



**CHARLES OSWALDO SÁNCHEZ RONCANCIO**

**AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA À ESTREPTOCOCOSE EM  
DIFERENTES VARIEDADES DE TILÁPIAS**

**LAVRAS-MG**

**2017**

**CHARLES OSWALDO SÁNCHEZ RONCANCIO**

**AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA À ESTREPTOCOCOSE EM DIFERENTES  
VARIEDADES DE TILÁPIAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Não Ruminantes, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Rilke Tadeu Fonseca de Freitas

Orientador

Profa. Dra. Sarah Laguna Conceição Meirelles

Prof. Dr. Carlos Manrique Perdomo

Profa. Dra. Gláucia Frasnelli Mian

Coorientadores

**LAVRAS-MG**

**2017**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Sánchez, Charles Oswaldo.

Avaliação da resistência à estreptococose em diferentes variedades de tilápias / Charles Oswaldo Sánchez. - 2017.

60 p. : il.

Orientador(a): Rilke Tadeu Fonseca de Freitas.

Coorientador(a): Sarah Laguna Meirelles, Carlos Manrique,  
Gláucia Frasnelli Mian

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Streptococcus agalactiae. 2. Oreochromis niloticus. 3. Seleção genética. I. De Freitas, Rilke Tadeu. II. Meirelles, Sarah Laguna. III. Manrique, Carlos. IV. Mian, Gláucia Frasnelli. V. Título.

**CHARLES OSWALDO SÁNCHEZ RONCANCIO**

**AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA À ESTREPTOCOCOSE EM DIFERENTES  
VARIEDADES DE TILÁPIAS**

**EVALUATION OF RESISTENCE TO STREPTOCOCCAL INFECTION IN  
DIFFERENT STRAINS OF TILAPIA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Não Ruminantes, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 20 de Janeiro de 2017

Dr. Gláucia Frasnelli Mian

UFLA/DMV

Dr. Mary Suzan Varaschin

UFLA/DMV

Dr. Rafael Vilhena Reis Neto

UNESP/Registro

Prof. Dr. Rilke Tadeu Fonseca de Freitas

Orientador

**LAVRAS-MG**

**2017**

*Aos meus pais, Cecilia e Sigifredo, pela confiança, por me apoiarem sempre e ao meu irmão*

*Jimmy.*

*A minha namorada Malú por acreditar em mim, companheira de sonhos e  
luta, pelo amor e apoio em todos os momentos.*

*Dedico*

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), especialmente ao Departamento de Zootecnia e ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia (PPGZ), pela oportunidade outorgada de realizar meus estudos de pós-graduação.

À Organização dos Estados Americanos (OEA), pela concessão da bolsa de estudos e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, FAPEMIG e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro do projeto.

Ao meu orientador, Prof. Rilke Tadeu Fonseca de Freitas pela orientação e confiança.

Às professoras Gláucia Frasnelli Mian, Mary Suzan Varaschin, pela grande disposição em contribuir com este projeto.

Aos meus amigos, Andrés, Bento, Gilmar, Henrique, Iván, Luís, Yony, Marco Aurelio, Sebastián, Raúl, por compartilhar sua amizade em Lavras; e na Colômbia Nicolás e Ricardo, obrigado pela torcida.

Ao grupo de melhoramento em peixes Aline, Acsa, Danielle e Henrique.

Às equipes dos Laboratórios de Bacteriologia e Patologia do Departamento de Medicina Veterinária.

Muito Obrigado!!!

*“Eu prefiro falar de coisas impossíveis, porque do possível se sabe muito.”*

*Silvio Rodríguez*

## RESUMO

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) sempre foi considerada mais resistente a doenças em comparação com outras espécies de peixes de cultivo, entretanto tem sido observadas nas últimas décadas que esta espécie de peixe também é susceptível a muitas doenças bacterianas, fúngicas, parasitárias e nutricionais. No Brasil, a estreptococose é uma das principais doenças que acomete às tilápias e que vem causando muitas perdas econômicas. Com objetivo avaliar a resistência à inoculação experimental com *Streptococcus agalactiae* em variedades de tilápia do Nilo, foi conduzido um ensaio de resistência com 180 tilápias de quatro variedades sendo três comerciais (VC1, VC2 e VC3, esta última red tilápia) e uma da UFLA. Cada variedade foi distribuída em cinco aquários, de forma que cada um contivesse nove exemplares de uma mesma variedade. Dos cinco aquários, quatro alojaram peixes inoculados intraperitonealmente com  $10^7$  CFU/peixe de *S. agalactiae* e um aquário alojou peixes que receberam 0,1 mL de BHI (Brain Heart Infusion) estéril, formando grupo controle. Um animal de cada aquário foi sacrificado às 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 360 h após a inoculação, foram retirados soro e tecidos para avaliações. A variedade UFLA apresentou menor sobrevivência que as demais variedades, que não diferiram entre si nos 15 dias de desafio. Foi realizado um delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial (4 variedades x 5 tempos) para os parâmetros de atividade de lisozima e antiprotease utilizando o teste de médias *Scott-Knott* e o teste de *Dunnnett* comparando animais inoculados e peixes não infectados a 5% de probabilidade. As variedades inoculadas apresentaram atividades de lisozima superiores aos peixes não infectados ( $p=0,001$ ), mas não diferiram entre si; em função do tempo pós-inoculação, houve diferença ( $p=0,001$ ) com aumento linear de 24 a 72 h. Até 24 h pós-inoculação a atividade de lisozima foi semelhante à dos peixes não infectados, após este tempo os peixes inoculados exibiram maior atividade de lisozima em relação aos não inoculados ( $p < 0,05$ ). Todas as variedades inoculadas apresentaram atividade antiprotease similar aos peixes não infectados ( $p=0,269$ ), no entanto, houve diferenças em função do tempo ( $p=0,042$ ), manifestadas nas primeiras 48 h. As lesões histopatológicas de brânquias, baço e fígado foram analisadas pelo teste *Qui-Quadrado*, encontrando diferenças entre UFLA e as variedades comerciais inoculadas no número de eventos apresentados durante o desafio, assim como a identificação das bactérias por imuno-histoquímica no baço não diferiu entre as variedades. Estes resultados demonstram que existem animais com uma melhor resposta ao teste de resistência que outros. Sendo a atividade de lisozima inversamente proporcional à taxa de sobrevivência. Entretanto, deve-se levar em conta que os peixes não resistentes ao patógeno não deveriam ser considerados indivíduos a serem descartados, pois estes podem possuir outros critérios de seleção genética. Porém, o entendimento das diferentes abordagens indiretas de seleção, pode viabilizar programas de seleção genética a ser utilizados em condições de cultivo ou exploração que estariam mais predispostas a surtos da doença.

**Palavras-chave:** *Streptococcus agalactiae*. *Oreochromis niloticus*. Sistema imune. Sobrevivência. Seleção genética.

## ABSTRACT

Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) has been always considered disease resistant compared to other fish species; however, it has been shown in recent decades that tilapia is also susceptible to many bacterial, parasitic, fungal and nutritional diseases. In Brazil, streptococcal infection is one of the major diseases that attacks fish causing many economic losses. Thus, this study aimed to evaluate resistance to experimental inoculation with *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia strains. A resistance test was performed within 180 fish of three commercial strains (VC1, VC2 and VC3, the latter red tilapia - RT) and UFLA strain. Each strain was distributed in five aquariums containing nine fish each, animals from four aquariums were inoculated intraperitoneally with  $10^7$  CFU of *S. agalactiae* per fish, and animals from the remaining aquariums received 0.1 mL of sterile BHI (Brain Heart infusion) as control group. One animal from each strain was sacrificed at 24 h, 48 h, 72 h, 96 h and 360 h after inoculation, to perform serum and tissue evaluations. Survival was, showing significant reduction between UFLA compared to other strains and these did not differ among themselves, through 15 days of challenge. A completely randomized design (CRD) was performed in a factorial scheme (4 strains x 5 times) for lysozyme and antiprotease activity, *Scott-Knott* and *Dunnett* tests were practiced to evaluate means and contrasts, respectively, between inoculated animals and non-infected fish at 5% probability. Infected strains showed higher lysozyme activity than non-infected ones ( $p = 0.001$ ), but did not differ among them. As a function of time after inoculation, there was linear increase ( $p = 0.001$ ) from 24 h to 72 h, and over 24 h after inoculation, lysozyme activity of inoculated groups was similar to non-infected fish. Subsequently, infected fish exhibited higher activities when compared to uninoculated ones ( $p < 0.05$ ). All infected strains showed similar anti-protease activity to non-infected fish ( $p = 0.269$ ), but there were differences as a function of the time between inoculated strains ( $p = 0.042$ ), within first 48 h. Histopathological lesions of gills, spleen and liver were analyzed by *Chi-square* test, finding differences in the number of events during the challenge between inoculated fish from UF and the other strains, but there were not meaningful differences within presence of the bacteria at spleen immunohistochemistry. These results demonstrate that exist animals with a better response to resistance challenges than others. Lysozyme activity is inversely proportional to the survival rate. However, fish that are not resistant to the pathogen should not be discarded, as these may exhibit other criteria of genetic selection. Nevertheless, understanding different approaches to indirect selection may allow genetic selection programs to be used in field conditions where they could be more prone to disease outbreaks.

**Keywords:** *Streptococcus agalactiae*. *Oreochromis niloticus*. Immune system. Survival. Genetic selection.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>13</b>
<b>2.1</b>	<b>Produção de tilápia no Brasil</b> .....	<b>13</b>
<b>2.1.1</b>	<b>Utilização de variedades geneticamente melhoradas</b> .....	<b>14</b>
<b>2.2</b>	<b>Estreptococose na piscicultura</b> .....	<b>15</b>
<b>2.3</b>	<b>Parâmetros imunológicos</b> .....	<b>17</b>
<b>2.4</b>	<b>Resposta imune humoral</b> .....	<b>19</b>
<b>2.5</b>	<b>Resistência a doenças</b> .....	<b>19</b>
<b>3</b>	<b>CONSIDERAÇÕES GERAIS</b> .....	<b>22</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>23</b>
	<b>SEGUNDA PARTE – ARTIGO</b> .....	<b>31</b>
	<b>ARTIGO 1: Avaliação da resistência à estreptococose em diferentes variedades de tilápias do Nilo, <i>Oreochromis niloticus</i> (L.)</b> .....	<b>31</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>32</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>35</b>
	<b>Instalações, animais e período pre-experimental</b> .....	<b>35</b>
	<b>Bactéria usada e infecção experimental</b> .....	<b>36</b>
	<b>Coleta de amostras e testes bacteriológicos</b> .....	<b>37</b>
	<b>Atividade da lisozima</b> .....	<b>37</b>
	<b>Atividade antiprotease</b> .....	<b>38</b>
	<b>Análise histopatológica</b> .....	<b>38</b>
	<b>Teste imuno-histoquímico</b> .....	<b>39</b>
	<b>Análises estatísticas</b> .....	<b>39</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>40</b>
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>42</b>
<b>5</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>48</b>
<b>6</b>	<b>TABELAS E FIGURAS</b> .....	<b>54</b>
<b>7</b>	<b>ANEXO</b> .....	<b>60</b>

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO

Apesar do grande potencial para produção de organismos aquáticos, os surtos de doenças infecciosas têm sido um dos fatores limitantes para a aquicultura de diversas espécies no Brasil. O estresse associado à intensificação no cultivo de tilápias tem sido um dos principais fatores que vem promovendo condições para uma maior ocorrência de doenças. Dentre estas doenças, a estreptococose, causada principalmente pela bactéria *Streptococcus agalactiae*, é uma das responsáveis por altas taxas de morbidade e mortalidade em cultivos de tilápia nas últimas décadas, sendo responsável por perdas econômicas significativas no setor.

No primeiro contato do patógeno com o hospedeiro são acionados mecanismos imunológicos inatos que as vezes são suficientes para prevenir ou conter as infecções, porém na maioria das vezes o patógeno poderá desencadear a doença no peixe ou, até mesmo, a sua morte. Uma melhor compreensão dos danos provocado no organismo e da eficiência dos mecanismos imunológicos acionados pelas infecções causadas por bactéria em peixes, certamente, contribuirá para elaboração de estratégias mais eficientes de prevenção e combate as doenças.

A suscetibilidade das tilápias às bacterioses depende da espécie ou variedade cultivada, das condições de qualidade da água, da carga orgânica na unidade de produção, do estado nutricional dos peixes, da temperatura da água e de outras condições ambientais. Para evitar as bacterioses, diferentes medidas de prevenção têm sido aplicadas, geralmente associadas às melhorias e manutenção das condições ideais de cultivo, pois qualquer desequilíbrio na densidade de estocagem, na qualidade da água, na nutrição ou nos manejos produtivo e sanitário dos peixes e das instalações, favorece a ocorrência de infecções por organismos patogênicos. As vacinas são vislumbradas como uma medida profilática, no entanto, na prática ela é de difícil aplicação e onerosa, uma vez que demanda muito trabalho e mão de obra para a despesca e vacinação individual dos peixes. Além disso, o manuseio e estresse advindos deste manejo podem debilitar e até mesmo causar a morte dos animais. Quando as medidas profiláticas não são devidamente tomadas ou falham, o tratamento com antibióticos tem sido a principal forma de conter e combater as infecções. É importante ressaltar que a utilização indiscriminada de antibióticos na aquicultura, ou em qualquer outro tipo de produção animal, é perigosa e condenável por possibilitar a contaminação do meio e do homem e resultar no surgimento e disseminação de resistências antimicrobianas.

A existência de indivíduos mais resistentes ou menos susceptíveis às doenças, dentro de populações infectadas, e a possibilidade de transmissão destas características aos seus descendentes, tem levado à seleção natural e o surgimento de variedades resistentes para algumas doenças. Além disso, os programas de melhoramento genético de tilápias têm incorporado a seleção de famílias ou indivíduos resistência a doenças aos seus objetivos. Assim, a utilização de peixes geneticamente resistente a doenças poderá ser a melhor e mais viável estratégia para reduzir a probabilidade de epidemias e, conseqüentemente, as altas taxas mortalidades e perdas econômicas causadas pelas doenças que acometem a aquicultura.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Produção de tilápia no Brasil

A produção aquícola mundial de espécies comestíveis aumentou em uma taxa anual de 6,2% no período 2000 a 2012, com 32,4 milhões e 66,6 milhões de toneladas respectivamente. No mesmo período os ritmos de crescimento da América Latina e do Caribe foram de 10%. Em 2014, a produção mundial de pesca e aquicultura foi de 167,2 milhões de toneladas, deste montante, o 47,14% foi proveniente da aquicultura continental, frente a 39,74% de 2010 (FAO, 2016).

Em 2014, a produção nacional foi estimada em 486 mil toneladas de peixes, que somadas as 90 mil toneladas de camarão reportadas pela ABCC (Associação Brasileira de Criadores de Camarão), 20 mil toneladas de mexilhões e aproximadamente quatro mil toneladas de outras espécies, alcançam uma produção aquícola de 600 mil toneladas de pescado (KUBITZA, 2015). O consumo *per capita* de pescado *in natura* no Brasil entre 2013 e 2015 foi de 9,6 kg/hab/ano, sendo menor que outros países como o Perú, Chile e a China(FAO, 2016).

A indústria brasileira de tilápia cresce vigorosamente, com posição de destaque entre os países americanos. Condições climáticas favoráveis e vastos reservatórios hídricos contribuem para a expansão significativa da produção nacional. Se 2% do potencial hídrico do país fosse utilizado para o cultivo de peixes em tanques-rede, o Brasil estaria entre os maiores produtores mundiais. O estabelecimento da cadeia produtiva da tilápia (*Oreochromis niloticus*) propicia o desenvolvimento de agroindústrias de processamento, geração de milhares de empregos, maior produção de alimentos, geração de renda e intercâmbio de tecnologias, incrementando o agronegócio nacional (VERA-CALDERÓN; FERREIRA, 2004).

Os principais fatores que limitam o crescimento da produção aquícola no Brasil e que desaceleram a produção da tilapicultura são: elevado custo de produção, dificuldade no licenciamento ambiental, mão de obra pouco qualificada, difícil acesso à tecnologia e ocorrência de doenças (KUBITZA, 2015). A limitação da produção causada pelo acometimento de doenças, possivelmente ocorre pela falta de conhecimento e acompanhamento técnico na identificação e caracterização dos patógenos, além de práticas de manejo sanitário inapropriadas.

### 2.1.1 Utilização de variedades geneticamente melhoradas

Algumas variedades de tilápia (*O. niloticus*) foram produzidas por processos de seleção genética e cruzamentos, destacando-se a variedade Chitralada, que foi desenvolvida no Japão e melhorada na Tailândia, caracterizada por apresentar bom desempenho e rápido crescimento quando comparadas as demais variedades (ZIMMERMAN, 2000). No Brasil, a variedade de tilápia vermelha, conhecida como Red-Stirling foi introduzida no início da década de 90, proveniente de Israel. O desempenho zootécnico dessa variedade é inferior quando comparado às demais variedades de tilápias cultivadas no Brasil (MOREIRA; MOREIRA; HILSDORF, 2005). Recentemente, experimentos, como os do Programa de melhoramento de tilápias vermelhas e nilóticas da Manit Farm na Tailândia, têm demonstrado uma correlação genética positiva e significativa entre a taxa de crescimento e sobrevivência, sendo o principal critério de seleção a resistência ao *Streptococcus* sp. (ZIMMERMANN et al., 2014). Também têm sido realizados estudos de variabilidade genética e de crescimento comparando outras variedades como Red Stirling, Chitralada e híbridos vermelhos (GARDUÑO-LUGO; MUÑOZ-CÓRDOVA; OLVERA-NOVOA, 2004; MOREIRA; MOREIRA; HILSDORF, 2005; ROMANA-EGUIA et al., 2010).

