e B, imunoglobulinas e moléculas do sistema complemento (ZAPATA et al., 1996; WATTS; MUNDAY, 2001).

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

A resposta imune humoral dos peixes diferencia-se dos vertebrados superiores por não apresentar a produção de anticorpos de classe Ig G na resposta imune humoral secundária, apresentando a imunoglobulina Ig M como principal anticorpo da resposta imune humoral primária e secundária (WATTS et al., 2001).

2.5 Centros de Melanomacrófagos (CMM's)

Em 1974, Ellis utilizou pela primeira vez o termo “centros de melanomacrófagos” (CMM's), descritos como grandes nódulos de macrófagos contendo glóbulos vermelhos degenerados e composto férrico no baço de teleósteos. Desde então diversas pesquisas foram realizadas para determinar as funções desses agregados, onde foi possível determinar que eles realizam a fagocitose de patógenos resistentes como esporos, processam antígenos na resposta imune; destroem, detoxificam ou reciclam materiais endógenos e exógenos; depositam metabólitos de células mortas, incluindo os eritrócitos e respondem a corpos estranhos ,incluindo agentes infecciosos (ROBERTS, 1975; FERGUSON, 1976; ELLIS, 1976; AGIUS, 1980; FULOP; MCMILLAN, 1984; AGIUS, 1985; HERRAEZ AND ZAPATA, 1986; AGIUS AND ROBERTS, 2003).

Os teleósteos apresentam quantidade variável de CMM's ou agregados de macrófagos nos diferentes tecidos, em particular fígado, baço e rim (MESSEGUER et

al. 1994). E seu aspecto morfológico pode variar em diferentes espécies, órgãos, condições fisiológicas (idade, inanição, metabolismo de ferro e hemoglobina), condições anatomopatológicas, inflamatórias e processos imunes (ROBERTS, 1975; AGIUS 1979^a, 1979^b; 1980; AGIUS e ROBERTS, 1981; AGIUS 1981, 1983, 1985; KRANZ e PETERS, 1984; AGIUS e AGBEDE, 1984; FULOP e McMILLAN, 1984; WOLKE et al., 1985; KRANZ e GERCKEN, 1987; VOGELBEIN et al., 1987; KRANZ, 1989; MIZUNO et al., 2002).

Vigliano e colaboradores (2006) realizaram estudos filogenéticos em peixes teleósteos que sugeriram que os melanomacrófagos livres e CMM's são precursores de células dendríticas foliculares e centros germinativos respectivamente, demonstrando uma relação evolutiva entre os CMM's de peixe e os centros germinativos de aves e mamíferos, onde há uma alta produção de anticorpos e expansão clonal dos linfócitos B (OLÁH; VERVELDE, 2008).

2.6 Vacinação em peixes

A habilidade dos peixes em desenvolverem imunidade contra determinado microrganismo depende da idade do peixe, da temperatura da água, do agente de imunização e do método de vacinação (GUDDING et al., 1999; SALVADOR et al., 2012).

Existem diversos métodos de vacinação que variam quanto à praticidade, nível de proteção e efeitos colaterais, entretanto as formas mais utilizadas para as pesquisas e comercialmente são as imunizações por banho de imersão, via intracelomática e via oral (GOMES et al., 2006; LONGHI et al., 2012).

No entanto os resultados de diversos trabalhos mostram que a aplicação de vacinas pela via intracelomática em peixe é o método mais confiável e eficaz, quando comparada à via oral e por imersão (MELO et al., 2015). As desvantagens desta via incluem estresse extra para os peixes, custos, segurança e tempo requerido para administração da vacina e para o desenvolvimento de imunidade (NAKANISHI; OTOTAKE, 1997).

Inúmeras vacinas contra estreptococose de peixes foram testadas por vários autores, entretanto os métodos de inativação são relativamente comuns e/ou semelhantes, utilizando-se o calor ou formol (EVANS et al., 2004; PASNIK et al., 2005; SHOEMAKER et al., 2010; PRETTO-GIORDANO et al., 2010; MARTINS et

al., 2001; SALVADOR et al., 2012). A sonicação é utilizada particularmente em microrganismos Gam negativos utilizados como vetores na produção de vacinas recombinantes, como a *Escherichia coli*, visando extração e posterior purificação de proteínas de interesse (CHIARINI; PENNA, 2003). Todavia, são escassas na literatura as referências à utilização desse método na produção de vacinas para peixes.

Tin Yi et al. (2013) testaram três vacinas, duas utilizando subunidades do *S. agalactiae* em tilápias, uma com a proteína de ligação do fibrinogênio A (FbsA) e outra com a α -enolase e a última com a bactéria inteira inativada com formol adicionando adjuvante. Os animais foram desafiados 4 semanas após as imunizações foi observada uma Percentagem Relativa de Sobrevivência de 40,63; 62,50 e 93,75%, respectivamente. Apesar das subunidades sozinhas conferirem proteção, elas foram menores que o microrganismo inteiro inativado e com adjuvante.

Em estudo com uma vacina recombinante inativada contra *S. agalactiae* em tilápias-do-Nilo, utilizando como base antigênica proteínas da parede celular da bactéria por via oral (10^6 UFC/mL), e desafiadas intracelomática, resultou em uma PRS de 70% no grupo vacinado e 0,0% no controle (Nur-Nazifah et al. 2014).

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

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

As tilápias-do-Nilo quando suplementadas com parede celular inata de *S. cerevisiae* e vacinadas contra *S. agalactiae*, observou-se que o suplemento favoreceu a resposta imune celular (SALVADOR et al., 2012).

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

via i.c., a mortalidade foi 100,0%, sugerindo não existir imunidade cruzada entre as espécies.

Chen et al. (2012) objetivaram escolher uma estirpe padrão para a produção de uma única vacina contra *S. agalactiae* na China. Para tanto eles produziram 10 vacinas diferentes utilizando a bactéria inteira, inativada e adicionando adjuvante com os 10 genótipos de *S. agalactiae* maior prevalência de isolamento no país. Posteriormente realizaram desafios cruzados entre todas e encontraram valores de PRS muito variáveis, desde 13,33, até 100%, os mesmos concluíram ser muito complicado definir uma única estirpe como padrão para a produção vacinal.

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

2.7 Métodos de inativação bacteriana

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

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

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

2.8 Técnica de imunohistoquímica

Em 1941, Coons e colaboradores desenvolveram uma técnica de detecção de anticorpos em matérias biológicos congelados, essa técnica ficou conhecida imunofluorescência e marcou o início do desenvolvimento de técnicas de que utilizam o princípio da reação de ligação entre antígeno e o anticorpo, que culminam com a deposição de um cromógeno no sítio de ligação e possibilitam a detecção de antígenos específicos em diferentes materiais biológicos (TAYLOR et al., 2002).

No entanto para a realização da imunofluorescência é necessário um microscópio especializado, material biológico fresco ou congelado que impossibilita armazenar as lâminas, ademais apresenta resolução morfológica pobre (SCHIMITT et al, 1992; VASSALO, 1993).

Uma das grandes vantagens associadas à técnica de imunohistoquímica é a localização do antígeno e também da lesão ao mesmo tempo, o que contribui para a melhor compreensão da lesão e da patogenia dos processos (RAMOS-VARA & MILLER, 2014).

A técnica de imunohistoquímica esta sendo cada vez mais utilizada na Patologia Veterinária, inclusive para exames diagnósticos, pois diversos anticorpos apresentam reatividade cruzada entre antígenos humanos e animais (TEIXEIRA et al., 2011).

Apesar do crescente uso da técnica em Medicina Veterinária, são escassas as pesquisas com vacinas em peixes que associam a técnica para detecção dos anticorpos nos diferentes tecidos dos animais vacinados.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os as características histológicas e imunohistoquímicas do baço, rim e fígado de tilápias-do-Nilo imunizadas com a porção insolúvel do *S. agalactiae* sonicado.

3.2 Objetivos específicos

- Descrever as possíveis alterações estruturais no rim, fígado e baço dos peixes vacinados por meio da histologia;
- Avaliar, a partir da marcação imunohistoquímica de IgM, a participação do rim, fígado e baço na resposta imune humoral dos peixes vacinados;

- Avaliar, quantitativamente, os centros de melanomacrófagos do rim, fígado e baço dos peixes vacinados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local, animais e acondicionamento

O presente estudo foi realizado no Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCAV-Unesp) e no Setor de Patologia Geral do campus Luiz Meneghel da Universidade Estadual do Norte do Paraná (CLM-UENP). Foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCAV-UNESP (protocolo nº 05197/14).

Foram utilizadas 166, sendo 40 peixes utilizados na CL50 e o restante para o teste vacinal. Todas as tilápias eram da mesma desova e revertidas sexualmente (masculinizadas), *Oreochromis niloticus*, com peso médio de 200 ± 25 g, oriundas de pisciculturas do norte do Paraná. Os peixes foram aclimatados pelo período de 10 dias, em caixas de fibra de 250 L, abastecidas com água corrente, proveniente de poço artesiano, com vazão de um litro por minuto, com aeração suplementar.

Após o período de acondicionamento os animais foram conduzidos à Unidade de Infecção Experimental de Organismos Aquáticos do CLM-UNEP e dispostos em grupos de acordo com o modelo experimental. Os peixes foram distribuídos em aquários com capacidade útil de 100 L, dotados de sistema de fluxo contínuo de água desprovida de cloro, oriunda de poço artesiano e aeração suplementar.

Durante experimento os peixes foram alimentados pela manhã e tarde com ração comercial, correspondendo a 3% da biomassa. As caixas foram sifonadas semanalmente e a qualidade da água determinada nos momentos da alimentação. Os parâmetros da água como temperatura, oxigênio dissolvido, condutividade e pH, foram determinados por meio do analisador portátil multiparâmetros (YSI®, modelo YSI 600R). Durante todo o experimento as variáveis físico-químicas (temperatura= $27,5 \pm 1,0$ °C, oxigênio dissolvido = $5,1 \pm 1,0$ mg / L, pH = $7,66 \pm 0,5$ e condutividade = $117,96 \pm 30,5$ mS /cm) mantiveram-se em zona de conforto para a espécie (BOYD, 1990).

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

4.2 Isolamento e identificação do *S. agalactiae* para confecção da vacina

Amostras de *S. agalactiae* foram isoladas de tilápias infectadas naturalmente, com sinais de meningoencefalite e identificadas segundo as características culturais, morfológicas, tintoriais e bioquímicas (VANDAMME et al., 1997; SALVADOR et al., 2005). Seguiu-se a identificação pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional. Para a identificação das espécies do gênero *Streptococcus*, realizou-se a extração de DNA das colônias isoladas de acordo com Jafar et al. (2009). Quantificou-se o DNA em espectrofotômetro (NanodropND-1000), as quantidades foram ajustadas para a reação de PCR (50 a 100 µg/µl) e o DNA armazenado à -20 °C até as reações de PCR.

