

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

**MÉTODOS NÃO-LETAIS DE COLETA DE AMOSTRAS PARA
O DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO POR *Streptococcus agalactiae*
EM TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)**

Guilherme Campos Tavares

**Belo Horizonte
UFMG-EV
2014**

GUILHERME CAMPOS TAVARES

**MÉTODOS NÃO-LETAIS DE COLETA DE AMOSTRAS PARA O
DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO POR *Streptococcus agalactiae* EM TILÁPIA DO
NILO (*Oreochromis niloticus*)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção de grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Henrique César Pereira Figueiredo

Coorientador: Carlos Augusto Gomes Leal

**Belo Horizonte – MG
Escola de Veterinária da UFMG
2014**

T231m Tavares, Guilherme Campos, 1985-
Métodos não-letais de coleta de amostras para o diagnóstico de infecção por *Streptococcus agalactiae* em Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) / Guilherme Campos Tavares. – 2014.

48 p. : il.

Orientador: Henrique César Pereira Figueiredo

Coorientador: Carlos Augusto Gomes Leal

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.
Inclui bibliografia

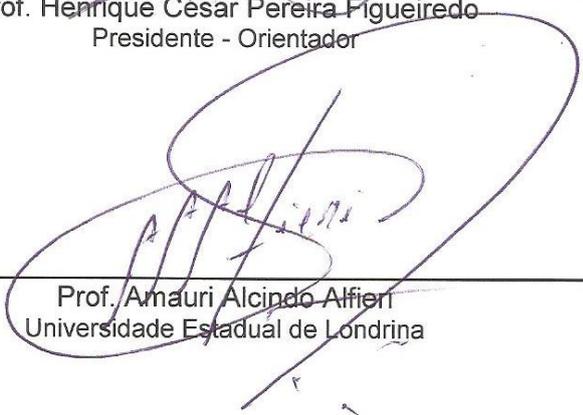
1. Tilápia (Peixe) – Doenças – Teses. 2. Tilápia (Peixe) – Criação – Teses.
3. Estreptococo do grupo B – Teses. I. Figueiredo, Henrique César Pereira. II. Leal, Carlos Augusto Gomes. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária.
IV. Título.

CDD – 639.31

Dissertação defendida e aprovada em 24 de janeiro de 2014, pela Comissão Examinadora constituída por:



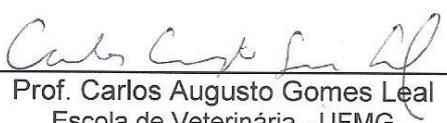
Prof. Henrique César Pereira Figueiredo
Presidente - Orientador



Prof. Amauri Alcindo Alfieri
Universidade Estadual de Londrina



Prof. Andrey Pereira Lage
Escola de Veterinária - UFMG



Prof. Carlos Augusto Gomes Leal
Escola de Veterinária - UFMG

*“O saber a gente aprende com os mestres e os livros.
A sabedoria, se aprende é com a vida e com os humildes”*

Cora Coralina

AGRADECIMENTOS

Minha busca, meus sonhos, minhas conquistas, foram plantados, inicialmente, dentro de mim e agradeço a Deus por proporcionar o crescimento de meus ideais.

Aos meus pais que me deram a vida e compartilharam de meus sonhos e alegrias, acalentaram-me nos momentos de dúvida e decepção, motivaram-me quando pensei que não seria possível e ensinaram-me a ter autoconfiança, mesmo em frente aos mais duros desafios.

Aos que amo: minhas irmãs e meus amigos do Tiradentes e da PUC. Agradeço por compreenderem minha ausência em vários momentos e por serem fonte de minha inspiração. Por compreenderem minhas falhas e limitações e por serem meus ouvintes mais prestimosos.

Aos colegas do AQUAVET que caminharam ao meu lado e dividiram comigo o mesmo ideal. Agradeço pelo apoio nos momentos de desesperança, pela palavra solidária, pelos trabalhos que realizamos juntos e pela felicidade que, se não compartilhada, torna-se ilusória.

Aos professores Henrique, Carlos, Raquel e Lilian, que além de me inculcaram conhecimento, detêm a capacidade de transformar minha mente através da sabedoria. Meu agradecimento sincero.

Aos amados peixes, fonte do meu maior aprendizado. Devoto a vocês o mais profundo respeito e amor.

E finalmente agradeço a todos, incluindo os não citados, que me ajudaram de alguma forma. Mesmo as críticas, as duras palavras foram úteis para que eu chegasse até aqui mais forte.

Encerro este capítulo tão importante de minha vida, confiante de que todo trabalho árduo foi válido e minha escolha profissional foi tomada baseada no amor aos seres vivos e assim persistirei.