A variedade UFLA foi originada na Universidade Federal de Lavras a partir de 2000 alevinos de tilápia nilótica doados pela Faculdade de Agricultura e Ciências Veterinárias da UNESP, Câmpus Jaboticabal em 11 de Novembro de 1977. Programas de melhoramento genético, baseado em seleção massal e ganho de peso, foram realizados durante 25 anos, dentre suas características dá-se destaque à textura firme do filé (DIAS, 2014).

No caso das espécies produzidas no Brasil, existem poucos programas de seleção com base no mérito individual e familiar combinados, ininterruptos e de longa duração, citando alguns exemplos, A variedade GIFT-Genetically Improved Farmed Tilapia, que destaca-se por sua taxa de crescimento rápido, alto rendimento de filé e resistência a doenças, é originária das Filipinas e no Brasil o programa GIFT teve início em 2005 com importação de 600 exemplares de 30 famílias, por meio de um convênio entre a Universidade Estadual de Maringá, no estado de Paraná e o *World Fish Center*, na Malásia; e o programa de produção de tilápias híbridas *veggie-fish* da Universidade Federal de Pelotas, que realiza seleção de animais resistentes ao estresse de manejo (ZIMMERMANN et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2012). No entanto, os programas de melhoramento genético atuantes não são suficientes para atender as demandas do setor. São necessários novos programas de seleção que abordem a resistência às doenças como parâmetro de seleção.

## 2.2 Estreptococose na piscicultura

Protozoários, fungos e bactérias são os principais agentes etiológicos associados aos casos de mortalidade em pisciculturas no Brasil (FIGUEIREDO et al., 2005; MARTINS et al., 2004; MIAN et al., 2009). As principais espécies de bactérias patogênicas para tilápias são: *Aeromonas* sp., *Flavobacterium columnare*, *Edwardsiella tarda* e *Streptococcus* sp. (KUBITZA, 2008). O *Streptococcus agalactiae*, que leva à estreptococose, tornou-se um dos mais graves patógenos aquáticos nas últimas décadas, desempenhando um papel muito importante em todo o mundo e provocando grande impacto econômico na produção de tilápia (AL-HARBI, 2016; LI et al., 2014; LUSIASTUTI et al., 2014; PASNIK et al., 2005).

Estreptococose é um termo genérico utilizado para designar as diferentes doenças de etiologia bacteriana causadas por pelo menos seis diferentes espécies de cocos Gram-positivos, incluindo os gêneros *Streptococcus*, *Lactococcus* e *Vagococcus* (MAJI; MOHATY, 2016; MATA et al., 2004). Em peixes, esta doença foi primeiramente descrita em 1956 no Japão, em um surto de septicemia em uma fazenda comercial de truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (HOSHINA et al., 1958). A família do gênero *Streptococcus*, abrange uma ampla gama de espécies bacterianas associadas a processos etiológicos em seres humanos e animais, bem como, microrganismos saprofíticos ou não patogênicos (GLAZUNOVA; RAOULT; ROUX, 2009). Atualmente, 116 espécies e 22 subespécies bacterianas são descritas como pertencentes a este gênero (WHELY; HARDIE, 2015).

O gênero *Streptococcus* contém bactérias Gram-positivas esféricas, inferiores a 2µm de diâmetro que crescem tipicamente em pares e formam cadeias quando cultivadas em meio líquido (IREGUI et al., 2014). Em laboratório, cultiva-se em meio de cultura suplementado com hemácias de ovelha ou cavalo, sendo classificados de forma preliminar com base na produção de hemólise, como β-hemolítica, α-hemolítica (aprox. 1% dos casos) ou estirpes não hemolíticas (EDWARDS; NIZET; BAKER, 2011; IREGUI et al., 2014; KAYANSAMRUJ et al., 2014).

Seis espécies têm sido descritas como os principais agentes etiológicos causadores de septicemia e meningoencefalite em peixes: *Streptococcus iniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus parauberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus phocae* e *Streptococcus ictaluri* (HERNÁNDEZ; FIGUEROA; IREGUI, 2009; NETTO; LEAL; FIGUEIREDO, 2011). Dentre as principais espécies patogênicas em peixes no Brasil destacam-se *S. iniae* e *S. agalactiae* (FIGUEIREDO et al., 2012; MIAN et al., 2009).

*S. agalactiae* é o único membro do Grupo B de Lancefield, comumente chamado GBS, considerado uma das principais bactérias causadoras de doenças em seres humanos, bovinos, peixes e em vários outros hospedeiros como aves, camelos, cães, equinos, gatos, rãs, hamsters, camundongos e macacos ( AL-HARBI, 2016; AMAL et al., 2012; BARATO et al., 2015; ELLIOTT; FACKLAM; RICHTER, 1990; HETZEL et al., 2003; JOHRI; GRANDI; RAPPUOLI, 2009; LIU et al., 2014; VÁSQUEZ et al., 2017; YILDIRIM et al., 2002; YILDIRIM; LAMMLER; WEIB, 2002). Estreptococose causada por *S. agalactiae* é uma das principais doenças responsáveis por altas taxas de mortalidade que pode atingir 90% em muitas espécies aquícolas, sendo a tilápia a mais afetada resultando em grandes perdas econômicas anualmente para a indústria aquícola (EVANS et al., 2002; LI et al., 2015; MIAN et al., 2009). Há relatos deste agente patogénico nos EUA, Israel, Japão, Kuwait, Tailândia, Honduras, Costa Rica, Brasil e Colômbia (IREGUI et al., 2014).

O número de ocorrências desta doença durante a última década em sistemas de cultivos de tilápia aumentou como consequência da intensificação da produção (MIAN et al., 2009). Existem isolados de *S. agalactiae*, em tilápia, que sugerem a presença de dois Biotipos diferentes (1 e 2), sendo Biotipo 1, beta-hemolítico, e Biotipo 2, não beta- hemolítico, que diferem em suas características bioquímicas e fenotípicas (SHEEHAN , 2009). Na Ásia e na América Latina, foram isolados cerca de 500 casos de *Streptococcus* sp. em tilápias, 18% de *S. iniae* e 82% de *S. agalactiae* (26% Biotipo 1 e 56% Biotipo 2), sendo o Biotipo 2 o mais predominante em diferentes países de América Latina. No Brasil e na Colômbia, esta infecção bacteriana tem causado alta mortalidade nas tilapiculturas (ASENCIOS et al., 2016; IREGUI et al., 2014; MARCUSSO et al., 2015; SHEEHAN , 2009).

Em condições naturais, a interação peixe-patógeno pode não causar problemas; porém em sistemas de produção ocorrem sérios prejuízos, sendo a transmissão horizontal o mecanismo mais comum de propagação bacteriana (FU et al., 2014; IREGUI et al., 2014). Os principais de surtos acontecem devido ao aumento da temperatura da água (acima de 27°C), manejo intensivo, altas densidades de estocagem, altas concentrações de amônia e nitrito, e interação com indivíduos portadores (EVANS et al., 2002; MIAN et al., 2009; YANONG; FRANCIS-FLOYD, 2013). Ainda existem informações limitadas sobre os mecanismos utilizados por *S. agalactiae* para induzir, invadir e disseminar a doença em peixes (IREGUI et al., 2016).

Os sinais clínicos comuns de infecção por *S. agalactiae* em peixes são exoftalmia unilateral ou bilateral, natação errática, letargia e rigidez dorsal, depressão ou irritabilidade, anorexia, postura em forma de “C”, e culminando com a morte do animal; em casos

superagudos pode ser assintomática, sendo verificada apenas a ocorrência das mortalidades. Esta bactéria é responsável por causar lesões em diversos tecidos tais como narinas, rins, cérebro, intestinos e a região retrobulbar, levando aparecimento de pericardite fibrinosa, miocardite, endocardite e peritonite entre outros (CHEN; CHAO; BOWSER, 2007; ELDAR et al., 1995; EVANS et al., 2002; IREGUI et al., 2016; MIAN et al., 2009).

A histopatologia é uma ferramenta eficaz para a visualização de lesões em células e tecidos (IREGUI et al., 2014; MISHRA; DEVI, 2014). Porém, técnicas mais precisas como a imuno-histoquímica (IHQ) têm sido utilizadas para a identificação de bactérias, como o *Streptococcus* sp. em tecidos de Truta arco íris, tilápia do Nilo e Mero (DELAMARE-DEBOUTTEVILLE et al., 2015; HERNÁNDEZ; FIGUEROA; IREGUI, 2009). Esta se baseia na utilização de anticorpos policlonais anti-*S. agalactiae*, produzidos em coelhos, onde o princípio da reação é a ligação entre o antígeno específico e o anticorpo (HERNÁNDEZ; FIGUEROA; IREGUI, 2009; IREGUI et al., 2014).

Atualmente, a principal medida terapêutica empregada em caso de surtos de estreptococose é o uso de antibióticos, que podem representar potenciais riscos para o meio ambiente (FAGUNDES et al., 2016; HEUER et al., 2009). E quando usados de forma excessiva, podem levar ao aparecimento de bactérias resistentes a antimicrobianos (SAPKOTA et al., 2008), sendo difícil achar fármacos capazes de controlar infecções causadas por *S. agalactiae* em tilápias (LI et al., 2015). Ainda não existem vacinas comerciais de alta eficiência disponíveis que possam ser utilizadas para prevenir as doenças infecciosas na tilápia (ZHAO et al., 2015). As vacinas e o uso de antibióticos são medidas que representam altos custos na produção. Portanto, os métodos de controle alternativos, como a seleção genética de peixes resistentes à doenças, se fazem necessários.

### **2.3 Parâmetros imunológicos**

O sistema imune dos peixes teleósteos apresenta dois componentes primários: inato (não específico) e adaptativo (específico) contra organismos invasores. Quando um agente patogênico ingressa ocorre a atuação do sistema imune não específico como primeira linha de defesa, que inclui as barreiras físicas, como as escamas, brânquias e mucosas superficiais da pele. Quando o patógeno ultrapassa essas barreiras uma resposta inflamatória inespecífica é iniciada a fim de resolver a infecção, que se caracteriza por aumento de células fagocíticas encarregadas de matar os organismos invasores (MAGNADÓTTIR, 2006; MAGNADOTTIR et al., 2005; SARDER et al., 2001; URIBE et al., 2011). Com o aumento do número de

macrófagos e neutrófilos ocorre o ataque a estes patógenos, pela ação da enzima lisozima, ativação do sistema complemento e compostos antiproteases (MACHADO et al., 2015), onde sua ação pode inibir o crescimento de microrganismos infecciosos (PENAGOS; BARATO; IREGUI, 2008) e podem ser usados como potenciais marcadores imunológicos (RØED et al., 1993; RØED; FEVOLDEN; FJALESTAD, 2002; SAHOO et al., 2008, 2011; SARDER et al., 2001).

As enzimas líticas, como a lisozima, hidrolases e outras enzimas bacteriolíticas hemolíticas são encontradas em células inflamatórias e nos fluidos corporais dos peixes. Estas podem atuar isoladamente ou em cascata, sendo importantes elementos de defesa, especialmente contra bactérias. No caso da lisozima, sua ação se dá principalmente, contra as bactérias Gram-positivas (MAGNADÓTTIR, 2006). Além de uma função antibacteriana, a lisozima promove a fagocitose por ativação direta de leucócitos polimorfonucleares e macrófagos ou indiretamente por um efeito de opsoninas; ela está presente no muco, tecido linfóide, soro e outros fluidos corporais em peixes de água doce e marinhos. Atividade da lisozima é variável de acordo com o sexo, idade, temperatura da água, estresse e infecções, sua mensuração pode ser um indicativo da condição imunológica e resistência às doenças (SAURABH; SAHOO, 2008).

As antiproteases, principalmente os inibidores da protease  $\alpha$ -1 e a macroglobulina  $\alpha$ -2, desempenham um papel vital na inibição da ação das proteases do agente bacteriano, que por ligação aos seus locais ativos ou por "captura" da protease, evita a hidrólise das proteínas e a invasão e crescimento da bactéria (AWAD; CEREZUELA; ANGELES, 2015; CHRISTYBAPITA; DIVYAGNANESWARI; DINAKARAN, 2007; GOBI et al., 2016; WU et al., 2013).

A transmissão genética da resistência inata a várias doenças bacterianas tem sido documentada em salmonídeos, carpas, trutas e tilápias do Nilo, correlacionada com parâmetros imunológicos não específicos, como são lisozima sérica, atividade hemolítica, explosão respiratória e atividades bactericidas; todos provavelmente afetam a capacidade inerente de peixes para resistirem a patógenos antes de uma resposta imune específica, sendo usados como traços indiretos para identificar os peixes mais resistentes (SAHOO et al., 2008). Além das interações entre os sistemas imunes inatos e adaptativos, também é possível que os genes de resistência e de tolerância estejam associados com a resposta imune (GLASS, 2012). Os fatores genéticos, assim como os ambientais (temperatura e estresse) desempenham um papel importante no sistema imunológico dos peixes, podendo ser utilizados para a avaliação de resistência a doenças na aquicultura (VAN MUISWINKEL; NAKAO, 2014).

## 2.4 Resposta imune humoral

Os principais órgãos linfoides de peixes teleósteos são o rim anterior, o timo e o baço (ZAPATA et al., 2006). Os peixes apresentam a imunoglobulina M (IgM) como o principal anticorpo da resposta imune humoral (MELO et al., 2009). A IgM é produzida pelos linfócitos B e nos peixes existe sob duas formas alternadas, uma como receptor de membrana para antígenos de superfície de células B e outra como proteína solúvel secretada como componentes de fluidos corporais (LITMAN; ANDERSON; RAST, 1999). A IHQ tem sido usada para detectar a expressão de IgM em linfócitos de peixes infectados por *Streptococcus* sp. objetivando conhecer a resposta imunológica a este agente patogênico (MARCUSO, 2015; YUNIS-AGUINAGA et al., 2015).

## 2.5 Resistência a doenças

A resistência a doenças pode ser definida como a capacidade do hospedeiro de reduzir a replicação do patógeno, limitar a infecção ou moderar o ciclo de vida do mesmo (BISHOP; MACKENZIE, 2003; DOESCHL-WILSON; KYRIAZAKIS, 2012). A seleção de animais com maior resistência a doenças específicas é um método viável para melhorar a produtividade, o bem-estar animal e oferece vantagens sobre outros métodos de controle das infecções (STEAR et al., 2001; YÁÑEZ; HOUSTON; NEWMAN, 2014).

Diferentes variáveis devem ser consideradas na seleção de variedades de tilápia melhorada, como as taxas de crescimento, peso, sobrevivência, resistência a doenças, tolerância à água fria, maturação sexual, qualidade do produto e eficiência alimentar. Vários programas de melhoramento genético tiveram sucesso nas espécies de animais aquáticos cultivados que foram desenvolvidos ao longo das últimas quatro décadas para obtenção de ganhos genéticos entre 10% e 20% por geração, em características economicamente importantes (PONZONI et al., 2013). Devido à crescente importância da produção de tilápias na piscicultura global, a intensidade e diversidade de esforços para melhorar a base genética desta espécie têm se intensificado ao longo das últimas décadas (ANSAH; FRIMPONG; HALLERMAN, 2014).

De acordo com Ponzoni; Nguyen e Khaw (2007) o melhoramento genético é um dos meios mais eficazes para aumentar a eficiência da aquicultura, apresentando uma série de vantagens como o ganho genético contínuo e a possibilidade de ser transmitido de uma geração para outra. A importância dos programas está focada em aumentar a rentabilidade dos

sistemas da aquicultura através da seleção (GJEDREM, 2012). Um dos programas de melhoramento genético de tilápias mais conhecidos é o programa GIFT, desenvolvido inicialmente na Malásia com a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e gerido pelo *World Fish Center* onde até o ano de 2014 passou por 12 gerações de seleção para a taxa de crescimento. Este programa se baseou no uso de melhoramento por seleção de uma população base sintética altamente diversificada (KHAW et al., 2015). A população base de 10 dos 20 programas de melhoramento genético de tilápias é conhecida por ser derivada da variedade GIFT (GJEDREM, 2012; NEIRA, 2009; RYE; GJERDE; GJEDREM, 2009).

No entanto, a seleção de peixes resistentes a doenças pode ser um procedimento difícil de ser aplicado, pois testar o desempenho de resistência nos indivíduos contra patógenos requer a infecção experimental e posterior abate dos animais (SHEN et al., 2015). Até agora os programas de melhoramento genético abordam a resistência a doenças somente com base na informação dos parentais, o que afeta o grau de progresso genético possível em cada geração (YÁÑEZ; MARTÍNEZ, 2010). Através da seleção de animais resistentes a doenças, aqueles genes serão herdados pela descendência, ou seja, passados para a seguinte geração. A maioria das características de seleção de importância econômica é registrada em indivíduos vivos, desta forma, a seleção individual de animais vivos não pode ser incluída para resistência a doenças, porém, as informações da família são essenciais (GJERDREM; BARANSKI, 2009). Pode-se utilizar a informação presente nos candidatos à seleção ou nos parentes próximos, especialmente no caso de doenças ou características invasivas (YÁÑEZ; HOUSTON; NEWMAN, 2014). Em peixes genes relacionados com a imunidade não específica tem sido caracterizados (BAYNE et al., 2001; SAHOO et al., 2011). Muito estudados, pois favorecem a maior compreensão da evolução do sistema imune dos peixes (ZHU et al., 2013).

A variação genética para a resistência a doenças existe para vários patógenos específicos em diferentes espécies de peixes (YÁÑEZ; NEWMAN; HOUSTON, 2015; SALAZAR et al., 2016). É possível que os genes de resistência e tolerância estejam associados com os principais fatores da resposta imunológica (GLASS, 2012). Vários estudos em diferentes espécies aquícolas demonstraram que a resistência a doenças tem moderada herdabilidade ( $h^2$ ) em condições de desafio ao patógeno viral ou bacteriano, variando entre  $h^2$  0,00 a 0,60 (ØDEGÁRD et al., 2011). Recentemente, a variação genética aditiva para resistência a *Streptococcus* sp. em tilápias cultivadas foi determinada com  $h^2$  de  $0,42 \pm 0,07$  para *S. iniae*, e  $0,58 \pm 0,09$  (LAFRENTZ et al., 2016) ou  $0,38 \pm 0,11$  para *S. agalactiae* (SHOEMAKER et al., 2016).

