

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE MESTRADO PROFISSIONAL EM DEFESA AGROPECUÁRIA**

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE *Streptococcus agalactiae*  
ATRAVÉS DA PCR EM TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis  
niloticus*) IMUNIZADA CONTRA ESTREPTOCOCOSE**

**Andrine Virginia Silva de Jesus**

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA**

**2017**

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE *Streptococcus agalactiae*  
ATRAVÉS DA PCR EM TILÁPIAS-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*)  
IMUNIZADAS CONTRA ESTREPTOCOSE**

**Andrine Virginia Silva de Jesus**  
Bacharel em Medicina Veterinária  
União Metropolitana de Educação e Cultura – UNIME, 2013

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Defesa Agropecuária, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Defesa Agropecuária.

**Orientador:** Prof. Dr. Robson Bahia Cerqueira  
**Coorientador:** Dr. Carlos Eduardo Crispim Ramos  
**Coorientadora:** Dra. Denise Soledade Peixoto Pereira

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA**  
**2017**

## FICHA CATALOGRÁFICA

J58a

Jesus, Andrine Virginia Silva de.

Avaliação da presença de *Streptococcus agalactiae* através da pcr em tilápias-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) imunizadas contra estreptococose / Andrine Virginia Silva de Jesus. – Cruz das Almas, BA, 2017.  
64f.; il.

Orientador: Robson Bahia Cerqueira.

Coorientador: Carlos Eduardo Crispim Ramos.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

1.Tilápia (peixe) – Alimentos. 2.Tilápia (peixe) – Microbiologia. 3.Bacteriologia – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Peixoto, Denise Soledade. III.Título.

CDD: 639.3

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas - UFRB.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE MESTRADO PROFISSIONAL EM DEFESA AGROPECUÁRIA**

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE *Streptococcus agalactiae*  
ATRAVÉS DA PCR EM TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*)  
IMUNIZADA CONTRA ESTREPTOCOCOSE**

Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação de  
Andrine Virginia Silva de Jesus

Aprovada em: 17 de Novembro de 2017

Prof. Dr. Robson Bahia Cerqueira  
UFRB – Orientador

Dr. Felipe Guedes de Araújo  
UFRB – Examinador Interno

Dra. Bartira Guerra Santos  
UFBA– Examinador Externo

## **DEDICATÓRIA**

Dedico o desenvolvimento desta pesquisa a minha mãe e ao meu pai, sem eles nada seria possível.

## **AGRADECIMENTOS**

Enfim, acredito que posso agradecer, ou pelo menos tentar, a todos que fizeram e ajudaram no desenvolvimento não só desta pesquisa, mas também no crescimento pessoal que tive ao longo destes anos de mestrado. Não tenho nenhuma religião definida mais gostaria de agradecer a Deus, a quem tantas vezes roguei por ajuda, mesmo que inconscientemente e de certa forma ajudou.

A minha família, que torceu, apoiou, ajudou e acreditou em especial a minha mãe que sempre fez, faz e fará tudo que está além dos seus limites em prol dos meus sonhos, e também a meu pai que sempre faz tudo que está ao seu alcance para que, eu consiga os meus objetivos.

Agradeço ao Professor Dr. Robson Bahia, pela oportunidade, pelos ensinamentos, por acreditar no meu potencial, não tenho palavras para descrever o que sinto, serei grata por muito tempo, por tudo.

A todos os professores que contribuíram indiretamente e diretamente para o desenvolvimento desta pesquisa neste processo ao Professor Carlos Ramos, e o Professor Rodrigo que gentilmente cedeu o laboratório e seus estagiário, em especial a Denise Soledade que foi minha orientadora durante boa parte do desenvolvimento desta pesquisa, doando seu tempo, conhecimento e experiências, algumas destas vezes mesmo doente, para guiar meus passos no momento em que estava só. Acredito que muito obrigada é pouco por tudo que foi feito, Deni, mesmo assim gostaria de registra aqui meu muitíssimo obrigada por tudo.

Aos estagiários e Doutores do Aqua em especial a Bartira que fizeram parte desta jornada, guiando ensinando e o principal me ajudando muito durante todo esse processo, obrigada pelas risadas, pela companhia e por toda amizade que recebi durante este período, em especial Mara, Bruna, Géssica e Jhon.

Agradeço também a Cássia e Marcos, que ajudaram, em todo o desenvolvimento da PCR, contribuindo com suas experiências e conhecimentos, muito obrigada.

Ao pessoal do LDI por me receberem tão bem, vocês foram como uma família para mim, todo este tempo, passamos por muitos momentos que guardarei para sempre,

obrigada a todos, Sarinha, Kissa, Breno, Joadson e Flávia, também a Thaisinha, Julira, Deise e a meu querido Dedel (BebÊzinho do meu coração)

Aos meus colegas de turma no Mestrado de Defesa Agropecuária, por toda amizade e cumplicidade, passamos por muitas coisas, porém sempre juntos, muito obrigada a todos.

Quando vim a Cruz das Almas, sabia que faria amizades, porém não sabia que iria ganhar alguns dos meus melhores amigos, pessoas que fizeram e farão parte da minha vida para o infinito e além.

Ao meu trio favorito, Kayck por toda amizade, disposição, entusiasmo, risadas, comidas, companheirismo e carinho; a Vini pelas loucuras, amizade, ideias, nos conselhos, apoio, disponibilidade e cumplicidade, por último e não menos imo a SilBio (Silvania) pela amizade incondicional, cumplicidade, companheirismo, parceria, por nunca ter implicado com minha cara, por sempre me ouvir. A todos vocês desculpem as falhas e muito, muitíssimo obrigada por TUDO.

Ao programa de Pós-Graduação em Defesa Agropecuária da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia pela oportunidade.

À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado da Bahia (Fapesb), pelo apoio financeiro aos meus estudos durante o mestrado.

À UFRB, pela colaboração com a logística e transporte.

A todos que não foram mencionados aqui, mas de alguma forma foram importante e contribuíram para mais essa etapa da minha vida.

Aos membros desta banca, por suas contribuições que muito ajudarão na melhoria desta pesquisa.

Grata!!

## EPÍGRAFE

“...Só levo a certeza de que muito pouco sei, ou nada sei.”

Almir Sater

## **AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE *Streptococcus agalactiae* ATRAVÉS DA PCR EM TILÁPIAS-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*) IMUNIZADAS CONTRA ESTREPTOCOLOSE**

**RESUMO:** A estreptococose gera prejuízos devido as grandes perdas econômicas à indústria pesqueira mundial. Faz-se necessário o desenvolvimento de técnicas diagnósticas para a rápida identificação do patógeno. O objetivo deste trabalho foi, verificar a presença ou ausência da bactéria *S. agalactiae* em órgãos (encéfalo, rim cefálico e baço) de tilápias imunizadas contra estreptococos, através da PCR, a partir da utilização de diferentes doses de uma vacina comercial. Para a extração do DNA da bactéria, foi realizado o protocolo fenol clorofórmio, após a realização da PCR o *Streptococcus agalactiae* foi visualizado nos fragmentos de tecidos, analisou-se a mortalidade dos animais vacinados comparado ao controle. Através da extração do DNA, observou-se a amplificação do DNA do *Streptococcus* diretamente dos tecidos que foram reservado para o estudo. A porcentagem da probabilidade de órgãos negativos foi no controle (T1) 0% em todas as amostras e nos demais tratamentos T2 75%; 33% e 58%. Já no T3 100%; 85%; 69% no encéfalo, rim e baço, respectivamente. A mortalidade dos animais do controle foi de 83%, contra 69 e 63 % nos tratamento que receberam 1 dose e 2 doses da vacina. Todos os peixes foram desafiados com a mesma quantidade e concentração da bactéria, Através da extração do DNA da bactéria pelo protocolo fenol clorofórmio foi possível conseguir o material genético e realizar uma boa amplificação identificando o DNA da bactéria através da PCR nos tecidos do peixes analisados.

**Palavras chaves:** imunização, tilapicultura, amplificação, extração de DNA.

## EVALUATION OF THE PRESENCE OF *Streptococcus agalactiae* THROUGH PCR IN NILO-TILAPS (*Oreochromis niloticus*) IMMUNIZED AGAINST STREPTOCOCOSIS

**ABSTRACT:** Streptococcosis usually damages due to the great economic losses to the world fishing industry. It is necessary to develop diagnostic techniques for the rapid identification of the pathogen. The objective was verify the presence or absence of *S. agalactiae* bacteria in organs (brain, cephalic kidney and spleen) of Tilapia immunized against streptococci through PCR, use of different doses of commercial vaccine. For the extraction of DNA from bacterium, was performed the phenol chloroform protocol. After the PCR, the *Streptococcus agalactiae* was visualized in the chosen tissue fragments, and the mortality of the vaccinated animals was analyzed compared to the control. Through DNA extraction Streptococcus DNA amplification was observed directly from tissues that were reserved for this study. The percentage probability of negative organs was in the control (T1) 0% in all the samples and in the other treatments T2 75%; 33% and 58% already in T3 100%; 85%; 69% in the brain, kidney and spleen, respectively. The mortality in the control animals was 83% against 69 and 63% in the treatments that received 1 dose and 2 doses of the vaccine. Through the extraction of the bacterial DNA by the chloroform phenol protocol, it was possible to obtain the genetic material and to perform a good amplification by identifying the DNA of the bacterium through PCR in the tissues of the analyzed fish.

**Keywords:** immunization, tilapiaculture, amplification, DNA extraction.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Eletroforese da extração de DNA dos tecidos das Tilápias.....	34
Figura 2 – Amostras de Encéfalo de Tilápias (T1) poços 1-3 (Ladder, controle + e -); poços 4-9 (amostras analisadas).....	35
Figura 3 – Amostras do Rim cefálico de Tilápias (T1) poços 1-3 (Ladder, controle + e -); poços 4-9 (amostras analisadas).....	35
Figura 4 – Amostras do Baço de Tilápias (T1) poços 1-3 (Ladder, controle + e -); poços 4-9 (amostras analisadas).....	35
Figura 5 – Probabilidade de amostras dos órgãos analisados dos tratamentos T1 (ctrl) T2 (1 dose) T3 (2 doses), negativos para presença do <i>S. agalactiae</i> .....	36
Figura 6 – Índices em percentagem da mortalidade das Tilápias com diferentes doses da vacina e do controle após o desafio com <i>S. agalactiae</i>	37

## LISTA DE ABREVIATURAS

Abs – Absorbância  
BHI – Brain heart Infusion  
CL – Concentração letal  
°C – Grau celsius  
DNA – Ácido desoxirribonucléico  
EDTA – Ácido etileno diamina tetra acético  
FAO – Food and Agriculture Organization  
g – Gramas  
HUMV – Hospital universitário de medicina veterinária  
i.p. – Intraperitoneal  
  
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e estatística  
Kg – Kilogramas  
L – Litro  
LDI – Laboratório de doenças infecciosas  
mL – Mililitro  
MAPA – Ministério da agricultura e pecuária  
Mg – Miligrama  
p – peso  
PBS – Tampão fosfato-salino  
Pb – Pares de bases  
PCR – Reação em cadeia da polimerase pH - Potencial hidrogênico  
Rpm – Rotações por minuto  
STE – Sódio Tris EDTA SDS  
SDS – Sódio dodecilsulfato  
UFC – Unidades formadoras de colônias  
v – volume  
µl – Microlitro

## SUMÁRIO

	Página
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	17
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>18</b>
3.1 TILÁPIA-DO-NILO .....	18
3.2 IMPACTO ECONÔMICO DA AQUICULTURA.....	19
3.3 AGENTE ETIOLÓGICO.....	20
3.4 EPIDEMIOLOGIA.....	21
3.5 PATOGENIA.....	21
3.6 RESPOSTA IMUNE CELULAR E HUMORAL .....	22
3.7 SINAIS CLÍNICOS .....	24
3.8 DIAGNÓSTICO LABORATÓRIAL.....	25
3.8.1 ELISA.....	25
3.8.2 Técnica microbiológica (Padrão ouro).....	26
3.8.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	26
3.9 UTILIZAÇÃO DE VACINAS COMERCIAIS.....	27
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>

4.1	CONDIÇÕES DO EXPERIMENTO.....	29
4.2	PROCEDIMENTOS DE VACINA.....	30
4.3	INFECÇÃO EXPERIMENTAL.....	30
4.4	EXTRAÇÃO DO DNA PROTOCOLO FENOL CLOROFÓRMIO.....	31
4.5	AMPLIFICAÇÃO (PCR) .....	32
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>34</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>38</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>41</b>
	<b>REFERÊNCIA.....</b>	<b>42</b>
	ARTIGO 1.....	48
	ARTIGO 2.....	55

## 1 INTRODUÇÃO

A piscicultura nacional cresce e se consolida, tornando o Brasil um dos principais produtores na América Latina. Dentre as espécies cultivadas destaca-se a Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), que produziu cerca de 219 mil toneladas durante todo o ano de 2015 (IBGE, 2016).

Estes números são crescentes com o passar do tempo, principalmente por esta espécie ser importante economicamente na aquicultura mundial e em virtude das suas vantagens como: textura, qualidade da carne e baixo custo com a produção, características atrativas para a aquicultura brasileira (OLIVEIRA et al., 2010).

A Tilápia é uma espécie que se destaca na piscicultura por desenvolver-se rapidamente, se adaptar consideravelmente bem em água doce ou em diferentes níveis de salinidade, além de consumir uma grande variedade de alimentos, de apresentar sucesso produtivo em variados sistemas de criação, tornando-se uma alternativa para produtores em regiões onde rios e lagos não são abundantes (JESUS et al., 2011).

As altas taxas de estocagem dos peixes associadas ao intenso arraçamento, características dos sistemas intensivo, geram consequências como estresse nos animais e a diminuição da qualidade da água, aumentando a susceptibilidade às enfermidades (LONGHI, PRETTO-GIORDANNO, MULLER; 2012).

O *Streptococcus agalactiae* tem sido isolado em diversas espécies de peixes, sendo considerado um patógeno emergente na aquicultura mundial, levando às septicemias que podem afetar animais de diferentes habitats devido à ampla variedade de hospedeiros que esta bactéria pode atingir, elevando assim o número de casos clínicos associados (FIGUEIREDO et al., 2006).