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

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

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

4.3 Determinação do inóculo vacinal e da CL50

Para a determinação da concentração bacteriana letal para 50,0% dos peixes (CL50) e determinação do inóculo vacinal, foram utilizados quatro em caixas de fibra de 250 L, abastecidas com água corrente, proveniente de poço artesiano, com vazão de um litro por minuto, com aeração suplementar. Cada caixa contendo 10 peixes, com peso médio inicial de 200 ± 25 g, totalizando 40 animais. Os peixes dos aquários 1, 2, 3 e 4 foram inoculados via i.c. com as concentrações crescentes de 1×10^2 ; 1×10^4 ; 1×10^6 e 1×10^8 UFC/mL de *S. agalactiae*, respectivamente.

Após 15 dias os resultados da mortalidade diária foram submetidos à análise estatística pelo método “trimmed sperman Karber”, obtendo a DL50 estimada em $1 \times 10^{7,71}$ e com o limite inferior e superior em $1 \times 10^{6,52}$ e $1 \times 10^{7,98}$, respectivamente.

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 e contabilizados para o cálculo final da mortalidade.

4.4 Padronização do inóculo vacinal

Para a confecção do inóculo vacinal constituído pela porção insolúvel do *S. agalactiae* sonicado, o microrganismo foi semeado em 500 mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion – DIFCO®). Após cinco dias de incubação a 29,0°C, em aerofilia, o meio foi centrifugado à 4000G (4,0°C), durante 20 minutos. O sobrenadante foi desprezado, a massa bacteriana foi ressuspensa em 500 mL de PBS (tampão fosfato-salino) e novamente centrifugada. Essa operação foi repetida por mais três vezes.

A massa bacteriana foi diluída em PBS de modo a conter quantidade adequada de unidades formadoras de colônias obtidas pela determinação prévia da CL₅₀. Após a obtenção do extrato adicionou-se bloqueador de proteinase (CellLyctm B Plus Kit - SIGMA®) e a solução final foi submetida a sonicação (5 pulsos) em potência 7 por 1 min, com intervalos de 1 min entre as sonicações e mantidos no gelo durante todo o

processo (Fisher Scientificm[®], Modelo 120 Dismembrator). Para a confirmação da inativação o produto final foi semeado em meio sólido BHI adicionado 5% de sangue de ovino e incubados à 29°C, durante 7 dias em aerofilia. Confirmada a inativação realizou-se a padronização da concentração de proteínas do inóculo vacinal (porção insolúvel) para 8 mg/dL de proteínas totais, por meio de espectrofotometria utilizando aparelho bioquímico semi-automático (Thermoplate[®], Modelo TP Analyzer plus) e kit comercial (Interlab[®]), conforme resultados de Marcusso (2014).

Foi incorporado o adjuvante incompleto de Freund, na fração 1:1 à vacina e emulsionada em misturador elétrico, sendo 100 µl de cada, resultando em dose final e 200 µl. Também foi realizado o teste de emulação e preparação das doses que foram mantidas em sob refrigeração até o momento da imunização (MARCUSO, 2014).

4.5 Delineamento experimental

Os animais foram divididos em dois grupos com 63 tilápias cada, sendo eles Grupo 1 (G1) injetado com salina 0,65% (controle) e Grupo 2 (G2) imunizado com a fração insolúvel do antígeno de *S. agalactiae* obtido por sonicação + adjuvante incompleto de Freund.

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

Na coleta dos órgãos os animais foram anestesiados da mesma forma descrita anteriormente e foram realizadas as coletas de fragmentos órgãos (baço, rim e fígado) de sete animais de cada grupo por tempo, sendo: zero, antes da inoculação, e 7, 14, 21, 28, 35, 42, 60 e 90 dias pós inoculação. Os fragmentos do baço, rim e fígado coletados foram fixados em formol tamponado a 10% em volume de 1:10 (tecido/formol) para a realização das técnicas de histologia e imunohistoquímica.

4.6 Técnica histológica

Para a histologia foram coletados fragmentos do baço, fígado e rim de todos animais dos grupos controle (salina 0,65%) e do grupo imunizado com a vacina contendo a porção insolúvel do *S. agalactiae* sonicado e o adjuvante incompleto de Freund (1:1), em todos os tempos pré-estabelecidos.

Os órgãos foram fixados em solução de formalina neutra a 10%, por período de 24 horas. De maneira ordenada as peças foram submetidas aos procedimentos laboratoriais de usuais em histologia para inclusão em parafina (LUNA, 1960). Posteriormente foram realizados cortes de 5 µm de espessura que foram corados pela técnica de hematoxilina e eosina (HE) e montadas com Entellan (Merck® cód. 107960).

As lâminas foram analisadas, quanto às alterações estruturais e celulares em microscópio de luz Olympus BX51 em todos os aumentos. Também foi realizada a contagem dos centros de melanomacrófagos nas lâminas histopatológicas dos tecidos supracitados.

4.7 Técnica de imunohistoquímica

Para a imunohistoquímica foram coletados os órgãos (baço, fígado e rim) dos animais do grupo controle (salina 0,65%) e do grupo imunizado com a vacina contendo a porção insolúvel do *S. agalactiae* sonicado e o adjuvante incompleto de Freund (1:1), em todos os tempos pré-estabelecidos. A técnica foi padronizada e realizada no Laboratório “Antônio Carlos Alessi” – LACA (Laboratório de Imunohistoquímica) do Departamento de Patologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP), sob a supervisão da Prof^a Dr^a Rosemeri de Oliveira Vasconcelos.

Cortes de 3 µm de espessura dos fragmentos dos órgãos emblocados em parafina foram desparafinados em estufa a 60 °C e rehidratados. Seguidamente foi realizado o bloqueio da proteína endógena (Protein block - Dako), lavagem por três vezes de 5 minutos cada com PBS (pH 7,4) e posteriormente acrescenta-se o anticorpo primário (IgM RP024 DBS) (1:250) e incuba-se em câmara úmida, durante 2 horas a temperatura ambiente (23°C). Seguido deste tempo lava-se três vezes com PBS (pH 7,4) durante 5 minutos e coloca-se o anticorpo secundário (Envision + Dual link System-HRP - Dako) para incubação na câmara úmida, durante 60 minutos, em temperatura ambiente (23°C).

Para a revelação foi utilizado o cromógeno diaminobenzidina (1:200) (DAB - Dako). O tempo de revelação foi de 3 minutos. Para parar a reação, deixa-se as lâminas em água destilada. Como controle positivo utiliza-se tecido de tonsila humana. Para o controle negativo o anticorpo primário não foi utilizado na reação, conservando os outros passos.

A contra coloração foi realizada com hematoxilina de Harris por 15 segundos, com posterior lavagem em água corrente, seguida de desidratação em soluções crescentes de alcoóis e xilol, montados com Entellan (Merck® cód. 107960). As lâminas foram analisadas em microscópio de luz Olympus BX51 em todos os aumentos. A contagem das células imunomarcadas foi realizada a partir da captura de cinco campos em 40 vezes com câmera Olympus DP12 (software cellSens Standard 1.5 Olympus Corporation®) e as imagens analisadas com o software Image-Pro Plus versão 6,3.

4.8 Contagem das células positivas para marcação com anticorpo anti-IgM e dos centros de melanomacrófagos

Para a contagem das células marcadas, foram selecionadas as melhores lâminas de imunohistoquímica de cada animal, de acordo com a integridade, totalizando 63 lâminas em cada grupo, controle e vacinado. Em cada uma delas foram escolhidos cinco campos aleatoriamente no aumento de 400x (40x objetiva e 10x ocular) em microscópio de luz (Olympus BX51). Já para contagem dos CMM's foram selecionadas as melhores lâminas de histopatologia coradas com HE de cada animal e escolhidos cinco campos aleatoriamente de cada lâmina no aumento de 200x (20x objetiva e 10x ocular), no mesmo microscópio.

4.9 Análise estatística

Os resultados foram comparados por meio de análise de variância (ANOVA) ao nível de 5% de probabilidade e a diferença entre as médias foi comparada pelo teste de Tukey (SILVA & AZEVEDO, 2009).

5. RESULTADOS

No baço dos animais imunizados com a porção insolúvel de *S. agalactiae* foi possível observar uma menor proporção polpa vermelha:polpa branca comparada ao grupo controle, caracterizando uma proliferação de linfócitos que iniciou discretamente a partir de 21 dias após a imunização e se tornou bem evidenciada passados 60 e 90 dias após a vacinação. Nos animais controle foi possível observar alta proporção polpa vermelha:polpa branca em todos os tempos avaliados, demonstrando o padrão fisiológico do tecido (Figura 1). Já nos animais vacinados essa proporção é visivelmente menor (Figura 2).

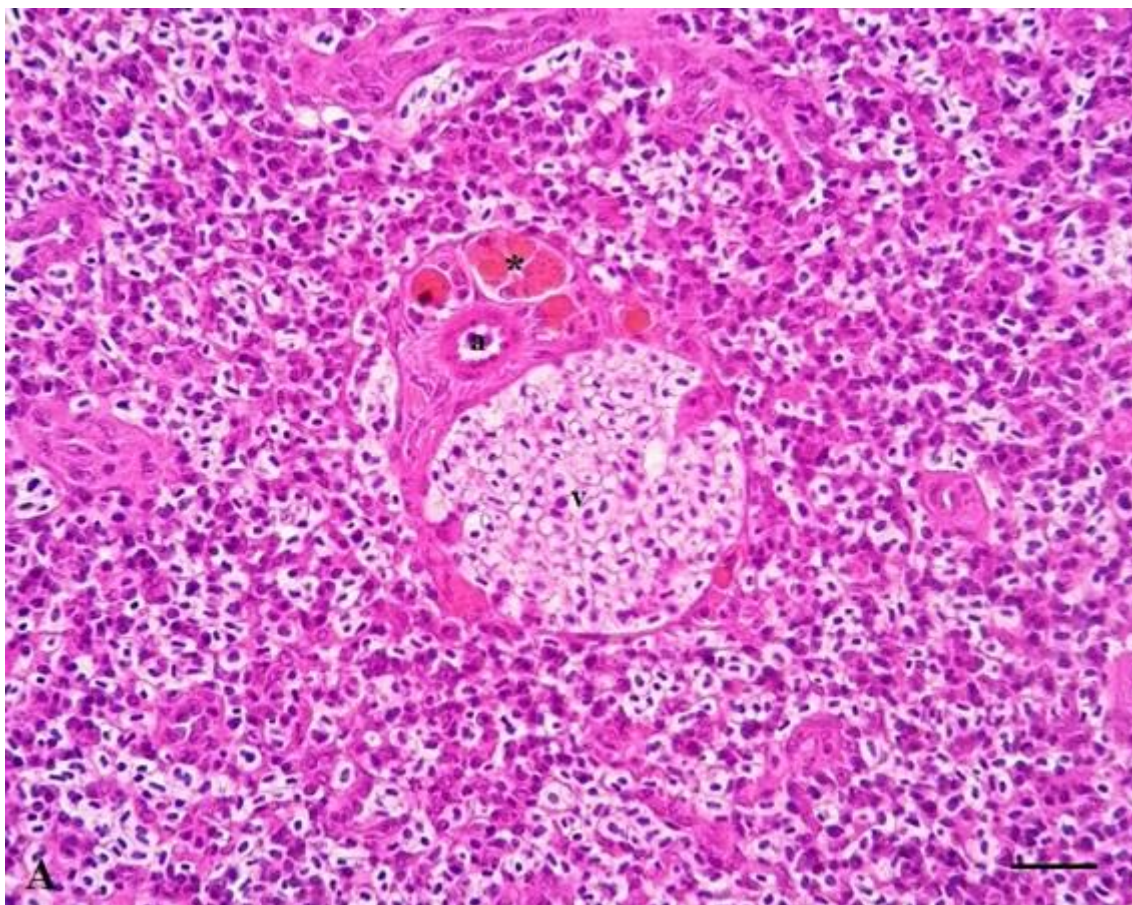


Figura 1. Fotomicrografia do baço de um animal do grupo controle 90 dias após a imunização, evidenciando a proliferação de linfócitos. (v) veia, (a) artéria, (*) centro de melanomacrófagos (hematoxilina e eosina, 400x, barra = 20µm).