SUMÁRIO

	LISTA DE TABELAS	08
	LISTA DE FIGURAS	09
	LISTA DE ABREVIATURAS	10
	RESUMO	11
	ABSTRACT	11
1.	INTRODUÇÃO	12
2.	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1.	Aquicultura.....	13
2.2.	Tilapicultura no Brasil e fatores predisponentes para a ocorrência de doenças.....	14
2.3.	Infecção por <i>Streptococcus agalactiae</i> em peixes.....	14
2.4.	Diagnóstico e Identificação de <i>Streptococcus agalactiae</i> em peixes.....	18
2.5.	Métodos não-letais de coleta de amostras para o diagnóstico de doenças infecciosas em peixes.....	19
3.	MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1.	Delineamento Experimental.....	21
3.2.	Animais Experimentais.....	22
3.3.	Padronização de métodos não-letais de coleta de amostras.....	22
3.3.1.	Métodos não-letais de coleta de amostras.....	23
3.3.1.1.	Biópsia Aspirativa de Rim Cranial.....	23
3.3.1.2.	Punção Venosa.....	23
3.4.	Avaliação da eficiência dos métodos letais e não-letais de coleta para a detecção de <i>Streptococcus agalactiae</i> em tilápia do Nilo.....	24
3.4.1.	Bactéria e condições de cultivo.....	24
3.4.2.	Infecção experimental.....	24
3.4.3.	Diagnóstico.....	24
3.4.3.1.	Exame bacteriológico.....	25
3.4.3.2.	PCR espécie-específica.....	25
3.4.3.2.1.	Extração de DNA.....	25
3.4.3.2.2.	PCR.....	25
3.4.4.	Análise estatística.....	25
4.	RESULTADOS	26
4.1.	Viabilidade, segurança e sobrevivência dos peixes submetidos aos métodos não letais de coleta de amostras.....	26
4.2.	Eficácia dos métodos não-letais de coleta de amostras para o diagnóstico de portadores e infecções subclínicas por <i>S. agalactiae</i> em tilápias do Nilo.....	26
4.2.1.	Infecção experimental.....	26
4.2.2.	Sensibilidade clínica dos diferentes métodos de diagnóstico.....	28
4.2.2.1.	Sensibilidade e especificidade das técnicas de diagnóstico.....	28
4.2.2.2.	Bacteriologia.....	29
4.2.2.3.	PCR.....	31
4.2.2.4.	Bacteriologia X PCR.....	32
5.	DISCUSSÃO	33
6.	CONCLUSÕES	40
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Resultados da bacteriologia e PCR obtidos durante a realização do experimento....	28
Tabela 2 -	Característica de performance da bacteriologia e PCR espécie-específica para a detecção de <i>Streptococcus agalactiae</i> a partir de amostras obtidas por métodos letais e não-letais.....	29
Tabela 3 -	Isolamento e detecção de <i>Streptococcus agalactiae</i> em tilápia do Nilo infectadas experimentalmente a partir de diferentes tecidos coletados e diagnosticado por bacteriologia e PCR.....	30
Tabela 4 -	Comparação de tecido cerebral com as amostras de rim (obtidas por método letal e não-letal) e sangue em tilápia do Nilo infectadas experimentalmente com <i>S. agalactiae</i> e detectadas por bacteriologia.....	30
Tabela 5 -	Comparação do tecido renal, obtido por método letal, com amostras obtidas por métodos não-letais em tilápias do Nilo infectadas experimentalmente com <i>S. agalactiae</i> e detectadas por bacteriologia.....	30
Tabela 6 -	Comparação das amostras obtidas por métodos não-letais em tilápias do Nilo infectadas experimentalmente com <i>S. agalactiae</i> e detectadas por bacteriologia.....	31
Tabela 7 -	Comparação de tecido cerebral com as amostras de rim (obtidas por método letal e não-letal) e sangue em tilápia do Nilo infectadas experimentalmente com <i>S. agalactiae</i> e detectadas por PCR espécie-específica	32
Tabela 8 -	Comparação do tecido renal, obtido por método letal, com amostras obtidas por métodos não-letais em tilápias do Nilo infectadas experimentalmente com <i>S. agalactiae</i> e detectadas por PCR espécie-específica	32
Tabela 9 -	Comparação das amostras obtidas por métodos não-letais em tilápias do Nilo infectadas experimentalmente com <i>S. agalactiae</i> e detectadas por PCR espécie-específica	32
Tabela 10 -	Comparação da bacteriologia de cérebro com as amostras obtidas por método letal e não-letal em tilápia do Nilo infectadas experimentalmente com <i>S. agalactiae</i> e detectadas por PCR espécie-específica.....	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Mapa do Brasil mostrando os estados onde <i>S. agalactiae</i> já foi isolado em peixes.....	16
Figura 2 -	Fluxograma de execução do experimento de padronização dos métodos não-letais de coleta de amostras em Tilápia do Nilo.....	21
Figura 3 -	Fluxograma de execução do experimento de infecção experimental para a detecção de <i>Streptococcus agalactiae</i> em tilápia do Nilo por bacteriologia e PCR espécie-específica.....	22
Figura 4 -	Procedimento de coleta de amostra de rim cranial por biopsia aspirativa em tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	23
Figura 5 -	Procedimento de coleta de sangue por punção venosa da veia caudal em tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	23
Figura 6 -	Tilápia do Nilo após ser submetida a biópsia aspirativa de rim cranial.....	26
Figura 7 -	Esfregaço de aspirado de rim cranial corado por panótico rápido e visualizado a 40x.....	26
Figura 8 -	Principais sinais clínicos observados em tilápias do Nilo infectadas experimentalmente com <i>S. agalactiae</i>	27

LISTA DE ABREVIATURAS

µL	Microlitro
µm	Micrometro
AQUAVET	Laboratório de Doenças de Animais Aquáticos, DMVP, EV-UFMG
BHI	Caldo Infusão cérebro coração
CEUA-UFMG	Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais
DL ₅₀	Dose letal 50%
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desorribonucleotídeo Trifosfatado
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético Sal dissódico
EUA	Estados Unidos da América
EV/UFMG	Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais
FAO	Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação
G	Gauge
H	Hora
hab.	Habitantes
HCl	Ácido clorídrico
Kg	Quilogramas
KOH	Hidróxido de Potássio
L	Litros
Mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitros
mM	Milimolar
Ng	Nanogramas
Nm	Nanômetro
°C	Graus centígrados
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
qRT-PCR	Reação da Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real
rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	Reação da Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia da Polimerase
<i>S. agalactiae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>S. dysgalactiae</i>	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>
<i>S. iniae</i>	<i>Streptococcus iniae</i>
THA	Agar Todd Hewitt
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
TSA	Agar Triptona de Soja
U	Unidades
UFC	Unidade Formadora de Colônia

RESUMO

A bactéria *Streptococcus agalactiae* tem se destacado como um dos principais agentes etiológicos de surtos de septicemia e meningoencefalite em pisciculturas ao redor do mundo. No Brasil, esse micro-organismo é um dos principais entraves sanitários para a tilapicultura. O objetivo deste estudo foi padronizar métodos não-letais de coleta de amostras para diagnosticar infecções por *S. agalactiae* em tilápias do Nilo, por meio de testes microbiológicos e moleculares. Para tanto, o estudo foi dividido em duas etapas. A primeira etapa consistiu na padronização dos métodos não-letais de coleta de amostras (biópsia aspirativa de rim cranial e punção venosa) em tilápias do Nilo. A segunda etapa consistiu na infecção experimental de tilápias do Nilo com a bactéria *Streptococcus agalactiae* SA 20-06, onde a sensibilidade clínica no exame bacteriológico e PCR foram comparadas a partir da obtenção de amostras por métodos letais e não-letais. Houve diferença estatisticamente significativa entre os métodos letais e não-letais para a detecção do patógeno para ambos métodos de diagnóstico. A frequência de diagnóstico foi significativamente maior para a detecção da bactéria em amostras de cérebro quando comparada com as demais amostras obtidas no experimento, independentemente do método de diagnóstico utilizado. Os métodos de coleta de amostras e de diagnóstico foram eficazes na detecção de peixes com doença clínica e portadores. Não houve diferença estatisticamente significativa entre bacteriologia e PCR para o diagnóstico de *S. agalactiae* a partir de amostras de cérebro. Os resultados obtidos sugerem que a biópsia aspirativa de rim cranial e a punção venosa podem ser usados como alternativas de coleta não-letal de amostras para a detecção de *S. agalactiae* em tilápia do Nilo, porém com desempenho inferior à bacteriologia de cérebro.