A utilização da biologia molecular para o diagnóstico de bactérias com difícil isolamento e identificação em laboratório, como o *Streptococcus sp*, tem

garantido a qualidade, eficiência e segurança no diagnóstico de uma grande variedade de enfermidades. Esta técnica tem sido introduzida nas mais diversas áreas, e na piscicultura não é diferente. A PCR pode ser utilizada de maneira eficaz, para detectar a patogenicidade de diferentes amostras identificando o microrganismo a partir da extração de DNA (FIGUEIREDO et al., 2008).

As técnicas sorológicas como o ensaio imunoenzimático, também podem ser consideradas uma alternativa importante para detectar o contato da Tilápia com o patógeno, a partir das imunoglobulinas específicas produzidas como resposta pelo hospedeiro, ajudando assim a identificar a possível presença do agente causador (KAYANSAMRUAJ, 2017).

Para o tratamento das infecções causadas por estreptococose em peixes, normalmente são utilizados antibióticos a base de penicilinas. Entretanto, os resíduos gerados por estes fármacos favorece o surgimento de estirpes resistentes ao antibiótico utilizado, o que acaba dificultando tratamentos futuros e o combate a bactéria no plantel (ISMAIL, 2017).

O uso de vacinas tem auxiliado no controle e prevenção da estreptococose, que podem se instalar no cultivo das Tilápias. Embora esses métodos apresentem vantagens e desvantagens, a ampla utilização destas vacinas tem gerado benefícios econômicos aos produtores, com uma redução das perdas devido à alta mortalidade provocada por *Streptococcus* ssp. (LONGHI, PRETTO-GIORDANNO, MULLER; 2012).

Com a intensificação da Tilápicultura associada à falta de informação, a introdução de patógenos no cultivo fica mais fácil, levando a alta e rápida mortalidade, gerando perdas econômicas para o produtor, chamando a atenção para a utilização de vacinas que se tornam cada vez mais utilizadas para prevenção de surtos contra estreptococose, melhorando os ganhos produtivos. Por isso justifica-se a utilização de técnicas como a PCR que identifique de forma rápida a presença do patógeno no cultivo de Tilápias, ajudando assim a traçar meios de prevenção contra futuros surtos associados a estreptococose.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Observar a presença da bactéria *S. agalactiae* através da PCR em Tilápias do Nilo, vacinadas com uma vacina comercial e desafiadas com a referida bactéria.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair o DNA da bactéria pelo método fenol clorofórmio, a partir do tecido de Tilápias.
- Padronizar a técnica da reação em cadeia de polimerase (PCR) para o diagnóstico da enfermidade a partir da análise em tecido de peixes vacinados e desafiados.
- Verificar a presença ou ausência da bactéria *Streptococcus agalactiae*, em órgãos (encéfalo, rim cefálico, baço) através da PCR, frente a diferentes doses da vacina comercial utilizada.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 TILÁPIA – DO – NILO

O nome Tilápia faz parte da denominação dada às espécies de peixes ciclídeos originários do continente africano. A espécie *Oreochromis niloticus*, conhecida popularmente por tilápia-do-Nilo, é a mais utilizada na aquicultura devido ao seu alto potencial nos mais diversos sistemas de produção (BOSCOLO et al., 2001).

Esta espécie é bastante utilizada devido a sua boa aceitação pelo consumidor, ao elevado valor comercial e ao baixo custo com a produção, além disso a Tilápia possui hábito alimentar onívoro, que lhe confere facilidade na adaptação do manejo alimentar, tolerar bem às altas taxas de estocagem no sistema de produção intensiva (MARENGONI, 2006).

A escolha da Tilápia se deu devido a sua rusticidade e a facilidade que apresenta para se adaptar principalmente em condições adversas e a tolerar o manuseio. Comumente eram apresentados baixos índices de deficiências nutricionais e enfermidades, mas com essas facilidades para a produção, os investimentos se intensificaram e a espécie foi se consolidando no mercado com boa aceitação (KUBITZA, 2005).

Por ser um dos grupos de peixes mais importantes para a piscicultura é aproveitado no sistema intensivo, o que leva ao acúmulo de animais e arraçoamento intenso, com isso consequências como estresse e a diminuição da qualidade da água deixam os peixes susceptíveis as infecções, principalmente as bacterianas que são as que causam maiores problemas e prejuízos à produção (LONGHI, PRETTO-GIORDANNO, MULLER; 2012).

### 3.2 IMPACTO ECONÔMICO DA AQUICULTURA

O Brasil é tradicionalmente conhecido como uma potência na produção, tanto na agricultura como na pecuária, e apesar de possuir uma das maiores reservas hídricas do planeta, ainda cresce na aquicultura. Uma das espécies mais cultivadas é a Tilápias do Nilo que apresentou de 2005 a 2015 um crescimento em sua produção de 223%. Este crescimento tem sido atribuído aos investimentos em modernização e aumentos na produção (MAPA, 2017).

A atividade pesqueira representa um PIB de aproximadamente 5 bilhões de reais, gerando 3,5 milhões de empregos diretamente ou indiretamente, com uma produção cada vez maior passando de 1.000.000 toneladas. As condições climáticas e os recursos naturais disponíveis no Brasil tornam o país um dos principais futuros fornecedores de peixes, de acordo com a FAO até 2030 o país poderá ser um dos maiores produtores do mundo (SOUZA, LEITE; 2017).

Apesar de toda a infraestrutura necessária para a criação de peixes, este tipo de carne ainda não é a mais consumida pelos brasileiros, a região norte é considerada a que mais consome animais aquáticos, embora o consumo de Tilápias seja insignificante nesta região (ANTONUCCI et al., 2017).

Mesmo com os crescentes valores em relação a aquicultura, a demanda de peixe no Brasil ainda é maior que a oferta. Grande parte do que é produzido no país fica destinado ao próprio mercado interno e os principais estados produtores são Paraná, São Paulo, Ceará e Santa Catarina. Ainda há nos consumidores o preconceito em relação a carne de peixes, principalmente de água doce, que apresentam sabor barroso, ou então sem sabor. Atualmente a venda de filés já limpos e oriundos de empresas frigoríficas, tem elevado o consumo interno deste tipo de carne atraindo o consumidor (KUBITZA, 2017).

### 3.3 AGENTE ETIOLÓGICO

Dentre as patologias de origem bacteriana que acometem a Tilápia criada em sistema intensivo, destacam-se as infecções por *Streptococcus spp.*, *Flavobacterium columnare*, *Aeromonas spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Vibrio spp.* e *Edwardsiella spp.*, deste conjunto de bactérias os estreptococcus são considerados como um patógeno emergente que tem sido identificado como responsável por elevados prejuízos a tilapicultura (SALVADOR, 2008).

Os *Streptococcus* são cocos Gram positivos, quando visualizado ao microscópio se apresentam em pares ou cadeias lineares, são imóveis, não formam esporos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, podem ou não ser beta hemolíticos e pertencem ao Grupo B Lancefield (OLIVEIRA, 2012).

Estudos tem detalhado dois grupos distintos, com diferentes características bioquímicas e fenotípicas, estes grupos são denominados biótipos onde são estabelecidas diferenças entre o *S. agalactiae*, conhecido como beta-hemolítico, pertencente ao Biótipo I e o *S. agalactiae* não-beta-hemolítico (Biótipo II). O biótipo II é considerado de maior importância, por gerar mortalidade em muitos países asiáticos e latino-americanos (WENDOVER et al., 2011).

Nas infecções em peixes causadas por *Strpetococcus*, as espécies envolvidas podem ser *Streptococcus iniae* e *Streptococcus agalactiae*, as quais podem apresentar hospedeiros e sinais clínicos parecidos. Ultimamente tem sido observado uma elevação na ocorrência de casos relacionados à infecção por *S. agalatiae* (FIGUEIREDO et al., 2006).

Para que a infecção bacteriana possa se instalar, é necessário que o patógeno se multiplique na temperatura que é ideal para o peixe, no caso das Tilápias em condições de temperatura entre 27°C aos 30°C. As criações em tanques-redes também favorecem as infecções principalmente nos meses em que a temperatura se encontra elevada, e os valores totais de oxigênio dissolvido, de pH, de alcalinidade, de nitrito e de amônia da água estiverem fora dos padrões de normalidade (SUHET, 2011).

### 3.4 EPIDEMIOLOGIA

A estreptococose pode acontecer diferentes classes de organismos aquáticos, foi isolada em mais de 45 espécies de peixes e em continentes distintos como Ásia, Europa, África e na América, no último em mais de 12 países diferentes (LEIRA et al., 2016a).

Os primeiros surtos de estreptococose no Brasil nas criações de Tilápias foram relatados em 2003, nas fazendas de criação de tilápias no Paraná. Os estados do Espírito Santo, São Paulo, Minas Gerais, Ceará e Bahia também apresentaram surtos relacionados a estreptococose com a mesma espécie, sendo registrados altos graus de morbidade e mortalidade, e com perda de grande parte do plantel (LEIRA et al., 2016b).

O *Streptococcus spp.* nos estados de São Paulo e no Paraná, diferente dos estados do Nordeste, tem apresentado baixa prevalência em alevinos e maior incidência em tilápias na fase de engorda, principalmente nos meses de junho a dezembro, sendo no entanto, que outras bactérias como pseudomonas e aeromonas tiveram uma incidência alta no mês de julho, no qual a resposta imunológica do peixe diminui. Fato este que pode levar a instalação de patógenos secundários como o Streptococcus que pode levar a septicemias, por encontrar as condições ótimas para se desenvolver (ROMERA et al., 2003).

### 3.5 PATOGENIA

Diversos fatores externos podem favorecer o surgimento de infecções por patógenos, como: baixa qualidade da água (baixo oxigênio dissolvido e elevados níveis de amônia tóxica e nitrito), má nutrição, acúmulo de resíduos orgânicos, mudanças bruscas de temperatura, manejo intenso, e transporte. Tais condições aumentam o estresse dos animais dos cultivos, diminuindo a capacidade de

resposta imunológica eficaz dos peixes, deixando-os suscetíveis a instalação dos patógenos (FRANCESCHINI, 2012).

De acordo com IREGUI et al. (2016), *S. agalactiae* pode se inserir no organismo da Tilápia através do trato gastrointestinal, atravessando as primeiras barreiras como muco luminal e o epitélio, encontradas pelo patógeno no início da infecção e segue com sua colonização e disseminação sistêmica, afetando órgãos como o cérebro, rim e intestino (PRETTO-GIORDANO, 2010). A bactéria penetra nas células hospedeiras e, uma vez dentro delas, se replica e ocasiona morte celular (LI et al., 2014).

Uma vez no organismo do hospedeiro, o *S. agalactiae* se adere às barreiras endoteliais e epiteliais, liberando fatores de virulência como o Fator CAMP, que forma poros na membrana do hospedeiro, a proteína C que facilita aderência nas células epiteliais, a  $\beta$ -hemolisina que leva a lise das células do hospedeiro induzindo à resposta inflamatória e apoptose. Apresenta uma capsula rica em ácido siálico, mimetizando o ácido siálico da célula do hospedeiro prevenindo o reconhecimento do microrganismos pelo sistema imune, a adesina bacteriana imunogênica (BibA) promove a aderência na célula do hospedeiro se ligando ao CD4 do sistema complemento, e também iagA gene relacionado a invasão a barreira hemato- encéfalica, nos casos de meningite. Estes fatores fazem com que a bactéria consiga driblar o sistema imune do hospedeiro permitindo que a mesma se espalhe pela corrente sanguínea (GODY, 2011).

### 3.6 RESPOSTA IMUNE CELULAR E HUMORAL

A partir do momento que bactérias agridem o organismo dos peixes, estes tendem a responder através do processo inflamatório para isolar ou destruir o patógeno invasor. Os peixes teleósteos apresentam um sistema imune inato e adaptativo ainda pouco elucidado, porém, sabe-se que possui barreiras físicas (pele), e químicas (lisozimas séricas, sistema complemento, proteína C reativa, macrófagos, neutrófilos, linfócitos, trombócitos e muco) que revestem a mucosa e a pele, além de envolver ovos embrionados protegendo-os da ação de

patógenos ambientais por meio da resposta imune e celular. Ocorre então a reação inflamatória direta aos antígenos logo no primeiro contato e em um segundo contato com a bactéria por meio da resposta adaptativa criada anteriormente (MARCUSO et al., 2013).

A resposta imune dos peixes pode ser de forma inespecífica ou específica, mediada por células e também humoral. A imunidade celular em peixe envolve monócito, leucócitos e linfócitos responsáveis por inflamação, fagocitose e citotoxicidade não específica. A resposta humoral é composta por uma variedade de substâncias como: lisozimas; sistema complemento; interferon; proteína C reativa; transferina; lectina, que inibem o crescimento de agentes infecciosos. Na imunidade celular os linfócitos T reconhecerem alguns dos antígenos que se ligam as células. Quando a bactéria é fagocitada pelo macrófago, as partículas resultantes deste processo se ligam aos marcadores superficiais do macrófago que os apresenta aos linfócitos T, estimulando a sua proliferação (BARBUIO, 2013).

A resposta imune humoral é ativada, quando o antígeno entra no organismo e atinge um órgão linfóide, a partir deste processo os linfócitos B dividem-se e formando os plasmócitos (linfócitos B ativados) e as células de memória. Os plasmócitos são responsáveis por produzir anticorpos específicos para cada antígeno, que se encontram no sangue e migram para os locais da infecção. As células de memória tornam-se inativas, mas prontas a responder rapidamente, caso venha a acontecer um posterior contato com o antígeno, as imunoglobulinas (Ig), são formadas por moléculas tetramétricas bastante parecida com a IgM (mamíferos). Atuando como receptor de membrana para antígeno de superfície de células B, neutralizando, reconhecendo e eliminando antígenos pelos mecanismos efetores, formando o complexo antígeno-anticorpo eliminados pela fagocitose, tentando assim debelar a ação do patógeno (MARCUSO, 2014).