Baço																		
Controle	12,00	Aa	13,28	Aa	13,57	Ba	12,28	Ba	13,71	Ba	14,71	Ba	14,28	Ba	13,85	Ba	14,42	Ba
Vacinado	12,71	Ae	13	Ae	17,85	Ae	31,14	Ad	35,85	Acd	39,57	Abc	45,14	Ab	57,42	Aa	43,28	Ab

*Letras maiúsculas diferentes mostram diferença entre colunas de cada órgão e minúsculas diferentes entre a linha do mesmo grupo.

No rim foi possível observar aumento significativo do número de células marcadas do grupo vacinado nos tempos experimentais depois de 28, 42, 60 e 90 dias em pós-vacinação em relação ao grupo controle (Tabela 1).

No baço dos peixes vacinados (Figura 3) também se notou aumento ($p < 0,05$) do número de células marcadas quando comparados ao observado no grupo controle (Figura 4). Esse aumento começa a partir do décimo quarto dia e vai até o nonagésimo dia pós-vacinal, com maior número de células positivamente marcadas 60 dias após a vacinação.

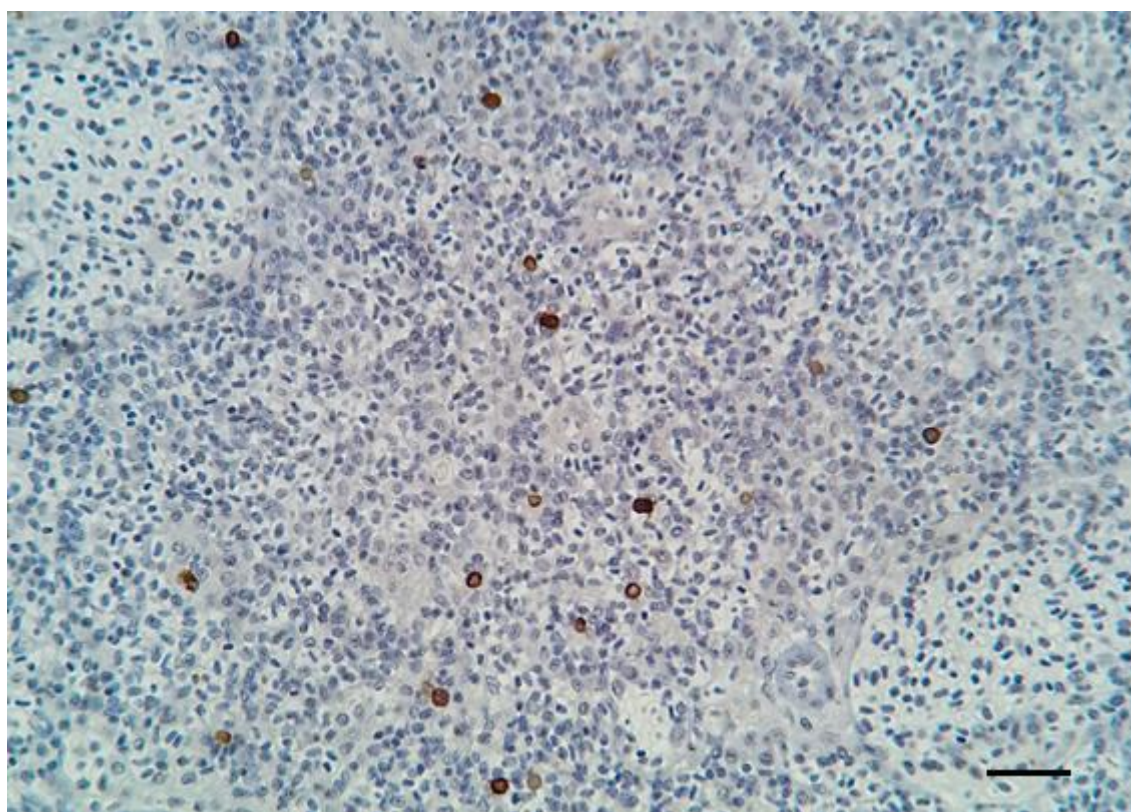


Figura 3. Fotomicrografia do baço no grupo vacinado após 60 dias do estímulo, evidenciando as células marcadas por meio da técnica de imunohistoquímica com anticorpo policlonal anti-Ig M (hematoxilina de Harris, 400x, barra = 20µm).

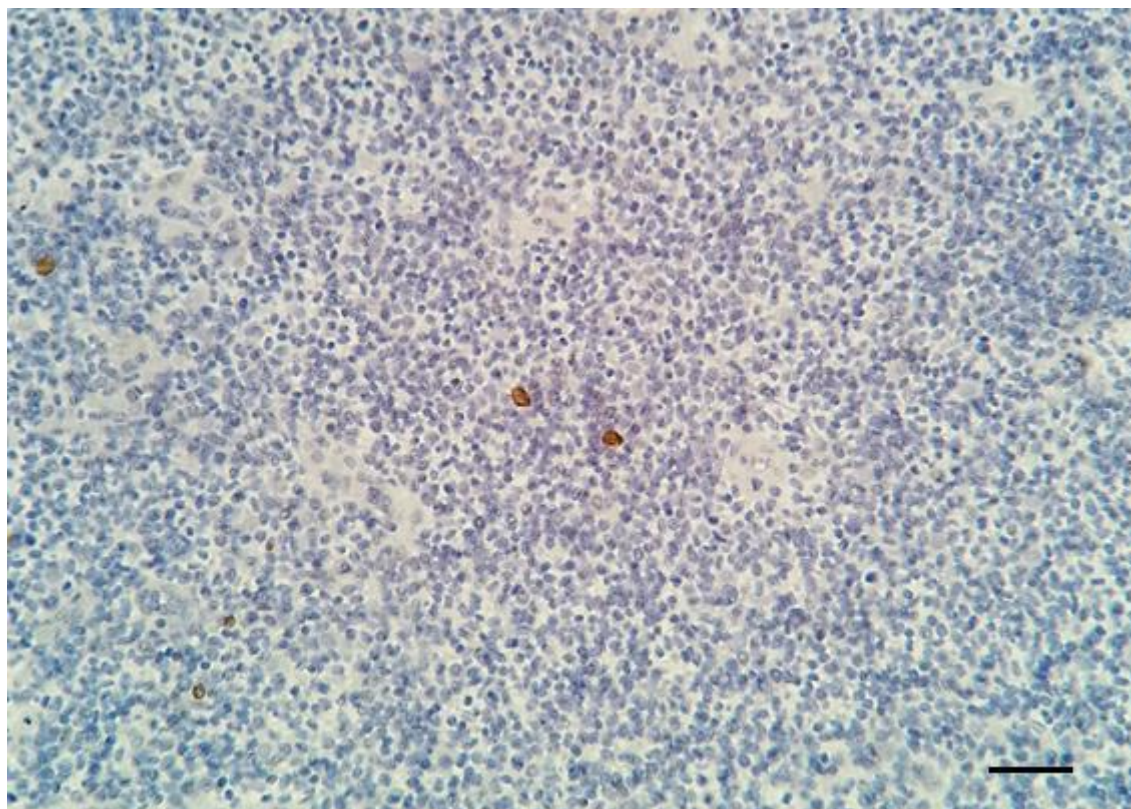


Figura 4. Fotomicrografia do baço no grupo controle após 60 dias do estímulo, evidenciando as células marcadas por meio da técnica de imunohistoquímica com anticorpo policlonal anti-Ig M (hematoxilina de Harris, 400x, barra = 20µm).

Na contagem dos CMM's no fígado e no rim não houve diferença significativa entre os grupos controle e vacinado. Todavia na contagem dos centros presentes no baço dos animais vacinado foi possível observar aumento significativo comparado ao controle (Figura 5), nos tempos 21, 35, 42, 60 e 90 dias após a vacinação (Tabela 2).

Tabela 2. Número médio de centros de melanomacrófagos observados no baço, rim e fígado das tilápias-do-Nilo dos grupos controle e vacinado, durante o período experimental.

Órgão		Tempos (dias)									
Fígado	Pré	7	14	21	28	35	42	60	90		
Controle	0,14 ^{Aa}	0,00 ^{Aa}	0,14 ^{Aa}	0,28 ^{Aa}	0,00 ^{Aa}	0,14 ^{Aa}	0,28 ^{Aa}	0,14 ^{Aa}	0,28 ^{Aa}		
Vacinado	0,00 ^{Aa}	0,14 ^{Aa}	0,14 ^{Aa}	0,28 ^{Aa}	0,14 ^{Aa}	0,14 ^{Aa}	0,14 ^{Aa}	0,28 ^{Aa}	0,28 ^{Aa}		
Rim											
Controle	0,28 ^{Aa}	0,14 ^{Aa}	0,14 ^{Aa}	0,28 ^{Aa}	0,28 ^{Aa}	0,42 ^{Aa}	0,28 ^{Aa}	0,28 ^{Aa}	0,28 ^{Aa}		
Vacinado	0,28 ^{Aa}	0,14 ^{Aa}	0,28 ^{Aa}	0,28 ^{Aa}	0,42 ^{Aa}	0,42 ^{Aa}	0,14 ^{Aa}	0,28 ^{Aa}	0,42 ^{Aa}		
Baço											
Controle	0,42 ^{Aa}	1,28 ^{Aa}	1,28 ^{Aa}	1,14 ^{Ba}	0,71 ^{Aa}	1,28 ^{Ba}	1,28 ^{Aa}	2,28 ^{Ba}	2,14 ^{Ba}		

Vacinado	0,71 ^{Ac}	0,42 ^{Ac}	1,71 ^{Abc}	2,85 ^{Abc}	2,00 ^{Abc}	3,00 ^{Abc}	3,42 ^{Ab}	13,42 ^{Aa}	12,71 ^{Aa}
----------	--------------------	--------------------	---------------------	---------------------	---------------------	---------------------	--------------------	---------------------	---------------------

*Letras maiúsculas diferentes mostram diferença entre colunas de cada órgão e minúsculas diferentes entre a linha do mesmo grupo.