Palavras-chave: biópsia aspirativa de rim, punção venosa, coleta não-letal, *Oreochromis niloticus*, *Streptococcus agalactiae*.

ABSTRACT

Streptococcus agalactiae has emerged as a major etiological agent of septicemia and meningoencephalitis outbreaks in fish farms around the world. In Brazil, this microorganism is a major health threat for Nile tilapia farms. The aim of this study was to standardize nonlethal sampling methods to diagnose infections caused by *S. agalactiae* in Nile tilapia, by microbiological and molecular tests. Therefore, the study was divided into two stages. The first step consisted in standardization of nonlethal sampling methods (kidney needle biopsy and venipuncture) in Nile tilapia. The second step consisted in infection experimental in Nile tilapia with *Streptococcus agalactiae* SA 20-06 and clinical sensitivity in bacteriological and PCR methods were measured from nonlethal and lethal sampling methods. There was statistically significant difference between lethal and nonlethal methods for detection of pathogen for both diagnostic methods. Diagnostic frequency was significantly greater for bacteria in brain samples detection compared with other samples obtained in present study, regardless of diagnostic method. Sample collection methods and diagnosis were effective for detecting sick fish and carrier. There was no statistically significant difference between bacteriology and PCR for diagnosis of *S. agalactiae* from brain samples. Results suggest that kidney needle biopsy and venipuncture can be used as nonlethal sampling methods for detection of *S. agalactiae* in Nile tilapia, but with less that brain bacteriology results.

Keywords: kidney needle biopsy, venipuncture, nonlethal sampling, *Oreochromis niloticus*, *Streptococcus agalactiae*

1. INTRODUÇÃO

A aquicultura é o ramo da produção animal que mais tem se desenvolvido nos últimos anos no Brasil e no mundo. Essa atividade caracterizada pelo cultivo de organismos aquáticos, especialmente peixes, tem sido considerada importante e promissora fonte de proteínas de origem animal para o consumo humano. A produção aquícola nacional atingiu no ano de 2011 o total de 628.704 toneladas, tendo como principais espécies produzidas a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), o tambaqui (*Colossoma macropomum*) e o camarão marinho (*Litopenaeus vannamei*). A tilápia do Nilo é proveniente da África e foi introduzida no Brasil no século passado. Esses animais apresentam características zootécnicas e qualidade da carne propícias para o cultivo comercial. Porém um dos principais entraves para a expansão da tilapicultura no Brasil é a ocorrência de surtos de doenças infecciosas, principalmente as causadas por *Streptococcus agalactiae*.

A infecção por *S. agalactiae* é uma enfermidade emergente para a piscicultura mundial. Esse patógeno Gram-positivo é responsável por casos de septicemia e meningoencefalite em peixes, principalmente em espécies de água quente de ambientes estuarinos, marinhos e de água doce. Os casos de infecção por *S. agalactiae* são verificados principalmente em peixes adultos mas pode ser reproduzida experimentalmente em alevinos e juvenis de tilápia do Nilo. Os principais fatores de risco para a ocorrência de surtos de infecção por *S. agalactiae* são o aumento da temperatura, manejo intensivo e altas densidades de estocagem. A transmissão da estreptococose por *S. agalactiae* ocorre de maneira direta entre peixes infectados e sadios, e indireta, através da água. Surtos dessa doença podem causar mortalidade de até 90% dos plantéis, principalmente na introdução da doença na propriedade. Surtos de estreptococose por *S. agalactiae* em tilápia do Nilo foram relatados em 11 Estados

brasileiros pela equipe do AQUAVET – Laboratório de Doenças de Animais Aquáticos da Universidade Federal de Minas Gerais.

O diagnóstico da estreptococose é baseado no isolamento e identificação da bactéria por métodos fenotípicos e moleculares. O isolamento é realizado a partir de amostras de tecido do sistema nervoso central, rim, fígado e baço de peixes moribundos, após a eutanásia dos animais. A eutanásia de peixes é um procedimento inviável para realização em larga escala dentro de uma propriedade comercial e para a avaliação de reprodutores de alto valor zootécnico em programas de monitoramento da doença por causar prejuízo econômico ao produtor. Adicionalmente, a ocorrência de peixes portadores da infecção dentro de uma propriedade pode ser uma importante fonte de infecção. A detecção de peixes portadores é importante para evitar a manutenção do agente nas fazendas, transmissão da doença para outras propriedades e sua reintrodução através da aquisição de novos animais.

Os métodos de diagnóstico que têm sido utilizados para a detecção de *S. agalactiae* como bacteriologia e PCR espécie-específica, a partir de isolados obtidos de tecido cerebral e renal, são eficientes, porém não foram realizados estudos comprovando a eficácia do diagnóstico a partir de amostras coletadas por métodos não-letais. Não existem métodos não-letais de coleta de amostras padronizados para o diagnóstico da estreptococose em tilápias e para outras espécies de peixes. Assim sendo, a padronização de protocolos de diagnóstico envolvendo a coleta de amostras por métodos não-letais associados às técnicas de diagnóstico é uma demanda essencial de monitoramento da infecção por *S. agalactiae* para o desenvolvimento e implementação de futuros programas de controle e erradicação dessa doença em uma propriedade.

O objetivo desse estudo foi padronizar métodos não-letais de coleta de amostras (biópsia aspirativa de rim cranial e punção venosa) para o diagnóstico da infecção por *Streptococcus agalactiae* em tilápias do Nilo por bacteriologia e PCR espécie-específica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aquicultura

A produção de pescado mundial em 2010, segundo a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) ultrapassou 168 milhões de toneladas, incluindo a pesca e aquicultura. A aquicultura é o ramo da produção animal que mais tem se desenvolvido nos últimos anos no mundo, sendo uma alternativa de maior viabilidade para a crescente demanda por pescados (FAO, 2012; MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA, 2013).

O Brasil é uma das maiores potências mundiais para a produção de peixes, já que possui um imenso território, com mais de dois terços ocupando a região tropical e possuindo ricas bacias hidrográficas. Neste contexto, pode se destacar a Bacia Amazônica, que é responsável por aproximadamente 20% do total de água doce não congelada do mundo (BARROS *et al.*, 2009). Com o seu vasto litoral e inúmeros rios, o Brasil concentra uma das maiores reservas de peixes do mundo, sendo que em 2011, a produção aquícola e pesqueira alcançou volume superior a um 1,4 milhão de toneladas, sendo cerca de 44% de participação da aquicultura (628.704 toneladas) (MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA, 2013). A produção aquícola nacional vem crescendo em média 21,1% ao ano, e as principais espécies de peixes produzidas no Brasil são: tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), tambaqui (*Colossoma macropomum*), tambacu (*Colossoma macropomum x Piaractus mesopotamicus*), as carpas (*Cyprinus* sp.) e pacu

(*Piaractus mesopotamicus*) (MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA, 2013).