No caso de atividade da lisozima, as tilápias do Nilo podem apresentar uma herdabilidade entre (0,3 a 0,7). A alta herdabilidade da atividade de lisozima sérica e a associação genética negativa significativa entre esta característica e a taxa de sobrevivência sugerem que a atividade da lisozima sérica seja uma característica promissória como seleção indireta para melhorar a taxa de sobrevivência em peixes desafiados contra patógenos. De acordo com a associação negativa entre o traço e a taxa de sobrevivência, os reprodutores devem ser selecionados entre indivíduos e famílias com baixa atividade de lisozima sérica (CHIAYVAREESAJJA et al., 1999; GJEDREM; RYE, 2016; SAURABH; SAHOO, 2008). A seleção da resistência à doença com base na variação da atividade de lisozima do soro pode ser complicada, pelo fato que é altamente influenciada pelo estado imunitário dos peixes (SAURABH; SAHOO, 2008; RØED; FEVOLDEN; FJALESTAD, 2002).

A sobrevivência é uma característica que tende a ter uma baixa herdabilidade, ficando entre 0,00 a 0,17 (GJERDE et al., 2004; RYE; LILLEVIK; GJERDE, 1990). Assim, além da taxa de sobrevivência, devem-se considerar diferentes variáveis para a escolha de indivíduos. A metodologia Kaplan-Meier permite analisar a resposta de sobrevivência, definida como a probabilidade de um indivíduo sobreviver num dado período de tempo, considerando simultaneamente pequenos intervalos de tempo. Sendo a variável dependente o tempo e, aqueles indivíduos que não desenvolveram a doenças denominados censurados (GOEL; KHANNA; KISHORE, 2010)

Os ensaios experimentais encontrados na literatura diferem quanto às vias de infecção, ou seja, co-habitação, imersão, injeções intraperitoneais e intramusculares (EVANS et al., 2002; HERNÁNDEZ; FIGUEROA; IREGUI, 2009). A resistência a doenças pode ser analisada de diferentes formas, entre elas a **Taxa de sobrevivência**, que é uma característica complexa, influenciada por vários agentes patogênicos, pode não diferir entre os patógenos e, também, depende de muitos fatores; o **Teste de desafio** que consiste em expor o peixe a agentes de doenças específicas, realizado em instalações fechadas, sem risco de infectar o plantel num curto período de tempo; e por meio de **Parâmetros imunológicos ou fisiológicos**, que podem ser obtidos de informações dos parentes e não dos próprios candidatos, realizando-se a seleção indireta baseada na medição de outras características que são geneticamente correlacionadas. Alguns estudos tiveram por objetivos determinar a variação genética, as variáveis fisiológicas e imunológicas e a correlação entre elas, além da sobrevivência em testes de desafio (FJALESTAD; GJEDREM; GJERDE, 1993; YÁÑEZ; HOUSTON; NEWMAN, 2014).

### **3 CONSIDERAÇÕES GERAIS**

O Brasil apresenta vantagens para o desenvolvimento da aquicultura, destacando-se há alguns anos a piscicultura entre as atividades agropecuárias mais crescentes no país e a tilápia do Nilo como o peixe mais cultivado e procurado pelos consumidores. Porém, com a intensificação da produção observamos um aumento nos problemas de manejo culminando em surtos de doenças nos plantéis, ocasionando grandes prejuízos econômicos para os produtores. Uma alternativa viável é usar a seleção de animais resistentes a doenças importantes na piscicultura brasileira com o intuito de reduzir os prejuízos decorrentes, impactos ambientais e assim aumentar a produção.

Desta forma, este trabalho pode contribuir para o crescimento da piscicultura no Brasil e no estado de Minas Gerais. Mais pesquisas, neste âmbito, devem ser realizadas, uma vez que, existem poucos estudos sobre o desenvolvimento de variedades geneticamente resistentes às infecções bacterianas.

## REFERÊNCIAS

- AL-HARBI, A. H. Phenotypic and genotypic characterization of *Streptococcus agalactiae* isolated from hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*). **Aquaculture**, v. 464, p. 515–520, 2016.
- AMAL, et al. An outbreak of *Streptococcus agalactiae* infection in cage-cultured golden pompano, *Trachinotus blochii* (Lacépede), in Malaysia. **Journal of Fish Diseases**, v. 35, p849–852, 2012.
- ANSAH, Y.; FRIMPONG, E.; HALLERMAN, E. Genetically-Improved Tilapia Strains in Africa: Potential Benefits and Negative Impacts. **Sustainability**, v. 6, n. 6, p. 3697–3721, 2014.
- ASENCIOS, Y. O. et al. First report of *Streptococcus agalactiae* isolated from *Oreochromis niloticus* in Piura, Peru: Molecular identification and histopathological lesions. **Aquaculture Reports**, v. 4, p.74-79, 2016.
- AWAD, E.; CERZUELA, R.; ANGELES ESTEBAN, M. Effects of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) immune status and growth performance. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 45, p. 454–464, 2015.
- BARATO, P.; MARTINS E. R.; MELO-CRISTINO J.; IREGUI C. A.; RAMIREZ M. Persistence of a single clone of *Streptococcus agalactiae* causing disease in tilapia (*Oreochromis* sp.) cultured in Colombia over 8 years. **Journal of Fish Diseases**, p. 1–5, 2015.
- BAYNE, C. J. et al. Immune-relevant (including acute phase) genes identified in the livers of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by means of suppression subtractive hybridization. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 25, n. 3, p. 205–217, 2001.
- BISHOP, S. C.; MACKENZIE, K. M. Genetic management strategies for controlling infectious diseases in livestock populations. **Genetics selection evolution : GSE**, v. 35 Suppl 1, p. S3–S17, 2003.
- CHEN, C. Y.; CHAO, C. B.; BOWSER, R. R. Comparative histopathology of *streptococcus iniae* and *streptococcus agalactiae*-infected tilapia. **Bulletin of the European Association of Fish Pathologists**, v. 27, n. 1, p. 2–9, 2007.
- CHIAYVAREESAJJA, J. et al. Genetic variation in lytic activities of blood serum from Nile tilapia and genetic associations with survival and body weight. **Aquaculture**, v. 175, n. 1–2, p. 49–62, 1999.
- CHRISTYBAPITA, D.; DIVYAGNANESWARI, M.; DINAKARAN MICHAEL, R. Oral administration of *Eclipta alba* leaf aqueous extract enhances the non-specific immune responses and disease resistance of *Oreochromis mossambicus*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 23, n. 4, p. 840–852, 2007.

DELAMARE-DEBOUTTEVILLE, J. et al. Infection and pathology in Queensland grouper, *Epinephelus lanceolatus*, (Bloch), caused by exposure to *Streptococcus agalactiae* via different routes. **Journal of Fish Diseases**, v. 38, n. 12, p. 1021–1035, 2015.

DIAS, M. A. D. **Caracterização genética do gene do hormônio do crescimento em variedades de tilápia utilizando marcadores microssatélite**. 2014. 137 f. Tese (Doutorado em Zootecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, 2014.

DOESCHL-WILSON, A. B.; KYRIAZAKIS. Should we aim for genetic improvement in host resistance or tolerance to infectious pathogens? **Frontiers in Genetics**, v. 3, n. DEC, p. 1–2, 2012.

EDWARDS, M. S.; NIZET, V.; BAKER, C. J. Group B Streptococcal Infections. **Infectious Diseases of the Fetus and Newborn**, n. 12, p. 419–469, 2011.

ELDAR, A. et al. Experimental streptococcal meningo-encephalitis in cultured fish. **Veterinary microbiology**, v. 43, n. 1, p. 33–40, 1995.

ELLIOTT, J. A.; FACKLAM, R. R.; RICHTER, C. B. Whole-cell protein patterns of nonhemolytic Group B, Type Ib, Streptococci isolated from humans, mice, cattle, frogs, and fish. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 628–630, 1990.

ELLIS, A. E. Serum antiprotease in fish: **Techniques in Fish Immunology**, v. 1, p. 95–99, 1990.

EVANS, J. J. et al. Characterization of ??-haemolytic Group B *Streptococcus agalactiae* in cultured seabream, *Sparus auratus* L., and wild mullet, *Liza klunzingeri* (Day), in Kuwait. **Journal of Fish Diseases**, v. 25, n. 9, p. 505–513, 2002.

FAGUNDES L. C. et al. Transferência passiva de soro hiperimune anti-*Streptococcus agalactiae* e seu efeito profilático em tilápias-do-nylo infectadas experimentalmente: sobrevivência e títulos de anticorpos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n.2, p. 379-386, 2016.

FAO. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. **Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura**, p. 224, 2016.

FIGUEIREDO, H. C. P. et al. Isolation and characterization of strains of *Flavobacterium columnare* from Brazil. **Journal of Fish Diseases**, v. 28, n. 4, p. 199–204, abr. 2005.

FIGUEIREDO, H. C. P. et al. *Streptococcus iniae* outbreaks in Brazilian Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) farms. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 576–580, 2012.

FJALESTAD, K. T.; GJEDREM, T.; GJERDE, B. Genetic improvement of disease resistance in fish: an overview. **Aquaculture**, v. 111, n. 1–4, p. 65–74, 1993.

FU, G. H. et al. The MCP-8 gene and its possible association with resistance to *Streptococcus agalactiae* in tilapia. **Fish & shellfish immunology**, v. 40, n. 1, p. 331–6, 2014.

GARDUÑO-LUGO, M.; MUÑOZ-CÓRDOVA, G.; OLVERA-NOVOA, M. Á. Mass selection for red colour in *Oreochromis niloticus* (Linnaeus 1758). **Aquaculture Research**, v. 35, n. 4, p. 340–344, 2004.

GJERDE, B. et al. Genetic variation for juvenile growth and survival in Atlantic cod (*Gadus morhua*). **Aquaculture**, v. 236, p. 167–177, 2004.

GJEDREM, T. Genetic improvement for the development of efficient global aquaculture: A personal opinion review. **Aquaculture**, v. 344–349, n. 44, p. 12–22, 2012.

GJEDREM, T.; RYE, M. Selection response in fish and shellfish: a review. **Reviews in Aquaculture**, v. 0, p. 1–12, 2016.

GJERDREM, T.; BARANSKI, M. **Selective Breeding in Aquaculture: An introduction**. Springer ed. New York, 2009. 221 p.

GLASS, E. J. The molecular pathways underlying host resistance and tolerance to pathogens. **Frontiers in genetics**, v. 3, n. December, p. 1–12, 2012.

GLAZUNOVA, O. O.; RAOULT, D.; ROUX, V. Partial sequence comparison of the *rpoB*, *sodA*, *groEL* and *gyrB* genes within the genus *Streptococcus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, n. 9, p. 2317–2322, 2009.

GOBI, N. et al. *Oreochromis mossambicus* diet supplementation with *Psidium guajava* leaf extracts enhance growth, immune, antioxidant response and resistance to *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 58, p. 572–583, 2016.

GOEL, M. K.; KHANNA, P.; KISHORE, J. Understanding survival analysis: Kaplan-Meier estimate. **International Journal of Ayurveda Research**, v. 1, n. 4, p. 274–278, 2010.

HERNÁNDEZ, E.; FIGUEROA, J.; IREGUI, C. Streptococcosis on a red tilapia, *Oreochromis* sp., farm: A case study. **Journal of Fish Diseases**, v. 32, p. 247–252, 2009.

HETZEL, U. et al. Septicaemia in emerald monitors (*Varanus prasinus* Schlegel 1839) caused by *Streptococcus agalactiae* acquired from mice. **Veterinary Microbiology**, v. 95, n. 4, p. 283–293, 2003.

HEUER, O. E. et al. Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 8, p. 1248–1253, 2009.

HOSHINA, T.; SANO, T.; MORIMOTO, Y. A *Streptococcus* pathogenic to fish. **Journal of Tokyo University of Fisheries**, v. 44, p. 57–68, 1958.

IREGUI, C. et al. Epidemiology of *Streptococcus agalactiae* and Streptococcosis in Tilapia Fish. **Concept Press Ltd**, p. 18, 2014.

IREGUI, C. A. et al. Experimental early pathogenesis of *Streptococcus agalactiae* infection in red tilapia *Oreochromis* spp. **Journal of Fish Diseases**, v. 39, n. 2, p. 205–215, 2016.

- JOHRI, A.; GRANDI, G.; RAPPUOLI, R. Group B *Streptococcus*: global incidence and vaccine development. **Nat Rev microbiol**, v. 4, n. 12, p. 932–942, 2009.
- KAYANSAMRUAJ, P. et al. Increasing of temperature induces pathogenicity of *Streptococcus agalactiae* and the up-regulation of inflammatory related genes in infected Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Veterinary Microbiology**, v. 172, n. 1–2, p. 265–271, 2014.
- KHAW, H. L. et al. Genetic and non-genetic indirect effects for harvest weight in the GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Proceedings of 10th World Congress of Genetics Applied to Livestock Production**, v. 450, p. 154–161, 2015.
- KUBITZA, F. Tilápias na mira dos patógenos. **Panorama da Aquicultura**, v. 18, n. 107, p. 28–37, 2008.
- KUBITZA, F. Aquicultura no Brasil. **Panorama da Aquicultura**, v. 25, n. 150, p. 10–23, 2015.
- LAFRENTZ, B. R. et al. Controlled challenge experiment demonstrates substantial additive genetic variation in resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to *Streptococcus iniae*. **Aquaculture**, v. 458, p. 134–139, 2016.
- LI, L. P. et al. Development of live attenuated *Streptococcus agalactiae* vaccine for tilapia via continuous passage in vitro. **Fish & shellfish immunology**, v. 45, n. 2, p. 955–63, 2015.
- LITMAN, G. W.; ANDERSON, M. K.; RAST, J. P. Evolution of Antigen Binding Receptors. **Annual Review of Immunology**, v. 17, n. 1, p. 109–147, 1999.
- LIU, L. et al. Outbreak of *Streptococcus agalactiae* infection in barcoo grunter, *Scortum barcoo* (McCulloch & Waite), in an intensive fish farm in China. **Journal of Fish Diseases**, v. 37, p. 1067–1072, 2014.
- LUSIASTUTI, A. M. et al. The occurrence of *Streptococcus agalactiae* sequence type 261 from fish disease outbreaks of tilapia *Oreochromis niloticus* in Indonesia. **Aquaculture Research**, v. 45, p. 1260–1263, 2014.
- MACHADO, M. et al. Dietary tryptophan and methionine as modulators of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) immune status and inflammatory response. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 42, n. 2, p. 353–362, 2015.
- MAGNADOTTIR, B. et al. Ontogeny of humoral immune parameters in fish. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 19, n. 5, p. 429–439, 2005.
- MAGNADÓTTIR, B. Innate immunity of fish (overview). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 20, n. 2, p. 137–151, 2006.
- MARCUSSO, P. F. **Imunohistoquímica em órgãos de tilápias-do-nilo imunizadas com antígeno insolúvel de *Streptococcus agalactiae***. 2015. Tese (Doutorado em medicina Veterinária)-Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São paulo 2015.

- MARCUSSO, P. et al. Isolamento de *Streptococcus agalactiae* em diferentes órgãos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) criadas em tanques-rede. **Bioscience Journal**, v. 31, p. 549-554, 2015.
- MARTINS, M. L. et al. Haematological alterations of *Leporinus macrocephalus* (Osteichthyes: Anostomidae) naturally infected by *Goezia leporini* (Nematoda: Anisakidae) in fish pond. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, p. 640–646, 2004.
- MATA, A. I. et al. Multiplex PCR Assay for Detection of Bacterial Pathogens Associated with Warm-Water Streptococcosis in Fish. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 5, p. 3183–3187, 2004.
- MELO, D.C. et al. Perfil proteico de tilápia nilótica chitralada (*Oreochromis niloticus*), submetida ao estresse crônico por hipóxia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 5, p. 1183–1190, 2009.
- MIAN, G. F. et al. Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia. **Veterinary Microbiology**, v. 136, n. 1–2, p. 180–183, 2009.
- MISHRA, A.; DEVI, Y. Histopathological alterations in the brain (optic tectum) of the fresh water teleost *Channa punctatus* in response to acute and subchronic exposure to the pesticide Chlorpyrifos. **Acta Histochemica**, v. 116, n. 1, p. 176–181, 2014.
- MOREIRA, A. A.; MARQUES MOREIRA, H. L.; SILVA HILSDORF, A. W. Comparative growth performance of two Nile tilapia (Chitralada and Red-Stirling), their crosses and the Israeli tetra hybrid ND-56. **Aquaculture Research**, v. 36, n. 11, p. 1049–1055, 2005.
- NEIRA, R. Breeding in Aquaculture Species : Genetic Improvement Programs in Developing Countries. **9th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production**, p. 8, 2009.
- NETTO, L. N.; LEAL, C. A. G.; FIGUEIREDO, H. C. P. *Streptococcus dysgalactiae* as an agent of septicaemia in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). **Journal of fish diseases**, v. 34, n. 3, p. 251–4, 2011.
- OLIVEIRA, C.A.L. et al. melhoramento genético de peixes: uma realidade para a piscicultura brasileira. **Revista Panorama da Aquicultura**, v.22, p. 38-47, 2012.
- ØDEGÁRD, J. et al. Methodology for genetic evaluation of disease resistance in aquaculture species: Challenges and future prospects. **Aquaculture Research**, v. 42, n. SUPPL. 1, p. 103–114, 2011.
- PASNIK, D. J. et al. Antigenicity of *Streptococcus agalactiae* extracellular products and vaccine efficacy. **Journal of fish diseases**, v. 28, n. 4, p. 205–12, 2005.
- PENAGOS, G.; BARATO, P.; IREGUI, C. Sistema inmune y vacunación de peces immune system and vaccination in fish. **Acta biol. Colomb**, v. 13, n. 3, p. 3–26, 2008.
- PONZONI, R. W. et al. Strain comparisons in aquaculture species: a manual. **Worldfish**, p. 1–13, 2013.