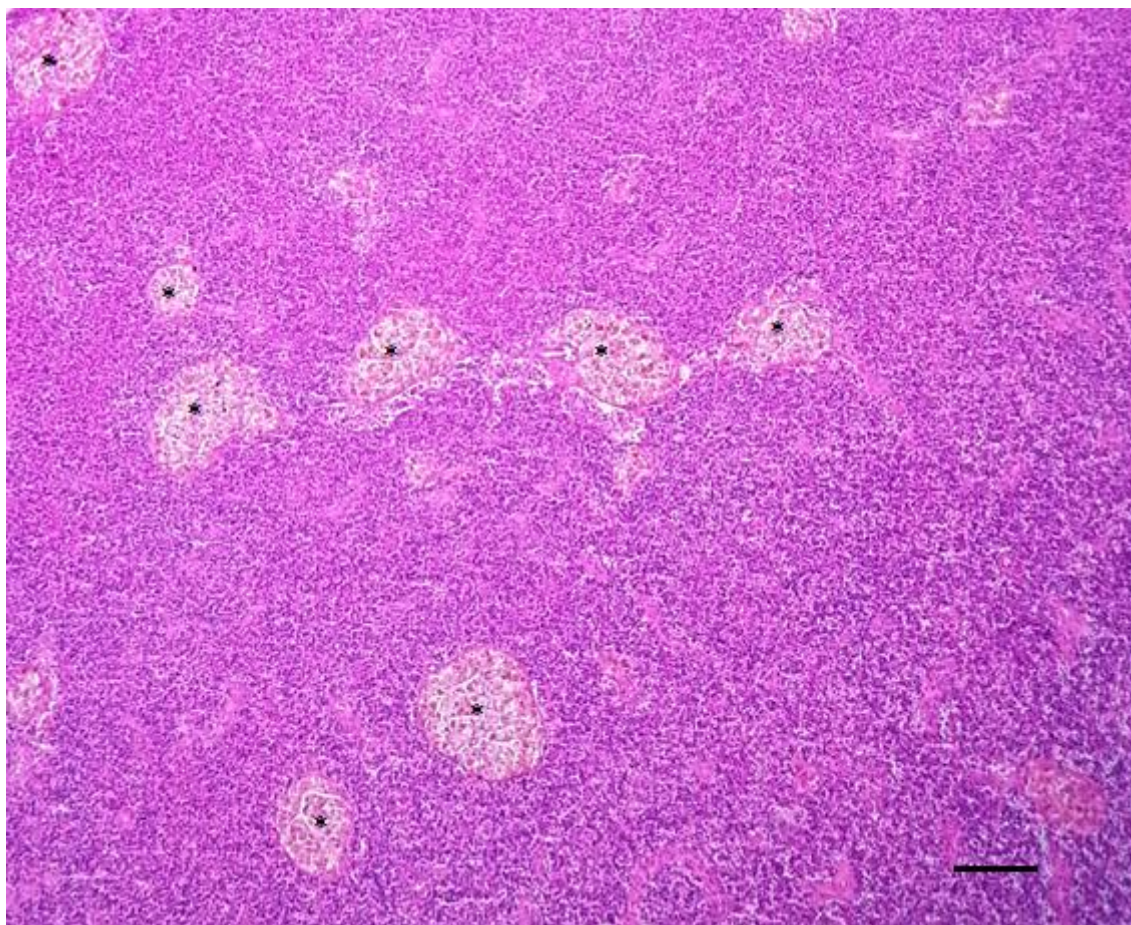


Figura 5. Aspecto estrutural do baço de peixes, evidenciando os centros de melanomacrófagos (*) de um animal do grupo vacinado 60 dias após o estímulo (hematoxilina e eosina, 200x, barra = 50µm).

6. DISCUSSÃO

Não foram encontradas alterações significativas na estrutura histológica dos rins e fígados das tilápias do grupo vacinado comparado com o grupo controle.

No baço de peixes diferente do que ocorre em mamíferos a divisão de polpa vermelha e branca não é bem definida (SOLEM & STENVIK, 2006), entretanto foi possível observar o aumento da proporção de polpa branca nos animais do grupo vacinado, comparado com os animais do grupo controle, especialmente após 60 e 90 dias da imunização. A proliferação de linfócitos no baço ocorre, principalmente, em casos de reconhecimento antigênico por células apresentadoras de antígenos presentes

no órgão que ativam os linfócitos residentes que iniciam sua expansão clonal e a produção de anticorpos (TIZARD, 2014).

No presente estudo sugere-se que parte dos antígenos insolúveis de *S. agalactiae* inoculados foram capturados, principalmente por macrófagos no baço dos animais imunizados, estimulando a formação de centros de melanomacrófagos, que vão reter esses antígenos, processar e apresentar aos linfócitos, induzindo sua proliferação e posteriormente aumentando a produção de anticorpos.

Em relação às células marcadas não foi possível observar diferença significativa quanto ao número de células marcadas nos fígados dos grupos controle e o vacinado. As células hepáticas dos teleósteos estão envolvidas na hematopoiese e na produção de anticorpos no período larval (TAKASHIMA & HIBIYA, 1995; PARIS-PALACIOS et al., 2000), essas funções vão se modificando conforme o desenvolvimento e podem se tornar pouco expressivas na fase adulta. A marcação de células produzindo anticorpos nos fígados dos animais do grupo vacinado, sendo igual à marcação do grupo controle sugere que no indivíduo adulto de *O. niloticus* o fígado não esteja mais participando efetivamente da produção de anticorpos, tendo sua atividade voltada ao metabolismo de proteínas, lipídios, carboidratos e biotransformação de xenobióticos, que são compostos químicos estranhos ao organismo do peixe (HEATH, 1987, TAKASHIMA & HIBIYA, 1995), processos essenciais para o crescimento e desenvolvimento dos animais.

O rim cefálico é multifuncional nos peixes teleósteos, como órgão formador de células sanguíneas, isto é, tem função hematopoiética além da produção de catecolaminas como função endócrina e de anticorpos como função imune, tanto na fase larval, quanto na vida adulta (WEYTS et al., 1999; ROCHA & FLORES, 2001; HUISING et al., 2007). Entretanto essas funções se alternam de acordo com a prioridade, segundo a fase de crescimento, a sazonalidade, a maturidade sexual ou mesmo a adaptabilidade (COSTA, 2007). Uma maior marcação das células nesse órgão nos peixes vacinados comparado aos não vacinados (controle) sugere seu envolvimento na resposta imune humoral de *O. niloticus* após à vacinação e, portanto, sua função imune na fase adulta dessa espécie.

A imunidade adquirida pode ser dividida em dois padrões de resposta, a imunidade humoral, representada pelos linfócitos B e a celular pelos linfócitos T (RUBIO-GODOY, 2010), durante a ontogenia do sistema imune dos teleósteos os linfócitos que migram do rim anterior para o timo adquirem receptores específicos de células T (timo-dependente), enquanto os linfócitos B adquirem seus receptores específicos,

aparentemente no rim anterior (NIELSEN & ESTEVEGASSENT 2006). Sugere-se que o antígeno insolúvel do *S. agalactiae* utilizado estimulou a imunidade humoral produzida por linfócitos B, aumentando o número dessas células no rim anterior e a síntese da imunoglobulina denominada M (Ig M), que vai para a circulação sanguínea, protegendo o animal da infecção provocada pelo *S. agalactiae* (Gráfico 1).

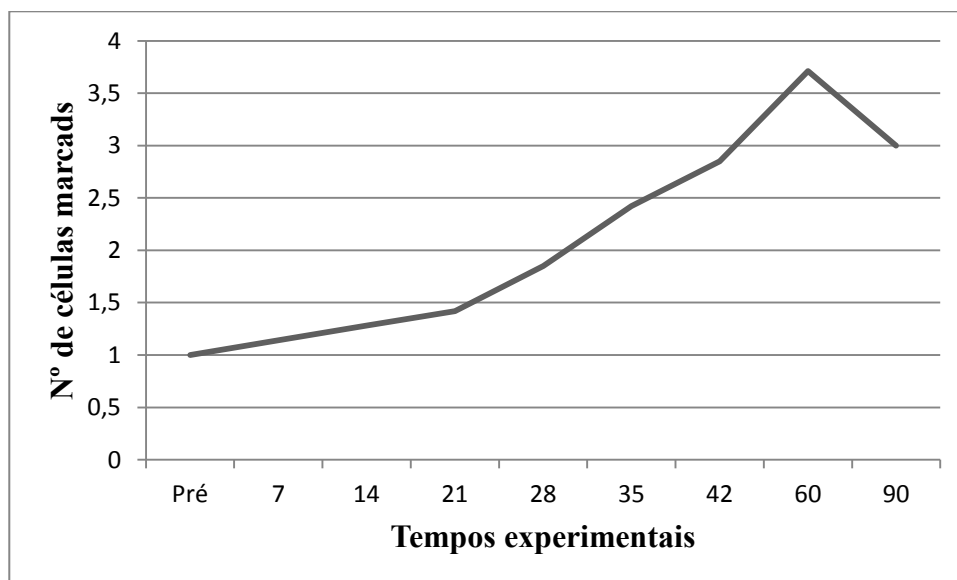


Gráfico 1. Número médio de células positivas para marcação com o anticorpo anti-Ig M pela técnica imunohistoquímica no rim das tilápias-do-Nilo do grupo vacinado durante o período experimental.

Já no baço foi possível observar um aumento significativo de células marcadas 14 dias após a vacinação e dentre os órgãos avaliados na tilápia, foi o que primeiro respondeu ao estímulo vacinal dando início a expansão clonal de linfócitos B e consequentemente, a produção de anticorpos. Esse aumento ocorreu em todos os tempos seguintes e de forma crescente até 60 dias pós vacinação, fato que demonstra que essa resposta não foi pontual, mas sim gradual e duradouro. O baço nos teleósteos tem a função de eliminar macromoléculas e eritrócitos senis e atua na defesa contra microrganismos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999), além de participar da hematopoiese e da produção de anticorpos (KIRON, 2012), características que podem explicar a rápida resposta do órgão ao estímulo vacinal (Gráfico 2).