O Brasil ocupava em 2010 o 14º lugar no ranking mundial de produção aquícola, representando 0,8% da produção mundial (FAO, 2012). É o segundo país em importância na aquicultura América Sul, estando abaixo somente do Chile. Comparada às demais atividades nacionais, como a avicultura, suinocultura e bovinocultura, a aquicultura vem apresentando crescimento superior às demais atividades, que apresentam taxas de crescimento pouco maiores que 5% ao ano (OSTRENSKY *et al.*, 2007).

A carne de pescado é um importante alimento da dieta das populações de muitos países e contribui com cerca de um quarto da oferta de proteína de origem animal, além de ser fonte importante de emprego, lucro e renda em alguns países (SANTOS, 2011; GONÇALVES *et al.*, 2008). O incremento no consumo de pescado aumentou nas últimas décadas devido às diversas qualidades nutricionais benéficas, cada vez mais estudadas, que esta carne apresenta. Dentre tais qualidades estão, por exemplo, o alto teor proteico, a presença de vitamina A e D, íons importantes como cálcio e fósforo, os ácidos graxos insaturados como ômega 3 e 6, encontrado em algumas espécies e que estão relacionados à diminuição da incidência de doenças cardiovasculares (SANTOS, 2011; GONÇALVES *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2013).

Apesar das estatísticas mostrarem expansão do setor aquícola brasileiro, o consumo de pescado *per capita* não tem apresentado crescimento na mesma proporção, sendo a carne menos consumida no país (CARVALHO e LEMOS, 2009). O consumo *per capita* mundial em 2009 foi aproximadamente de 18,4 kg ao ano, dados mais recentes demonstraram que no Brasil, em 2010, houve consumo de, aproximadamente, 9,75 kg/hab./ano, sendo

que o recomendando pela Organização Mundial de Saúde (OMS) são 12 kg/hab./ano (FAO, 2012; MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA, 2013; OSTRENSKY *et al.*, 2007; SANTOS, 2011;). O consumo nacional de pescados é ainda baixo devido aos altos preços do produto final, aos hábitos alimentares da população, que valorizam o consumo da carne bovina e à falta de qualidade, diversidade e praticidade oferecidas pelos produtos comercializados nacionalmente (BOMBARDELLI *et al.*, 2005; OSTRENSKY *et al.*, 2007; SONODA, 2006).

2.2. Tilapicultura no Brasil e fatores predisponentes para a ocorrência de doenças

Dentre as espécies de peixes cultivados no Brasil, a que possui maior produção e importância na aquicultura nacional é a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Esta espécie, proveniente da África, foi introduzida no Brasil por apresentar rusticidade, grande adaptação a diferentes tipos de ambientes e sistemas de produção, ser resistentes a enfermidades, suportar variações de temperatura e baixos níveis de oxigênio dissolvidos na água, se reproduzir facilmente, ter rápido crescimento e baixo custo de produção, além de ser uma carne de excelente qualidade nutricional com elevado valor proteico (RODRIGUES, 2007).

A produção de tilápias em nosso país, em 2011, ultrapassou 253 mil toneladas/ano, sendo o Ceará e o Paraná os principais estados produtores. A expansão significativa dos cultivos de tilápia no Brasil é decorrente da utilização de tanques-rede nos grandes reservatórios nos Estados de São Paulo, Paraná, Bahia, Alagoas, Ceará e Minas Gerais (MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA, 2013).

Com a crescente popularização na tilapicultura em nosso país, observa-se aumento no número de produtores e maior

intensificação nos sistemas de produção. O mais antigo e tradicional sistema de produção praticado no Brasil é o da criação de tilápias em tanques escavados, sistema este, que apresenta disponibilidade de alimento natural associado ao maior espaço físico, conferindo a esta espécie maior conforto e resistência a enfermidades. O sistema intensivo em tanques-rede, porém, é o mais comum no território nacional, sendo caracterizado por criações de altas densidades e alta renovação de água (BOZANO e CYRINO, 1999). Neste sistema, as tilápias são submetidas a estresse físicos e ambientais derivados do manejo, seja por classificação, transferência ou transporte dos animais, além da baixa qualidade de água. O manejo inadequado, associado a uma baixa qualidade de água, resulta na queda de resistência do animal aos patógenos oportunistas e o aparecimento de doenças, inclusive as de origem bacteriana, associadas ao aumento da mortalidade e queda de produção (KUBITZA, 2005).

Um dos principais entraves para a expansão da tilapicultura no país é a ocorrência de surtos de doenças infecciosas, principalmente os causados por *Streptococcus agalactiae* (MIAN *et al.*, 2009; PEREIRA *et al.*, 2010). Essa bactéria ocasiona prejuízos significativos à produção, devido às altas mortalidades ocasionadas, bem como, redução no desempenho produtivo dos lotes e elevação do custo de produção das pisciculturas.

2.3. Infecção por *Streptococcus agalactiae* em peixes

Pertencente à família Streptococcaceae, o gênero *Streptococcus* abrange uma ampla gama de espécies bacterianas associadas a processos infecciosos em seres humanos e animais, bem como, micro-organismos saprófitos ou não patogênicos. Atualmente, 104 espécies e 20 subespécies bacterianas são descritas como pertencentes a esse gênero (LPSN, 2014). Os *Streptococcus* são cocos Gram-positivo, com diâmetro de 0,5-2,0 µm,

organizados em pares ou cadeia lineares curtas, catalase negativos, não móveis e não formadores de esporos (AUSTIN e AUSTIN, 2007). Além das características fenotípicas, o tipo de hemólise e a sorotipagem baseada na antigenicidade de polissacarídeos capsulares, denominados de Grupos de Lancefield, têm sido empregadas para caracterizar as diferentes espécies de *Streptococcus* (SHEWMAKER *et al.*, 2007).