### 3.7 SINAIS CLÍNICOS

Alguns fatores que afetam a virulência, a transmissão e a introdução do estreptococos, como a temperatura da água entre 27°C e 28°C, o sistema em gaiolas flutuantes, por concentrar muitos peixes, as altas taxas de estocagem por m<sup>3</sup> e a junção de animais doentes com sadios. Além de cepas virulentas que apresentam alta infectividade, podendo contaminar peixes através do contato direto, levando a grande quantidade de animais enfermos e peixes mortos de forma rápida em grande parte dos casos devido a surtos de meningoencefalites e septicemias (MIAN et al., 2009).

Os sinais clínicos que caracterizam a infecção por *Streptococcus agalactiae* normalmente são descritos como anorexia, escurecimento da pele, natação errática, letargia, curvatura do corpo, exoftalmia, opacidade e coloração esbranquiçadas de córnea uni ou bilateral, sulfusões no opérculo e base das nadadeiras, ulceração da epiderme, abscessos, distensão abdominal (MARCUSO et al., 2015).

A mortalidade associada a estreptococose geralmente ocorre em curtos períodos de tempo, aproximadamente em 10 dias. Recentemente, fazendeiros da China relataram a presença de nódulos de cor amarelada ou vermelho escuro no músculo de peixes, próximo a vertebra, estes animais apesar de suspeitos para parasitoses não se apresentavam acometidos por parasitas e sim, após a análise em órgãos como o fígado, foi constatado a presença de *Streptococcus agalactiae* (LI et al., 2014).

Lesões internas também podem ser encontradas devido as afecções causadas pelos estreptococos como ascite, esplenomegalia, hepatomegalia com congestão dos órgãos desta área, petéquias e necrose, vermelhidão devido ao acúmulo de sangue nas brânquias e encefalomalácea devido ao tecido cicatricial formado após disseminação da bactéria nas meninges (FAGUNDES et al., 2016).

### 3.8 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico da estreptococose pode ser feito por meio das características observadas nos sinais clínicos, anatomopatológicos, técnicas microbiológicas, sorológicas como ELISA e moleculares como a PCR. A partir da porta de entrada o agente etiológico pode provocar amigdalite, otite, rinite, mastite, artrite, adenite, infecções piogênicas, meningites, endocardites além de septicemias (OLIVEIRA, 2012).

#### 3.8.1 ELISA

O diagnóstico pode ser realizado através de métodos que nos auxiliem a encontrar o agente etiológico ou informações referentes a ele, utilizando material biológico do hospedeiro ( soro) para a detecção de anticorpos contra o patógeno, que pode estar presente independente da presença de sinais clínicos, indicando que o hospedeiro entrou em contato com o agente em um determinado momento da vida. Métodos sorológicos como o ELISA tornaram-se importante pois através dele é possível identificar a resposta imune do hospedeiro, traçando um perfil profilático, ajudando a evitar grandes perdas no cultivo (FERREIRA et al., 2005).

O teste do ELISA se tornou o método utilizado para detecção e identificação da resposta imunológica a patologias também na piscicultura, por apresentar velocidade na identificação de imunoglobulinas, precisão e bom custo. Devido as características positivas do teste, uma grande variedade de teste diagnostico em forma de kit são produzidos, tornando o ensaio muito mais prático afim de otimizar os resultados (SHELBY et al., 2002).

Na piscicultura o ELISA é utilizado para a avaliação dos parâmetros imunológicos, como a resposta adaptativa a partir de um antígeno, em testes referentes a resposta vacinal, pois é possível visualizar e mensurar numericamente a eficácia da vacina aplicada através das ligações antígeno e anticorpo que acontecem durante o ensaio (MA et al., 2017).

### 3.8.2 Técnica microbiológica (Padrão ouro)

Tradicionalmente utiliza-se a técnica microbiológica como o isolamento e identificação para detectar o *S. agalactiae*, a partir do swabs do encéfalo, rim, fígado, coração, líquido visceral e olhos. Pode-se semear em Ágar sangue, meio de predileção para o crescimento do microrganismo em questão, incubar a 37°C por 24 a 48 horas e posteriormente observar a morfologia das colônias e ausência ou presença da hemólise. A morfologia é realizada com a coloração de Gram e as provas bioquímicas que ajudam na confirmação da existência da bactéria podem ser utilizados kits comerciais como Api 20 Strep (BioMérieux, France) e para a classificação no grupo de Lancefield o Slidex Strepto Kit (BioMerieux, França) (LONGHI, PRETTO-GIORDANNO, MULLER; 2012).

### 3.8.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A utilização da biologia molecular para o diagnóstico de bactérias com difícil isolamento e cultivo *in vitro* como o *streptococcus*, tem garantido a qualidade, eficiência e segurança ao diagnóstico das enfermidades encontradas nos peixes, tornando a PCR uma técnica molecular bastante precisa, que pode ser utilizado para identificação de patógenos em diferentes tipos de amostras a partir da extração de DNA (FIGUEIREDO et al.,2008).

A técnica da reação em cadeia da polimerase pode ser utilizada para identificar a presença de um determinado agente etiológico que acomete os peixes, através da utilização de primer específico para a identificação do material genético do patógeno pesquisado em seus órgãos de predileção. Primeiro é necessário que se faça a extração do ácido nucleico, que pode ser realizada utilizando uma grande variedade de protocolos para extração. Dentre eles o método de fenol-clorofórmio, também podem ser utilizados kits prontos vendidos comercialmente, para a realização da PCR é preciso que o DNA do material desejado seja extraído, após a extração pode-se armazenar à temperatura de -20°C até a utilização (ITISARO, SUANYUNK, TANTIKITTI; 2012).

A reação em cadeia da polimerase foi se desenvolvendo após muitas pesquisas, inovando a forma de diagnosticar enfermidades. Atualmente diversos tipos de amplificações do DNA podem ser feitos com esta técnica, dentre elas: PCR em tempo real, simples, nested, RT-PCR, multiplex entre outras. O processo da amplificação ocorre a partir de variações de temperaturas em microtubos fechados o que minimizam possíveis contaminações externas (FIGUEIREDO, 2008).

Com a técnica da PCR é possível identificar de forma específica, com alta sensibilidade e rapidez, o *Streptococcus agalactiae* em amostras coletadas nos órgãos de peixes como a Tilápia do Nilo, onde o processo de infecção se desenvolve, caracterizados geralmente por meningoencefalite ou as septicemias, envolvendo órgãos como encéfalo, rim cefálico, fígado e baço, que são responsáveis por partes das funções imunológicas por serem altamente vascularizados além de ser possível encontrar a bactéria (LEAL, 2011).

### 3.9 UTILIZAÇÃO DE VACINAS COMERCIAIS

O cultivo de Tilápias em sistemas intensivos tem aumentado no Brasil, com isso, produtores costumam investir na Tilapicultura devido às facilidades encontrada com os custos de produção. Porém, grande parte destes investidores não buscam orientações adequadas, nem contam com a supervisão de profissionais qualificados e a falta de atenção a esses fatos contribuem para a instalação de agentes patógenos no cultivo (KUBITZA, 2005).

O manejo pode ser considerado um dos fatores que tornam os peixes mais sensíveis às infecções bacterianas e a utilização de antibióticos na alimentação que leva resistência aos remédios utilizados, contribuindo para um ambiente propício ao desenvolvimento bacteriano. O aumento das produções e os prejuízos causados pelas bacterioses estimulam a utilização de vacinas na aquicultura, visando prevenir as enfermidades causadoras de alta mortalidade aos peixes (KUBITZA, 2008).

Diversos países produtores de tilápias já fazem a utilização de Imunoproteção. No Brasil essa prática vem sendo cada vez mais introduzida com os peixes a partir de 0,15 g, antes de iniciar a fase de engorda, fase em que as perdas dos peixes podem ocorrer principalmente se o animal não estiver vacinado, animais vacinados são vendidos por um preço (R\$ 0,55) diferente dos animais não vacinados (R\$ 0,12) (G1, 2017).

Os peixes podem ser vacinados através de injeção intraperitoneal, por imersão, mergulhando-os na solução de vacina diluída, ou por administração oral junto ao alimento. Estes métodos apresentam diferentes vantagens e desvantagens, sendo a vacina intraperitoneal considerada o método mais eficaz, seguro, e com menor efeito colateral devido à utilização de vacinas inativadas, consideradas seguras por não ocorrer a replicação, não gerando danos devido a liberação de toxina nos peixes, diminuindo os casos de mortalidade dos peixes (GOMES, AFONSO, GARTNER; 2006).

Outras alternativas para Imunoproteção profilática, vem sendo desenvolvida e estudada a imunização passiva, que pode apresentar proteção imediata, já que as imunoglobulinas são inoculadas diretamente na Tilápia, diferente da vacina ativada que requer um período de aproximadamente 28 dias para que a resposta imunológica seja produzida e estabelecida (FAGUNDES et al., 2016).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 CONDIÇÕES DO EXPERIMENTO

O projeto foi aprovado pela comissão de ética da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, registrado com o processo nº 23007.008642/2016-68. A pesquisa foi desenvolvida nas dependências da Universidade federal do Recôncavo da Bahia, sendo utilizados 144 alevinos da espécie Tilápia-do-Nilo revertidos sexualmente, oriundos de uma piscicultura comercial, Aquavale na fazenda vale do Juliana, no município de Ituberá-BA. Os animais não apresentaram sinais clínicos para a enfermidade estreptococose, além de não serem vacinados previamente contra a enfermidade. Foram alocados por um período 20 dias para que pudessem adquirir peso suficiente para serem vacinados e divididos nos tanques do experimento. Os peixes foram divididos em 12 tanques com capacidade para 250 litros cada, recebendo em cada unidade 12 peixes por tanque, estes foram cobertos por uma estrutura feita de lona, com pé direito de aproximadamente 2 metros, visando o controle da temperatura. Além de possuir aeração contínua para cada tanque, a renovação da água era realizada diariamente de fonte livre de cloro, era feita a sifonagem e a água residual era descartada em local separado. Os peixes eram alimentados duas vezes por dia por ração com 40% de proteína bruta. Foram mensurados também parâmetros de qualidade de água com médias de 1 ppm para amônia, o nível de pH em média 6. Estes procedimentos foram realizados no laboratório Aqua e NEPA, nas dependências da UFRB, adicionado hipoclorito de sódio para evitar contaminações.

## 4.2 PROCEDIMENTOS DE VACINA

A vacina utilizada foi adquirida comercialmente, específica para a prevenção contra a estreptococose, Aquavac Strep SA da fabricante MSD saúde animal, fabricada a partir de culturas inativadas de *Streptococcus agalactiae*, especificamente selecionadas para proteção contra o biotipo 2, composta por um adjuvante oleoso que facilita a absorção do fármaco pela tilápia. O material utilizado para a aplicação da vacina foram seringas estéreis de 1 ml, e a vacina foi devidamente agitada antes da utilização, mantida sobre refrigeração até o momento da aplicação.

## 4.3 INFECÇÃO EXPERIMENTAL

As tilápias passaram por mais um período de aclimatação de 10 dias, após atingirem o peso médio de 20g, os animais adquiriram peso suficiente para que a vacina pudesse ser aplicada de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante (MSD, 2014). Foi comprovada a ausência de estreptococose através do isolamento e identificação da bactéria, por meio de swabs do baço, rim cefálico e encéfalo em meio específico para o crescimento da bactéria, junto com as provas bioquímicas, estas análises foram realizadas no Laboratório de Doenças Infeciosas do Hospital Universitário de Medicina Veterinária, a partir da retirada de uma amostragem de 10 animais do acordo com SALVADOR (2008), retirados aleatoriamente para afirmar a ausência da enfermidade. Foi realizado também a CL 50, para a verificação da dose de infecção, de acordo com o realizado por SALVADOR (2008) e LONGHI et al (2012), na concentração  $1 \times 10^8 \text{ ml}^{-1} \text{ UFC}$ . Os peixes utilizados no experimento foram divididos em três tratamentos, o “ctrl” controle onde os animais receberam 0,05 ml de solução fisiológica estéril, “1 dose” neste tratamento foi injetado nos peixes 0,05 ml da vacina comercial utilizada em dose única e o último tratamento “2 doses” recebeu a primeira dose da vacina e após 10 dias recebeu mais uma dose reforço de 0,05

ml, cada tratamento foi repetido 4 vezes. Após a inserção dos animais nos tanques foi iniciado a pesquisa e no dia 1 foi realizada a primeira vacinação de todos os tratamentos, sendo o tratamento “ctrl” com 0,05 ml solução fisiológica e os tratamentos “1 dose” e “2 doses” com 0,05 ml da vacina, dez dias depois da primeira dose da vacina foi realizada o reforço da vacina no tratamento “2 doses” e os outros tratamentos “ctrl” e “1 dose” foram vacinados com doses de 0,05 ml de solução fisiológica. Depois de 20 dias após a realização da segunda vacinação, tempo em que espera-se que exista resposta humoral estabelecida, foi feito o desafio na dose 1 ml concentração de  $1 \times 10^8$  UFC: dose determinada pela CL50, 15 dias depois do desafio foi realizado a colheita e armazenamento através do congelamento das amostras do baço, encéfalo e rim cefálico, para a realização da extração de DNA e da PCR. Antes de cada procedimento os animais passaram por um jejum de 24 horas e foram anestesiados com a “solução mãe” contendo 9 ml de etanol 99% e 1 ml de eugenol. Desta solução foi utilizado de 1 a 2 ml em 3 litros de água, sendo adicionados gradativamente até que fosse observado os peixes em decúbito. As carcaças remanescentes do experimento foram descartadas, congeladas em refrigerador destinado a material biológico para descarte, e entregue a empresa responsável pela coleta de material biológico do HUMV.

#### 4.4 EXTRAÇÃO DO DNA PROTOCOLO FENOL CLOROFÓRMIO

A extração de DNA foi realizada nas amostras de 1 mm de tecido colhidas do baço, rim cefálico e encéfalo das tilápias, através de pinças e tesouras estéreis, armazenados em eppendorfs, e também foi realizada a extração do DNA das colônias de *Streptococcus agalcatiae* (ATCC 13013) cultivadas em ágar sangue para o controle positivo, de acordo com a metodologia de SAMBROOK (2001) com adaptações. As amostras foram agitadas em vortex, labnet VX-200, até que estivessem homogêneas, incubadas a 65°C por uma hora. Após este tempo, diminui-se a temperatura até 37°C, fez-se as centrifugações por aproximadamente 60 minutos, e após esta etapa foi possível visualizar um acúmulo de material genético ao fundo do tubo (Pallet). Após as lavagens,

acrescentou-se 50 µl de água ultra pura livre de DNase e RNase de acordo com o peso molecular do DNA do fragmento utilizado, e posteriormente o material foi armazenado a -20°C até a utilização.