- PONZONI, R. W.; NGUYEN, N. H.; KHAW, H. L. Investment appraisal of genetic improvement programs in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 269, p. 187–199, 2007.
- RØED, K. H. et al. Genetic variation in lysozyme activity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 109, n. 3–4, p. 237–244, 1993.
- RØED, K. H.; FEVOLDEN, S. E.; FJALESTAD, K. T. Disease resistance and immune characteristics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selected for lysozyme activity. **Aquaculture**, v. 209, p. 91–101, 2002.
- ROMANA-EGUIA, M. R. R. et al. Growth comparison of Asian Nile and red tilapia strains in controlled and uncontrolled farm conditions. **Aquaculture International**, v. 18, n. 6, p. 1205–1221, 2010.
- RYE, M.; GJERDE, B.; GJEDREM, T. Genetic Improvement Programs For Aquaculture Species In Developed Countries. **Proc. Assoc. Advmt. Breed. Genet.**, p. 8, 2009.
- RYE, M.; LILLEVIK, K. M.; GJERDE, B. Survival in early life of Atlantic salmon and rainbow trout: estimates of heritabilities and genetic correlations. **Aquaculture**, v. 89, n. 3–4, p. 209–216, 1990.
- SAHOO, P. K. et al. Family association between immune parameters and resistance to *Aeromonas hydrophila* infection in the Indian major carp, *Labeo rohita*. **Fish & shellfish immunology**, v. 25, n. 1–2, p. 163–9, 2008.
- SAHOO, P. K. et al. Selection for improved resistance to *Aeromonas hydrophila* in Indian major carp *Labeo rohita*: survival and innate immune responses in first generation of resistant and susceptible lines. **Fish & shellfish immunology**, v. 31, n. 3, p. 432–8, 2011.
- SALAZAR, S. et al. Comparative analysis of innate immune responses to *Streptococcus phocae* strains in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 51, p. 97–103, 2016.
- SAPKOTA, A. et al. Aquaculture practices and potential human health risks: Current knowledge and future priorities. **Environment International**, v. 34, n. 8, p. 1215–1226, 2008.
- SARDER, M. R. I. et al. Immune responses of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) clones: I. Non-specific responses. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 25, n. 1, p. 37–46, 2001.
- SAURABH, S.; SAHOO, P. K. Lysozyme: An important defence molecule of fish innate immune system. **Aquaculture Research**, v. 39, n. 3, p. 223–239, 2008.
- SHEEHAN, B. et al. Streptococcosis in Tilapia; Vaccination Effective Against Main Strep Species. **Global Aquaculture Advocate**, p. 72–74, 2009.

- SHEN, Y. et al. Fish & Shellfish Immunology Characterization of the duodenase-1 gene and its associations with resistance to *Streptococcus agalactiae* in hybrid tilapia (*Oreochromis* spp.). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 45, p. 717–724, 2015.
- SHOEMAKER, C. A. et al. Additive genetic variation in resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to *Streptococcus iniae* and *Streptococcus agalactiae* capsular type Ib: Is genetic resistance correlated? **Aquaculture**, v. 468, p. 193–198, 2016.
- STEAR, M. J. et al. The sustainability, feasibility and desirability of breeding livestock for disease resistance. **Research in veterinary science**, v. 71, n. 1, p. 1–7, 2001.
- URIBE, C. et al. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. **Veterinarni Medicina**, v. 56, n. 10, p. 486–503, 2011.
- VAN MUISWINKEL, W. B.; NAKAO, M. A short history of research on immunity to infectious diseases in fish. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 43, n. 2, p. 130–150, 2014.
- VASQUÉZ, G. et al. Amperometric biosensor based on a single antibody of dual function for rapid detection of *Streptococcus agalactiae*. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 87 p.453-458, 2017.
- VERA-CALDERÓN, L. E.; FERREIRA, A. C. M. Estudo da economia de escala na piscicultura em tanque-rede no estado de São Paulo. **Informações Econômicas**, v. 34, n. 1, p. 1–11, 2004.
- WHILEY, R. A.; HARDIE J.M. Streptococcus. **Bergey's Manual of systematics of Archaea and Bacteria**. 2015Disponível em : <<http://www.bacterio.net/streptococcus.html>>. Acesso em :03 de Jan. 2017.
- WU, Y. RUI et al. Effect of *Sophora flavescens* on non-specific immune response of tilapia (GIFT *Oreochromis niloticus*) and disease resistance against *Streptococcus agalactiae*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 34, n. 1, p. 220–227, 2013.
- YANONG, R. P. E.; FRANCIS-FLOYD, R. Streptococcal Infections of Fish. **University of Florida**, p. 1–5, 2013.
- YÁÑEZ, J. M.; HOUSTON, R. D.; NEWMAN, S. Genomics in aquaculture to better understand species biology and accelerate genetic progress. **Frontiers in genetics**, v. 6, p. 1-3, 2015.
- YÁÑEZ, J. M.; HOUSTON, R. D.; NEWMAN, S. Genetics and genomics of disease resistance in salmonid species. **Frontiers in genetics**, v. 5, n. November, p. 415, 2014.
- YÁÑEZ, J. M.; MARTÍNEZ, V. Factores genéticos que inciden en la resistencia a enfermedades infecciosas en salmónidos y su aplicación en programas de mejoramiento. **Archivo de medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile**, v. 13, p. 1–13, 2010.
- YILDIRIM, A. O. et al. Pheno- and genotypic properties of streptococci of serological group B of canine and feline origin. **FEMS microbiology letters**, v. 212, n. 2, p. 187–92, 2002.

YILDIRIM, A. Ö.; LAMMLER, C.; WEIB, R. Identification and characterization of *Streptococcus agalactiae* isolated from horses. **Veterinary Microbiology**, v. 85, p. 31–35, 2002.

YUNIS-AGUINAGA, J. et al. Uncaria tomentosa increases growth and immune activity in *Oreochromis niloticus* challenged with *Streptococcus agalactiae*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 47, n. 1, p. 630–638, 2015.

ZAPATA, A. et al. Ontogeny of the immune system of fish. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 20, n. 2, p. 126–136, 2006.

ZHAO, X. LIANG et al. L-proline increases survival of tilapias infected by *Streptococcus agalactiae* in higher water temperature. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 44, n. 1, p. 33–42, 2015.

ZHU, L. et al. Advances in research of fish immune-relevant genes: A comparative overview of innate and adaptive immunity in teleosts. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 39, p. 39–62, 2013.

ZIMMERMANN, S. O bom desempenho das chitraladas no Brasil. **Panorama da Aquicultura**, v. 10, n. 60, p. 15-19, 2000.

ZIMMERMANN, S. et al. Melhoramento genético para resistência a doenças em organismos aquáticos. **Panorama da Aquicultura**, v. 24, p. 34–43, 2014.

**SEGUNDA PARTE – ARTIGO**

**ARTIGO 1: Avaliação da resistência à estreptococose em diferentes variedades de tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus* (L.)**

**Sánchez, C. O.; Mian G.; Varaschin M. S.; Custodio D.; Rosado A.; Freitas, R. T. F.**

**Avaliação da resistência à estreptococose em diferentes variedades de tilápias do Nilo,  
*Oreochromis niloticus* (L.)**

**RESUMO**

Com objetivo de estudar a resistência a estreptococose em diferentes variedades de tilápias do Nilo, foi avaliada à inoculação intraperitoneal experimental com  $10^7$  CFU/peixe com *Streptococcus agalactiae* em quatro variedades de tilápia do Nilo, sendo uma UFLA e três comerciais (VC1, VC2 e VC3, red tilápia – RT). Quatro peixes inoculados e um controle de cada variedade foram sacrificados nos tempos de 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 360h após a inoculação, para mensuração de atividade de lisozima e antiprotease séricas, assim como realização de histopatologia em diferentes tecidos e imuno-histoquímica (IHQ). Estabeleceu-se um valor  $p < 0,05$  como estatisticamente significativo. A atividade de lisozima apresentou diferenças ( $p = 0,001$ ) entre variedades e tempo pós-inoculação, sendo inversamente proporcional à taxa de sobrevivência. Não houve diferença ( $p = 0,269$ ) na atividade antiprotease entre as variedades, mas ela variou ( $p = 0,0492$ ) em função do tempo pós-inoculação. A variedade UFLA apresentou menor sobrevivência que as demais variedades, que não diferiram entre si. Na variedade UFLA se observaram maiores alterações em brânquias, baço e fígado. Para a IHQ não houve diferenças entre as variedades. Estes resultados demonstraram a existência de variação de repostas entre as variedades ao teste de resistência.

**Palavras-chave:** *Streptococcus agalactiae*, resistência a doenças, inoculação, seleção.

**INTRODUÇÃO**

Estreptococose é o termo genérico utilizado para designar a doença septicêmica causada pela bactéria Gram-positiva *Streptococcus agalactiae*. Esta bactéria infecta peixes de água doce e salgada, onde a mortalidade pode atingir 90% dos animais, sendo a tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* a

espécie mais afetada, resultando, conseqüentemente em grandes perdas econômicas para a indústria aquícola (Evans *et al.*, 2002; Mian *et al.*, 2009; Amal *et al.*, 2012; Yi *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015). Há relatos da ocorrência de *S. agalactiae* em peixes dos EUA, Israel, Japão, Kuwait, Tailândia, Honduras, Costa Rica, Brasil e Colômbia (Iregui *et al.*, 2014).

O número de ocorrências da estreptococose em sistema de cultivos de tilápia, aumentou como consequência da intensificação da produção (Mian *et al.*, 2009). Na Ásia e na América Latina, foram isolados cerca de 500 casos em tilápias de *Streptococcus* sp., 18% de *S. iniae* e 82% de *S. agalactiae* (26% Biotipo 1 e 56% Biotipo 2), sendo o Biotipo 2 o mais predominante em diferentes países de América Latina. No Brasil e na Colômbia, esta infecção bacteriana tem causado alta mortalidade em tilápicuturas (Asencios *et al.*, 2016; Iregui *et al.*, 2014; Marcusso *et al.*, 2015; Sheehan, 2009).

Os sinais clínicos comuns da infecção por *S. agalactiae* são: exoftalmia unilateral ou bilateral; natação errática; letargia e rigidez dorsal; depressão ou irritabilidade; anorexia e postura em forma de “C” evoluindo para a morte dos animais. Em casos superagudos podem não ocorrer sinais clínicos, sendo verificada apenas a ocorrência das mortalidades. Esta bactéria é responsável por causar lesões em diversos tecidos, tais como: hemorragias no cérebro e olhos; pericardite fibrinosa; miocardite; endocardite; peritonite; entre outros (Eldar *et al.*, 1995; Evans *et al.*, 2002; Chen, Chao & Bowser, 2007; Mian *et al.*, 2009; Iregui *et al.*, 2016).

Os principais fatores de risco para a ocorrência de surtos são: aumento da temperatura da água (acima de 27°C), altas concentrações amônia e nitrito, manejo intensivo, altas densidades de estocagem, além da interação com indivíduos portadores da doença (Evans *et al.*, 2002; Mian *et al.*, 2009; Yanong & Francis-floyd, 2013). A suscetibilidade das tilápias às bacterioses depende da espécie ou variedade cultivada, das condições de qualidade da água, da carga orgânica na unidade de produção, do estado nutricional dos peixes, da temperatura da água e de outras condições ambientais. Para evitar as bacterioses, diferentes medidas de prevenção têm sido aplicadas, geralmente associadas à melhorias e manutenção das condições ideais de cultivo, pois qualquer desequilíbrio na densidade de estocagem, na qualidade da água, na nutrição ou nos manejos produtivo e sanitário dos peixes e das instalações, favorece a ocorrência de infecções por organismos patogênicos. As vacinas são

vislumbradas como uma medida profilática, no entanto, na prática ela é de difícil aplicação e onerosa (Evans, Klesius & Shoemaker, 2004; Locke et al., 2010; LaFrentz, Shoemaker & Klesius, 2011; Chen et al., 2012; Zhao et al., 2015), uma vez que demanda muito trabalho e mão de obra para a despesca e vacinação individual dos peixes. Além disso, o manuseio e estresse advindos deste manejo podem debilitar e até mesmo causar a morte dos animais. Quando as medidas profiláticas não são devidamente tomadas ou falham, o tratamento com antibióticos tem sido a principal forma de conter e combater as infecções. É importante ressaltar que a utilização indiscriminada de antibióticos na aquicultura, ou em qualquer outro tipo de produção animal, é perigosa e condenável por possibilitar a contaminação do meio e do homem e resultar no surgimento e disseminação de resistências antimicrobianas.

No sistema imune dos peixes teleósteos, quando um agente patogênico ingressa as primeiras linhas de defesa são o sistema imune não específico, que inclui barreiras físicas como as escamas, as brânquias e as mucosas superficiais da pele, quando o patógeno ultrapassa essas barreiras, uma resposta inflamatória inespecífica é iniciada (Sarder *et al.*, 2001; Magnadóttir *et al.*, 2005; Magnadóttir, 2006; Uribe *et al.*, 2011). Com o aumento do número de neutrófilos e macrófagos ocorre o ataque a estes patógenos, pela ação da enzima lisozima, ativação do sistema complemento e antiproteases (Machado *et al.*, 2015), enzimas que podem ser usados como potenciais marcadores imunológicos (Røed *et al.*, 1993; Sarder *et al.*, 2001; Røed, Fevolden & Fjalestad, 2002; Sahoo *et al.*, 2008).

Os principais órgãos linfoides de peixes teleósteos são o rim anterior, o timo e o baço (Zapata *et al.*, 2006). Os peixes apresentam a imunoglobulina M (IgM) como o principal anticorpo da resposta imune humoral (Melo *et al.*, 2009). Nos tecidos, os melanomacrófagos (MMC) auxiliam na defesa, atuando como células processadoras de antígenos durante a resposta imune. Os MMC geralmente contêm uma variedade de pigmentos, incluindo a melanina, que aumenta em peixes com doenças caquetizantes e atuam como reservatórios de bactérias no baço, rim e fígado (Agius & Roberts, 2003)

Uma melhor compreensão dos danos provocado no organismo e da eficiência dos mecanismos imunológicos acionados pelas infecções causadas por bactéria em peixes, certamente, contribuirá para elaboração de estratégias mais eficientes de prevenção e combate as doenças.

A existência de indivíduos mais resistentes ou menos susceptíveis às doenças, dentro de populações infectadas, e a possibilidade de transmissão destas características aos seus descendentes, tem levado à seleção natural e o surgimento de variedades resistentes para algumas doenças. A transmissão genética da resistência inata a várias doenças bacterianas tem sido documentada em salmonídeos, carpas, trutas e tilápias do Nilo, correlacionada com parâmetros imunológicos não específicos, como são lisozima sérica, atividade hemolítica, explosão respiratória e atividades bactericidas; todos provavelmente afetam a capacidade inerente de peixes para resistirem a patógenos antes de uma resposta imune específica, sendo usados como traços indiretos para identificar os peixes mais resistentes (Sahoo *et al.*, 2008). É possível que os genes de resistência e de tolerância estejam associados com os principais agentes da resposta imune (Glass, 2012).

Desta forma, futuramente o controle e a prevenção de doenças pode ocorrer pela seleção de peixes resistentes a patógenos, como uma estratégia complementar a fim de melhorar a saúde e o desempenho na produção aquícola (LaFrentz *et al.*, 2016; Shoemaker *et al.*, 2016). O presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar os efeitos patológicos e a resposta imune à inoculação experimental de *Streptococcus agalactiae*, sob condições controladas, em quatro variedades de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus*.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

Esta pesquisa foi conduzida em concordância com o Comitê de Ética em Uso Animal - CEUA UFLA, (protocolo-017/13).

### **Instalações, animais e período pre-experimental**

O experimento foi conduzido no Laboratório de Doenças de Peixes, do Departamento de Zootecnia, da Universidade Federal de Lavras -UFLA/MG-Brasil. Para o desafio foram utilizados um total de 180 peixes, com peso médio de 58 g(8.6), oriundos de quatro variedades de tilápia do Nilo,

três de origem comercial (VC1, VC2 e VC3) e uma do plantel do setor da piscicultura da UFPA. Os peixes foram distribuídos em aquários de vidro com capacidade para 57 L e fluxo contínuo de água desclorada, na vazão de 500 ml/h e à temperatura controlada de  $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Cada aquário recebeu 9 (nove) exemplares de uma mesma variedade, sendo destinado 5 (cinco) aquários para cada variedade. Alojados nos aquários, os peixes foram submetidos a um período de adaptação de 15 dias, sendo alimentados com ração comercial de 32% PB, fornecida duas vezes ao dia e na proporção 2% da biomassa. Ao final deste período, procedeu-se a inoculação e deu-se início ao ensaio de desafio.

### **Bactéria usada e infecção experimental**

Para o estudo foi utilizado um isolado patogênico de *Streptococcus agalactiae* obtido de um surto de estreptococose em tilápia do Nilo no estado de Minas Gerais pertencente ao banco de bactérias do Departamento de Medicina Veterinária da UFPA – Laboratório de Bacteriologia. A amostra utilizada foi previamente identificada fenotípica e genotipicamente por testes bioquímicos e posteriormente a PCR espécie-específico para *S. agalactiae* (Berridge, Bercovier & Frelier, 2001). O isolado bacteriano estocado em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  foi descongelado e semeado em ágar tripticaseína de soja suplementado com 5% de sangue equino (TSA sangue) a  $28^{\circ}\text{C}$  durante 24 h. Após este período foram inoculadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion) por 18h a  $30^{\circ}\text{C}$  até atingir uma densidade óptica de 0,1 a 600 nm, equivalente a carga bacteriana de  $10^7$  UFC/mL.