Seis espécies têm sido descritas como os principais agente etiológicos causadores de septicemia e meningoencefalite em peixes: *Streptococcus parauberis* (DOMEÉNECH *et al.*, 1996), *Streptococcus agalactiae* (MATA *et al.*, 2004), *Streptococcus dysgalactiae* (NOMOTO *et al.*, 2004), *Streptococcus iniae* (AGNEW e BARNES, 2007), *Streptococcus phocae* (GIBELLO *et al.*, 2005; ROMALDE *et al.*, 2008), *Streptococcus ictaluri* (SHEWMAKER *et al.*, 2007). No Brasil, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* e *S. iniae* foram descritos como agentes causadores de septicemia e meningoencefalite em tilápia do Nilo (SALVADOR *et al.*, 2003; SALVADOR *et al.*, 2005; MIAN *et al.*, 2009; NOBREGA-NETTO *et al.*, 2011; FIGUEIREDO *et al.*, 2012).

S. agalactiae é uma das principais espécies bacterianas do gênero *Streptococcus*. Único representante do grupo B de Lancefield, tem importância médica e veterinária, e tem sido caracterizado como agente etiológico de doenças desde 1887 (BISHARAT *et al.*, 2004). Esta bactéria é β -hemolítica em ágar sangue e apresentam-se como células esféricas ou ovoides, Gram-positivo, catalase-negativo que crescem em cadeia em meio líquido e algumas linhagens podem produzir pigmento laranja ou amarelo. Bactéria imóvel, não formadora de esporos, anaeróbia facultativa e produz ácido láctico como produto final do metabolismo de carboidratos (NIZET, 2002; PEREIRA *et al.*, 2013).

S. agalactiae é um micro-organismo amplamente encontrado colonizando o trato digestório e genitourinário de seres humanos e animais (MAIONE *et al.*, 2005). Esta bactéria também pode ser encontrada na glândula mamária de ruminantes, ocasionando mastite (BROCHET *et al.*, 2006). Diferenças entre isolados de seres humanos e animais já foram descritas, sendo que a maioria das linhagens de seres humanos é hemolítica e não utiliza a lactose como fonte de energia. Porém, já foi descrito que linhagens isoladas de bovinos não produzem hemólise em ágar sangue e utilizam a lactose (YILDIRIM *et al.*, 2002). Adicionalmente, linhagens isoladas de peixes também já foram descritas como não hemolíticas (FIGUEIREDO *et al.*, 2006).

S. agalactiae acomete principalmente seres humanos, bovinos e peixes, mas pode também estar associada a casos de doenças em várias outras espécies, como por exemplo: aves, camelos, caninos, equinos, felinos, anfíbios, hamster, camundongos, primatas, golfinhos, crocodilos, camarões, dentre outros (KEEFE, 1997; BERRIDGE *et al.*, 2001; EVANS *et al.*, 2002; MAIONE *et al.*, 2005; EVANS *et al.*, 2006; BISHOP *et al.*, 2007; HASSON *et al.*, 2009). Esta bactéria é considerada a principal causadora de septicemia e meningite em neonatos humanos, responsável por morbidade em gestantes e idosos, além de causar óbito em adultos imunocomprometidos (MAIONE *et al.*, 2005; JOHRI *et al.*, 2006). Adicionalmente, quadros de mastite clínica e subclínica em bovinos são ocasionadas por esse patógeno, sendo impactante para a bovinocultura leiteira (KEEFE, 1997).

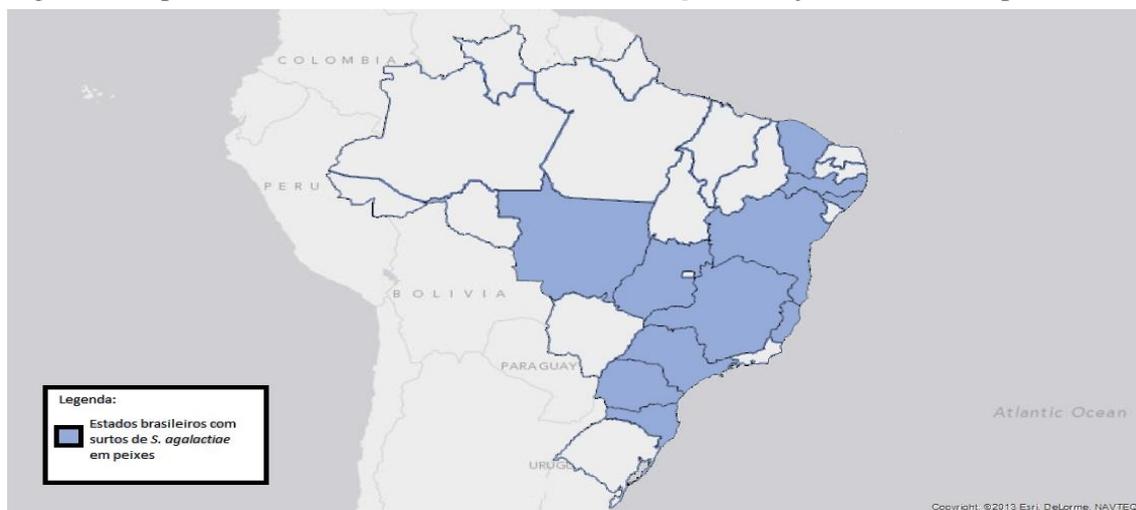
S. agalactiae tem se destacado como patógeno emergente para a piscicultura mundial, sendo relatados surtos no Japão, China, Vietnã, Tailândia, Kuwait, Irã, Israel, Egito, Austrália, Malásia, Indonésia, Filipinas, Irlanda, Estados Unidos, Honduras, Costa Rica, Colômbia e Brasil (AMAL *et al.*, 2012; BOWATER *et al.*, 2012; ELDAR *et*

al., 1994; EVANS *et al.*, 2002; EVANS *et al.*, 2008; HERNANDEZ *et al.*, 2009; MIAN *et al.*, 2009; PLUMB *et al.*, 1974; SUANYUK *et al.*, 2005; YE *et al.*, 2011; RUANE *et al.*, 2013). Taxas elevadas de morbidade e mortalidade são observadas em surtos por *S. agalactiae* em fazendas de peixes de água doce, marinhos e de ambiente estuarino (EVANS *et al.*, 2002; MIAN *et al.*, 2009). Casos de infecção por *S. agalactiae* foram descritas em mais de 20 espécies de peixes incluindo dourada (*Sparus auratus*), tainha (*Liza klunzingeri*), truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), sereia (*Trachinotus blochii*), pampo-prateado (*Pampus argenteus*), garoupa (*Epinephelus slanceolatus*), “golden shiner” (*Notemigonus crysoleucas*), menhaden-escamudo (*Brevoortia patronus*), “gulf killifish” (*Fundulus grandis*), “ya-fish” (*Schizothorax prenanti*), “doctor fish” (*Garra rufa*), “zebrafish” (*Danio rerio*), “barcoo grunter” (*Scortum barcoo*) pintado-da-amazônia (*Pseudoplatystoma facium x Leiarius marmoratus*) e tilápia (*Oreochromis* spp.) (ROBINSON e MEYER, 1966; PLUMB *et al.*, 1974; RASHEED e PLUMB, 1984; NOGA, 2000; EVANS *et al.*, 2002; DUREMDEZ *et al.*, 2004; SALVADOR *et al.*, 2003; HERNANDEZ *et al.*, 2009; AMAL *et al.*, 2012; BOWATER *et al.*, 2012; GENG *et al.*, 2012; ITSARO *et al.*, 2012; MIAN *et*

al., 2009; PATTERSON *et al.*, 2012; GODOY *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2013; RUANE *et al.*, 2013).