#### 4.5 AMPLIFICAÇÃO (PCR)

Na amplificação do DNA dos controles positivos, feitos a partir das colônias e o do controle do negativo, amostras em DNA e as amostras de tecido dos peixes utilizados no experimento através do método fenol-clorofórmio, foram utilizados primers capazes de detectar sequências específicas do gene 16 S rDNA gene do *S. agalactiae*, o direto 5' GAGTTTGATCATGGCTCAG"3' e o reverso 5'ACCAACATGTGTTAATTACTC3',de acordo com (Marcusso *et al.*,2015). Para a realização da amplificação foi utilizado o PCR SuperMix da invitrogen com 22 U/ml Taq DNA polimerase, 22mM Tris-HCL, 55mM KCl, 1,65mM MgCl<sub>2</sub>, 220 µM dGTP, 220 µM Datp, 220 µM dTTP, 220 µM dCTP, deste mix foi utilizado 45 µl, 0,5 µl de primer direto, 0,5 µl de primer reverso e 4 µl de amostras de DNA resultado da extração e também da solução destinada ao controle negativo, totalizando 50 µl de volume total para a reação, valores estes que foram adaptados de acordo com os resultados obtidos na eletroforese. As condições para a realização da ciclagem na desnaturação foram 94°C, por 4 minutos seguidos por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento dos primers a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto e mais 5 minutos em extensão em termociclador ( BIODER®, Argentina) por um período total de 2 horas e 32 minutos, até o momento da eletroforese o material resultante da amplificação foi mantido congelado a - 20°C. O resultado da amplificação foi visualizado por eletroforese em gel de agarose a 1%(p/v) e corados com brometo de Etídio a 0,015%(p/v). A condições de corrida em gel foram de 30 volts por 1 hora e 30 minutos, visualizados após o tempo de corrida em foto documentador.

## 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na análise estatística dos dados foi considerado o modelo linear generalizado (GLM) para uma distribuição binominal com função de ligação probit. para distribuição Gaussiana com função de ligação de *identidade*. O modelo considerado no desenho experimental é descrito a seguir:

$$Prob_{ij} = \beta_0 + \beta_{1xi} + \varepsilon_{ij}$$

No qual;

$Prob_{ij}$  – Repetição;

$\beta_0$  - Constante (média) das probabilidades;

$\beta_1$  - Coeficiente que estima o efeito para a dose x;

$i$  - Vacina de 1 a 3 ( controle, 1 dose, 2 dose);

$\varepsilon_{ij}$  - Representa o vetor de erros aleatórios associados ao modelo.

Com uma confiabilidade de 95% e significância de  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

Através da extração de DNA pelo método fenol clorofórmio, a partir das amostras dos tecidos do baço, rim cefálico e encéfalo das tilápias, foi possível observar a extração do DNA (Figura 1).

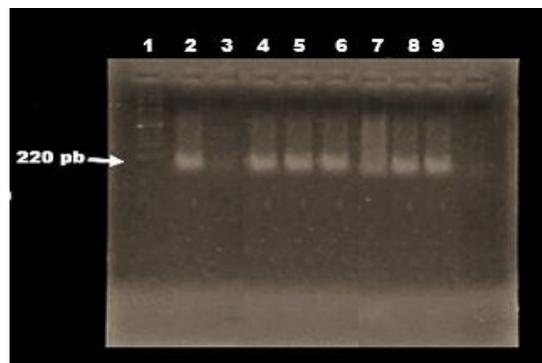
**Figura 1.** Eletroforese da extração de DNA dos tecidos das Tilápias



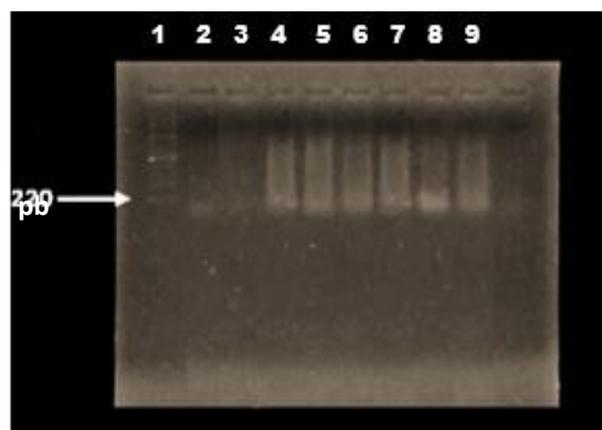
Dentre os DNAs extraídos dos tecidos dos peixes, foi possível extrair o material genético da bactéria *Streptococcus agalactiae*. Foi realizado a amplificação por meio de PCR das amostras que tiveram o DNA extraído pelo método fenol clorofórmio, juntamente com a realização da eletroforese em gel de agarose. As amostras correspondentes a amplificação do DNA da bactéria tiveram seu fragmento evidenciado, na mesma direção do ladder 220 igual ao 220 amplicons do *Streptococcus agalactiae* (ITSARO, SUANYUK, TANTIKITTI; 2012), é evidenciado (Figura 2), o peso referente a presença do material genético do *S. agalactiae* nas amostras pesquisadas nos tecidos onde a bactéria se fazia presente.

Foi possível detectar a amplificação do DNA do *S. agalactiae* em todos os órgãos analisados das Tilápias do controle (T1) (Figura 2, 3 e 4).

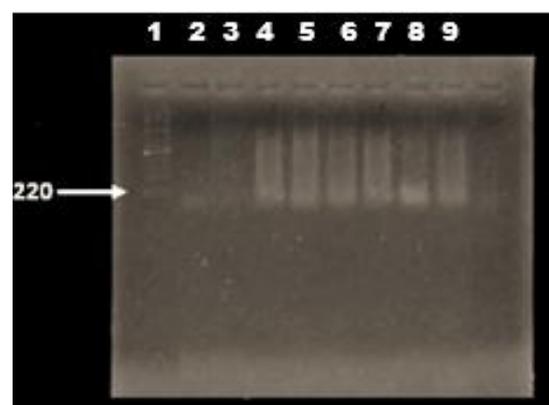
**Figura 2.** Amostra de Encéfalo de Tilápias (T1) poços 1-3 (Ladder, controle + e -); poços 4-9 (amostras analisadas).



**Figura 3.** Amostra do Rim cefálico de Tilápias T1 poços 1-3 (Ladder, controle + e -); poços 4-9 (amostras analisadas).

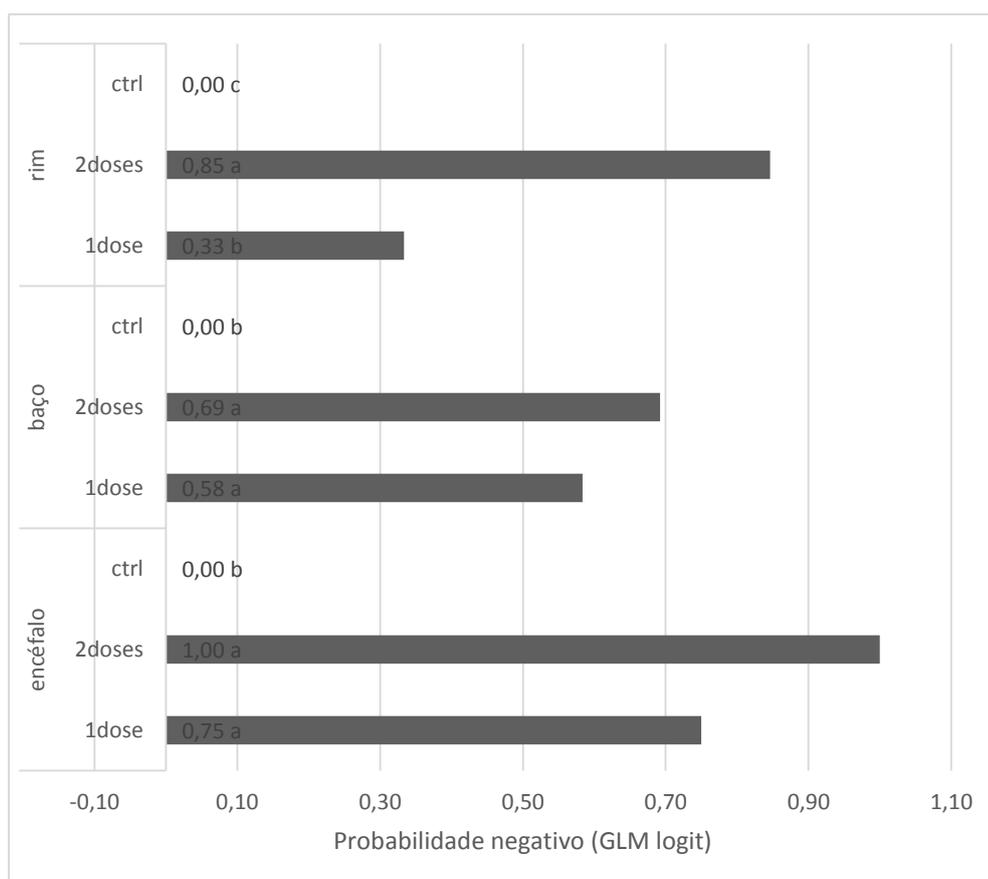


**Figura 4.** Amostra do Baço de Tilápias T1 poços 1-3 (Ladder, controle + e -); poços 4-9 (amostras analisadas).



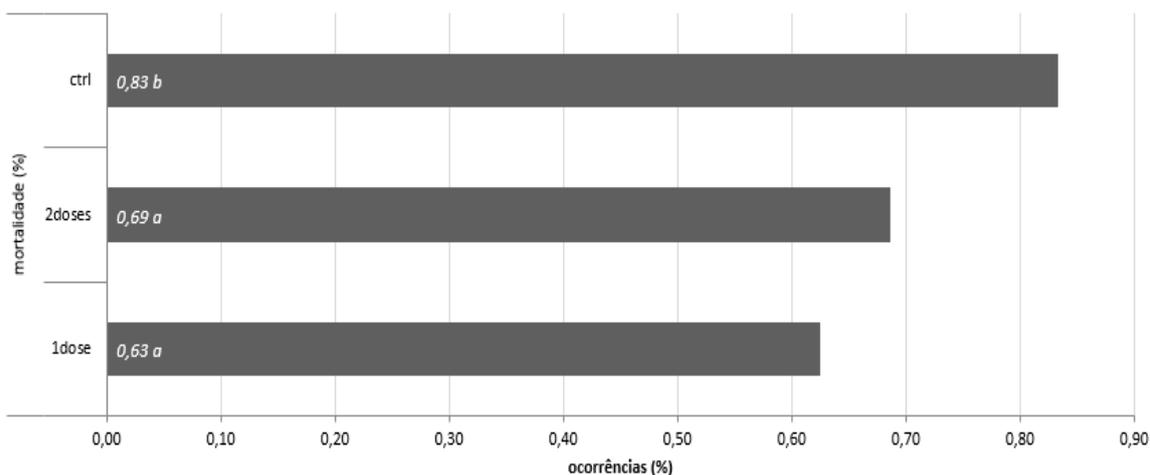
Nos tratamentos “1 dose” e “2 doses” também foi possível amplificar o material genético do *Streptococcus agalactiae*. No tratamento “2 doses” a amplificação do material genético não ocorreu em nenhum dos peixes do encéfalo, porém, pôde ser encontrada no rim cefálico e baço. No tratamento “1 dose” foi encontrado o DNA da bactéria em alguns dos órgãos. Estes resultados indicam que através da técnica da reação em cadeia da polimerase pode ser considerada uma técnica segura e eficaz, por diagnosticar a presença do patógeno de forma muito mais rápida do que outras técnicas como o isolamento e identificação, como demonstrado na Figura 5 abaixo:

**Figura 5.** Probabilidade de amostras dos órgãos analisados dos tratamentos T1 (ctrl) T2 (1 dose) e T3 (2 doses), negativas para a presença do *S.agalactiae*.



As Tilápias do tratamento “1 dose” e “2 doses” do experimento foram imunizadas com a vacina comercial já utilizada no mercado para a proteção contra estreptococose, foi observado a mortalidade de 63%(1 dose), 69%(2 doses) contra 83% nas tilápias pertencentes ao tratamento “ctrl”, logo, não houve diferença de acordo com a estatística entre os tratamentos “1 dose” e “2 doses”, com relação aos peixes analisados após o desafio como demonstrado no (Figura 6).

**Figura 6.** Índices em porcentagem da mortalidade das Tilápias com diferentes doses da vacina e do controle após o desafio com *S. agalactiae*.



A quantidade de amostras em que o DNA da bactéria estava presente entre o encéfalo e o baço dos peixes que receberam uma única dose da vacina e os que receberam 2 doses de reforço da vacina comercial, com exceção do rim cefálico, onde foi notado uma diferença entre a probabilidade de encontrar amostras negativas de 85% nas tilápias “2 doses” e 33% nas tilápias vacinadas com “1 dose”.

## 6 DISCUSSÃO

A extração de DNA do *Streptococcus agalactiae*, em muitos trabalhos é realizada após o isolamento e identificação das colônias com características da bactéria para posterior confirmação com primers através da amplificação em PCR e Swabs dos órgãos de Tilápias consideradas suspeitas, são feitos como nos trabalhos realizados por Scarpassa (2014), Marcusso et al. (2015), Glazunova et al. (2009).

No entanto, no presente estudo a extração diretamente do tecido de Tilápias suspeitas, com o método fenol clorofórmio, foi capaz de fornecer a extração de DNA do *S. agalactiae*, do mesmo jeito que se consegue a partir do isolamento feito após o período de incubação das amostras suspeitas. A técnica executada através do tecido torna a realização da PCR mais rápida diminuindo o tempo para a conclusão do Diagnóstico.