Após jejum alimentar de 24 horas, os peixes foram imersos em solução com 100 mg de benzocaína/L de água. Estes, logo após a sedação, foram submetidos ao processo inoculação. Os animais, de quatro dos cinco aquários destinados a cada variedade, foram individualmente infectados inoculando-se, por meio de uma seringa descartável e aplicado intraperitonealmente,  $10^7$  CFU de *S. agalactiae* e, da mesma maneira, os do aquário restante inoculados com BHI estéril (0,1 ml) formando o grupo controle.

### **Coleta de amostras e testes bacteriológicos**

Após a inoculação, os peixes voltavam aos seus respectivos aquários, agora com a temperatura da água mantida a 30°C e, durante os 15 dias que se seguiram, os peixes que morriam em cada aquário eram contados e submetidos à exames bacteriológicos do rim e cérebro. Dos que sobreviveram até 24, 48, 72, 96 e 360 horas após a infecção experimental, um peixe era retirado aleatoriamente de cada aquário e anestesiado em solução de 100mgde benzocaína /L, para a coleta asséptica de 100 µL de sangue. Após a coleta, realiza-se a eutanásia do peixe em uma solução de 300mg de benzocaína/L e a amostra de sangue coletada centrifugada a 3000xg/1h e 4°C, sendo o soro produzido estocado a – 80°C. Os peixes eutanasiado eram submetidos a necropsia, sendo deles coletados fragmentos de cérebro, rim, baço, brânquias, fígado e olhos, para exame histopatológico e imuno-histoquímico (IHQ). Terminado o desafio, processou-se a eutanásia dos peixes sobreviventes e os mesmos testes foram realizados para o re-isolamento do *S. agalactiae*.

### **Atividade da lisozima**

A curva padrão foi elaborada com lisozima de ovo de galinha branca; a atividade de lisozima em soro foi determinada por ensaio turbidimétrico segundo Ellis (1990), com algumas modificações pelo kit de lisozima (Lysozyme Detection Kit detection-Sigma Aldrich, St. Louis, USA). As amostras de soro foram inativadas em banho-maria a 45°C, durante 30 minutos, visando à inativação das proteínas do sistema complemento, 10 µL de soro + 200 µL de suspensão bacteriana *Micrococcus lysodeikticus* foram adicionados em placas estéreis de 96 poços de 300µL fundo U , feitas em triplicata e incubadas na leitora de microplacas *Multiskan 60* (Thermo Scientific, FINLÂNDIA) a 25°C por dois minutos. O branco foi realizado contendo 10 µL com tampão buffer fosfato de potássio (66 mM pH 6.24) + 200 µL de suspensão de *Micrococcus lysodeikticus*. A redução da densidade óptica (delta DO) em 450 nm foi avaliada a cada 5 minutos durante 30 minutos a 25°C. A equação de regressão lineal da curva padrão foi utilizada para determinar os níveis de lisozima sérica expressos em unidades/mL:

$$\frac{(\Delta A450/\text{min Test} - \Delta A450/\text{min Blank}) (df)}{(0,001)(0,01)}$$

### **Atividade antiprotease**

O ensaio antiprotease foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Ellis, 1990 com algumas modificações. Foram utilizados 10 µL de soro incubado com 10 µL de tripsina (Trypsin from bovine pancreas Sigma Aldrich, St. Louis, USA) para cada amostra, 20 µL de tampão Tris- HCL 0,1 M (pH 6,8) como branco, uma solução de 10 µL de Tris HCL + 10 µL de tripsina como controle. As soluções foram realizadas em triplicata e posteriormente incubadas por 15 minutos a 25°C. Para cada uma das reações foram adicionado na sequência 500 µL de caseína a 1% e cada uma das amostras foi incubada por 15 minutos a 25°C. Para a parada da reação foram adicionados 250 µL de ácido tricloro acético (TCA) a 10% e na sequência as amostras foram mantidas em gelo por 15 minutos. A mistura foi centrifugada a 10551 x g por 5 minutos e posteriormente adicionados em placas estéreis de 96 poços de fundo U e realizados a leitura D.O. a 280 nm no leitor de microplacas *Multiskan 60* (Thermo Scientific, FINLÂNDIA): A porcentagem de inibição foi calculada pela fórmula abaixo:

$$\text{Porcentagem de inibição (\%)} = \frac{\text{OD referencia} - \text{OD amostra}}{\text{OD referencia}} \times 100$$

### **Análise histopatológica**

Os tecidos de cérebro, rim, baço, brânquias, fígado e olhos, foram fixados em formalina tamponada a 10% e processados rotineiramente para histopatologia. A pesquisa do *S. agalactiae* e a avaliação de lesões histopatológicas foram realizadas mediante microscopia óptica. A presença de melanomacrófagos foi considerada discreta (até 5 células por campo, objetiva 40), moderada (de 6 a 10 células por campo, objetiva 40) e acentuada (mais de 11 células por campo, objetiva 40). As lesões de esteatose hepática foram consideradas discretas (pequenos vacúolos no citoplasma, abrangendo menos de 1/3 dos hepatócitos), moderadas (vacúolos pequenos e médios abrangendo

aproximadamente 2/3 dos hepatócitos) e acentuadas (grande quantidade de vacúolos com deslocamento do núcleo para a periferia do hepatócito, abrangendo todos os hepatócitos).

### **Teste imuno-histoquímico**

Os tecidos de todos os peixes foram submetidos à marcação IHQ, pelo método estreptoavidina-biotina-peroxidase, usando o anticorpo primário policlonal anti-*S. agalactiae* (Abcam, ab53584, Cambridge, USA), na diluição de 1:200, de acordo com metodologia descrita por Delamare-Deboutteville *et al.*, (2014). Um kit comercial (K406189-2-ENVISION+DUAL LINK SYSTEM-HRP, DAKO®, Carpinteria, USA), contendo o anticorpo secundário foi utilizado na reação. A recuperação antigênica foi feita por digestão enzimática com tripsina 0,1% (pH 7,8) por 10 min a 37°C e seguida por calor (irradiação em micro-ondas na potência máxima) por dois minutos em tampão citrato (pH 6,0). As lâminas foram incubadas *overnight* a 4°C e a reação foi revelada com DAB (3,3 – diaminobenzidina, DAKO®, Carpinteria, USA) e contra corado com hematoxilina. Como controle negativo, o anticorpo primário foi substituído por água destilada. Amostras de baço foram submetidas à marcação IHQ com o anticorpo primário anti-IgM de peixes (Diagnostic BioSystems RP024, Nanterre, França), na diluição de 1:200 seguindo a mesma metodologia descrita anteriormente.

A pesquisa do *S. agalactiae* e IgM nos tecidos foi realizada mediante microscopia ótica, onde a contagem do número de bactérias/ou colônias bacterianas foi realizado em três campos por tecido, na objetiva de 40.

### **Análises estatísticas**

Para os parâmetros enzimáticos foi feito ANOVA com delineamento inteiramente casualizado com os tratamentos em esquema fatorial (4 variedades por 5 tempos); realizou-se o teste de comparação múltipla de médias de Scott-Knott para verificar a diferença significativa dentro das variedades e os tempos de colheita (24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 360 h) e o teste de Dunnett. Os achados da histopatologia para brânquia, fígado e baço e da IHQ para baço foram submetidos análises de Qui

quadrado as análises foram feitas com o uso do software R 3.2.3. A sobrevivência em cada grupo genético foi estudada utilizando a análise de Kaplan-Meier, usando o software SPSS. O valor  $p < 0.05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## RESULTADOS

Obteve-se o crescimento do *S. agalactiae* na totalidade das placas que foram semeadas com amostras de rim e cérebro, pelo qual houve uma inoculação eficiente de todas as variedades avaliadas. Os peixes não infectados, também foram submetidos ao exame bacteriológico e não apresentaram crescimento bacteriano.

Nos grupos controles não houve mortalidade nas quatro variedades inoculadas. A quantidade de peixes mortos durante o desafio foi de 18, 19, 22 e 18 para VC1, VC2, UFLA e RT respectivamente. O tempo de sobrevivência médio para VC1, VC2, UFLA e RT foi de 10, 11, 2 e 7 dias respectivamente, determinado pela análise de Kaplan-Meier, o maior impacto de mortalidade ocorreu entre os primeiros 5 dias após a inoculação para as variedades VC1, UFLA e RT, sendo maiores para UF onde 90% dos peixes morreram antes do quinto dia, seguida pela variedade RT e VC1 com 60% e 30% de mortalidade, respectivamente. Observou-se que VC1 e RT no final de desafio apresentaram uma sobrevivência média de 20% em comparação VC2 e UFLA com 5% e 0% respectivamente (Fig. 1). Constatada pelo teste Log Rank, onde houve diferença significativa entre UFLA quando comparada com VC1, VC2 e RT, (Tabela 1).

Não houve interação entre variedades e tempo, independente do tempo pós-inoculação da bactéria todas as variedades apresentaram atividades da lisozima superiores aos peixes não infectados ( $p=0,001$ ) e não diferiram entre si; sendo o valor médio dos peixes não infectados (127,76 unidades/mL) e para VC1, VC2, UFLA e RT (160,17; 171,22; 162,71 e 177,5 unidades/mL), respectivamente (Fig. 2); na atividade da lisozima em função do tempo pós-inoculação houve diferença ( $p=0,001$ ) com aumento a partir das 24 h (122,35 unidades/mL) até as 72 h (202,48 unidades/mL) após este tempo a atividade da lisozima mantém-se constante e superior aos peixes não infectados até as 360 h (196,42 unidades/mL) (Fig. 3). Para todas as variedades, os peixes inoculados com a bactéria

apresentaram maior atividade da lisozima que os peixes não infectados ( $p < 0,05$ ). Até 24 h pós-inoculação a atividade da lisozima foi semelhante aos peixes não infectados, após este tempo os peixes inoculados foram diferentes aos peixes não inoculados ( $p < 0,05$ ) (Tabela 2).

Todas as variedades apresentaram atividade antiprotease após-inoculação igual aos peixes não infectados ( $p=0,269$ ), os valores médios dos peixes não inoculados foram 22,77 % e 21,86; 25,33; 23,57 e 21,73 % para VC1, VC2, UFLA e RT, respectivamente (Fig. 4). A atividade antiprotease em função do tempo pós-inoculação diferiu entre eles ( $p=0,042$ ), houve um comportamento igual às 24 h (24,93 %) e 48 h (23,64%), seguido de uma diminuição dela desde às 72 h (22,22 %) até 96 h (19,72 %), com posterior aumento até 26,31% às 360 h (Fig. 5). Para todas as variedades os peixes inoculados com a bactéria apresentaram igual atividade antiprotease que os peixes não infectados. A atividade antiprotease foi diferente aos peixes não infectados nas primeiras 48 h, depois voltou aos níveis dos peixes sem inoculação bacteriana (Tabela 2).

Os peixes sacrificados 24 h após a inoculação não apresentaram sinais clínicos da doença ou lesões nos tecidos; após 48 h de desafio foi observada exoftalmia, coloração escura em todo o corpo, letargia, natação errática e dilatação abdominal em vários peixes das quatro variedades inoculadas. A exoftalmia bilateral ocorreu em 53%, 55%, 56% e 56% dos peixes para as variedades VC1, VC2, UFLA e RT, respectivamente. Presença de líquido avermelhado na cavidade abdominal (ascite) foi observada em 39%, 39%, 43% e 42% dos peixes para VC1, VC2, UFLA e RT, respectivamente. Na avaliação macroscópica não houve alterações nos peixes não infectados.

As lesões microscópicas mais relevantes nos peixes desafiados com *S. agalactiae* foram: no baço, hiperplasia acentuada de polpa branca (Fig. 6a e 6b), aumento do número de MMC, áreas de necrose celular subcapsular associadas à presença de macrófagos, neutrófilos e colônias bacterianas intralesionais (Fig. 6c) e menos frequentemente trombose (Fig. 6b). Na marcação IHQ, observaram-se colônias bacterianas ou bactérias isoladas, livres nos tecidos ou dentro do citoplasma dos macrófagos (Figuras 6d e 6e). No hepatopâncreas: retenção de pigmento biliar no citoplasma dos hepatócitos e sinusóides hepáticos, esteatose discreta a acentuada e aumento do número de MMC, nas brânquias observa-se hiperplasia interlamelar acentuada, fusão lamelar e infiltrado de eosinófilos multifocal acentuado (Tabela 3). As lesões oculares foram poucas e caracterizadas por um infiltrado inflamatório

discreto a moderado, de macrófagos, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos na gordura e musculatura periocular (Fig. 7a) e com bactérias evidenciadas pela IHQ no citoplasma de macrófagos (Fig. 7b). Somente um peixe da variedade VC2 apresentou lesões no SNC, caracterizadas por meningoencefalite não supurativa moderada (Fig. 7c) associada à presença de bactérias no citoplasma dos macrófagos (Fig. 7d). A marcação IHQ para IgM ocorreu em algumas células nas áreas de hiperplasia de polpa branca do baço de alguns peixes (Fig. 7e e 7f). Não foram observadas lesões nos rins. Os peixes do grupo controle não apresentaram sinais clínicos, lesões macroscópicas e microscópicas.

Não houve diferença significativa ( $p>0,05$ ) entre as variedades em relação aos tempos de abate (24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 360 h) para as lesões encontradas nas brânquias, baço e fígado. Já na avaliação do tempo de frequência absoluta total, para o número de eventos apresentados durante o desafio, houve uma diferença significativa em três alterações: baço com MMC+++ ( $p=0,003$ ) onde a variedade UFLA apresentou 12 eventos em comparação com 0, 5 e 4 para VC1, VC2 e RT, respectivamente; hiperplasia interlamelar em brânquias ( $p< 0,001$ ) apresentou 15 eventos para variedade UFLA, em comparação com 0,5 e 0 para VC1, VC2 e RT, respectivamente; no fígado MMC+ ( $p=0,026$ ), as variedades UFLA e RT apresentaram 11 eventos em comparação com 2 e 4 para VC1 e VC2 respectivamente (Tabela 3). Os baços marcados na IHQ em três campos por tecido foram: VC1 5,5,5; VC2 7,6,7; UFLA 6,7,7 e RT 5,5,5, não se encontrou diferença significativa entre eles.

## DISCUSSÃO

Gjedrem, (2015) Relatou resultados de ganhos genéticos médios em seleção para o aumento da resistência à doença, onde o ganho genético para sobrevivência é bastante baixo (5,0% até 8,4%) por geração, sendo 5% em *Oreochromis* spp. O que pode ser explicado pela dificuldade de se padronizar as condições ambientais, havendo assim uma série de fatores que causam a mortalidade. A seleção de múltiplos traços pode reduzir a influência da sobrevivência no índice de seleção, no entanto, através de testes de desafio em condições ambientais padronizadas, informações mais confiáveis podem ser coletadas sobre a resistência à doença. Abuseliana *et al.* (2011) avaliaram diferentes doses de *S. agalactiae*  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  e  $10^3$  CFU/mL em juvenis de tilápia vermelha infectada

intraperitonealmente e identificaram que a dose de  $10^7$ CFU , mostrou 80% de mortalidade sete dias após da inoculação sendo a mais letal. Anshary *et al.* (2014) analisaram 25 juvenis de tilápias do Nilo infectadas com  $10^7$  UFC de *S. agalactiae* e observaram uma sobrevida média de 1,83 dias na análise de sobrevivência Kaplan Meier, e todos os peixes morreram seis dias após a inoculação. Delannoy *et al.*, (2016) inocularam via intraperitoneal  $10^2$ ,  $10^5$  e  $10^7$  UFC da cepa ST260 de *S. agalactiae* em tilápias e encontraram na metodologia de Kaplan-Meier que a dose  $10^7$  UFC foi a mais letal no dia 5 pós-inoculação, com mortalidade de 100%. Em comparação com estas pesquisas resultados similares foram observados neste estudo, onde o valor de sobrevida média foi baixo (2 dias) na variedade UFLA e as maiores mortalidades aconteceram entre o dia 3 e dia 10 para UFLA > RT > VC1 > VC2 .Shoemaker *et al.* (2016) Avaliaram um total de 144 e 130 famílias de irmãos completos de tilápias do Nilo que foram desafiados intraperitonealmente com *S. iniae* e intramuscularmente com *S. agalactiae* Ib, respectivamente. A mortalidade acumulativa no final do desafio foi de 46% para *S. iniae* e 68% para *S. agalactiae*. Houve um componente genético aditivo alto encontrado para a sobrevivência em peixes injetados com *S. iniae* (herdabilidade  $0,52 \pm 0,12$ ) e com *S. agalactiae* (herdabilidade  $0,38 \pm 0,11$ ).

Nos parâmetros imunológicos, a lisozima promove a fagocitose por ativação direta de leucócitos e macrófagos ou indiretamente por um efeito de opsoninas, ela rompe as paredes celulares das bactérias Gram-positivas e protege o hospedeiro da infecção (Saurabh & Sahoo, 2008). Suwannasang *et al.* (2014) desafiaram tilápias jovens com duas cepas de *S. agalactiae*, as cepas GBS-Ia e GBS-III foram inoculadas por via intraperitoneal na dosagem de  $10^7$  CFU/peixe, onde foi encontrado um aumento da lisozima nos três últimos dias, dos nove dias de desafio das duas cepas. Yi *et al.* (2014) observaram que tilápias desafiadas intraperitonealmente com *S. agalactiae*  $10^8$  CFU, tiveram um aumento na atividade da lisozima nas quatro semanas de desafio, em comparação ao controle. No presente estudo, verificou-se uma diferença significativa na atividade da lisozima sendo maior nas quatro variedades avaliadas (VC1, VC2, UFLA e RT) inoculadas com a bactéria em relação aos peixes não infectados, uma diferença foi observada em função do tempo em comparação com peixes não infectados desde as 48 h até 360 h pós-inoculação. Huang *et al.* (2013) avaliaram a resistência de tilápias a infecção com *S. agalactiae*, cepa THN ( $8 \times 10^7$  CFU) onde demonstrou-se que a variedade *Oreochromis niloticus x Oreochromis niloticus* não apresentaram diferença significativa no

final do desafio em relação ao controle, mais as tilápias híbridas *Oreochromis niloticus x Oreochromis aereus* tiveram uma maior atividade da enzima lisozima em relação seu controle.