No Brasil, o primeiro relato de estreptococose por *S. agalactiae* em peixes foi em 2003, onde foram identificados surtos da doença em tilapiculturas no norte do Paraná (SALVADOR *et al.*, 2003). Desde então, infecções causadas por *S. agalactiae* foram relatadas em tilapiculturas nos estados do Paraná, São Paulo, Espírito Santo, Bahia, Minas Gerais e Ceará (FIGUEIREDO *et al.*, 2006; MIAN *et al.*, 2009). Segundo dados da casuística do AQUAVET, surtos de doenças em peixes também já ocorreram nos estados de Santa Catarina, Mato Grosso, Pernambuco, Alagoas e Goiás (Figura 1). *S. agalactiae* é considerado o principal risco sanitário para criações comerciais de tilápia do Nilo no país. Altas taxas de mortalidade têm sido verificadas em surtos da doença nesta espécie, sendo o aumento da temperatura da água (acima de 27°C) e manejo intensivo (altas densidades de estocagem) os principais fatores de risco para ocorrência de surtos por este patógeno (MIAN *et al.*, 2009). Medidas de manejo tais como processos de seleção e classificação também têm sido caracterizados como desencadeadores de surtos em tilápias do Nilo cultivadas em tanques-rede.

Figura 1. Mapa do Brasil mostrando os estados onde *S. agalactiae* já foi isolado em peixes



A transmissão da infecção por *S. agalactiae* ocorre por contato direto entre peixe infectado e peixe sadio, e por contato indireto, através da bactéria presente na água, permitindo que a doença se manifeste gradativamente nos diferentes sistemas de produção (KUBITZA, 2000; FIGUEIREDO *et al.*, 2007a). Os casos da infecção por *S. agalactiae* são comumente observados em peixes com peso corporal a partir de 50 gramas, acometendo principalmente adultos em fase da engorda, com peso médio de 500 gramas (FIGUEIREDO *et al.*, 2007a).

A infecção por *S. agalactiae* causa doença septicêmica, sendo capaz de invadir e multiplicar em diferentes órgãos do peixe acometido. Contudo, acredita-se que o cérebro seja órgão de predileção, por causar meningoencefalite que, conseqüentemente, culmina em sinais clínicos de natação errática e perda de equilíbrio. Outros sinais que podem ser observados em peixes infectados são: anorexia, melanose, taquipnéia, excitabilidade, rigidez dorsal, corpo levemente curvado, exoftalmia uni ou bilateral, opacidade de córnea uni ou bilateral, hemorragia difusa no tegumento e ascite (KUBITZA, 2000; EVANS *et al.*, 2002; PASNIK *et al.*, 2005 FIGUEIREDO *et al.*, 2007a; MIAN *et al.*, 2009). Internamente podem ser observados: acúmulo de líquido sero-sanguinolento na cavidade celomática, fígado pálido e esplenomegalia (KUBITZA, 2000). Em tilápia, as principais alterações observadas decorrentes da infecção por *S. agalactiae* são pericardite, epicardite, miocardite, endocardite, meningite e septicemia (CHEN *et al.*, 2007). Recentemente, casos crônicos de estreptococose tem sido reportados, em tilápias do Nilo com presença de nódulos amarelo ou vermelho escuro na musculatura próximo às vértebras. Esse achado clínico sugere que a bactéria seja eliminada do sangue e dos tecidos infectados pelo sistema imune do hospedeiro e que as bactérias remanescentes migrem para a musculatura

por ser uma região de resposta imunológica fraca (LI *et al.*, 2013).

A antibioticoterapia oral em peixes é um dos principais métodos para controle de infecções por *S. agalactiae*. No Brasil, os antibióticos a base de florfenicol e oxitetraciclina podem ser utilizados para conduzir uma intervenção terapêutica em surtos dentro de uma piscicultura comercial (PADUA *et al.*, 2012). A administração de florfenicol é efetivo contra diversos tipos de bactérias e possui boa estabilidade na água, porém não há dados avaliando a eficácia deste fármaco contra a infecção por *S. agalactiae* em tilápia do Nilo (FIGUEIREDO *et al.*, 2007b). O antibiótico a base de Oxitetraciclina é amplamente utilizado em pisciculturas brasileiras e possui eficácia contra bactérias Gram-positivo e Gram-negativo (RIGOS *et al.*, 2003). Em estudos realizados pela equipe do AQUAVET foi avaliada a eficácia terapêutica da oxitetraciclina contra infecção por *S. agalactiae*. Este antibiótico reduziu significativamente a mortalidade de alevinos de tilápia do Nilo que iniciaram a administração do fármaco 24 horas antes da infecção, uma e 24 horas pós-infecção quando comparados ao grupo que não utilizou o antibiótico. Apesar da redução da mortalidade, foi possível reisolar a bactéria em amostras de cérebro e rim de peixes aparentemente saudáveis dos grupos tratados com o antibiótico, o que caracteriza estado de portador da infecção. Em outras palavras, o antibiótico pode não controlar a infecção e a bactéria pode permanecer viável nos diferentes órgãos do peixe, resultando na manutenção do patógeno numa piscicultura (FARIA, *et al.*, 2014). Adicionalmente, como a anorexia é uma das primeiras alterações fisiológicas induzidas pela infecção, a antibioticoterapia é limitada, pois, evita a ocorrência da doença em peixes não infectados, elimina a doença nos peixes com quadro inicial de infecção, porém não cura os peixes com sinais clínicos (HEUER *et al.*, 2009).