Marengoni (2006), também realizou a extração do DNA de Tilápias a partir de tecidos, considerando a rapidez e praticidade para conseguir o material genético, utilizando para lise a proteinase K e o método fenol/clorofórmio.

Os órgãos escolhidos para as análises condizem com os pesquisados de maior frequência no isolamento da bactéria encontrado por outros autores como Marcusso et al 2015; Itsaro, Suanyuk, Tantikitti 2012; Jiménez et al 2011; Jiménez et al 2007 e Chen et al, 2012.

Sebastião (2015), amplificou o DNA da bactéria, diretamente dos swabs das amostras de tecidos isoladas em placa, sem executar nenhum método de extração de DNA, ou utilização de kit para a extração, a partir da execução desta metodologia conseguiu uma boa amplificação e uma redução significativa nos custos para a realização.

Su *et al* (2016), também realizou a extração através de tecidos dentre eles o baço, como um dos órgãos utilizados no presente experimento, porém a extração foi feita a partir de um kit (Omega Bio-Tek), conseguindo uma boa amplificação e identificação da bactéria em uma PCR em tempo real, destacando a eficiência

deste tipo de reação e também chama atenção para a presença de peixes assintomáticos no plantel que podem se tornar uma fonte de contaminação de outros peixes saudáveis, e que, por ventura, não tenham sido imunizados.

De acordo com Longhi, Pretto-Giordano e Muller (2012), a vacinação inativada de *Streptococcus* ssp. em Tilápias-do-Nilo, apresenta alta eficácia nos animais vacinados, principalmente se feito de forma intraperitoneal. Suanyuk, Itsaro (2011), relataram uma maior produção de anticorpos, uma boa eficácia da resposta vacinal em animais vacinados de forma intraperitoneal, semelhante com o presente experimento em que pode-se observar uma melhor sobrevivência dos animais vacinados.

Segundo Pretto-Giordano et al. (2010), Tilápias vacinadas contra *S. agalactiae* com aplicação intraperitoneal inoculadas com duas doses de vacina apresentaram taxas de sobrevivência de 96,6% e os peixes inoculados com uma dose apresentaram taxas de sobrevivência de 83,6%, ressaltando a importância de preparar o sistema imunológico dos peixes para possíveis surtos de enfermidade que apresenta alta mortalidade e morbidade.

Itsaro; Suanyuk; Tantikitti (2012), utilizando amostras de tecidos conseguiram identificar o material genético da bactéria, comprovando a acurácia da PCR como técnica diagnóstica, mostrando-se uma ferramenta de diagnóstico específica na detecção de *Streptococcus agalactiae* em peixes, apresentando resultados positivos na detecção do patógeno a partir de amostras de tecidos.

Conforme Jiménez et al. (2007), a utilização de técnicas moleculares como a PCR tem ajudado na determinação das diferenças de gêneros e espécies bacterianas que acometem a tilapicultura em geral, utilizando genes específicos e apresentando uma especificidade de 100% para microrganismos de difícil isolamento como *S. agalactiae*.

Jafar et al. (2008), indicam a importância da utilização da biologia molecular na identificação correta dos patógenos causadores de enfermidades que acometem o plantel, pois, surtos associados as outras bacterioses como o *Lactococcus graviae* ou *Streptococcus shiloi*, que apresenta similaridade com *S. agalactiae*

pode ser associado a enfermidade enquanto o verdadeiro patógeno pode acabar sendo esquecido.

Segundo Harbi (2016), a estreptococose leva a graves prejuízos econômicos devido à alta mortalidade e morbidade. Utilizar um teste eficiente como a PCR que identifique rapidamente o agente causador pode contribuir para o aumento da produtividade, com uma prevenção adequada e um tratamento direcionado, fazendo com que a qualidade produtiva aumente.

Kannika et al., (2017), na Tailândia, realizou o isolamento de amostras de tilápias naturalmente infectadas e com sintomatologia clínica sugestiva e realizou o teste API 20 STREP onde encontrou 97% de peixes com a bactéria e também fez a confirmação e análise das amostras negativas através da PCR, encontrando 100% dos peixes com sintomatologia clínicas com a presença do material genético da bactéria em seus isolados. Ressaltando assim, a importância da utilização da biologia molecular para realização do diagnóstico preciso e da estreptococose e a vacinação como importante método para prevenção.

## 7 CONCLUSÃO

- Conclui-se que é possível realizar a extração do DNA da bactéria *S. aglactiae* diretamente dos tecidos (encéfalo, rim cefálico e baço) através do método fenol clorofórmio.
- Com a extração de DNA dos tecidos é possível conseguir uma boa amplificação através da PCR identificando a presença da bactéria nos tecidos.
- A vacina apresenta uma boa eficácia, quando os peixes são expostos a patógeno.

## REFERÊNCIAS

ANTONUCCI, M. C.; PAIVA P., E.; SALVADOR, R.; ZANONI, M. A., LOPERA-BARRETO, N. M.; PORTO, P. P. Fish consumers in the pioneer northern Region of the State of Paraná, **Semina: Ciências Agrárias**, v. 38, n. 1, p. 165-174, 2017.

BARBUIO, R. **Hematologia e histopatologia de Tilápias (*Oreochromis niloticus*) vacinadas e desafiadas com *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae***. 2013. 35f. Tese (Mestrado), Universidade estadual paulista, Jaboticabal, 2013.

BOSCOLO, W. R.; HAYASHI, C.; SOARES, C. M.; FURUYA, W. M.; MEURER, F. Desempenho e Características de Carcaça de Machos Revertidos de Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagens Tailandesa e Comum, nas Fases Inicial e de Crescimento, **Revista brasileira zootecnia**, v. 30, n.5, p. 1391-1396, 2001.

CHEN M.; LI L. P.; WANG R.; LIANG W. W.; HUANG Y.; LI J.; LEI A. Y.; HUANG W. Y.; GAN X. PCR detection and PFGE genotype analyses of streptococcal clinical isolates from tilapia in China, **Veterinary Microbiology**, v.159, p. 526–530, 2012.

FAGUNDES, L. C.; ETO, S. F.; MARCUSSO, P. F.; Fernandes, D. C.; Marinho-Neto, F. A.; Claudiano, G. S.; Salvador, R. Passive transfer of hyperimmune serum anti *Streptococcus agalactiae* and its prophylactic effect on Nile tilapia experimentally infected. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 2, p. 379-386, 2016.

FERREIRA, M. C.; Médici, K. C.; Alfieri, A. F.; Alfieri, A. A. Desenvolvimento e avaliação de um ensaio imunoenzimático para o diagnóstico sorológico da infecção pelo herpesvírus bovino 1. **Seminário, Ciência Agropecuária**, v. 26, n. 3, p. 363-372, 2005.

FIGUEIREDO, H. C. P.; CARNEIRO, D. O.; FARIA, F. C.; COSTA, G. M. *Streptococcus agalactiae* associado à meningoencefalite e infecção sistêmica em tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil, **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.4, p. 678-680, 2006.

FIGUEIREDO, H. C. P.; LEAL, C. A. G. Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes, **Revista Brasileira Zootecnia**, v.37, p. 08-14, 2008.

FRANCESCHINI, L. **Infecções parasitárias e microbianas na produção do pacu *Piaractus mesopotamicus* e do híbrido patinga procedentes da região Noroeste do Estado de São Paulo**, 2012, 91f. Tese (Mestrado), Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2012.

GLAZUNOVA, O. O.; RAOULT, D.; ROUX, V. Partial sequence comparison of the rpoB, soda, groEL, and gyrB genes within the genus *Streptococcus*.

**Institute Journal System Evolving Bacteriologic**, v. 59, n. 9, p. 2317-2322, 2009.

GODY, D. T. **Relações coloniais, genes de virulência e patogenicidade de *Streptococcus agalactiae* isolado de peixes**. 2011, 49f, Tese (Doutorado), Universidade federal de Lavras, Lavras, 2011.

GOMES, S.; AFONSO, A.; GARTNER, F. Vacinação em peixes contra infecções por espécies de *Streptococcus* e o caso particular da Lactococcose, **Revista Portuguesa Ciências Veterinária**, v.101, p. 25-35, 2006.

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.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, IBGE, Disponível em <http://agenciabrasil.ebc.com.br/economia/noticia/2016-09/producao-de-tilapia-aumenta-97-no-brasil-diz-ibge> acesso em: 19/ 11/ 2017.

ISMAIL, M. S.; SYAFIQ, M. R; SITI-ZAHRAH, A; FAHMI, S; SHAHIDAN, H; HANAN, Y; SAAD, M. Z. I. The effect of feed-based vaccination on tilapia farm endemic for streptococcosis. **Fish & shellfish immunology**, v. 60, p. 21-24, 2017.

IREGUI, C. A.; COMAS, J; VARQUEZ, G.M.; VERJAN, N. Experimental early pathogenesis of *Streptococcus agalactiae* infection in red tilapia *Oreochromis* spp. **Journal of Fish Diseases**, v. 39, n. 2, p. 205-215, 2016.

ITISARO, A.; SUANYUK, N.; TANTIKITTI, C. Multiplex PCR for simultaneous detection of *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus iniae* and *Lactococcus garvieae*: a case of *S. agalactiae* infection in cultured Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and red tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis mossambicus*), **Songklanakarín Journal of Science and Technology**, v.34, n.5, 495-500, Sep-Oct. 2012.

JAFAR Q. A.; SAMEER, A. Z.; SALWA, A. M.; SAMEE, A. A.; AHMED, A. M.; FAISAL, A. S. Molecular investigation of *Streptococcus agalactiae* isolates from environmental samples and fish specimens during a massive fish kill in Kuwait Bay. **African Journal of Microbiology Research**, v. 3, p. 022-026, Jan, 2008.

JESUS, L. S. F.; AZEVEDO, R. V.; CARVALHO, J. S. O.; BRAGA, L. G. T. Farellos da vagem da algaroba e da folha da mandioca em rações para juvenis de tilápia do Nilo mantidos em água salobra. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 12, n. 4, p. 1116-1125, 2011.

JIMÉNEZ, R. Enfermidad de tilapia em cultivo. **Edición de La Universidad de Guayaquil Facultad de ciência naturals**, Guayaquil, Equador, 108p 2007.

JIMÉNEZ, A.; TIBATÁ, V.; JUNCA, H.; ARIZA, F.; VERJAN, N.; IREGUI, C. Evaluating a nested-PCR assay for detecting *Streptococcus agalactiae* in red tilapia (*Oreochromis sp.*) tissue. **Aquaculture**, v. 321, n. 3, p. 203-206, 2011.

KANNIKA, K.; PISUTTHARACHAI, D.; SRISAPOOME, P.; WONGTAVATCHAI, J.; Kondo, H.; Hirono, A. N. Molecular serotyping, virulence gene profiling and pathogenicity of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia farms in Thailand by multiplex PCR. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, p. 1497-1507, 2017.

KAYANSAMRUJ, P.; DONG, H. T.; PIRARAT, N.; NILUBOL, D.; RODKHUM, C. Efficacy of  $\alpha$ -enolase-based DNA vaccine against pathogenic *Streptococcus iniae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 468, p. 102-106, 2017.

KUBITZA, F. Tilápia em água salobra e salgada: Uma boa alternativa de cultivo para, **Panorama de Acuicult**, v. 15, n. 88, p. 14-18, 2005.

KUBITZA, F. Tilápias na mira dos patógenos. **Panorama da aquicultura**, v. 18, p. 28-37, 2008.

KUBITZA, Fernando, A produção de Tilápia no Barsil, Portal Matsuda, 2017, disponível em:  
<<http://www.matsuda.com.br/Matsuda/Web/Entrevistas/detalhe.aspx?idnot=H12101114130328&lang=pt-BR>> acessado em: 25/05/2017.

LEAL, C.A.G. **Desenvolvimento e otimização de protocolos de PCR em tempo real para o diagnóstico de patógenos emergente para a aquicultura nacional**. 2012. 73f. Tese (Doutorado), Universidade federal de Lavras, Lavras, 2011.

LEIRA, M. H.; LAGO, A. A.; BOTELHO, H. A. M. C; CINCATO V. M. F. G. NASCIMENTO, A. F.; FREITAS, R. T. F. Principais Infecções Bacterianas na Criação de Peixes de Água Doce do Brasil – Uma revisão. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v. 3, n. 1, p. 44-59, 2016a.

LEIRA, M. H.; BRAZ Mirian Silvia; TANAKA Marcelo Stefanini; FRANSO Vanessa Soube; GARCIA Adriana Mello, Estreptococose nas pisciculturas de Lavras, Sul do Estado de Minas Gerais. **Nutritime**, v. 13, n 3, maio/jun, 2016b.

LI, W.;YOU-LU, S.; YONG-ZHAN, M.; YAN-WEI, L.; ZE- QUAN, M.; AN-XING, L. Comparative proteome analysis of two *Streptococcus agalactiae* strains from cultured tilapia with different virulence, **Veterinary Microbiology**, v.170, p 135–143, 2014.

LONGHI, E.; PRETTO-GIORDANNO, L. G.; MULLER, E.E. Avaliação da eficácia de vacina autóctone de *Streptococcus agalactiae* inativado aplicada por banho de imersão em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n.2, p. 3191-3200, 2012.

LONGHI, Elaine; PRETTO-GIORDANO, Lucienne Garcia; MÜLLER, Ernst Eckehardt. Effectiveness of homologous inactivated *Streptococcus agalactiae* vaccine by immersion bath in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 6Supl2, p. 3191-3200, 2013.

MA, Y. P.; KE, H.; LIANG, Z. L.; MA, J. Y.; HAO, L.; LIU, Z. X. Protective efficacy of cationic-PLGA microspheres loaded with DNA vaccine encoding the sip gene of *Streptococcus agalactiae* in tilapia. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 66, p. 345-353, 2017.

MARCUSSO, P. F.; FERNANDES, S. E.; FERNANDES, D. C.; SALVADOR, R. Imunologia das vacinas bacterianas em teleósteos: Revisão, **Revista de biologia e ciência da terra**, v.13, n. 2, 2º Semestre, São Paulo, 2013.

MARCUSSO, P. F. Resposta imune de **Tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) vacinadas contra *Streptococcus agalactiae***, 2014, 68f, Tese(Mestrado), Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2014.