Na avaliação de resistência a infecção, vários autores encontraram aumento da atividade de lisozima após a inoculação com bactérias Gram positivas e negativas em diferentes espécies de peixes, como *Onchorhynchus mykiss*, *Salmon salar* e *Cyprinius carpus* (Paulsen, Engstad & Robertsen, 2001; Røed, Fevolden & Fjalestad, 2002; Ardó *et al.*, 2010; Salazar *et al.*, 2016). Porém, existem estudos com imunostimulantes para aumento da atividade da lisozima em tilápias do Nilo em pesquisas de nutrição, com a adição de probióticos e plantas as quais aumentaria a proteção contra patógeno e aumentada resistência contra *S. agalactiae* (Wu *et al.*, 2013; Ferreira *et al.*, 2015; Newaj-Fyzul & Austin, 2015; Yunis-Aguinaga *et al.*, 2015; Reda *et al.*, 2016; Ridha and Azad, 2016), contudo, as pesquisas em resposta genética em tilápias são limitadas. Neste estudo, o aumento da atividade da lisozima pós-inoculação com *S. agalactiae* indica que esta é um importante agente não específico do sistema imune para proteger os peixes do patógeno.

No entanto, poucas informações estão disponíveis respeito da resposta genética da inoculação de *S. agalactiae* em relação à atividade antiprotease. Neste trabalho não houve diferença significativa nas diferentes variedades desafiadas, dados semelhantes, porém com outra abordagem, foram relatados por Chebaani *et al.* (2014), que avaliaram o estresse agudo como baixa temperatura e aglomeração em Redbelly tilápia e não encontraram diferenças significativas para a atividade da antiprotease. Embora pesquisas sejam feitas em diferentes áreas sobre resistência e imunidade a bactérias, a suplementação nutricional com *Sophora flavescens* em GIFT inoculada intraperitonealmente com  $10^8$  CFU de *S. agalactiae*, demonstraram que a atividade antiprotease foi significativamente maior que o controle (Wu *et al.*, 2013). Em dietas suplementadas com extrato aquoso não se observou aumento significativo da atividade antiprotease sérica em *O. mossambicus* inoculadas com *Aeromonas hydrophila*  $10^8$  CFU/peixe (Christyapita, Divyagnaneswari & Dinakaran Michael, 2007).

Medições imunológicas de lisozima e antiprotease podem apresentar uma correlação negativa com a sobrevivência contra edwardsiellosis, furunculose e estreptococose em espécies como Rohu (*Labeo rohita*), salmão do Atlântico (*Salmo salar*) e tilápia do Nilo (Røed, Fevolden & Fjalestad, 2002; Saurabh & Sahoo, 2008; Sahoo *et al.*, 2011). No caso da atividade da lisozima, as tilápias do

Nilo podem apresentar uma herdabilidade entre (0,3 a 0,7). A alta herdabilidade da atividade de lisozima sérica e a associação genética negativa significativa entre esta característica e a taxa de sobrevivência, sugere que a atividade da lisozima sérica seja uma característica promissória como seleção indireta para melhorar a taxa de sobrevivência em peixes desafiados contra patógenos. De acordo com a associação negativa entre o traço e a taxa de sobrevivência, os reprodutores devem ser selecionados entre indivíduos e famílias com baixa atividade de lisozima sérica (Chiayvareesajja *et al.*, 1999; Sahoo, 2008; Gjedrem & Rye, 2016). Neste estudo demonstrou-se que o aumento da atividade da lisozima nos peixes expostos, coincidiu-o com a diminuição da sobrevivência em todas as variedades inoculadas, porém quando foi analisada a atividade da lisozima em função do tempo ela aumentou desde as 24 h até 96 h, sendo esta relacionada com a maior mortalidade das variedades UF, VC1 e RT (Fig. 1). A utilização da lisozima como critério de seleção para melhorar a resistência a doença é um processo complexo, pelo fato que sua variação depende do sexo, idade e tamanho, estação do ano, temperatura da água, pH, presença de toxinas, infecções e grau de estresse (Røed, Fevolden & Fjalestad, 2002; Sahoo *et al.*, 2008; Saurabh & Sahoo, 2008; Bresolin de Souza *et al.*, 2016). Estudos relatam o aumento da IgM em peixes como indicador de uma melhor resposta imunológica já que sua produção ocorre pouco tempo após o contato com as bactérias (Hedfors *et al.*, 2012). Situação confirmada nas IHQ feitas nos baços de vários peixes.

Os peixes desafiados das quatro variedades apresentaram sinais clínicos característicos da estreptococose, como escurecimento do corpo, natação errática, postura em forma de C, e exoftalmia unilateral e bilateral. Respostas semelhantes em tilápias do Nilo foram descritas em diferentes estudos, inclusive incluindo a transmissão vertical de doenças bacterianas à progênie (Suebsing *et al.*, 2013; Pradeep *et al.*, 2016), associação de temperatura da água e a suscetibilidade à infecção (Rodkhum, Kayansamruaj & Pirarat, 2011), suplementação com probióticos e prebióticos (Ng *et al.*, 2014), e usando diferentes cepas de *S. agalactiae* (Suanyuk *et al.*, 2008). Independentemente da forma de transmissão do patógeno ao hospedeiro e das medidas de controle, as lesões foram semelhantes.

As lesões macroscópicas como ascite, pele avermelhada, congestão de fígado, baço, rim e cérebro são relatadas em *O. niloticus*, *E. lanceolatus* e *Acipenser baerii* infectadas com *S. agalactiae* (Zamri-Saad, Amal & Siti-Zahrah, 2010; Bowater, 2015; Deng *et al.*, 2015). Além destas

alterações, na maioria dos peixes das quatro variedades neste estudo, ocorreu esplenomegalia e palidez do fígado, que se evidenciaram dois dias pós-inoculação.

Microscopicamente lesões oculares caracterizadas por infiltrado discreto de macrófagos e eosinófilos, foram observadas na coróide, na região periorbital, nervo óptico e nos músculos retos em tilápias pós-infecção intraperitoneal com  $10^9$  CFU e  $10^5$  CFU de *S. agalactiae* (Filho *et al.*, 2009; Abdullah *et al.*, 2013). Lesões semelhantes foram observadas nas quatro variedades VC1, VC2, UFLA e RT desafiadas neste estudo, a partir de 24 h pós-infecção, sugerindo que estas lesões estão associadas ao quadro de exoftalmia, como também foram detectadas colônias bacterianas na IHQ no baço em todos os tempos de coleta e em menor quantidade na meninge e na região periocular em alguns animais. Iregui *et al.* (2016) detectaram por IHQ, colônias bacterianas de *S. agalactiae* no baço de tilápias infectadas por imersão 2 h após desafio, assim como também em brânquias, narinas e olhos, mas em pequenas quantidades.

Muitos estudos têm demonstrado um aumento do tamanho e do número de MMC em fígado e baço de peixes infectados com bactérias (Miyazaki *et al.*, 2001; Alagappan *et al.*, 2009). Em híbridos de tilápia vermelha (*Oreochromis sp.*) inoculados intraperitonealmente com  $10^4$  CFU de *S. agalactiae* foram observadas inflamação no parênquima hepático, picnose nuclear, vacuolização de hepatócitos e aumento do número de MMC (Alsaid *et al.*, 2013). Em juvenis de tilápia vermelha, inoculadas por via intraperitoneal com  $10^7$  UFC de *S. agalactiae*, foram observadas hemorragia na polpa branca do baço e aumento dos MMC, sete dias após a inoculação (Li *et al.*, 2014). Existe uma associação significativa entre infecção por *S. agalactiae* e a presença de MMC no fígado e no baço (Filho *et al.*, 2009). Neste estudo, encontrou-se aumento de MMC em baço e fígado nas variedades desafiadas (VC1, VC2, UFLA e RT) e hiperplasia acentuada de polpa branca, provavelmente como resposta à presença da bactéria.

Numa avaliação microscópica da infecção de *S. Iniae* e *S. agalactiae* em tilápias, encontrou-se um número maior de *S. agalactiae* na circulação e nos órgãos internos. Possivelmente, o patógeno pode interferir com o sistema imunológico ou ultrapassar a capacidade do sistema imunológico para eliminá-lo, porém a imunidade inata da tilápia poderia controlar a infecção por *S. iniae* mais efetivamente do que por *S. agalactiae* (Chen, Chao & Bowser, 2007). A resistência contra patógenos

bacterianos, virais e parasitários em peixes pode ser hereditária (Ødegård *et al.*, 2011). Porém, no futuro, o controle e a prevenção mais eficaz da estreptococose exigirá a utilização de métodos alternativos, como seria a identificação de animais com resistência a *S. agalactiae*, limitando o impacto da doença na piscicultura.

Evans, Pasnik & Klesius, (2015) avaliaram diferentes isolados de *S. agalactiae* mediante injeção intraperitoneal em tilápias e concluíram que os isolados dos EUA, Brasil e Honduras são mais patogênicos e resultam em maior mortalidade do que os isolados do Oriente Médio (Israel e Kuwait). A maioria dos testes de desafio sugere que a tilápia é mais suscetível a *S. agalactiae* por via intraperitoneal do que intramuscular.

Em conclusão, existem diferenças nas lesões teciduais, tempo de vida e atividade da lisozima nos peixes expostos à bactéria *S. agalactiae*, nas variedades de tilápia do Nilo, o que faz com que algumas variedades tenham melhores respostas em surtos de doença. Estes resultados são muito importantes do ponto de vista prático para entender formas de diagnóstico e mecanismos de abordagem para selecionar animais resistentes, uma vez que as variedades mais resistentes poderão dar início a programas de seleção genética e serem utilizadas em condições de cultivo ou de exploração que estejam mais predispostas a doenças.

## REFERÊNCIAS

- Abdullah, S., Omar, N., Yusoff, S. M., Obukwho, E. B., Nwunuji, T. P., Hanan, L. & Samad, J. (2013) Clinicopathological features and immunohistochemical detection of antigens in acute experimental. *Springer open journal* **2**, 2-7.
- Abuseliana AF, Daud HHM, Abdul Aziz S, Khairani Bejo S, A. M. (2011) Pathogenicity of *Streptococcus agalactiae* isolated from a fish in Selangor to Juvenile Red tilapia (*Oreochromis* sp.). *Journal of animal and Veterinary Advances* **10**, 914–919.
- Agius, C. & Roberts, R. J. (2003) Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *Journal of Fish Diseases* **26**, 499-509.
- Alagappan, K. M., Deivasigamani, B., Kumaran, S. & Sakthivel, M. (2009) Histopathological Alterations in Estuarine Catfish (*Arius maculatus*; Thunberg, 1792) Due to *Aeromonas hydrophila* Infection. *World Journal of Fish and Marine Sciences* **1**, 185-189.
- Alsaid Milud, Daud Hassan Hj Mohd, Mohamed Mustapha Noordin, B. S. K. & Mohamed Abdelhadi Yasser, Abuseliana Ali Farag . (2013) Pathological findings of experimental *Streptococcus Agalactiae* Infection in Red Hybrid Tilapia (*Oreochromis* sp.). In *International Conference on Chemical, Agricultural and Medical Sciences*, 70-73.
- Amal, M. N. A., Zamri-Saad, M., Iftikhar, A. R., Siti-Zahrah, A., Aziel, S. & Fahmi, S. (2012) An outbreak of *Streptococcus agalactiae* infection in cage-cultured golden pompano, *Trachinotus blochii* (Lacépède), in Malaysia . *Journal of Fish Diseases* **35**, 849–852.
- Anshary, H., Kurniawan, R. A., Sriwulan, S., Ramli, R. & Baxa, D. V. (2014) Isolation and molecular identification of the etiological agents of streptococcosis in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in net cages in Lake Sentani, Papua, Indonesia. *Springer open journal* **3**, 1–11.
- Ardó, L., Jeney, Z., Adams, A. & Jeney, G. (2010) Immune responses of resistant and sensitive common carp families following experimental challenge with *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology* **29**, 111–116.
- Asencios, Y.O., Sánchez F. B., Mendizábal H. B., Pusari K. H., Alfonso H. O., Sayan A. M., Pereira M. A., Manrique W. G., Belo M. A., Chaupe N. S. (2016) First report of *Streptococcus agalactiae* isolated from *Oreochromis niloticus* in Piura, Peru: Molecular identification and histopathological lesions. *Aquaculture Reports* **4**, 74-79.
- Berridge, B. R., Bercovier, H. & Frelie, P. F. (2001) *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus difficile* 16S-23S intergenic rDNA: genetic homogeneity and species-specific PCR. *Veterinary microbiology* **78**, 165–173.
- Bowater, R. O. (2015) Investigation of an emerging bacterial disease in wild Queensland grouper, marine fish and stingrays with production of diagnostic tools to reduce the spread of disease to other states of Australia. *Fisheries Research and Development Corporation* 1-201.
- Bresolin de Souza, K., Asker, N., Jönsson, E., Förllin, L. & Sturve, J. (2016) Increased activity of lysozyme and complement system in Atlantic halibut exposed to elevated CO<sub>2</sub> at six different temperatures. *Marine Environmental Research* **1**, 1-5.

- Chebaani, N., Guardiola, F. A., Sihem, M., Nabil, A., Oumouna, M., Meseguer, J., Esteban, M. A & Cuesta, A. (2014) Innate humoral immune parameters in *Tilapia zillii* under acute stresslow temperature and crowding. *Fish Physiology and Biochemistry***4**, 797-804.
- Chen, C. Y., Chao, C. B. & Bowser, R. R. (2007) Comparative histopathology of *streptococcus iniae* and *streptococcus agalactiae* infected tilapia. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* **27**, 2-9.
- Chen, M., Wang, R., Li, L. P., Liang, W. W., Li, J., Huang, Y., Lei, A. Y., Huang, W. Y. & Gan, X. (2012) Screening vaccine candidate strains against *Streptococcus agalactiae* of tilapia based on PFGE genotype. *Vaccine***30**, 6088–6092.
- Chiayvareesajja, J., Røed, K. H., Eknath, A. E., Danting J.C., De Vera, M.P. & Bentsen, H. B. (1999) Genetic variation in lytic activities of blood serum from Nile tilapia and genetic associations with survival and body weight. *Aquaculture***175**, 49-62.
- Christyapita, D., Divyagnaneswari, M. & Dinakaran Michael, R. (2007) Oral administration of *Eclipta alba* leaf aqueous extract enhances the non-specific immune responses and disease resistance of *Oreochromis mossambicus*. *Fish and Shellfish Immunology* **23**, 840-852.
- Delamare-Deboutteville, J., Bowater, R., Condon, K., Reynolds, A., Fisk, A., Aviles, F. & Barnes, A. C. (2014) Infection and pathology in Queensland grouper, *Epinephelus lanceolatus*, (Bloch), caused by exposure to *Streptococcus agalactiae* via different routes. *Journal of Fish Diseases***38**, 1-100.
- Delannoy, C. M. J., Zadoks, R. N., Crumlish, M., Rodgers, D., Lainson, F. A., Ferguson, H. W., Turnbull, J. & Fontaine, M. C. (2016) Genomic comparison of virulent and non-virulent *Streptococcus agalactiae* in fish. *Journal of Fish Diseases***39**, 13–29.
- Deng, M.-L., Yu, Z.-H., Geng, Y., Wang, K.-Y., Chen, D.-F., Huang, X.-L., Ou, Y.-P., Chen, Z.-L. Zhong, Z.-J., Lai, W.-M. & Geng, Y. (2015) Outbreaks of Streptococcosis associated with *Streptococcus iniae* in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) in China. *Aquaculture Research* 1-11.
- Eldar, A., Bejerano, Y., Livoff, A., Horovitz, A. & Bercovier, H. (1995) Experimental streptococcal meningitis-encephalitis in cultured fish. *Veterinary microbiology***43**,33–40.
- Ellis, A. E. (1990) ‘Serum antiprotease in fish’: *Techniques in Fish Immunology*. SOS. Edited by D. P. A. J.S. Stolen, T.C. Fletcher. New York, USA. **1**, 95–99
- Evans, J. J., Klesius, P. H., Gilbert, P. M., Shoemaker, C. a., Al Sarawi, M. a., Landsberg, J., Duremdez, R., Al Marzouk, A. & Al Zenki, S. (2002) Characterization of  $\beta$ -haemolytic Group B *Streptococcus agalactiae* in cultured seabream, *Sparus auratus* L., and wild mullet, *Liza klunzingeri* (Day), in Kuwait. *Journal of Fish Diseases***25**, 505–513.
- Evans, J. J., Klesius, P. H. & Shoemaker, C. a. (2004) Efficacy of *Streptococcus agalactiae* (group B) vaccine in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by intraperitoneal and bath immersion Administration. *Vaccine***22**, 3769–3773.
- Evans, J. J., Pasnik, D. J. & Klesius, P. H. (2015) Differential pathogenicity of five *Streptococcus agalactiae* isolates of diverse geographic origin in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Aquaculture Research***46**, 2374–2381.
- Ferreira, M. W., Costa, D. V. da, Leal, C. A. G., Figueiredo, H. C. P. & Rosa, P. V (2015) Dietary Oil Sources on the Innate Immunity and Resistance of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, to *Streptococcus agalactiae* Challenge. *Journal of the World Aquaculture Society***46**, 252–262.