O controle da infecção por *S. agalactiae* pode ser realizado através da manutenção adequada das condições ambientais, realização de tratamentos táticos com antibióticos, descarte de animais mortos e/ou com sinais clínicos de doença neurológica, arraçamento adequado e realização de testes laboratoriais para certificar que os peixes estão isentos deste agente bacteriano (KUBITZA, 2000; FIGUEIREDO *et al.*, 2007b). A vacinação é uma alternativa para a prevenção e controle das infecções por *Streptococcus* nas pisciculturas. Diversas vacinas têm sido desenvolvidas contra diferentes *Streptococcus* patogênicos para peixes, sendo que, atualmente, no mundo já existem vacinas comercializadas contra *S. iniae* e *S. agalactiae* (SHOEMAKER *et al.*, 2010). No Brasil, foi lançada a vacina bacterina AQUAVAC Strep Sa, pela MSD Saúde Animal, a qual está sendo comercializada desde 2012. Em ensaios experimentais, essa bacterina demonstrou ser segura e capaz de induzir efetiva proteção em tilápia do Nilo desafiadas com *S. agalactiae* biotipo II (SALVADOR, 2012). Porém, ainda há necessidade de mais estudos sobre as relações entre variabilidade genética, perfil antigênico e capacidade de proteção contra desafio heterólogo induzido por essa vacina. Portanto, esta vacina comercial deve ser testada frente as várias outras amostras de bactérias isoladas no país para melhor verificação da sua efetividade.

2.4. Diagnóstico e Identificação de *Streptococcus agalactiae* em peixes

O diagnóstico e a identificação do agente infeccioso podem ser realizados através da associação de sinais clínicos com os achados laboratoriais. Devido à ampla gama de hospedeiros susceptíveis e sinais clínicos genéricos verificados nos casos de infecções em peixes pelas diferentes espécies do gênero *Streptococcus*, o diagnóstico laboratorial é indispensável para a determinação do agente etiológico envolvido (MATA *et al.*, 2004; FIGUEIREDO e LEAL, 2012). O

diagnóstico de estreptococose por *S. agalactiae* em peixes é baseado no isolamento e identificação do microorganismo. Peixes moribundos devem ser coletados e encaminhados vivos ou refrigerados para os laboratórios de diagnóstico (FIGUEIREDO *et al.*, 2007a). Os órgãos de predileção para a coleta de material para a realização de exames bacteriológicos variam de acordo com a doença e bactéria associada ao processo. Em geral, doença causada por *S. agalactiae* está associada a quadros de septicemia e meningoencefalite, sendo indicados a coleta do sistema nervoso central e órgãos altamente vascularizados ou que desempenham funções imunológicas, como rim, fígado e baço (NOGA, 2000).

No laboratório, o diagnóstico pode ser realizado por bacteriologia ou por métodos moleculares (KUBITZA, 2000; FIGUEIREDO *et al.*, 2007a). O diagnóstico da infecção por *S. agalactiae*, em peixes afetados tipicamente envolve análise bacteriológica com posterior identificação, porém isso requer tempo para definição do diagnóstico, resultando no incremento do potencial para o surto da doença (EVANS *et al.*, 2010; ITSARO *et al.*, 2012). A bacteriologia é realizada a partir do cultivo de órgãos coletados de forma asséptica em meios de cultivo como ágar sangue, ágar BHI (“Brain Heart Infusion”), TSA (Tripton de Soja) e THA (Todd-Hewitt). Após o período de incubação, a identificação primária do agente infeccioso é baseada na avaliação da morfologia das colônias por microscopia óptica (coloração pelo método de Gram), tipo de hemólise, padrão de antígenos capsulares (grupo de Lancifield) e testes bioquímicos (catalase e oxidase, por exemplo) (GLAZUNOVA *et al.*, 2009). A utilização de kits comerciais para identificação fenotípica de *Streptococcus agalactiae* como o RAPID32 e API 20 Strep apresentam boa aplicabilidade, acurácia na análise e economia do tempo (FIGUEIREDO e LEAL, 2012). Com o desenvolvimento e popularização de técnicas moleculares para

identificação de micro-organismos e diagnóstico de doenças, foi possível a realização de reações de PCR para identificação de *S. agalactiae* com iniciadores espécie-específicos ou universais para genes conservados associadas ao sequenciamento e à análise filogenética (AGNEW e BARNES, 2007).

Para que um laboratório de diagnóstico possa identificar adequadamente a bactéria *Streptococcus agalactiae* é preciso que haja uma combinação dos métodos fenotípicos, como o uso de kits de caracterização bioquímica, prova sorológica para determinação do Grupo Lancefield, e de métodos moleculares que permitam a realização de PCR e o sequenciamento do DNA para a construção de árvores filogenéticas (FIGUEIREDO e LEAL, 2012).

2.5. Métodos não-letais de coleta de amostras para o diagnóstico de doenças infecciosas em peixes

O diagnóstico da infecção por *Streptococcus agalactiae* é baseado no isolamento e identificação da bactéria por métodos fenotípicos e moleculares, sendo o isolamento realizado a partir de amostras de tecidos de peixes doentes após a eutanásia destes (FIGUEIREDO e LEAL, 2012). Porém, a eutanásia de animais para monitoramento sanitário é inviável para realização em larga escala e para a avaliação de reprodutores (CUTRIN *et al.*, 2005), que podem ser fontes de infecção importantes na dinâmica epidemiológica da doença nas pisciculturas. Procedimentos envolvendo métodos não-letais de coleta de amostras e testes microbiológicos e moleculares têm sido utilizados para diagnosticar infecções virais (GAHLAWAT *et al.*, 2004; DRENNAN *et al.*, 2007; CORNWELL *et al.*, 2013) e doenças bacterianas (NOGA *et al.*, 1988; CIPRIANO, *et al.*, 1996; WHITE *et al.*, 1996; ALTINOK *et al.*, 2001) em reprodutores e alevinos de diferentes espécies de peixes. Esses métodos geralmente são

usados para o diagnóstico de infecções crônicas e envolvem a coleta de fluidos corporais, produtos de excreção, sangue e outros tecidos como pele, escamas, e nadadeiras (WASKO *et al.*, 2003). Porém muitos patógenos não são encontrados nos fluidos como são nos órgãos internos (NOGA *et al.*, 1988).

As vantagens dos métodos não-letais de coleta de amostras para detectar patógenos de peixes incluem benefícios econômicos de não ter que submeter à eutanásia um reprodutor de alto valor zootécnico dentro de um lote, potencial para aumentar o número de amostras para tentar detectar baixos níveis de infecção, habilidade para avaliar a doença em espécies ameaçadas de extinção, permitir a utilização de um mesmo animal em diferentes momentos de coleta e beneficiar o bem-estar animal com a redução do número de peixes submetidos à eutanásia (QUINN e STEVENSON, 2012; CORNWELL *et al.*, 2013).