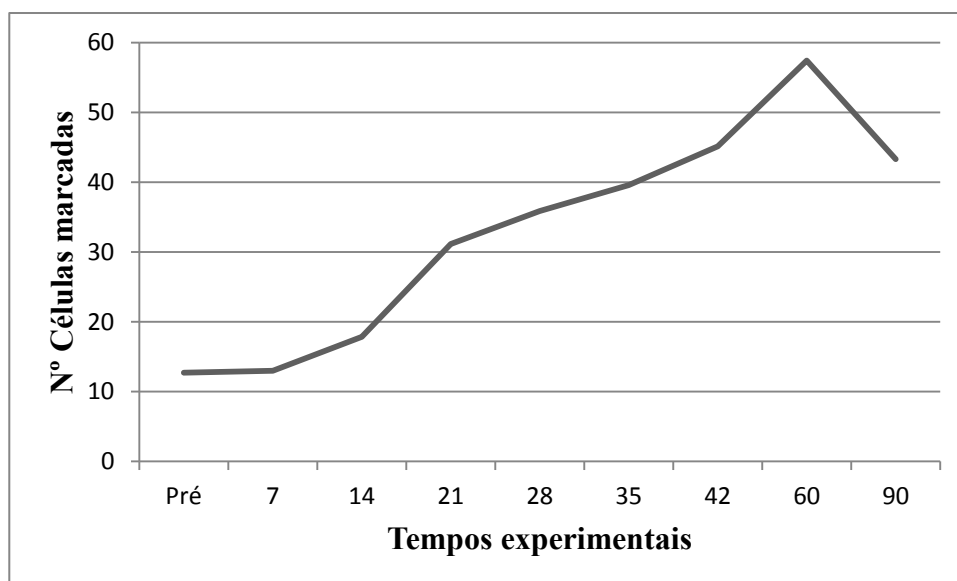


Gráfico 2. Número médio de células positivas para marcação com o anticorpo anti-Ig M pela técnica imunohistoquímica no baço das tilápias-do-Nilo do grupo vacinado durante o período experimental.

Após 90 dias do estímulo, mesmo diminuindo, o número médio das células marcadas ainda é alto (43,28), sugerindo que as tilápias vacinadas ainda permanecem protegidas. Por não ter sido realizadas coletas subsequentes, não é possível mensurar a tempo de proteção com precisão.

Ensaio anteriores utilizando a porção insolúvel do *S. agalactiae* adicionado adjuvante incompleto de Freund via i.c. (MARCUSO et al., 2014) demonstraram Porcentagem Relativa de Sobrevivência (PRS) de 100% dos animais vacinados e desafiados com cepa homóloga. Além de titulação de anticorpos positiva 21 dias após o estímulo, mantendo o mesmo nível até o 28º dia e aumentando progressivamente aos 35, 42 e 60 dias após a vacinação, onde atingiu o pico de titulação, que começa a diminuir no 90º dia pós vacinal, mesmo período de diminuição de células marcadas produzindo anticorpos, encontrado no presente ensaio.

Já a vacina comercial contra estreptococose comercializada no Brasil mostrou uma PRS de 84% nos peixes vacinados e desafiados com *S. agalactiae* por via i.c., em condições experimentais, sendo menor que a encontrada nesse estudo. (SALVADOR, ZANOLO & CERICATO, 2011).

Em relação à contagem do número de Centros de Melanomacrófagos (CMM's) nos órgãos, não houve diferença significativa na contagem realizada no rim e fígado dos animais dos grupos controle e vacinado. Diversos estudos relatam que as alterações,

tanto de número, quanto de área dos CMM's estão intimamente relacionadas à espécie, idade, sexo dos animais e aos diferentes tipos de estímulos oferecidos aos animais (WOLKE, 1992; FOURNIE et al., 1996; 2001; ROBERTS, 2001; BALAMURUGAN et al., 2012; DABROWSK et al., 2012; MANRIQUE et al., 2012). Talvez no presente estudo o estímulo por meio da porção insolúvel do *S. agalactiae* não foi suficiente para induzir o aumento do número do CMM's no rim e fígado das tilápias. Outra possível hipótese esta relacionada ao pouco tempo de exposição dos tecidos ao estímulo imunológico (3 meses), uma vez que trabalhos anteriores mostram que quanto maior o tempo de exposição ao estímulo, maior o número e área dos CMM's (MONTERO et al., 1999; AGIUS e ROBERTS, 2003; DE VICO et al., 2008).

Já no baço dos animais vacinados comparado ao grupo controle, foi possível observar a diferença significativa no número dos CMM's. Manrique et al. (2014) avaliaram a resposta de melanomacrofágicos esplênicos de *O. niloticus* a estímulos inflamatórios por Bacillus Calmette-Guérin (BCG) e corpos estranhos, concluindo que a formação dos CMM's esta relacionada ao tipo de estímulo, imune e não imune. Sendo que o maior aumento, tanto do número, como da área dos CMM's foi com o estímulo imune (BCG), demonstrando a participação dos CMM's na resposta imune.

Os baços dos animais vacinados apresentaram aumento dos CMM's comparado aos animais controle a partir do 21º dia até o 90º dia após o estímulo. Segundo Press et al. (1996) os CMM's também estão relacionados a retenção de partículas antigênicas, interação com células linfóides e aumento na produção de anticorpos. Portanto sugere-se que a porção insolúvel do *S. agalactiae* possa ter sido retida por melanomacrófagos no baço dos animais vacinados, estimulando a maior formação de CMM's e maior interação com as células linfóides locais, que se multiplicaram e produziram mais anticorpos, explicando também a maior marcação de células produzindo anticorpos Ig M nos baços dos animais vacinados.

Ademais em estudo anterior utilizando a mesma espécie de peixe e o mesmo estímulo antigênico (MARCUSO et al., 2014) foi possível observar um aumento da concentração sérica de anticorpos anti-*S. agalactiae* a partir de 21 dias até 90 dias pós vacinal, mesmo período encontrado para o aumento de CMM's no baço das tilápias imunizados, sugerindo que em *O. niloticus* os CMM's esplênicos podem estar diretamente relacionados a resposta imune humoral da espécie frente à estímulos antigênicos.

7. CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho sugerem que a imunização de tilápias-do-Nilo com antígeno insolúvel de *S. agalactiae* induz a proliferação de linfócitos esplênicos, leva ao aumento significativo de células produtoras da imunoglobulina M no baço e rim dos animais vacinados, a partir de 14 e 28 dias após o estímulo, respectivamente, mantendo-se elevados até 90 dias. Tilápias-do-Nilo imunizadas com esta vacina apresentaram maior quantidade de centro de melanomacrófagos no baço a partir de 21 dias pós-estímulo quando comparadas as tilápias do grupo controle.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUSELIANA, A.; HASSAN, D.; SALEHA, A.A.; SITI-KHAIRANI, B.; MILUD A. *Streptococcus agalactiae* the etiological agent of mass mortality in farmed red tilapia (*Oreochromis* sp.). **J Anim Vet Adv** 20:2640–2646. 2010.
- AGIUS, C. **Aspects of the melano-macrophage centres in fish**. 1979a. PhD (Thesis) - University of Stirling, Scotland, 1979a.
- AGIUS, C. The role of melano-macrophage centres in iron storage in normal and diseased fish. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 2, n. 4, p. 337-343, 1979b.
- AGIUS, C. Phylogenetic development of melano-macrophage centres in fish. **Journal of Zoology**, West Sussex, v. 191, n. 1, p. 11-31, 1980.
- AGIUS, C. The effects of splenectomy and subsequent starvation on the storage of haemosiderin by the melano-macrophages of rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. **Journal of Fish Biology**, Malden, v. 18, p. 41-44, 1981.
- AGIUS, C.; ROBERTS, R. J. Effects of starvation on the melano-macrophage centres of fish. **Journal of Fish Biology**, Malden, v. 19, p. 161-169, 1981.
- AGIUS, C. On the failure to detect haemosiderin in the melano-macrophages of the dogfish *Scylorhinus canicula* (Linnaeus) after prolonged starvation. **Experientia**, Basel, v. 39, p. 64-67, 1983.
- AGIUS, C.; AGBEDE, S. A. An electron microscopical studies on the genesis of lipofuscin, melanin and haemosiderin in the haemopoietic tissues of fish. **Journal of Fish Biology**, Malden, v. 24, p. 471-488, 1984.

- AGIUS, C. The melano-macrophage centres in fish: a review. In: Manning, M.J.; Tatner, M. F. (Ed.). **Fish Immunology**. London: Academic Press, p. 85-105. 1985.
- AGIUS, C.; ROBERTS, R. J. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 26, n. 9, p. 499-509, 2003.
- ALMEIDA, M. J. “**Análise da Efetividade da Terapia Fotodinâmica sobre Feridas Cutâneas Infectadas por *Staphylococcus aureus*, em Ratos**” Dissertação de Mestrado. Universidade do Vale do Paraíba. São José dos Campos-SP. 2011.
- AOYAGI, K; NAKANISHI, T; XIA, C. Specific cell-mediated immunity in fish. **Vet Immunol Immunopath**, v.72, p. 101 – 109, 1999.
- BALAMURUGAN, S. A.; DEIVASIGAMANI, B.; KUMARAN, S.; SAKTHIVEL, M.; RAJSEKAR, T.; PRIYADHARSINI, P. Melanomacrophage centers aggregation in *P. lineatus* spleen as bio-indicator of environmental change. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, Beijing, v. 2, p. S635-S638, 2012.
- BARBOZA, J. C. S.; SERRA, A. A. “Ultra-Som (I): Influência do Ultra-Som na Química”. **Quím. Nova**, 15, 302-316, 1992.
- BELÉM-COSTA, A; CYRINO, J. E. P. ANTIBIOTIC RESISTENCE OF *Aeromonas hydrophila* ISOLATED FROM *Piaractus esopotamicus* (Holmberg, 1887) AND *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). **Sci. Agric.** (Piracicaba, Braz.), v.63, n.3, p.281-284, May/June 2006.
- BOYD, C.E. **Water quality in ponds for aquaculture**. Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University. 1990.
- BOZZO, F. R., MORAES, J. R. E., MORAES, F. R., PEREIRA, G., TAVARES-DIAS, M., ONAKA, E. M. Kinetics of cellular component in inflammatory response induced by different stimuli in the swim bladder of pacu *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Characidae). **Journal of the World Aquaculture Society**, v.38, p.302 - 308, 2007.
- CHANG PH, PLUMB, JA. Effects of salinity on *Streptococcus* infection of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Journal of Applied Aquaculture** 6:39-45. 1996.
- CONAMA, **resolução**; nº 358, de 29 de abril de 2005 Publicada no DOU no 84, de 4 de maio de 2005, Seção 1, páginas 63-65, 2005.
- COONS, A.H.; CREECH, H.J.; JONES, R.N. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. **Proc Soc Exp Biol Med** 47:200–202, 1941.