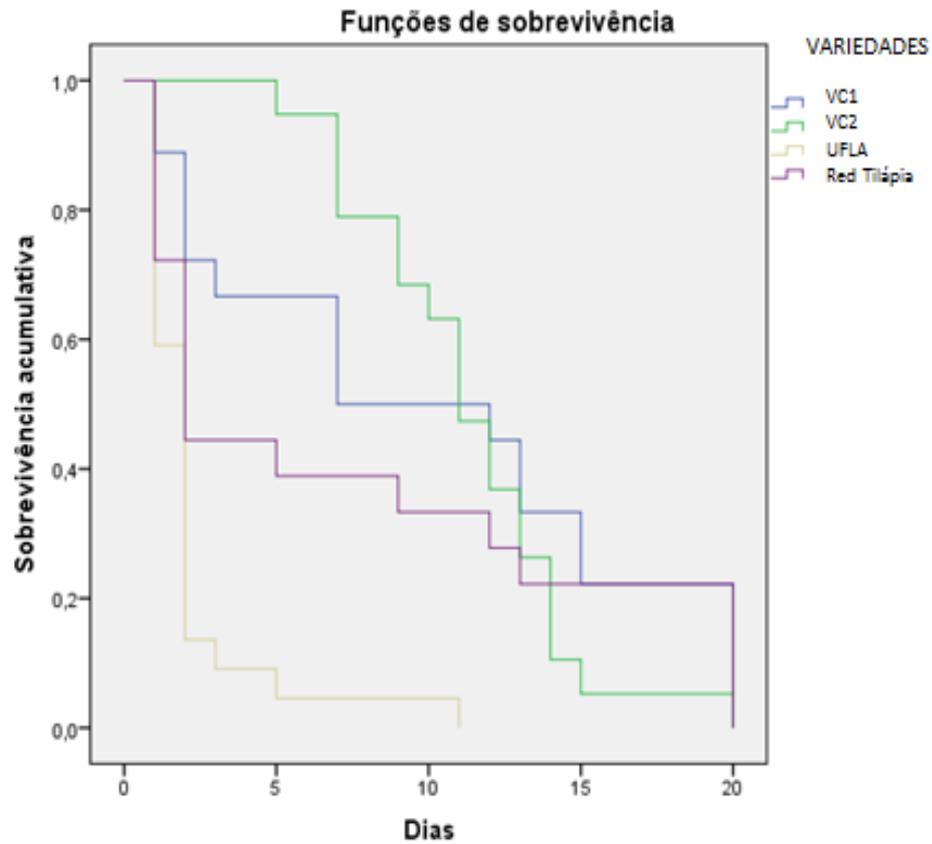
- Filho Clóvis Inocente , Müller Ernst E. , Pretto-Giordano Lucienne G., B. & Ana Paula F. R. L. (2009) Histological findings of experimental *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Brazilian Journal of Veterinary Pathology* **1**, 12–15.
- Gjedrem, T. (2015) Disease Resistant Fish and Shellfish Are within Reach: A Review . *Journal of Marine Science and Engineering***3**, 146-153.
- Gjedrem, T. & Rye, M. (2016) Selection response in fish and shellfish: a review. *Reviews in Aquaculture***1**, 1–12.
- Glass, E. J. (2012) The molecular pathways underlying host resistance and tolerance to pathogens. *Frontiers in genetics***3**, 1–12.
- Hedfors, I. A., Bakke, H., Skjødtt, K. & Grimholt, U. (2012) Antibodies recognizing both IgM isotypes in Atlantic salmon. *Fish and Shellfish Immunology***33**, 1199–1206
- Huang, B. F., Zou, L. L., Xie, J. G., Huang, Z. C., Li, Y. W. & Li, A. X. (2013) Immune responses of different species of tilapia infected with *Streptococcus agalactiae*. *Journal of Fish Diseases***36**, 747–752.
- Iregui, C., Barato, P., Rey, A., Vasquez, G. & Verjan, N. (2014) Epidemiology of *Streptococcus agalactiae* and Streptococcosis in Tilapia Fish. *Concept Press Ltd*, **18**, 1-18.
- Iregui, C. A., Comas, J., Vásquez, G. M. & Verján, N. (2016) Experimental early pathogenesis of *Streptococcus agalactiae* infection in red tilapia *Oreochromis* spp. *Journal of Fish Diseases***39**, 205–215.
- LaFrentz, B. R., Lozano, C. A., Shoemaker, C. A., García, J. C., Xu, D. H., Løvoll, M. & Rye, M. (2016) Controlled challenge experiment demonstrates substantial additive genetic variation in resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to *Streptococcus iniae*. *Aquaculture***458** ,134-139.
- LaFrentz, B. R., Shoemaker, C. A. & Klesius, P. H. (2011) Immunoproteomic analysis of the antibody response obtained in Nile tilapia following vaccination with a *Streptococcus iniae* vaccine. *Veterinary Microbiology***152**, 346–352.
- Li, L. P., Wang, R., Liang, W. W., Huang, T., Huang, Y., Luo, F. G., Lei, A. Y., Chen, M. & Gan, X. (2015) Development of live attenuated *Streptococcus agalactiae* vaccine for tilapia via continuous passage in vitro. *Fish & shellfish immunology***45**, 955–963.
- Li, W., Su, Y. L., Mai, Y. Z., Li, Y. W., Mo, Z. Q. & Li, A. X. (2014) Comparative proteome analysis of two *Streptococcus agalactiae* strains from cultured tilapia with different virulence. *Veterinary Microbiology***170**, 135–143.
- Locke, J. B., Vicknair, M. R., Ostland, V. E., Nizet, V. & Buchanan, J. T. (2010) Evaluation of *Streptococcus iniae* killed bacterin and live attenuated vaccines in hybrid striped bass through injection and bath immersion . *Diseases of Aquatic Organisms***89** , 117–123.
- Machado, M., Azeredo, R., Díaz-Rosales, P., Afonso, A., Peres, H., Oliva-Teles, A. & Costas, B. (2015) Dietary tryptophan and methionine as modulators of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) immune status and inflammatory response. *Fish and Shellfish Immunology***42** , 353–362.
- Magnadóttir, B. (2006) Innate immunity of fish (overview). *Fish & Shellfish Immunology***20**, 137-151.
- Magnadóttir, B., Lange, S., Gudmundsdóttir, S., Bogwald, J. & Dalmo, R. (2005) Ontogeny of humoral immune parameters in fish. *Fish & Shellfish Immunology***19**, 429–439.

- Marcusso, P.F., Eto, S.F., Claudiano G. da S., Viera F., Salvador R., Moraes, J. R., Moraes F.R. (2015) Isolamento de *streptococcus agalactiae* em diferentes órgãos de tilápias do nilo (*oreochromis niloticus*) criadas em tanques-rede. *Bioscience Journal* **31**, 549-554.
- Melo, D.C., Oliveira, D.A.A., Melo, M.M., Júnior, D.V. , Teixeira, E.A. , Guimarães, S. R. (2009) Perfil proteico de tilápia nilótica chitralada (*Oreochromis niloticus*), submetida ao estresse crônico por hipóxia. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* **5**, 1183–1190.
- Mian, G. F., Godoy, D. T., Leal, C. A. G., Yuhara, T. Y., Costa, G. M. & Figueiredo, H. C. P. (2009) Aspects of the natural history and virulence of *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia. *Veterinary Microbiology* **136** ,180–183.
- Miyazaki, T., Kageyama, T., Miura, M. & Yoshida, T. (2001) Histopathology of viremia-associated ana-aki-byo in combination with *Aeromonas hydrophila* in color carp *Cyprinus carpio* in Japan. *Diseases of Aquatic Organisms* **44**, 109–120.
- Newaj-Fyzul, A. & Austin, B. (2015) Probiotics, immunostimulants, plant products and oral vaccines, and their role as feed supplements in the control of bacterial fish diseases. *Journal of Fish Diseases* **38**, 937–955.
- Ng, W.-K., Kim, Y.-C., Romano, N., Koh, C.-B. & Yang, S.-Y. (2014) Effects of Dietary Probiotics on the Growth and Feeding Efficiency of Red Hybrid Tilapia, *Oreochromis* sp., and Subsequent resistance to *Streptococcus agalactiae*. *Journal of Applied Aquaculture* **26**, 22–31.
- Ødegård, J., Baranski, M., Gjerde, B. & Gjedrem, T. (2011) Methodology for genetic evaluation of disease resistance in aquaculture species: Challenges and future prospects. *Aquaculture Research* **42**, 103–114.
- Paulsen, S. M., Engstad, R. E. & Robertsen, B. (2001) Enhanced lysozyme production in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages treated with yeast  $\beta$ -glucan and bacterial lipopolysaccharide. *Fish & Shellfish Immunology* **11**, 23–37.
- Pradeep, P. J., Suebsing, R., Sirthammajak, S., Kampeera, J., Jitrakorn, S., Saksmerprome, V., Turner, W., Palang, I., Vanichviriyakit, R., Senapin, S., Jeffs, A., Kiatpathomchai, W. & Withyachumanarnkul, B. (2016) Evidence of vertical transmission and tissue tropism of Streptococcosis from naturally infected red tilapia (*Oreochromis* spp.). *Aquaculture Reports*, **3**, 58-66.
- Reda, R. M., Mahmoud, R., Selim, K. M. & El-Araby, I. E. (2016) Effects of dietary acidifiers on growth, hematology, immune response and disease resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish and Shellfish Immunology* **50**, 255–262.
- Ridha, M. T. & Azad, I. S. (2016) Effect of autochthonous and commercial probiotic bacteria on growth, persistence, immunity and disease resistance in juvenile and adult Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture Research*, 1-11.
- Rodkhum C., Kayansamruaj & P., Pirarat N. (2011) Effect of Water Temperature on Susceptibility to *Streptococcus agalactiae* Serotype Ia Infection in Nile Tilapia. *Thai Journal of Veterinary Medicine* **41**, 309–314.
- Røed, K. H., Fevolden, S. E. & Fjalestad, K. T. (2002) Disease resistance and immune characteristics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selected for lysozyme activity. *Aquaculture* **209**, 91–101.
- Røed, K. H., Larsen, H. J. S., Linder, R. D. & Refstie, T. (1993) Genetic variation in lysozyme activity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* **109**, 237–244.

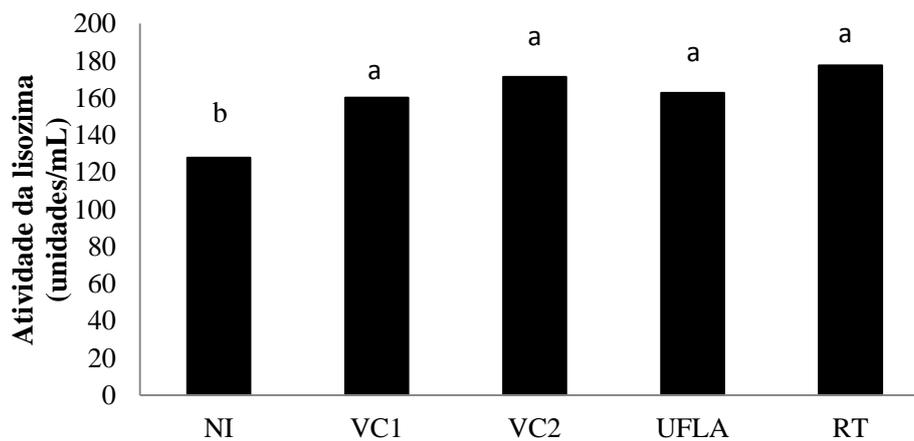
- Sahoo, P. K., Mahapatra, K. Das, Saha, J. N., Barat, a, Sahoo, M., Mohanty, B. R., Gjerde, B., Odegård, J., Rye, M. & Salte, R. (2008) Family association between immune parameters and resistance to *Aeromonas hydrophila* infection in the Indian major carp, *Labeo rohita*. *Fish & shellfish immunology***25**, 163–169.
- Sahoo, P. K., Rauta, P. R., Mohanty, B. R., Mahapatra, K. D., Saha, J. N., Rye, M. & Eknath, a E. (2011) Selection for improved resistance to *Aeromonas hydrophila* in Indian major carp *Labeo rohita*: survival and innate immune responses in first generation of resistant and susceptible lines. *Fish & shellfish immunology***31**, 432–438.
- Salazar, S., Oliver, C., Yáñez, A. J. & Avendaño-Herrera, R. (2016) Comparative analysis of innate immune responses to *Streptococcus phocae* strains in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish and Shellfish Immunology***51**, 97–103.
- Sarder, M. R. I., Thompson, K. D., Penman, D. J. & McAndrew, B. J. (2001) Immune responses of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) clones: I. Non-specific responses . *Developmental & Comparative Immunology***25**, 37–46.
- Saurabh, S. & Sahoo, P. K. (2008) Lysozyme: An important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture Research***39**, 223–239.
- Sheehan, B., Labrie, L., Lee, Y. S., Wong, F. S., Chan, J., Komar, C., Wendover, N., Grisez., L. (2009) Streptococcosis in Tilapia; Vaccination Effective Against Main Strep Species. *Global Aquaculture Advocate*, 72–74 .
- Shoemaker, C. A., Lozano, C. A., Lafrentz, B. R., García, J. C., Soto, E., Xu, D.-H., Beck, B. H. & Rye, M. (2016) Additive genetic variation in resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to *Streptococcus iniae* and *S. agalactiae* capsular type Ib: Is genetic resistance correlated. *Aquaculture***468**, 193–198.
- Suanyuk, N., Kong, F., Ko, D., Gilbert, G. L. & Supamattaya, K. (2008) Occurrence of rare genotypes of *Streptococcus agalactiae* in cultured red tilapia *Oreochromis* sp. and Nile tilapia *O. niloticus* in Thailand – Relationship to humans isolates?. *Aquaculture* **284**,35-40.
- Suebsing, R., Kampeera, J., Tookdee, B., Withyachumnarnkul, B., Turner, W. & Kiatpathomchai, W. (2013) ‘Evaluation of colorimetric loop-mediated isothermal amplification assay for visual detection of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus iniae* in tilapia. *Letters in Applied Microbiology***57**, 317–324.
- Suwannasang, A., Dangwetngam, M., Issaro, A., Phromkunthong, W. & Suanyuk, N. (2014) Pathological manifestations and immune responses of serotypes Ia and III *Streptococcus agalactiae* infections in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Songklanakarin Journal of Science and Technology***36**, 499–506.
- Uribe, C., Folch, H., Enriquez, R. & Moran, G. (2011) Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Veterinarni Medicina***56**, 486–503.
- Wu, Y. rui, Gong, Q. fang, Fang, H., Liang, W. wen, Chen, M.& He, R. jie (2013) Effect of *Sophora flavescens* on non-specific immune response of tilapia (GIFT *Oreochromis niloticus*) and disease resistance against *Streptococcus agalactiae* . *Fish and Shellfish Immunology***34** , 220–227.
- Yanong, R. P. E. & Francis-floyd, R. (2013) Streptococcal Infections of Fish. *University of Florida*, 1–5.

- Yi, T., Li, Y.-W., Liu, L., Xiao, X.-X. & Li, A.-X. (2014) Protection of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) against *Streptococcus agalactiae* following immunization with recombinant FbsA and  $\alpha$ -enolase. *Aquaculture***428–429**, 35–40.
- Yunis-Aguinaga, J., Claudiano, G. S., Marcusso, P. F., Manrique, W. G., de Moraes, J. R. E., de Moraes, F. R. & Fernandes, J. B. K. (2015) *Uncaria tomentosa* increases growth and immuneactivity in *Oreochromis niloticus* challenged with *Streptococcus agalactiae* . *Fish and Shellfish Immunology***47**, 630–638.
- Zamri-Saad, M., Amal, M. N. A. & Siti-Zahrah, A. (2010) Pathological changes in red tilapias (*Oreochromis* spp.) naturally infected by *Streptococcus agalactiae*. *Journal of Comparative Pathology***143**, 227–229.
- Zapata, A., Diez, B., Cejalvo, T., Gutiérrez-de Frías, C. & Cortés, A. (2006) Ontogeny of the immune system of fish .*Fish & Shellfish Immunology***20** ,126–136.
- Zhao, X. liang, Han, Y., Ren, S. tong, Ma, Y. mei, Li, H. & Peng, X. xian (2015) L-proline increases survival of tilapias infected by *Streptococcus agalactiae* in higher water temperature .*Fishand Shellfish Immunology***44**, 33–42.

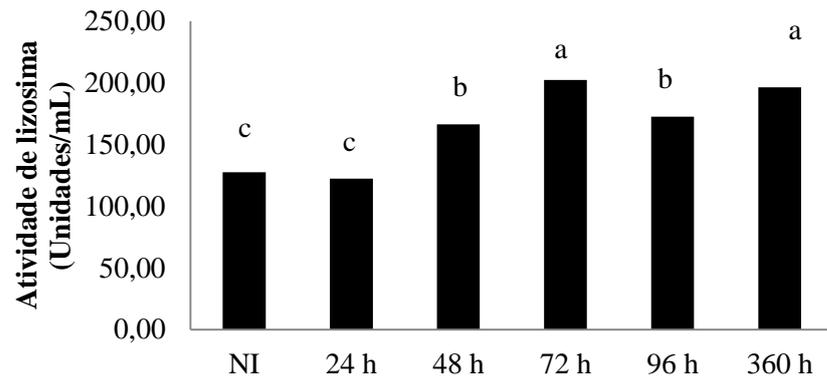
## TABELAS E FIGURAS



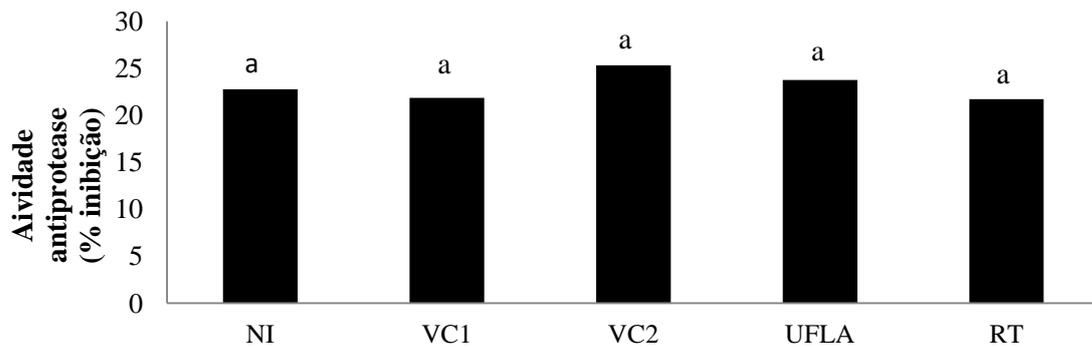
**Figura 1** Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier (sobrevivência acumulativa %), para as quatro variedades de tilápia do Nilo após-inoculação com *Streptococcus agalactiae*.