MARCUSSO, P. F.; NETO, S. F.; CLAUDIANO, G. S.; VIEIRA, F. C. F.; SALVADOR, S.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R. Isolamento de *Streptococcus agalactiae* em diferentes órgãos de Tilápias-do-Nilo(*Oreochromis niloticus*) criadas em tanques rede, **Bioscience Journal**, v.31, n.2, p. 549-554, mar/apr, Uberlândia, 2015.

MARENGONI, N. G. Produção de Tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus*(linhagem Chitralada), cultivada em tanques-redes, sob diferentes densidades de estocagem, **Arquivo Zootecnia**, v.55 n.210, p.127-138, 2006.

MIAN, G. F.; GODOY, D. T.; LEAL, C. A. G.; YUHARA, T. Y.; COSTA, G. M.; FIGEIREDO, H. C. P. Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia, **Veterinary microbiology**, 136, p. 180-183, 2009.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA, MAPA, produção de tilápia cresce mais de 200% em dez anos no brasil, disponível em :<  
<http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2017/04/producao-de-tilapia-cresce-200-em-dez-anos-no-brasil>> acessado em 16/05/2017.

OLIVEIRA, R. P. C.; SILVA, P. C.; SILVA, R. F.; GOMES, J. P.; PADÚA, D. M. C.; SILVEIRA FILHO, P. R.; MACHADO, L. C.; AGUIAR, M. S., Avaliação econômica da produção da Tilápia-do-Nilo em tanques com diferentes esquemas de troca de água no sistema raceway, **Revista Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 11, n. 4, p. 760-763, out - dez. 2010.

OLIVEIRA, S. J. **Guia Bacteriológico prático**: microbiologia veterinária, Canoas: ULBRA , 2012.

OLIVEIRA, T, F. **Therapeutic efficacy of florfenicol against *Streptococcus agalactiae* infection in nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)**2016. 39 f. Dissertação (Mestrado em ciência animal). Universidade Federal de Minas Gerais. Minas Gerais. 2016.

PRETTO-GIORDANO, L. G.; MULLER, E. E.; FREITAS, J. C. D.; SILVA, V. G. D. Evaluation on the Pathogenesis of *Streptococcus agalactiae* in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 1, p. 87-92, 2010.

ROMERA, D. M.; GOZI, K. S.; SCHALCH, S. H.; AYROZA, L. M.; AYROZA, D. M.; LIMA, J. P.; GARCIA, F. Bactérias de Tilápias do Nilo criadas em tanque-rede nos reservatórios de canoas II. Disponível em <[http://www.pesca.sp.gov.br/11recip2013/resumos/11a\\_ReCIP\\_R56\\_179-181.pdf](http://www.pesca.sp.gov.br/11recip2013/resumos/11a_ReCIP_R56_179-181.pdf)> Acesso em: 06 de outubro de 2017.

SAMBROOK, J.; RUSSELI, D. W. Molecular cloning: a laboratory manual. third. **Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York**, 2001.

SALVADOR, R.; MULLER, E. E.; LEONHARDT, J. H.; PRETTO-GIORDANO, L. G.; DIAS, J. A.; FREITAS, J. C.; MORENO, A. M. Isolamento de *Streptococcus spp* de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*) e qualidade da água de tanques rede na Região Norte do Estado do Paraná, Brasil, **Revista Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 1, p. 35-42, jan./jun. 2003

SALVADOR, R. **Imunização e inflamação por *Streptococcus agalactiae* em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com ração suplementada com parede celular de *Saccharomyces cerevisiae***.2008.129f. Tese (Doutorado), Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

SCARPASSA, J. A. **Detecção molecular e isolamento de *Streptococcus agalactiae* em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com e sem sinais clínicos de doença bacteriana**. 2014, 54f. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

SEBASTIÃO, F. A. **Validação de técnicas moleculares para o diagnóstico de bactérias em peixes, visando redução de tempo e custo**. 2015, 107f. Tese (Doutorado), Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2015.

SHELBY, R. A.; SHOEMAKER, Craig A.; KLESIOUS, Phillip H. Detection of humoral response to *Streptococcus iniae* infection of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, by a monoclonal antibody-based ELISA. **Journal of Applied Aquaculture**, v. 12, n. 3, p. 23-31, 2002.

SOUZA, G. M.; LEITE, M. A. Custo de produção de piscicultura de espécie Tilápia no sistema intensivo de tanque rede. **Ciência em movimento**, v. 2, n. 2, p. 141-167, 2017.

SUHET, M.I. ***Streptococcus spp.* e *Aeromonas spp.* na água e em Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) parâmetros físicos-químicos da água de piscicultura em tanques-redes**.2011. 74f. Tese (Doutorado), Universidade estadual paulista, Jaboticabal, 2011.

SU, Y. L., Feng, J., Li, Y. W., Bai, J. S., & Li, A. X. Development of a quantitative PCR assay for monitoring *Streptococcus agalactiae* colonization

and tissue tropism in experimentally infected tilapia. **Journal of fish diseases**, v. 39, n. 2, p. 229-238, 2016.

WENDOVER, N.; AGUIRRE, M.; ZANOLO, R.; CERICATO, L.; WARDLE, R. Os Estreptococos em Tilápias: implicações para o desenvolvimento de vacinas e as experiências de campo na Ásia. In: Simpósio Doenças bacterianas em peixes de água quente: novas estratégias para o controle sustentável, Natal, 2011. **Anais**. Natal: MSD, p. 18-24, 2011.

**ARTIGO 1**

Artigo a ser enviado para a revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, cujas orientações encontram-se disponíveis em:

<http://www.scielo.br/revistas/abmvz/pinstruc.htm>.

## EXTRAÇÃO DE DNA EM TECIDOS DE TILÁPIAS DO NILO ATRAVÉS DO PROTOCOLO FENOL-CLOROFÓRMIO

DNA EXTRACTION IN NILO TILAPIA TISSUES THROUGH THE PHENOL-CHLOROFORM PROTOCOL

A. V. S. Jesus, R. B. Cerqueira,

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

### ABSTRACT

Streptococcosis is an important disease affecting the world-wide fish industry caused by *Streptococcus agalactiae*, one of the diseases that cause great economic losses in aquaculture, the developing diagnostic tools for its rapid identification has thus become need. The objective was carry out a DNA extraction by the chloroform phenol method, from the tissue of Tilapias for faster realization of molecular techniques. Was extracting the DNA from the bacterium through the phenol chloroform method, the tissue of Tilapia from the tissue of fish that had been vaccinated and challenged, *Streptococcus agalactiae* was visualized in the brain, cephalic kidney, spleen tissues observing the survival of the vaccinated animals against the control. Through extraction it was possible to amplify the DNA of Streptococcus directly from the tissue. All animals were challenged with the same amount and concentration of the bacteria, thus indicating that the vaccine was effective in fish succeeded in controlling the action of the virulence factors of the bacteria.

**Keywords:** streptococcosis, amplification, extraction fish DNA

### RESUMO

A estreptococose é uma doença importante que afeta a indústria pesqueira mundial, causada por *Streptococcus agalactiae*, uma das doenças que causam grandes perdas econômicas na aquicultura, tornando-se assim, a necessidade de desenvolver ferramentas de diagnóstico para sua rápida identificação. O objetivo foi realizar uma extração de DNA pelo método fenol clorofórmio, a partir do tecido de Tilápias para realização mais rápida das técnicas moleculares. Foi extraído o DNA da bactéria através do método fenol

clorofórmio, em fragmentos de tecidos de encéfalo, rim cefálico e baço de Tilápias que haviam sido vacinadas e desafiadas, contra *Streptococcus agalactiae*. Foi possível visualizar em tecidos como cérebro, rim cefálico e baço analisando a sobrevivência dos animais vacinados contra o controle. Através da extração, foi possível amplificar o DNA do *Streptococcus* diretamente dos tecidos que foram reservado para o estudo. Todos os animais foram desafiados com a mesma quantidade e concentração da bactéria, indicando que a vacina foi efetiva nos peixes, conseguindo controlar a ação dos fatores de virulência da bactéria.

**Palavras chaves:** estreptococose, amplificação, extração de DNA de peixes

### Introdução

A piscicultura nacional vem crescendo e se consolidando, tornando o Brasil um dos principais produtores na América Latina, dentre as espécies cultivadas destaca-se a Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), com uma produção média de 40 mil toneladas por ano (SALVADOR *et al.*, 2003). Este, número vem aumentando com o passar do tempo, por esta espécie ser importante, do modo de vista econômico, na aquicultura mundial e devido a vantagens como: textura, qualidade da carne e baixo custo com a produção, tornando-se atrativa para a aquicultura brasileira (OLIVEIRA *et al.*, 2010). A Tilápia é uma espécie considerada por se desenvolver rapidamente, adaptando a variedades de alimentos, além de sucesso produtivo em variados sistemas de criação (JESUS *et al.*, 2011). O uso dos peixes em sistema intensivo gera consequências como estresse, aumentando a susceptibilidade às enfermidades (LONGHI; PRETTO-GIORDANNO; MULLER, 2012). O *Streptococcus agalactiae* tem sido isolado em diversas espécies de peixes, sendo patógeno emergente na aquicultura que leva a septicemia, elevando o número de casos associados à infecção por estreptococose (FIGUEIREDO *et al.*, 2006). A biologia molecular pode ser usada no diagnóstico de bactérias com difícil isolamento *in vitro*, como o *Streptococcus sp*, garantido a eficiência do diagnóstico. A PCR pode ser utilizada de maneira eficaz para detectar a presença de patógenos em diferentes amostras, identificando o microrganismo a partir da extração de DNA dos tecidos onde se pretende pesquisar (FIGUEIREDO *et al.*, 2008). A utilização de técnicas para extração do DNA que facilitem e otimizem este processo, ajudam com o

rápido desenvolvimento do diagnóstico. O objetivo deste trabalho foi realizar a extração de DNA pelo método fenol clorofórmio, a partir do tecido de Tilápias para realização mais rápida das técnicas moleculares.

## MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, no Laboratório de Doenças Infecciosas do Hospital Universitário de Medicina Veterinária. Foram utilizadas 96 amostras de tecido como encéfalo, rim cefálico e baço de 31 Tilápias (*Oreochromis niloticus*) resultantes de um desafio após a aplicação de vacina comercial contra estreptococose. Depois de 15 dias pós desafio, os peixes remanescentes foram anestesiados com solução mãe contendo 9 ml de etanol 99% e 1 ml de eugenol, sendo utilizado 2 ml em 3 litros de água. Foram eutanasiados e as amostras de tecidos foram colhidas para a realização da extração de DNA. Concomitantemente, foi realizada a extração da cepa utilizada no desafio como controle positivos. A metodologia utilizada para a extração seguia o modelo aplicado por de acordo com a metodologia SAMBROOK (2001), com adaptações empíricas para a espécie em questão descrita abaixo. As amostras coletadas foram maceradas e adicionado 500 µl de STE (100 mM NaCl, 10 mM HCL, 1 mM) em pH 8; 30 µl de SDS 10%; 10 µl de proteinase K, foram agitadas e incubadas a 65°C a, por um período de uma hora, após este tempo diminuiu-se a temperatura até 37°C, foi adicionado fenol e clorofórmio na proporção 25:24 partes (p/v) agitado e centrifugado por 10 minutos à 13400 RPM. O material resultante é uma divisão da parte com os oligoelementos e a parte aquosa que corresponde ao material genético liberado. Em seguida a parte com o DNA foi separado 450 µl do sobrenadante em eppendorf e adicionado mais 400 µl de clorofórmio, para que o DNA fosse purificado. Centrifugou-se por mais 10 minutos à 13400 RPM e foi retirado do sobrenadante 400 µl e foram acrescentados 30 µl de acetato de sódio 3M e 1 ml de isopropanol, agitados e armazenado a -20°C por aproximadamente 16 horas. Após este período, o DNA foi centrifugado a 14 mil RPM por um período de 30 a 60 minutos. Ao final desta etapa, é possível visualizar um acúmulo de material genético ao fundo do tubo “pallet”, descartou-se o isopropanol com cuidado e foi adicionado 1 ml de etanol 70% gelado, foi novamente centrifugado e retirado o máximo de etanol, acrescentou-se 50 µl de água ultra pura livre de DNase e RNase o material foi armazenado a -20°C até a utilização.

## Resultado

Através da extração do DNA pelo método fenol clorofórmio, a partir das amostras de tecidos do baço, rim cefálico e encéfalo das Tilápias, foi possível extrair o material genético das células do peixe.

Dentre elas também foi possível extrair o material genético da bactéria *Streptococcus agalactiae*. Posteriormente, a presença do material genético 16sRNA de 220 pares bases nos tecidos das amostras onde foi realizado a extração foi confirmado através da amplificação por meio da PCR. Através da extração do DNA foi possível realizar a amplificação com volume de 50 µl total dos reagentes e amostra. Foi realizada a eletroforese em gel de agarose a 1 % a irradiação de luz ultra-violeta produzida pelo fotodocumentador em reação com brometo de etídio 1,5 µL.

## Discussão

A extração de DNA do *Streptococcus agalactiae* em muitos trabalhos é realizada após o isolamento e identificação das colônias com características da bactéria para posterior confirmação, juntamente com primers através da amplificação em PCR e Swabs dos órgãos de Tilápias consideradas suspeitas são feitos, como nos trabalhos realizados por SCARPASSA 2014, MARCUSSO *et al* (2015), GLAZUNOVA *et al* (2009).

No entanto, no presente estudo a extração diretamente do tecido de Tilápias suspeitas, com o método fenol clorofórmio, foi capaz de fornecer a extração de DNA do *S. agalactiae*, do mesmo jeito que se consegue a partir do isolamento feito após o período de incubação das amostras suspeitas. A técnica executada através do tecido torna a realização da PCR mais rápida, diminuindo o tempo para a conclusão do Diagnóstico.

Marengoni (2006), também realizou a extração do DNA de Tilápias a partir de tecidos, considerando a rapidez e praticidade para conseguir o material genético, utilizando para lise proteinase K e o método fenol/clorofórmio.