- COSTA, G.M. Estudo histomorfológico. e anatomorfológico .unol N.; FLINK, G.; VERBURG *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887, Teleostei, Characidae), p. 349-357, 2007.
- CLAUDIANO, G. da S.; PETRILLO, T.R.; MANRIQUE, W.G.; CASTRO, M.P.; LOUREIRO, B.A.; MARCUSSO, P.F.; BELO, M.A.A.; MORAES, J.R.E. de; MORAES, F.R. Acute aerocystitis in *Piaractus mesopotamicus*: participation of eicosanoids and pro-inflammatory cytokines. **Fish and Shellfish Immunology**, v.34, p.1057-1062, 2013.
- COLONNA M, PULENDRAN B, IWASAKI A. Dendritic cells at the host pathogen interface. **Nature Immunology**, v.7(2), p.117-120, 2006.
- CONTE, L. **Produtividade e economicidade da tilapicultura em gaiolas na região sudeste do Estado de São Paulo: estudo de casos**. Piracicaba, 2002. 73 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.
- DABROWSKA, H.; OSTASZEWSKA, T.; KAMASZEWSKI, M.; ANTONIAK, A.; NAPORA-RUTKOWSKI, L.; KOPKO, O.; LANG, T.; FRICKE, N. F.; LEHTONEN, K. K. Histopathological, histomorphometrical, and immunohistochemical Biomarkers in flounder (*Platichthys flesus*) from the southern Baltic Sea. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Maryland Heights, v. 78, p. 14-21, 2012.
- DANILOVA, N.; BUSSMANN, J.; JEKOSCH, K.; STEINER, L.A. The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin. **Nature Immunology**, v.6 (3), p.295-302, 2005.
- DE VICO, G.; CATALDI, M.; CARELLA, F.; MARINO, F.; PASSANTINO, A. 2008: Histological, histochemical and morphometric changes of splenic melanomacrophage centers (SMMCs) in Sparicotyleinfected cultured sea breams (*Sparus aurata*). **Immunopharmacol. Immunotoxicol.** 30, 27–35.
- DUMRONGPHOL, Y., HIROTA, T., KONDO, H., AOKI, T., HIRONO, I. Identification of novel genes in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) head kidney up-regulated after vaccination with *Streptococcus iniae* formalin-killed cells. **Fish and Shellfish Immunology**. 26, 197–200. 2009.
- ELLIS, A. E.; DE SOUSA, M. A. B. Phylogeny of the lymphoid system. 1. A study of the fate of circulating lymphocytes in the plaice (*Pleuronectes platessa* L.). **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 4, p. 338-343, 1974.

- ELLIS, A. E. Lecocytes and related cells in the plaice *Pleuronectes platessa* **Journal of Fish Biology**, v.8, p.143-156, 1976.
- EVANS JJ, KLESIUS PH, GILBERT PM, SHOEMAKER CA, AL SARAWI MA, LANDSBERG J, DUREMDEZ R, AL MARZOUK A, AL ZENKI S. Characterization of b-hemolytic group B *Streptococcus agalactiae* in cultured sea bream, *Sparus auratus* L., and wild mullet, *Liza klunzingeri*, in Kuwait. **Journal of Fish Diseases** 25:505–513. 2002.
- EVANS J.J., KLESIUS P.H. & SHOEMAKER C.A. Warmwater fish vaccinology in catfish production. **Animal Health Research Reviews** 5,305-311.2004.
- EVANS JJ, PASNIK DJ, KLESIUS PH, AL-ABLANI, S. First report of *Streptococcus agalactiae* and *Lactococcus garvieae* from a wild bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). **J Wildl Dis**; 42:561–9. 2006.
- ELDAR A, BEJERANO Y, BERCOVIER H. *Streptococcus shiloi* and *Streptococcus difficile*: two new streptococcal species causing a meningoencephalitis in fish. **Current Microbiology** 28:139–143. 1994.
- FEARON, D.T.; LOCKSLEY, R.M. The instructive role of innate immunity in the acquired immune responses, **Science**, v.273, p.50-53, 1996.
- FERGUSON, H. W. **The reticulo-endothelial system of teleost fish with special reference to the plaice (*Pleuronectes platessa* L.)**. 1976a. Thesis (PhD) - University of Stirling, Scotland, 1976.
- FINN, J.P. e NIELSEN, O. N. The effect of temperature variation on the inflammatory response of rainbow trout. **J. Path.** 105: 257-268, 1971.
- FIGUEIREDO HCP, CARNEIRO DO, FARIA FC, COSTA, GM. *Streptococcus agalactiae* associado à meningoencefalite e infecção sistêmica em tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil. **Arq Bras Med Vet Zootec** 58:p.678-680. 2006.
- FIGUEIREDO, C. A. Jr.; VALENTE, A. S. V. Jr. Cultivo de tilápias no Brasil: origens e cenário atual. In: **CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL**, XLVI, 2008, Rio Branco. Anais... Rio Branco: SOBER, 2008.
- FITZSIMMONS, K.; MARTINEZ-GARCIA, R.; GONZALES-ALANIS, P. Why tilapia is becoming the most important food fish on the planet. In: **International Symposium in Tilapia in Aquaculture**, 9th, 2011, China. Proceedings... China: Shanghai Ocean University, 2011.

- FOURNIE, J. W.; SUMMERS, J. K.; WEISBERG, S. B. Prevalence of gross pathological abnormalities in estuarine fishes. **Transactions of the American Fisheries Society**, Bethesda, v. 125, n. 4, p. 581-590, 1996.
- FOURNIE, J. W.; SUMMERS, J. K.; COURTNEY, L. A.; ENGLE, V. D. Utility of splenic macrophage aggregates as an indicator of fish exposure to degraded environments. **Journal of Aquatic Animal Health**, Bethesda, v. 13, n. 2, p. 105-116, 2001.
- FULOP, G.M.I.; McMILLAN, D. Phagocytosis in the spleen of the sunfish *Lepomis* spp. **Journal of Morphology**, v. 179, n. 2, p. 175-195, 1984.
- GARCIA LEME, J. **Hormones and Inflammation**, CRC Press, Boca Raton, 1989. p.12-38.
- GOMES, S., AFONSO, A., GARTNER, F., Fish vaccination against infections by Streptococcal species and the particular case of Lactococcosis. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. 101, 25–35. 2006.
- GRIMHOLT, U.I; HORDVIK, V.M; FOSSE, I; OLSAKER, C.E, LIE, Y. Molecular cloning of major histocompatibility complex class I cDNAs from atlantic salmon (*Salmo salar*). **Immunogenetics**, v.37, p. 469 – 473, 1993.
- GUDDING, R.; LILLEHAUG, A.; EVENSEN, O. Recent developments in fish vaccinology. **Veterinary and Immunopathology**, v.72, p.203-212, 1999.
- HANSEN, J.D.; LANDIS, E.D.; PHILLIPS, R.B. Discovery of a unique Ig heavy chain isotype (IgT) in rainbow trout: implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. **National Academy Science**, v.102, n.19, p.6919-6924, 2005.
- HARDIE, J.M.; WHILEY, R.A. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**, v.83, p.1S–11S , 1997.
- HASTEIN, T.; GUDDING, R.; EVENSEN, O. Bacterial vaccines for fish-an update of the current situation worldwide. **Developments in Biologicals**, Basel, v. 121, p. 55-74, 2005.
- HEATH, A. G. **Water Pollution and Fish Physiology**. C.R.C. Press, 1987.
- HERRAEZ, M.P.; ZAPATA, A.G. Structure and function of the melano-macrophage centers of the goldfish *Carassius auratus*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 12, n. 1-4, p. 117-126, 1986.

- HIRONO, I., NAM, B.H., ENOMOTO, J., UCHINO, K., AOKI, T. Cloning and characterization of a cDNA encoding Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* IgD. **Fish Shellfish Immunol.** 15, 63–70, 2003.
- HUISING, M. O.;VAN DER AA, L. M.; METZ, J. R.; MAZON, A. D.; VERBURG-VAN KEMENADE, B. M. L.; FLIK, G.Corticotropin-releasing factor (CRF) and CRF-binding protein expression in and release from the head kidney of common carp: evolutionary conservation of the adrenal CRF system. **Journal of Endocrinology**, v. 193, n. 3, p. 349-357, 2007.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA.** Produção da Pecuária Municipal, Rio de Janeiro, v. 41, p.1-108, 2013.
- FERNANDES, M.O. Estresse social, metabolismo e crescimento em peixes. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 1997. 82p. **Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista**, 1997.
- JAFAR, Q. A.; SAMEER, A. Z.; SALWA, A. M.; SAMEE, A. A.; AHMED, A. M.; FAISAL, A. S. Molecular investigation of *Streptococcus agalactiae* isolates from environmental samples and fish specimens during a massive fish kill in Kuwait Bay, **African Journal of Microbiology Research**, v. 3, n. 1, p. 22-26, 2009.
- JIMÉNEZ A, TIBATÁ V, JUNCA H, ARIZA F, VERJAN N, IREGUI C. Evaluating a nested-PCR assay for detecting *Streptococcus agalactiae* in red tilapia (*Oreochromis* sp.) tissue. **Aquaculture** 321:203–206. 2011.
- JUBB, K.; PALMER'S, L. Hepatocellular adaptations and intracellular accumulation. In: MAXIE, M. G (Ed.). **Jubb, Kennedy, and Palmer's pathology of domestic animals**. 5. ed. Edinburgh: Elsevier Saunders, p. 305-316. 2007.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. 1999. **Histologia Básica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 540p.
- KILLIAN M. *Streptococcus* and *Lactobacillus*. In: **Topley e Wilson's Microbiology and Microbial Infections**. COLLIER, L., BALOWS, A and SUSSMAN, M (eds). Volume 2: Systematic Bacteriology. Balows, A; Duerden B.I. (vol Eds), Arnold (Hodder Headline Group), 635- 658, 1998.
- KIRON, V. Fishimmune system and its nutritionalmodulation for preventivehealthcare. **Animal Feed Science and Technology**, v. 173, p. 111-133, 2012.
- KRANZ, H.; PETERS, N. Melano-macrophage centres in liver and spleen of ruffe (*Gymnocephalus cernuus*) from the Elbe Estuary. **Helgolander Meeresuntersuchungen**, Heidelberg, v. 37, p. 415-424, 1984.