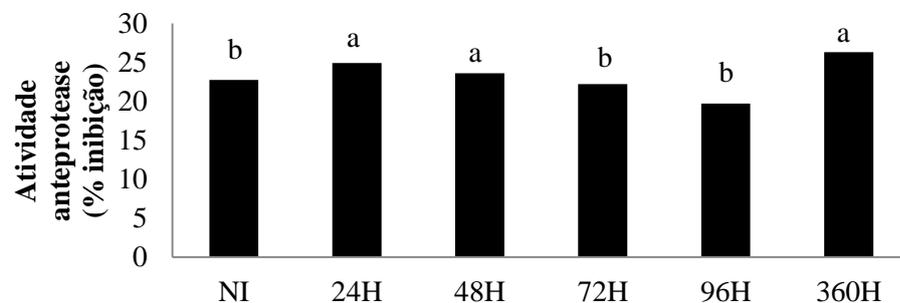
**Figura 2** Atividade da lisozima nas variedades de tilápia do Nilo após inoculação de *Streptococcus agalactiae*. NI (Peixes não infectados), VC1 (Variedade comercial 1), VC2 (Variedade comercial 2) e RT (Red Tilápia). Letras diferentes representam a diferença significativa ( $p < 0,05$ ).



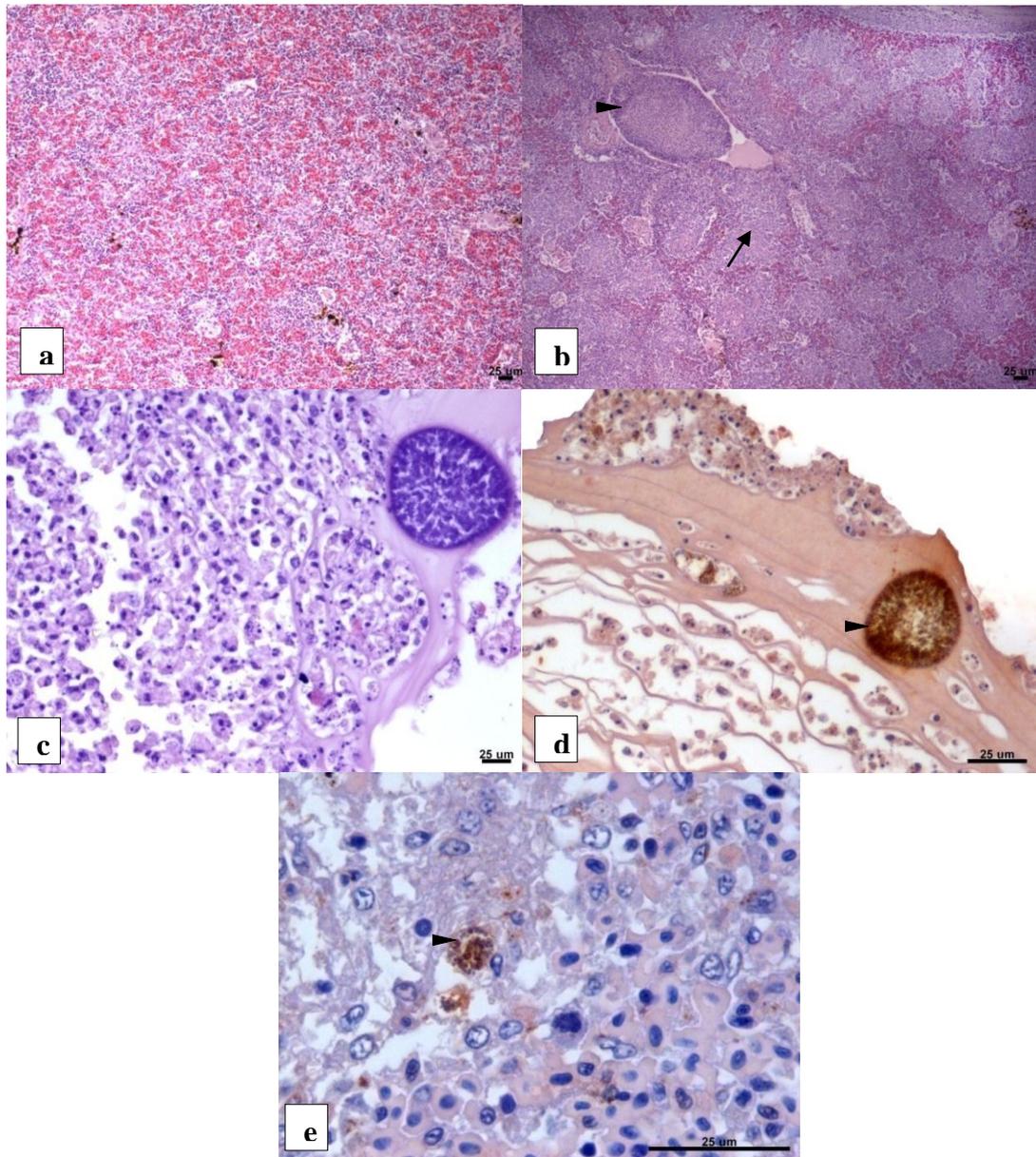
**Figura 3** Atividade de lisozima em função do tempo, em tilápias do Nilo após inoculação de *Streptococcus agalactiae*. NI (Peixes não infetados). Letras diferentes representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).



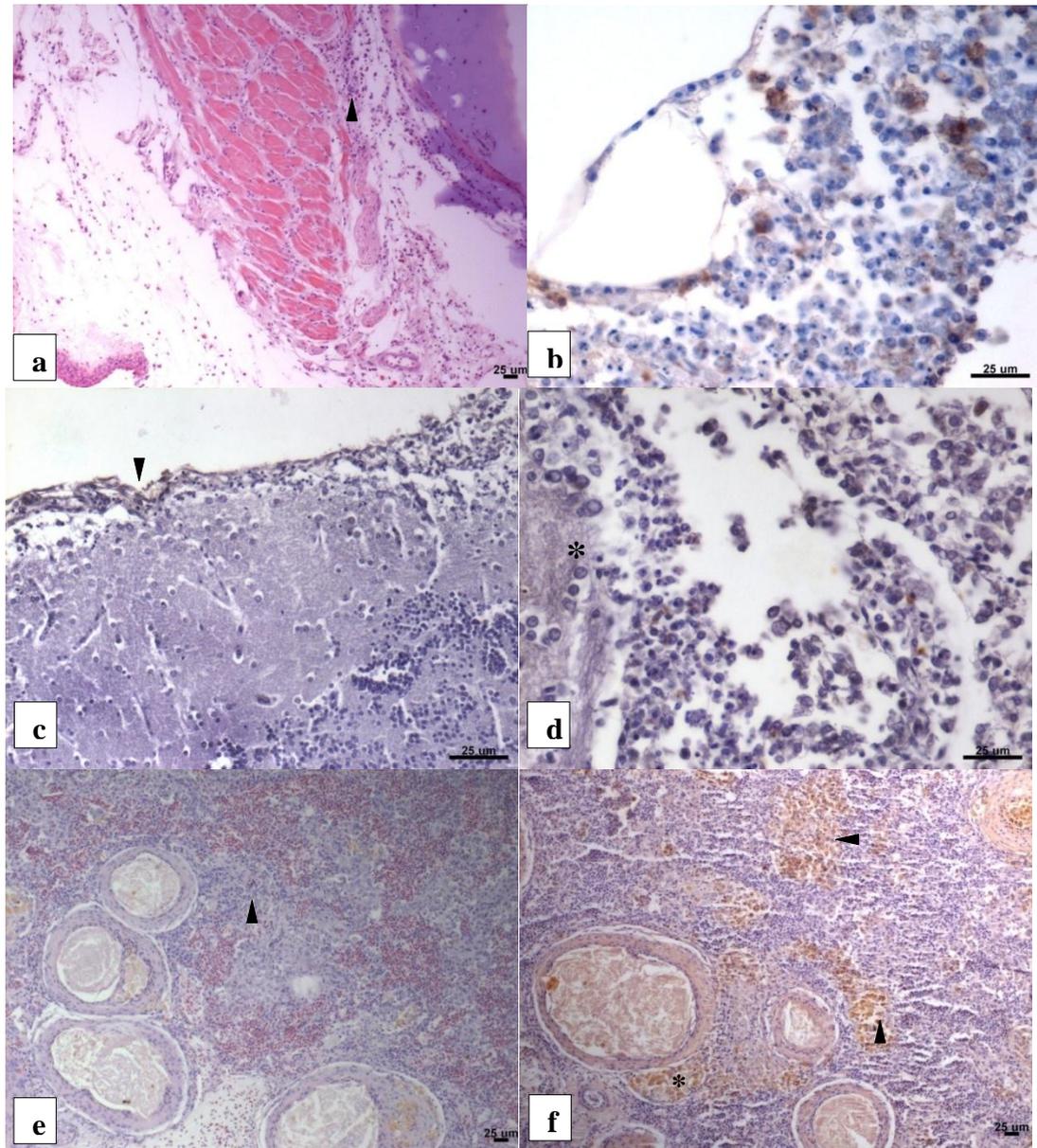
**Figura 4** Atividade antiprotease nas variedades de tilápias do Nilo após inoculação com *Streptococcus agalactiae*. NI (Peixes não infetados), VC1 (Variedade comercial 1), VC2 (Variedade comercial 2) e RT (Red Tilápia). Letras diferentes representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).



**Figura 5** Atividade antiprotease em tilápia do Nilo após inoculação com *Streptococcus agalactiae* em função do tempo. NI (Peixes não infetados). Letras diferentes representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).



**Figura 6** Lesões no baço em tilápia do Nilo infectadas com *Streptococcus agalactiae*. **a)** Grupo controle da variedade Red tilápia, fotomicrografia mostrando polpa vermelha, polpa branca e melanomacrófagos (H&E., Obj 10); **b)** Estreptococose na variedade Red Tilápia, fotomicrografia mostrando hiperplasia de polpa branca (seta) e trombo em artéria (cabeça de seta) (H&E., Obj 10); **c)** Estreptococose na variedade VC1, fotomicrografia demonstrando macrófagos e colônias bacterianas na região subcapsular (H&E., Barra 25 µm); **d)** e **e)** Imunomarcação de *S. agalactiae* (cabeça de seta), livre no parênquima e no citoplasma de macrófagos (IHQ, método estreptavidina-peroxidase, cromógeno DAB, Barra 25 µm).



**Figura 7** Lesões em tecidos de tilápia do Nilo infectadas com *Streptococcus agalactiae*. **a)** Olho, músculo e gordura periocular variedade UFLA, fotomicrografia mostrando infiltrado inflamatório periocular (cabeça de seta) (H&E, Barra 25  $\mu$ m); **b)** Gordura periocular. Imunomarcação de *S. agalactiae* no citoplasma de macrófagos (IHQ, método estreptavidina-peroxidase, cromógeno DAB, Barra 25  $\mu$ m); **c)** e **d)** Cortex cerebral (\*), meningite não supurativa (cabeça de seta) e imunomarcação de *S. agalactiae* no citoplasma de macrófagos da meninge (IHQ, método estreptavidina-peroxidase, cromógeno DAB, Barra 25  $\mu$ m), **e)** Baço variedade Red Tilápia, Hiperplasia moderada de polpa branca (cabeça de seta) (Barra 25  $\mu$ m) **f)** Baço variedade Red Tilápia IH da figura 7e, demonstrando

Imunomarcção de Ig M (cabeça de seta) e melanomacrófagos (\*). (IHQ, método estreptavidina-peroxidase, cromógeno DAB, Barra 25  $\mu$ m).

**Tabela 1** Teste Log Rank, para as quatro variedades de tilápia do Nilo após inoculação de *Streptococcus agalactiae*. \* Representam a diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Variedades	VC1	VC2	UFLA	RT
VC1	-	0,560	0,000*	0,443
VC2	0,560	-	0,000*	0,587
UFLA	0,000*	0,000*	-	0,007*
RT	0,443	0,587	0,007*	-

**Tabela 2** Comparações Múltiplas de Dunnet para atividade de lisozima e atividade antiprotease em tilápias do Nilo após inoculação de *Streptococcus agalactiae*. \*Indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

CONTRASTES	Atividade de lisozima	Atividade antiprotease
	<i>p</i> -valor	
VC1 - CONTROLE	0,002*	0,416
VC2 - CONTROLE	0,003*	0,958
UFLA - CONTROLE	<0,001*	0,940
RED TILAPIA - CONTROLE	0,030*	0,981
24h - CONTROLE	0,968	0,025*
48h - CONTROLE	<0,001*	0,049*
72h - CONTROLE	<0,001*	0,439
96h - CONTROLE	<0,001*	0,421
360h - CONTROLE	<0,001*	0,031*

**Tabela 3** Lesões microscópica observadas na infecção com *Streptococcus agalactiae* em tilápias do Nilo.

ORGÃO	Alterações	FREQUÊNCIA ABSOLUTA PARCIAL <sup>1</sup>																FREQUÊNCIA ABSOLUTA TOTAL <sup>2</sup>							
		24h				48h				72h				96h				360h				VC1	VC2	UF	RT
		VC1	VC2	UF	RT	VC1	VC2	UF	RT	VC1	VC2	UF	RT	VC1	VC2	UF	RT	VC1	VC2	UF	RT				
FIGADO	E. Leve	2	1	2	0	0	0	1	0	2	0	1	2	2	2	1	0	0	0	0	0	6	3	5	2
	E. Mod.	0	0	0	0	1	1	1	3	0	1	1	2	1	0	2	0	0	1	0	1	2	3	4	6
	E. Acen	2	3	3	1	0	3	0	2	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	3	7	4	4
	MMC +	1	1	4	3	0	0	2	3	1	0	2	2	0	3	3	2	0	0	0	1	2 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	11 <sup>b</sup>	11 <sup>b</sup>
	MMC ++	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
	MMC ++	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0	1
BRÂNQUIA	Eosi.	1	1	1	1	1	1	1	1	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2	5	2	2
	F. Lam.	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	4	0	0
	Hip. Int.	0	1	4	0	0	1	4	0	0	1	3	0	0	2	4	0	0	0	0	0	0 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	15 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>
BAÇO	MMC +	0	0	0	1	0	0	0	2	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	2	1	0	5
	MMC ++	0	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1	1	3	0	0	0	1	0	3	1	5
	MMC +++	0	1	4	2	0	1	3	0	0	1	3	0	0	1	2	1	0	1	0	1	0 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	12 <sup>b</sup>	4 <sup>a</sup>
	Hip. P. Bra.	1	2	3	2	1	1	2	3	2	3	2	2	2	2	2	1	0	1	0	0	6	9	9	8

<sup>1</sup> frequências obtidas do abate de quatro animais por variedade : Variedade comercial 1 (VC1), Variedade comercial 2 (VC2), UFLA (UF) e Variedade Red tilápia (RT) em relação aos tempos (24 h, 48 h, 72 h 96 h e 360 h). <sup>2</sup> Somatória dos cinco tempos de amostragem . Letras diferentes representam diferenças significativas ( $p < 0.05$ ) pelo teste de Qui-quadrado. Esteatose leve (E. leve), moderada (E. Mod), acentuada (E. Acen), melanomacrófagos (MMC), Eosinófilos (Eosi), Fusão lamelar (F. lam), Hiperplasia intralamelar (Hip. Int), Hiperplasia de polpa branca (Hip. P Bra.).

## ANEXO



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**  
 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS  
 Cx.P.3037 - Lavras - MG - 37200-000 - (35) 3829-5182 cba@nintec.ufla.br

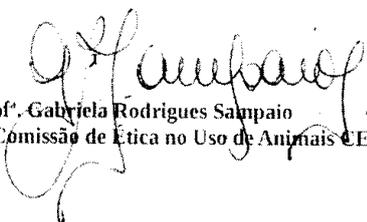
## CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº 017/13, relativo ao projeto intitulado "Avaliação de parâmetros moleculares de resistência à doença estreptococose em diferentes linhagens de tilápias.", que tem como responsável Gláucia Frasnelli Mian está de acordo com os princípios éticos da experimentação animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (Comissões Permanentes/PRP-UFLA), tendo sido aprovado na reunião de 18/04/2013.

## CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº 017/13, related to the project entitled "Evaluation of molecular parameters of resistance estreptococose in different strains of tilapia.", under the supervision of Gláucia Frasnelli Mian, is in agreement with the Ethics Principles in Animal Experimentation, adopted by the Bioethic Committee in Utilization of Animals (Comissões Permanentes/PRP-UFLA), and was approved in April 18, 2013.

Lavras, 18 de abril de 2013

  
 Prof. Gabriela Rodrigues Sampaio  
 Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA

Universidade Federal de Lavras  
 Pró-Reitoria de Pesquisa /Comissões Permanentes  
 Campus Universitário -  
 Caixa Postal 3037 / CEP 37200 000 - Lavras, MG - Brasil  
 Tel.: +55 (35) 3829 5182  
 cba@nintec.ufla.br - www.prp.ufla.br