Os órgãos escolhidos para as análises condizem com os tecidos pesquisados de maior frequência no isolamento da bactéria encontrado por outros autores como Marcusso *et al* 2015; Itsaro, Suanyuk, Tantikitti 2012; Jiménez *et al* 2011; Jiménez *et al* 2007 e Chen *et al*, 2012.

Sebastião (2015), amplificou o DNA da bactéria diretamente de isolamentos em placa, sem executar nenhum método de extração de DNA ou utilização de kit para a extração,

e, a partir da execução desta metodologia, conseguiu uma boa amplificação e uma redução significativa nos custos para a realização.

Su et al (2016), também realizou a extração através de tecidos dentre eles o baço, como um dos órgãos utilizados no presente experimento, porém, a extração foi feita a partir de um kit (Omega Bio-Tek), conseguindo uma boa amplificação e identificação da bactéria em PCR em tempo real, destacando a eficiência deste tipo de reação e também chama a atenção para a presença de peixes assintomáticos no plantel que podem se tornar uma fonte de contaminação de outros peixes saudáveis, e que por ventura, não tenham sido imunizados.

### Conclusão

Conclui-se que é possível realizar a extração do DNA da bactéria *S. agalactiae* diretamente dos tecidos (encéfalo, rim cefálico e baço) em peixes contaminados, através do método fenol clorofórmio.

### Referências

SALVADOR, R.; MULLER, E.E.; LEONHARDT, J.H.; PRETTO-GIORDANO, L. G.; DIAS, J.A.; FREITAS, J.C.; MORENO, A.M. Isolamento de *Streptococcus spp* de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*) e qualidade da água de tanques rede na Região Norte do Estado do Paraná, Brasil, **Revista Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 1, p. 35-42, jan./jun. 2003.

OLIVEIRA, R. P. C.; SILVA, P. C.; SILVA, R. F.; GOMES, J. P.; PADÚA, D. M. C.; SILVEIRA FILHO, P. R.; MACHADO JÚNIOR, L. C.; AGUIAR, M. S., Avaliação econômica da produção da Tilápia-do-Nilo em tanques com diferentes esquemas de troca de água no sistema raceway, **Revista Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 11, n. 4, p. 760-763, out - dez. 2010.

JESUS, Louise Santos Fernandes; AZEVEDO, R. V., CARVALHO, J. S. O., BRAGA, L. G. T.. Farelos da vagem da algaroba e da folha da mandioca em rações para juvenis de tilápia do Nilo mantidos em água salobra. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 12, n. 4, p. 1116-1125, 2011.

LONGHI, Elaine; PRETTO-GIORDANO, Lucienne Garcia; MÜLLER, Ernst Ekehardt. Effectiveness of homologous inactivated *Streptococcus agalactiae* vaccine by immersion

bath in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 6Supl2, p. 3191-3200, 2013.

FIGUEIREDO, H.C.P.; CARNEIRO, D.O.; FARIA, F.C.; COSTA, G.M. *Streptococcus agalactiae* associado à meningoencefalite e infecção sistêmica em tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil, **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.4, p.678-680, 2006.

FIGUEIREDO, H.C.P.; LEAL, C.A.G. Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes, **Revista Brasileira Zootecnia**, v.37, p.08-14, 2008.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Molecular cloning: a laboratory manual. third. **Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York**, 2001.

SCARPASSA, J. A. **Detecção molecular e isolamento de *Streptococcus agalactiae* em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com e sem sinais clínicos de doença bacteriana**. 2014, 54f. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

GLAZUNOVA, O. O.; RAOULT, D.; ROUX, V. Partial sequence comparison of the rpoB, soda, groEL, and gyrB genes within the genus *Streptococcus*. **Institute Journal System Evolving Bacteriologic.**, v. 59, n. 9, p. 2317-2322, 2009.

MARENGONI, N.G. Produção de Tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus*(linhagem Chitralada), cultivada em tanques-redes, sob diferentes densidades de estocagem, **Arquivo Zootecnia**, v.55 n.210, 127-138, 2006.

**ARTIGO 2**

Artigo a ser enviado para a revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, cujas orientações encontram-se disponíveis em:

<http://www.scielo.br/revistas/abmvz/pinstruc.htm>.

## IDENTIFICAÇÃO DE *Streptococcus agalactiae* EM ÓRGÃOS DE TILÁPIAS DO NILO (*Oreochromis niloticus*) ATRAVÉS DA PCR

IDENTIFICATION OF *Streptococcus agalactiae* IN NILE TILAP ORGANS (*Oreochromis niloticus*) THROUGH PCR

A. V. S. Jesus, R. B. Cerqueira,

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

### ABSTRACT

Streptococcosis is an important disease affecting the world-wide fish industry caused by *Streptococcus agalactiae*, one of the diseases that cause great economic losses in aquaculture, the developing diagnostic tools for its rapid identification has thus become need. The objective was verify presence or absence of *S. agalactiae* bacteria in organs (brain, cephalic kidney, spleen) from tilapia immunized against streptococcus by the PCR technique, against different doses of the commercial vaccine used. Was extracting the DNA from the bacterium through the phenol chloroform method, the tissue of Tilapia from the tissue of fish that had been vaccinated and challenged, *Streptococcus agalactiae* was visualized in the brain, cephalic kidney, spleen tissues observing the survival of the vaccinated animals against the control. In the control, it was possible to amplify all the samples, in the other treatments T2 25%; 41,6% and 41,6% already in the T3 0%; 15,38%; 30,77% in the encephalus, kidney and spleen respectively, All animals were challenged with the same amount and concentration of the bacteria, thus indicating that the vaccine was effective in fish succeeded in controlling the action of the virulence factors of the bacteria.

**Keywords:** streptococcosis, amplification, molecular biology

### RESUMO

A estreptococose é uma doença importante que afeta a indústria pesqueira mundial, causada pelo *Streptococcus agalactiae*, esta enfermidade leva a grandes perdas econômicas na aquicultura, tornando-se necessário o desenvolvimento de ferramentas que auxiliem no diagnóstico para sua rápida identificação. O objetivo do presente estudo foi verificar a presença ou ausência de bactérias de *S. agalactiae* em órgãos (cérebro, rim cefálico, baço) de Tilápia imunizadas com a vacina comercial contra estreptococos pela

técnica de PCR. Foi extraído o DNA da bactéria através de tecidos dos peixes que haviam sido imunizados e o controle, por meio do método de fenol clorofórmio. O *Streptococcus agalactiae* foi visualizado em algumas das amostras, observando-se a amplificação de todas as amostras no controle e nos demais tratamentos T2 25%; 41,6% e 41,6% no T3 0%; 15,38%; 30,77% respectivamente, no encéfalo, rim e baço. Todos os animais foram desafiados com a mesma quantidade e concentração da bactéria, indicando que a vacina foi efetiva no peixe, conseguindo controlar a ação dos fatores de virulência da bactéria.

**Palavras Chaves:** estreptococose, amplificação, biologia molecular

### Introdução

A aquicultura brasileira cresce com os passar dos anos, levando o Brasil a se tornar um dos principais produtores na América Latina e um potencial criador a nível mundial, devido as suas reservas hídricas. Dentre as espécies cultivadas, a Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), ganha mais espaço por apresentar uma produção média de 40 mil toneladas por ano (SALVADOR *et al.*, 2003). O número aumenta com o tempo, por esta espécie ser importante na piscicultura e em virtude das suas características de textura, qualidade da carne e baixo custo com a produção, tornando-se atrativa para a economia brasileira (OLIVEIRA *et al.*, 2010). A tilápia tende a desenvolver-se rapidamente e adaptar-se bem em água doce ou aos diferentes níveis de salinidade. Acostuma-se a grandes variedades de alimentos, apresentando sucesso na produção em variados sistemas de criação (JESUS *et al.*, 2011). A utilização dos peixes em sistema intensivo, o manejo incorreto e o excesso de ração, gera consequências como estresse dos animais, diminuindo a resposta imunológica, aumentando a susceptibilidade às enfermidades (LONGHI; PRETTO-GIORDANNO; MULLER, 2012). O *Streptococcus agalactiae* tem sido isolado em diversas espécies de peixes, e é considerada um patógeno emergente na piscicultura mundial, levando às septicemias que podem afetar peixes de diferentes ambientes aquáticos, elevando cada vez mais os números de casos clínicos associados à infecção por estreptococose (FIGUEIREDO *et al.*, 2006). A biologia molecular vem sendo utilizada para diagnóstico de bactérias com difícil isolamento e identificação como o *Streptococcus* sp. A PCR pode ser utilizada de maneira eficiente, para detectar e inferir sobre a patogenicidade de diferentes amostras, identificando o microrganismo a partir da extração de DNA dos tecidos pesquisados (FIGUEIREDO *et al.*, 2008). Normalmente o tratamento das infecções causadas por estreptococose em peixes, é antibióticos a base de penicilina. Porém, podem ser deixados resíduos na carne e na água, contaminando o meio

e ajudando o microrganismo a criar mecanismos de resistência aos antibióticos, o que acaba dificultando tratamentos futuros e o combate a bactéria no plantel (ISMAIL, 2017). As vacinas a partir de células inativas, ativas ou a partir de compostos fitoterápicos através das técnicas de aplicação, auxiliam no controle e prevenção da estreptococose, que podem se instalar no cultivo das tilápias. A utilização destas vacinas tem gerado benefícios econômicos aos produtores, com uma redução na mortalidade que o estreptococo causa (LONGHI; PRETTO-GIORDANNO; MULLER, 2012). Com o trabalho objetivou-se analisar a presença da bactéria *S. agalactiae*, em Tilápias do Nilo, através da PCR após aplicação da vacina comercial específica contra estreptococose.

### **Material e Método**

Foram utilizados 144 alevinos da espécie tilápia (*Oreochromis niloticus*), revertidos sexualmente, oriundos de piscicultura comercial, no estado da Bahia. Os animais não apresentaram sinais clínicos para a enfermidade estreptococose, e não foram vacinados previamente contra a enfermidade. Os peixes foram divididos em 12 tanques com capacidade de 250 litros, recebendo em cada unidade 12 peixes por tanque. A cepa utilizada para realização do desafio e controle positivo da PCR foi cedida pela Fundação Oswaldo Cruz, de origem ATCC 13813, grupo B de Lancefield, cultivada em ágar Mueller Hilton enriquecido com sangue de ovino desfibrinado a 5%. A vacina específica utilizada para a prevenção contra a estreptococose foi a Aquavac Strep SA da fabricante MSD saúde animal. As tilápias passaram por aclimatação, os animais adquiriram peso suficiente para que a vacina pudesse ser administrada, acima de 15 gramas, de acordo com as instruções do fabricante (MSD SAÚDE ANIMAL, 2014). Foi comprovada a ausência de estreptococose através do isolamento e identificação da bactéria no Laboratório de doenças infecciosas do Hospital Universitário de Medicina Veterinária, UFRB, a partir de amostras de acordo com SALVADOR (2008), foi realizado a CL 50 de acordo com SALVADOR, (2008) e (LONGHI et al., 2012), na concentração  $1 \times 10^8$  ml<sup>-1</sup>UFC. Os animais foram divididos em três tratamentos, o T1 controle animais receberam 0,05 ml de solução fisiológica, T2 os peixes receberam 0,05 ml da vacina comercial utilizada em dose única como indicado pelo fabricante e o tratamento T3 recebeu a primeira dose da vacina como recomendado pelo fabricante, e após 10 dias recebeu mais uma dose reforço de 0,05 ml, cada tratamento foi repetido 3 vezes. Foi realizada a vacinação de todos os tratamentos, sendo o tratamento T1 com 0,05 ml solução fisiológica e os tratamentos T2 e T3 com 0,05 ml da vacina, dez dias depois da primeira

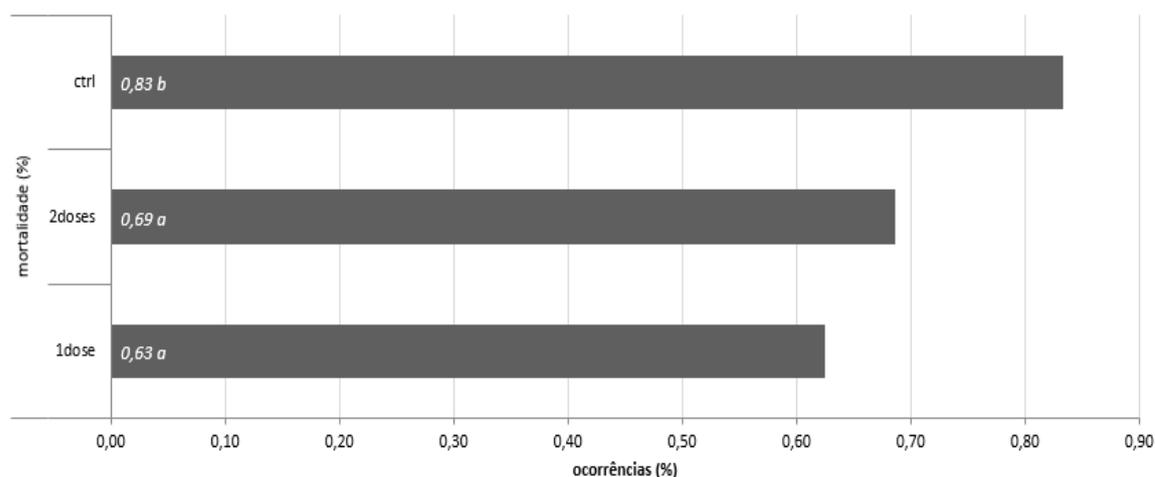
dose da vacina. Foi feita a segunda dose no tratamento T3 e nos outros tratamentos T1 e T2 com doses de 0,05 ml de solução fisiológica. Depois de 20 dias da vacinação, foi feito o desafio na dose 1 ml concentração de  $1 \times 10^8$  UFC, dose determinada com a CL50, 15 dias depois do desafio foi realizado a colheita das amostras do baço, encéfalo e rim cefálico, para a realização da PCR. Antes de cada procedimento os animais passaram por um jejum de 24 horas e foram anestesiados com a solução mãe contendo 9 ml de etanol 99% e 1 ml de eugenol. As amostras foram coletadas de forma asséptica, para a realização da extração do DNA e também foi realizado a extração do DNA das colônias de *Streptococcus agalactiae* (ATCC 13013) cultivadas para o controle positivo, através do método fenol clorofórmio de acordo com a metodologia SAMBROOK (2001). Foram utilizados primers capazes de detectar sequências específicas do gene 16 S rDNA gene do *S. agalactiae*, o direto 5' GAGTTTGATCATGGCTCAG'3' e o reverso 5'ACCAACATGTGTTAATTACTC3', para a realização da amplificação foi utilizado o PCR SuperMix da invitrogen® com 22 U/ml Taq DNA polimerase, 22mM Tris-HCL, 55mM KCl, 1,65mM MgCl<sub>2</sub>, 220 μM dGTP, 220 μM Datp, 220 μM dTTP, 220 μM dCTP, deste mix foi utilizado 45 μl, 0,5 μl de primer direto, 0,5 μl de primer reverso e 4 μl de amostras de DNA resultado da extração, totalizando 50 μl de volume total para a reação. Para a ciclagem as condições foram desnaturação 94°C, por 4 minutos seguidos por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento dos primers a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto e mais 5 minutos em extensão em termociclador (BIODER®). O resultado da amplificação foi visualizado por eletroforese em gel de agarose a 1% e corados com brometo de Etídio a 0,015%, por 30 V durante 1 hora e 30 minutos. A estatística dos dados foi considerada o modelo linear generalizado (GLM) para uma distribuição binomial com função de ligação probit. para distribuição Gaussiana com função de ligação de *identidade*, A com confiabilidade de 95% e significância de  $p < 0,05$ . O modelo considerado no desenho experimental é descrito a seguir:

$$Prob_{ij} = \beta_0 + \beta_{1x_i} + \varepsilon_{ij}$$

## Resultado

Por meio da extração de DNA pelo método fenol-cloroformio, foi possível extrair o material genético da bactéria *Streptococcus agalactiae* a partir do tecido da tilápia, confirmado através da amplificação por meio da PCR. As amostras foram coletadas nos peixes pertencentes ao controle (T1) e nos demais tratamentos que foram imunizados com a vacina comercial. Após o período de formação da resposta imune, os peixes foram desafiados com  $1 \times 10^8$  UFC e os remanescentes foram eutanasiados e os órgãos analisados para verificação da presença da bactéria nos tecidos (encéfalo, rim cefálico e baço). Foi possível detectar a amplificação do DNA do *S. agalactiae* em todos os órgãos analisados das Tilápias do controle (T1). Nos tratamentos 2 e 3 também foi possível amplificar o material genético do *Streptococcus agalactiae*, porém, só em alguns dos órgãos analisado (encéfalo, rim cefálico e baço). O presente trabalho indica que através da PCR, junto com a extração do DNA diretamente do tecido, é possível de forma rápida, se comparado com o isolamento e identificação, diagnosticar a presença do patógeno no plantel. As Tilápias do experimento foram imunizadas com vacina comercial utilizada no mercado para a proteção contra estreptococose, com mortalidade de 63% nos animais após o desafio, como demonstrado no (Gráfico 1).

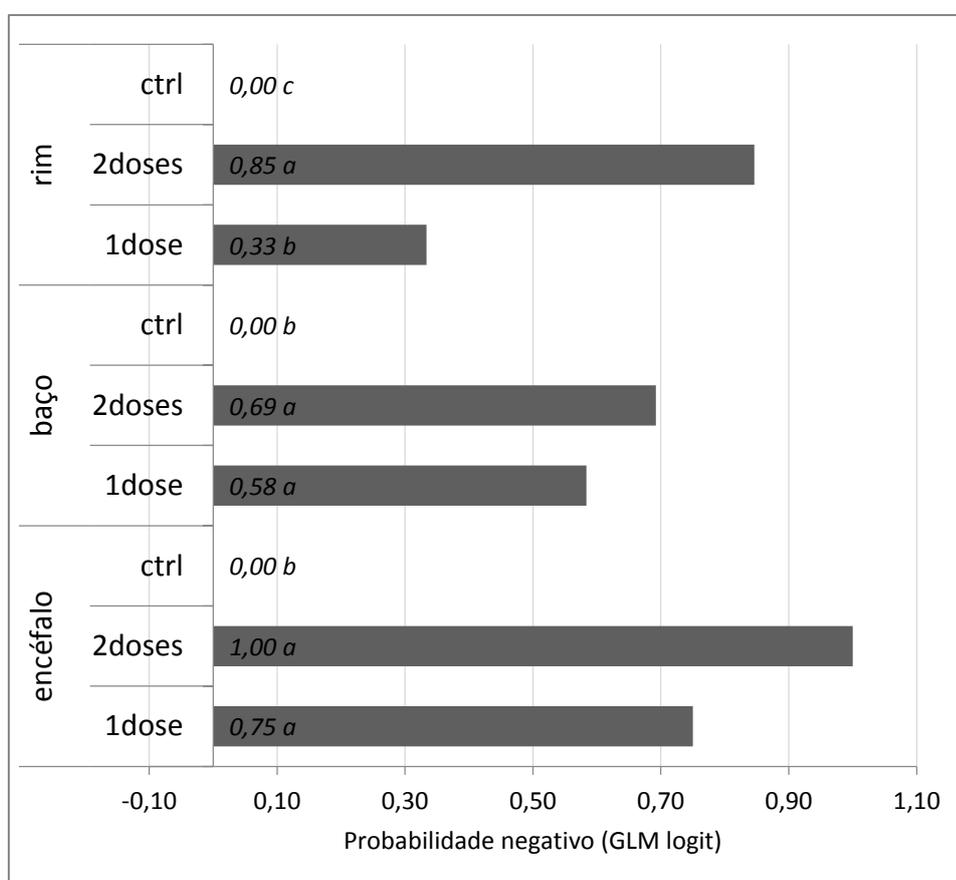
**Gráfico 1:** índices em porcentagem da sobrevivência e da mortalidade das Tilápias com diferentes doses da vacina e do controle após o desafio com *S. agalactiae*.



Os peixes do experimento, tratamento T2 e T3, foram vacinados com a vacina comercial nacional, própria para a proteção contra estreptococose, e o controle vacinado com

solução fisiológica. Nos animais vacinados foi possível observar que poucas amostras dos órgãos analisados das Tilápias encontraram-se à amplificação do material genético da bactéria nos peixes que permaneceram até o último dia do experimento. No tratamento T3 a probabilidades de encontrar amostras de rim cefálico negativas para a bactéria foram de 85% no baço 69% e no encéfalo 100%. Já no T2 e foi possível encontrar amostras negativas para o rim em 33% dos órgãos analisados, 58% no baço e 75% no encéfalo como indicado no (gráfico 2).

**Gráfico 2.** Probabilidade de amostra dos órgãos analisados dos tratamentos T1 (ctrl) T2 (1 dose) e T3 (2 doses), negativas para a presença da *S.agalactiae*.



Não houve diferença estatística (Gráfico 2) ( $p > 0,05$ ) na quantidade de amostras em que a bactéria estava presente entre o encéfalo e o baço dos peixes que receberam uma única dose da vacina e os que receberam a dose de reforço da vacina comercial aplicada de forma intraperitoneal, com exceção do rim cefálico onde foi notado uma diferença entre a probabilidade de encontrar amostras negativas de 85% nos peixes revacinados e 33% nas Tilápias vacinadas apenas uma vez. Indicando que o sistema imune dos peixes conseguiu debelar a ação dos fatores de virulência da bactéria.

## Discussão

De acordo com Longhi, Pretto-Giordanno e Muller (2012), a vacina inativada de *Streptococcus ssp.* em Tilápias-do-Nilo, apresenta alta eficácia nos animais vacinados, principalmente se for feito de forma intraperitoneal. SUANYUK, N.; ITSARO (2011), relataram uma maior produção de anticorpos, uma boa eficácia da resposta vacinal em animais vacinados de forma intraperitoneal, semelhante com o presente experimento em que pode-se observar uma melhor sobrevivência dos animais vacinados. A vacina AquacVac® STREP S.A se mostrou eficaz contra infecções agudas por Estreptococos em trabalhos experimentais realizados sobre condições de produção comercial. A vacinação dos peixes foi feita de forma intraperitoneal, onde foi observado o aumento da sobrevivência de 91,9% e 87,0% em animais vacinados contra 76,5% e 78%, dos animais não vacinados nas 2 fazendas analisadas. (MSD SAÚDE ANIMAL, 2012). Segundo Pretto-Giordanno *et al.* (2010), Tilápias vacinadas contra *S. agalactiae* com aplicação intraperitoneal inoculadas com duas doses de vacina apresentaram taxas de sobrevivência de 96,6% e os peixes inoculados com uma dose apresentaram taxas de sobrevivência de 83,6%, ressaltando a importância de preparar o sistema imunológico dos peixes para possíveis surtos da enfermidade que apresenta alta mortalidade e morbidade. ITISARO; SUANYUNK; TANTIKITTI, 2012, também utilizando amostras de tecidos, conseguiram identificar o material genético da bactéria, comprovando a acurácia da PCR como técnica diagnóstica, mostrando-se uma ferramenta de diagnóstico específica na detecção de *Streptococcus agalactiae* em peixes, apresentando resultados positivos na detecção do patógeno a partir de amostras de tecidos. Conforme Jiménez *et al.* (2007), a utilização de técnicas moleculares como a PCR tem ajudado no delineamento das diferenças de gêneros e espécies bacterianas, que acometem a tilapicultura em geral, utilizando genes específicos e apresentando uma especificidade de 100% para microrganismos de difícil isolamento como *S. agalactiae*. Jafar *et al.*, (2008), indicam a importância da utilização da biologia molecular na identificação correta dos patógenos causadores de enfermidades que acometem o plantel, pois surtos associados as outras bacterioses como o *Lactococcus graviae* ou *Streptococcus shiloi*, que apresenta similaridade com *S. agalactiae*, podem ser levados em consideração enquanto o verdadeiro patógeno pode acabar sendo negligenciado. Segundo Antonucci (2016), a estreptococose leva a graves prejuízos econômicos devido à alta mortalidade e morbidade. Utilizar um teste eficiente como a PCR, que identifique rapidamente o agente causador, pode contribuir para o aumento da

produtividade com uma prevenção adequada e um tratamento direcionado, fazendo com que a qualidade produtiva aumente. Kannika et al., 2017, na Tailândia, realizou o isolamento de amostras de tilápias naturalmente infectadas e com sintomatologia clínica sugestiva, e realizou o teste API 20 STREP, onde encontrou 97% de peixes com a bactéria e também fez a confirmação em análise das amostras negativas através da PCR, encontrando 100 % dos peixes com sintomatologia clínicas com presença do material genético da bactéria em seus isolados. Ressaltando assim, a importância da utilização da biologia molecular para realização do diagnóstico preciso da estreptococose e a vacinação como importante método para prevenção.

### Conclusão

Com a extração de DNA dos tecidos é possível conseguir uma boa amplificação através da PCR, identificando a presença da bactéria nos tecidos. A vacina apresenta uma boa eficácia, quando os peixes são expostos ao patógeno.

### Referência

ANTONUCCI, M. C.; PAIVA P., E.; SALVADOR, R.; ZANONI, M. A., LOPERA-BARRETO, N. M.; PORTO, P. P. Fish consumers in the pioneer northern Region of the State of Paraná, **Semina: Ciências Agrárias**, v. 38, n. 1, p. 165-174, 2017.

BARBUIO, R. **Hematologia e histopatologia de Tilápias (*Oreochromis niloticus*) vacinadas e desafiadas com *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae***. 2013. 35f. Tese (Mestrado), Universidade estadual paulista, Jaboticabal, 2013.

BOSCOLO, W.R.; HAYASHI, C.; SOARES, C.M.; FURUYA, W.M.; MEURER, F. Desempenho e Características de Carcaça de Machos Revertidos de Tilápias do Nilo(*Oreochromis niloticus*), linhagens Tailandesa e Comum, nas Fases Inicial e de Crescimento, **Revista Brasileira Zootecnia**, v. 30, n.5,1391-1396, 2001.

CHEN M.; LI L. P.; WANG R.; LIANG W. W.; HUANG Y.; LI J.; LEI A. Y.; HUANG W. Y.; GAN X. PCR detection and PFGE genotype analyses of streptococcal clinical isolates from tilapia in China, **Veterinary Microbiology**, v.159, p 526–530, 2012.

OLIVEIRA, S. J. **Guia Bacteriológico prático: microbiologia veterinária**, Canoas: ULBRA , 2012.

OLIVEIRA, T, F. Therapeutic efficacy of florfenicol against *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) 2016. 39 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal de Minas Gerais. Minas Gerais. 2016.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Molecular cloning: a laboratory manual. third. **Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York**, 2001.

SALVADOR, R.; MULLER, E.E.; LEONHARDT, J.H.; PRETTO-GIORDANO, L. G.; DIAS, J.A.; FREITAS, J.C.; MORENO, A.M. Isolamento de *Streptococcus spp* de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*) e qualidade da água de tanques rede na Região Norte do Estado do Paraná, Brasil, **Revista Ciências Agrárias**, Londrina, v . 24, n. 1, p. 35-42, jan./jun. 2003

SALVADOR, R. **Imunização e inflamação por *Streptococcus agalactiae* em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com ração suplementada com parede celular de *Saccharomyces cerevisiae***.2008.129f. Tese (Doutorado), Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

SCARPASSA, J. A. **Deteção molecular e isolamento de *Streptococcus agalactiae* em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com e sem sinais clínicos de doença bacteriana**. 2014, 54f. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

SEBASTIÃO, F. A. **Validação de técnicas moleculares para o diagnóstico de bactérias em peixes, visando redução de tempo e custo**. 2015, 107f. Tese (Doutorado), Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2015.

SHELBY, R. A.; SHOEMAKER, Craig A.; KLESZIUS, Phillip H. Detection of humoral response to *Streptococcus iniae* infection of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, by a monoclonal antibody-based ELISA. **Journal of Applied Aquaculture**, v. 12, n. 3, p. 23-31, 2002.

SOUZA, G. M.; LEITE, M. A. Custo de produção de piscicultura de espécie Tilápia no sistema intensivo de tanque rede. **Ciência em movimento**, v. 2, n. 2, p. 141-167, 2017.