- KRANZ, H.; GERCKEN, J. Effects of sublethal concentration of potassium dichromate on the occurrence of splenic melanomacrophage centres in juvenile plaice, *Pleuronectes platessa* L. **Journal of Fish Biology**, West Sussex, v. 31, p. 75-80, 1987. Supplement A.
- KRANZ, H. Changes in splenic melano-macrophage centres of dab, *Limanda limanda* during and after infection with ulcer disease. **Diseases of Aquatic Organisms**, Oldendorf, v. 6, n. 3, p. 167-173, 1989.
- KUMAR, V.; CONTRAN; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Patologia – Bases Patológicas das Doenças**. 4ª. Elsevier. 49pp. 2004.
- LANGE, C. C.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; ARCURI, E. F.; SOUZA, G. N.; MACHADO, M. A.; DOMINGUES, R.; SALIMENA, P. S. Uso de PCR e sequenciamento do rDNA 16S para identificação de bactérias do gênero *Staphylococcus* isoladas de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 36-40, jan. 2011.
- LEITE, M. J. C. **Utilização de microrganismos eficazes como probióticos no cultivo de tilápias do Nilo**. Areia, 2009. 63 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2009.
- LEONG. A.S.; WANNAKRAIROT P. A retrospective analysis of immunohistochemical staining in identification of poorly differentiated round cell and spindle cell tumors – results, reagents and costs. **Pathology**. 24: 254-260. 1992.
- LIM C, WEBSTER CD. Tilápia: biology, culture and nutrition. **An Imprint of the Haworth Press**, New York, United Stated. 678pp. 2006.
- LITMAN, G.W.; ANDERON, M.K.; RAST, J.P. Evolution of antigen biding receptors. **Annual Review of Immunology**, v.17, p.109-147, 1999.
- LONGHI, E., PRETTO-GIORDANO, L. G., MÜLLER, E. E. Avaliação da eficácia de vacina autóctone de *Streptococcus agalactiae* inativado aplicada por banho de imersão em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Semina: Ciências Agrárias**. 33, 3191–3200. 2012.
- LUNA, L.G., 1960. **Hstologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. 3. ed. New York, Mc-Graw Hill, 1960.
- MANRIQUE, W.G. Estudo comparativo da resposta inflamatória crônica induzida em *Piractus mesopotamicus* em *Oreochromis niloticus* por corpo estranho e bacilo de Calmette-Guérin. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Vetrinárias, Jaboticabal, São Paulo, 93f. 2012.

- MANRINQUE, W.G.; CLAUDIANO, G.S.; PETRILLO, T.R.; PARDI, M.C.; FIGUEIREDO, M.A.P.; BELO, M.A.A.; MORAES, J.R.E.; MORAES, F.R. Response of splenic melanomacrophage centers of *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) to inflammatory stimuli by BCG and foreign bodies. **Journal of Applied Ichthyology**, p. 1-6, 2014.
- MARCUSSO, P.F. Resposta imune de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*) vacinadas contra *Streptococcus agalactiae*. 76f. 2014. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2014.
- MARCUSSO, P.F.; CLAUDIANO, G.S.; ETO, S.F.; VIEIRA, F.C.F.; SLAVADOR, R.; MORAES, J.R.E.; MORAES, F.R. Isolamento de *Streptococcus agalactiae* em diferentes órgãos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) criadas em tanques-rede. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 31, n. 2, p. 549-554, Mar./Apr. 2015.
- MARTINEZ G.; HAREL J.; GOTTSCHALK M. Specific detection by PCR of *Streptococcus agalactiae* in milk. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 65, p. 68-72, 2001.
- MARTINS, M.L. **Efeito da suplementação com vitamina C sobre a reação inflamatória em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887**. Dissertação (Doutorado em Aqüicultura). CAUNESP-Unesp-2000.
- MARTINS, M.L.; ONAKA, E.M.; TAVARES-DIAS, M.; BOZZO, F.R.; MALHEIROS, E.B. Características hematológicas do híbrido tambacu, seis e 24 horas após a injeção de substâncias irritantes na bexiga natatória. **Rev. Ictiol.**, Corrientes, 9 (1-2): 25-31. 2001.
- MARTINS, M. L., MORAES, F. R., FUJIMOTO, R. Y., ONAKA, E. M., BOZZO, F. R., MORAES, J. R. E. Carrageenin induced inflammation in *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthues: Characidae) cultured in Brazil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.32, p.31 - 39, 2006.
- MATUSHIMA, E.R.; MARIANO, M. Kinetics of the inflammatory reaction induced by carrageenin in the swimbladder of *Oreochromis niloticus*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.33, n.1, p.5-10, 1996.
- McARTHUR, J.I.; FLETCHER, T.C.; PIRIE, B.J.S.; DAVISON, R.J.L.; THOMSON, A.W. Peritoneal inflammatory cells in plaice, *Pleuronectes platessa* L.: effects of stress and endotoxin. **Journal of Fish Biology**, v.25, p.69-81, 1984.

MELO, C.C.V.; BRUHN, F.R.P.; ASCARI, I.J.; LEIRA, M.H.; ZANGERONIMO, M.G.; PEREIRA, L.J.; MIAN, G.F. A eficácia das vacinas contra *Streptococcus agalactiae* em tilápias: Uma revisão sistemática. **Revista Científica de Medicina Veterinária**. n.24, jan. 2015.

MENDES, L. H.; VELOSO, T. Valor Econômico destaca crescimento do mercado de pescado no Brasil. Caderno B16/Agronegócios, 2012.

MESSEGUER, J.; LOPEZ-RUIZ, A.; ESTEBAN, M.A. Melano-macrophages of the seawater teleosts, sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*): morphology, formation and possible function. **Cell Tissue Research**, v. 277, n. 1, p. 1-10, 1994.

MONTERO, D.; BLAZER, V. S.; SOCORRO, J.; IZQUIERDO, M. S.; TORT, L. Dietary and culture influences on macrophage aggregate parameters in gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 179, p. 523- 534, 1999.

MING CHEN, RUI WANG, LI-PING LI, WAN-WEN LIANG, JIAN LI, YAN HUANG, AI-YING LEI, WEI-YI HUANG, XI GAN. Screening vaccine candidate strains against *Streptococcus agalactiae* of tilápia based on PFGE genotype. **Vaccine**, v.30, 42, 6088-6092p., 2012.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. 2014 (a). Potencial brasileiro. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/aquicultura/potencial-brasileiro>. Acesso em: 09 de agosto de 2015.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. 2014 (b). Maiores produtores de peixes do Brasil não estão no litoral e sim no Centro-Oeste, mostra IBGE. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2014/12/maiores-produtores-de-peixes-do-brasil-nao-estao-no-litoral-e-sim-no-centro-oeste-mostra-ibge>. Acesso em: 10 de agosto de 2015.

MIZUNO, S.; MISAKA, N.; MIYAKOSHI, Y.; TAKEUCHI, K.; KASAHARA, N. Effects of starvation on melano-macrophages in the kidney of masu salmon (*Oncorhynchus masou*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 209, p. 247-255, 2002.

MORAES, F. R.; MOREAS, J. R.E. Nutracêutico na inflamação e cicatrização e peixes de interesse zootécnico. In: TAVARES-DIAS, M. (Org.) Manejo e sanidade de peixes em cultivo. **Macapá: Embrapa Amapá**, p. 625-723. 2009.

- MSD SAÚDE ANIMAL.** AQUAVAC® STREP Sa: overview. 2015. Disponível em: <http://aqua.merck-animal-health.com/products/aquavac-strep-sa/overview.aspx>. Acesso em: 01 set. 2015.
- MUSA N, WEI LS, MUSA N, HAMDAN RH, LEONG LK, WEE W, AMAL MN, Kutty BM, Abdullah SZ (2009) *Streptococcosis* in red hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*) commercial farms in Malaysia. *Aquaculture* 40:630-632.
- NAKANISH, T.; OTOTAKE, M. Antigen uptake and immune responses after immersion vaccination. In: GUDDING R. et al. **Fish Vaccinology**, p.59-68, 1997.
- NIELSEN, M.E. & ESTEVE-GASSENT, M.D. The eel immune system: present knowledge and the need for research. **J. Fish Dis.** 29: 65-78. 2006.
- NIZET, V. Streptococcal b-hemolysins: genetics and role in disease pathogenesis. **Trends Microbiol.** 10 (12), 575–580. 2002.
- NGUYEN HT, KANAI K, YOSHIKOSHI K. Immunohistochemical examination of experimental *Streptococcus iniae* infection in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. **Fish Pathol.** 36:169-178. 2001.
- NGUYEN HT, KANAI K, YOSHIKOSHI K. Ecological investigation of *Streptococcus iniae* in cultured Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) using selective isolation procedures. **Aquaculture.** 205: 7-17. 2002.
- NUR-NAZIFAH, M., SABRI, M.Y., SITI-ZARHRAH, A. Development and efficacy of feed-based recombinant vaccine encoding the cell wall surface anchor Family protein of *Streptococcus agalactiae* against streptococcosis in *Oreochromis* sp. **Fish and Shellfish Immunology.** v. 37, 1, 193-200p., 2014.
- OBA ET, MARIANO WS, SANTOS LRB. Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para manejo. In: TAVARES-DIAS, M. (Org.) **Manejo e sanidade de peixes em cultivo.** Macapá: Embrapa Amapá 226-247. 2009.
- OLÁH, I.; VERVELDE, L. Structure of the avian lymphoid system. In: DAVISON, F.; BERND, K. SCHAT, K. A. **Avian Immunology.** London: Elsevier, 2008. cap. 2, p. 13-50.
- PARIS-PALÁCIOS, S.; BIAGIANTI-RISBOURG, S.; VERNET, G. Biochemical and (ultra) structural hepatic perturbations of *Brachydanio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) exposed to two sublethal concentrations of cooper sulfate. **Aquatic Toxicology.** v. 50, p.109-124, 2000.

- PASNIK, D. J., EVANS, J. J., KLESIUS, P. H. Duration of protective antibodies and correlation with survival in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* following *Streptococcus agalactiae* vaccination. **Dis. Aquat. Organ.**, 66,129-34, 2005.
- PAVANELLI, G.C.; EIRAS, J.C.; TAKEMOTO, R.M.; **Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento.** Maringá: Eduem, 2008, 311p., 3ed.
- PEREIRA, E. P.; GAMEIRO, A. H. Análise da tilapicultura brasileira com ênfase no comércio internacional. **CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, XLV.**, 2007, Londrina. Anais... Londrina: Administração e Sociologia Rural, Universidade Estadual de Londrina, 2007.
- PEREIRA, U.P. Genotipagem de *Streptococcus agalactiae* isolados de seres humanos, bovinos e peixes e seu potencial de virulência para tilápia do Nilo. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 23p. 2008.
- PRESS, C.; EVENSEN, O.; REITAN, L. J.; LANDSVERK, T. Retention of furunculosis vaccine components in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., following different routes of administration. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 19, p. 215-224, 1996.
- PRETTO-GIORDANO, L.G.; MÜLLER, E.E.; KLESIUS, P.; SILVA, V.G. Efficacy of na experimentally inactivated *Streptococcus agalactiae* vaccine in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in Brazil. **Aquaculture Research**. v.41, 1539-1544. 2010.
- QUEIROZ, J.F.; LOURENÇO, J.N.P.; KITAMURA, P.C.; SCORVO-FILHO, J.D.; CYRINO, J.E.P.; CASTAGNOLLI, N.; VALENTI, W.C.; BERNARDINO, G. Aquaculture in Brazil: research priorities and potential for further international collaboration. **World Aquaculture, Baton Rouge**, v.36, n.1, p.45-50, Mar. 2005.
- QUINTANA, C. F. **Respostas locais e sistêmicas induzidas por endotoxina em *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) tratados com cromo.** 67 p. Tese (Tese de Doutorado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal, SP, 2002.
- RAMOS-VARA J.A.; MILLER M.A. When tissue antigens and antibodies get along: revisiting the technical aspects of immunohistochemistry – the red, brown, and blue technique. **Veterinary Pathology**. 51: 42-87. 2014.
- REIS, R.S. dos **Abordagem proteômica da interação bactéria-hospedeiro na colibacilose aviária.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2011.

- REIS NETO, R. V. **Avaliação genética das características morfométricas de tilápias do Nilo, variedade GIFT, sob seleção para ganho em peso.** Lavras, 2012. 77 f. Tese (Doutorado em Zootecnia), Departamento de Produção Animal, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.
- RIVALAIN, N., ROQUAIN, J., DEMAZEAU, G. Development of high hydrostatic pressure in biosciences: pressure effect on biological structures and potential applications in biotechnologies. **Biotechnology Advances** 28, 659-672. 2010.
- ROBERTS R. J. Melanin-containing cells of the teleost fish and their relation to disease. In: RIBELIN, W. E.; MIGAKI, G. (Ed.). **The pathology of fishes.** Madison: University of Wisconsin Press, 1975. p. 399-428.
- ROBERTS, R.J.; BULLOCK, A. M. The skin surface ecosystem of teleost fishes. **Proc. R. Soc.** Edinburg, v. 79, p. 87-91, 1980.
- ROBERTS R. J. **Fish Pathology.** 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2001.
- ROCHA, R.M.; FLORES, C.Q. The ultrastructure of the hematopoietic tissue in the head kidney of matrinxa, *Bryconcephalus*, Gunther, 1869 (Teleostei–Characidae). *Acta Microscopica. Supl. B*, p. 207-208, 2001.
- ROMANO, L. A., MEJÍA J. Infección por *Streptococcus iniae*: Una enfermedad emergente que afecta a peces de cultivo y a humanos. **Revista AquaTIC**, nº 18, Enero-Junio. 2003.
- ROSS, L.G.; ROSS, B. **Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals.** Oxford: Blackwell Science, 159 p. 1999.
- RUBIO-GODOY, M. Inmunología de los peces óseos: Revisión. **Revista Mexicana Ciências Pecuária**, v. 1, p. 47-57. 2010.
- SACCHETIN, P.S.C. et al. Produção e micropartículas de alginate contend *Flavobacterium columnare* inativada pelo método de emulsão para vacinação de peixes por via oral. **Química Nova**, v.33, n.2, p.263-268, 2010.
- SALVADOR R, MULLER EE; FREITAS JC, LEONHARDT JH, PRETTOGIORDANO LG, DIAS JA, MORENO AM. Isolation of *Streptococcus* spp from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and quality of water in hapas nets in North Region of Parana State, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias** 24:35-42. 2003.
- SALVADOR R, MÜLLER EE, FREITAS JC, LEONHARDT JH, PRETTOGIORDANO LG, DIAS JA. Isolation and characterization of *Streptococcus* spp. group B in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in hapas nets and earth nurseries in the northern region of Parana State, Brazil. **Ciência Rural** 35:1374-1378. 2005.

- SALVADOR, R.; ZANOLO, R.; CERICATO, L. O impacto da Estreptococose em Tilápias no Brasil e a eficácia da vacina AquaVac® Strep Sa na prevenção da doença sob condições controladas. **Doenças Bacterianas em Peixes de Água Quente: Novas Estratégias para o Controle Sustentável**. Conferência da Sociedade Mundial de Aquicultura. p. 06-10, Junho, 2011.
- SALVADOR, R.; TOAZZA, C.S.; MORAES, J.R.E; MORAES, F.R. Inflammatory responses of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* to *Streptococcus agalactiae*: effects of vaccination and yeast diet supplement. **Diseases of Aquatic Organisms**.v.98, p.235–241, 2012.
- SCAPIGLIATI, G.; ROMANO, N.; ABELLI, L. Monoclonal antibodies in fish immunology: identification, ontogeny and activity of T and B – lymphocytes. **Aquaculture**, v.172, p.3-28, 1999.
- SERRANO, P. H. Responsible use of antibiotics in aquaculture. **Food and Agriculture Organization (FAO) Fisheries Technical Paper**, Roma, n. 469, p. 11-38, 2005.
- SHIMITT, F.C.; KIMARD, P.A., CAMPOS, P.F., BACHI, C.E. Contribuição ao estudo imnuo-histoquímico para o diagnóstico anátomo patológico. **Revista do Hospital das clínicas**, São Paulo, v.47, n.1, p.1-4, 1992.
- SHOEMAKER, C.A.; LAFRENTZ, B.R.; KLESIUS, P.H.; EVANS, J.J. Protection against heterologous *Streptococcus iniae* isolates using a modified bacterin vaccine in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Journal of Fish Diseases**. 3:7, 537–544, 2010.
- SHOEMAKER, C. A.; LAFRENTZ, B. R.; KLESIUS, P. H. Bivalent vaccination of sex reversed hybrid tilapia against *Streptococcus iniae* and *Vibrio vulnificus*. **Aquaculture**, v.354-355, p.45-49, 2012.
- SILVIA, F.V. et al. Características morfológicas, rendimentos de carcaça, filé, vísceras e resíduos em tilápias-do-Nilo em diferentes faixas de peso. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v.38, n. 8, p. 1407-1412, dez, 2009.
- SILVA, F.A.S.E. & AZEVEDO, C.A.V. de. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: **World Congress on Computers in Agriculture**, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.
- SOLEM, S.T.; STENVIK J. Antibody repertoire development in teleosts—a review with emphasis on salmonids and *Gadus morhua* L. *Developmental and Comparative Immunology*, v.30, p.57-76 .2006.

- SUANYUK N, KANGHEAR H, KHONGPRADIT R, SUPAMATTAYA K. *Streptococcus agalactiae* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Songklanakarin J Sci Technol**. 27: 307-319. 2005.
- SUZUKI, K. Morphological and phagocytic characteristics of peritoneal exudate cells in tilapia, *Oreochromis niloticus* (Trewavas), and carp, *Cyprinus carpio* L. **Journal of Fish Biology**, v. 29, p. 349-364, 1986.
- TAKASHIMA, F. e HIBIYA, T. **An Atlas of Fish Histology: Normal and Pathological Features**. 2. ed. Tokio: Kodansha Stuttgart. 1995. 213p.
- TAYLOR, C.R. The current role of immunohistochemistry in diagnostic pathology. **Advances in Pathology and Medicine**. 7: 59-63. 1994.
- TAYLOR, C.R.; SHI, S.R.; BARR, N.J. et al. Techniques of immunohistochemistry: principles, pitfalls and standardization. In: DABBS D.J. **Diagnostic Immunohistochemistry**, New York, Churchill-Livingstone. 2002.
- TEIXEIRA, M.J.; SOBRAL, A.P.V.; ABREU-E-LIMA, M.C.M. et al. Avaliação da supressão da proteína p53 e das mutações no éxon 8 do gene TP53 em carcinomas mamários caninos e glândulas normais. **Pesq. Vet. Bras**. 31(6): 521-526. 2011.
- TESSAROLLI, V. “**Ação da Terapia Fotodinâmica (TFD) sobre Biofilme Dentário Humano**”, Dissertação Mestrado. USP. Bauru-SP. 2010.
- TING YI, YAN-WE LI, LIANG LIU, XI-XI XIAO, NA-XING LI. Protection on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) against *Streptococcus agalactiae* following immunization with recombinant FbsA and α -enolase. **Aquaculture**. 428-429, 35-40, 2014.
- TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinária**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.
- TRABULSI LR, ALTERTHUM F, MARTINEZ MB, CAMPOS LC, GOMPERTZ OF, RÁCZ ML. 2005. **Microbiologia**. 5ed. Atheneu, São Paulo, 780pp.
- VANDAMME, P.; DEVRIESE, L.A.; POT, B.; KERSTERS, K.; MELIN, P. *Streptococcus difficile* is a nonhemolytic Group B, type Ib *Streptococcus*. **International Journal Systematic Bacteriology**, v.47, n.1, p.81-85, 1997.
- VASSALO, J. Avanços técnicos no diagnóstico histopatológico das neoplasias: imunohistoquímica. **Revista Unicamp**, Campinas, v.4.n.1, p.31-34, 1993.
- VIGLIANO, F. A.; BERMUDEZ, R.; QUIROGA. M. I.; NIETO, J. M. Evidence for melano-macrophage centres of teleost as evolutionary precursors of germinal centres of higher vertebrates: an immunohistochemical study. **Fish and Shellfish Immunology**, London, v. 21, p. 467-471, 2006.

- VOGELBEIN, W. K.; FOURNIE, J. W.; OVERSTREET, R. M. Sequential development and morphology of experimentally induced hepatic melanomacrophage centres in *Rivulus marmoratus*. **Journal of Fish Biology**, Malden, v. 31, p. 145-153, 1987.
- WATTS, M; MUNDAY, B.L; BURKE, C.M. cDNA sequences and organization of IgM heavy chain genes in two holostean fish. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 19, p. 153-164, 2001.
- WEDEMEYER G, ROSS AJ, SMITH L. Some metabolic effects of bacterial endotoxin in salmonid fishes. **Journal of Fisheries Research Board of Canada**; 26:115 e 22. 1970.
- WEYTS, F.A.A.; COHEN, N.; FLINK, G.; VERBURG –Van KEMENADE, B.M.L. Interactions between the immune system and the hypothalamo-pituitary inter-renal axis in fish. **Fish Shell fish Immunol.** v.9, p.1-20, 1999.
- WOLKE, R. E.; MURCHELANO, R. A.; DICKSTEIN, C.; GEORGE, C. J. Preliminary evaluation of the use of macrophage aggregates (MA) as fish health monitors. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 35, p. 222–227, 1985.
- WOLKE, R. E. Piscine macrophage aggregates: a review. **Annual Review of Fish Diseases**, Oxford, v. 2, p. 91-108, 1992.
- WONGSATHEIN, D. **Factors affecting experimental *Streptococcus agalactiae* infection in tilapia, *Oreochromis niloticus***. Dissertation, Institute of Aquaculture, University of Stirling. 2012.
- YOUSEFIAN, M.; AMIRI, M. S. The review of the use of prebiotic in aquaculture for fish and shrimp Mehdi. Kouzestan, I.R. Iran. **African Journal of Biotechnology** v.8 (25), p.7313-7318, 29 ISSN 1684–5315. 2009.
- ZAPATA, A.G.; CHIBA, A.; VARAS, A. Cells and Tissues of the Immune System of Fish. In: IWAMA, G., NAKANISHI, T. The fish immune system. London: **Academic Press**, p.1-62. 1996.
- ZAMRI-SAAD M, AMAL MNA, SITI-ZAHRAH A. Pathological changes in red tilapias (*Oreochromis* spp.) naturally infected by *Streptococcus agalactiae*. **Journal of Comparative Pathology** 143:227-229. 2010.