A coleta de amostra é um fator crítico para a acurácia do diagnóstico. Se a amostra não for coletada adequadamente ou se a manipulação desta após a coleta for inapropriada ou não enviada adequadamente ao laboratório de diagnóstico, os resultados dos testes podem não refletir o status de doença do peixe amostrado (ZAINATHAN *et al.*, 2013).

Os principais métodos não-letais de coleta de amostras utilizadas para o diagnóstico de doenças infecciosas em peixes envolve punção venosa e biópsias (NOGA *et al.*, 1988; ALTINOK *et al.*, 2001; CORNWELL *et al.*, 2013).

A punção venosa é um método comum de coleta de amostra utilizada para realização de testes bioquímicos e hormonais em peixes, inclusive em tilápias do Nilo. Adicionalmente, o sangue obtido por esta forma de coleta de amostras pode ser utilizada para o diagnóstico de doenças e monitoramento da saúde em peixes. A veia

caudal é o sítio preferencial para a coleta de sangue (BROWN, 1993).

GIRAY *et al.* (2005) ao avaliarem o sangue para diagnóstico do vírus da anemia infecciosa do salmão usando RT-PCR, verificaram que a amostra obtida por punção venosa foi igualmente sensível quando comparada com as amostras renais obtidas de salmão (*Salmo salar*) com sinais clínicos ou sem sinais clínicos. LOPEZ-VASQUEZ *et al.* (2006) utilizando o sangue de truta-marrom (*Salmo trutta*) em ensaios com nested RT-PCR para o diagnóstico do vírus da septicemia hemorrágica viral, obtiveram maior sensibilidade no método não-letal quando comparado com o diagnóstico a partir de órgãos internos.

Para a detecção do vírus da necrose pancreática infecciosa, GAHLAWAT *et al.* (2004) demonstraram que a utilização de leucócitos a partir do sangue colhido pode ser um método não-letal para portadores dessa enfermidade por ter sido mais sensível que o método letal por coleta de amostra renal (padrão de diagnóstico deste vírus) em alabote-do-Atlântico (*Hippoglossus hippoglossus*) infectados experimentalmente. LOPEZ-JIMENA *et al.* (2010), a partir de amostras de sangue obtidas de pargo-legítimo (*Pagrus pagrus*) e pargo-sêmola (*Pagrus auriga*) obtiveram diagnóstico negativo em todas as amostras avaliadas por RT-PCR, porém, por nested-PCR e hibridização subsequente com dot-blot foi capaz de detectar o vírus da necrose pancreática infecciosa em 100% das amostras de pargo-sêmola e 94,4% em pargo-legítimo.

O diagnóstico de doenças bacterianas a partir de amostras de sangue foi estudado por diferentes autores. ALTINOK *et al.* (2001) usaram sangue de 42 trutas arco-íris infectadas naturalmente e experimentalmente para detectar a presença de *Yersinia ruckeri* por PCR. A metodologia utilizada detectou nove indivíduos positivos. A PCR realizada a partir da amostra de sangue foi capaz de

detectar mais peixes infectados que o isolamento em meio de cultivo. EVANS *et al.* (2002) realizaram testes bacteriológicos a partir de amostras de cérebro, olho, rim cranial, intestino e sangue obtidas de tainhas (*Liza klunzingeri*) coletadas na baía do Kuwait e dourada (*Sparus auratus*) cultivada em tanques-rede. A frequência de detecção de *S. agalactiae* observada para a amostra de sangue foi de 71% em tainhas e 0% em dourada, evidenciando, dessa forma, a septicemia bacteriana em tainhas que apresentavam doença clínica.

A biópsia é um método não-letal de coleta de amostras que consiste na remoção de uma amostra de células e/ou tecidos dos peixes, sendo esse material utilizado para análise microscópica e para utilização em métodos de diagnóstico de doenças infecciosas (NOGA, 2000). Alguns patógenos não são detectados tão facilmente no sangue quanto são nos órgãos internos, sendo isso relatado para patógenos bacterianos de peixes em que o rim é usualmente o órgão utilizado para o isolamento. O rim de peixes é um longo órgão localizado ventralmente à coluna vertebral, é composto por tecido hematopoiético, excretório e linfóide. Possui consistência similar à medula óssea de mamíferos. Para obtenção de tecido renal por método não-letal é necessário a realização de biópsia aspirativa com agulha fina (NOGA *et al.*, 1988; NOGA, 2000).

A biópsia de rim cranial foi utilizada para a detecção de patógenos bacterianos causadores de doenças em peixes. NOGA *et al.* (1988) encontraram sensibilidade e especificidade de 88% e 93%, respectivamente, no exame bacteriológico para a detecção de *Yersinia ruckeri* em trutas arco-íris a partir de amostras de biópsia de rim cranial. WHITE *et al.* (1996), para determinar o *status* de infecção por *Renibacterium salmoninarum* em reprodutores de trutas cultivados em *raceways*, fizeram uso de coleta de amostra por biópsia de rim cranial. A metodologia foi

capaz de detectar quatro peixes positivos para a infecção em dez peixes amostrados. As amostras obtidas por estes autores foram adequadas para a realização de diagnóstico pelas técnicas de imunofluorescência indireta, imuno-histoquímica e exame histopatológico. O diagnóstico de infecção viral a partir de amostras obtidas por biópsia de rim cranial foi objetivo de estudo realizado por KORSNES *et al.* (2009). Estes autores determinaram que a biópsia de rim cranial é o melhor método para detectar a persistência da infecção de betanodavírus por qRT-PCR em alabote-do-atlântico (*Hippoglossus hippoglossus*).

Devido à grande variação anatômica entre as diferentes espécies de peixes, uma metodologia de biópsia de acordo com a espécie se torna necessário para a obtenção de tecido a ser utilizado em análises microscópicas e métodos de diagnósticos de

enfermidades em peixes, além de causar uma injúria mínima e evitar infecção pós-coleta (TRESISE *et al.*, 2013). Não existe descrição, na literatura científica, de coleta de amostras em tilápia do Nilo por biópsia.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Delineamento Experimental

Os ensaios experimentais foram realizados em duas etapas. A primeira etapa consistiu na padronização dos métodos de coleta de amostras (Figura 2). Após comprovada a viabilidade e segurança das técnicas de coletas de amostras em tilápia do Nilo, foi realizada a segunda etapa, mediante infecção experimental, para testar a eficiência dos métodos de coleta no diagnóstico da infecção por *S. agalactiae* utilizando técnicas bacteriológicas e moleculares (Figura 3).

Figura 2. Fluxograma de execução do experimento de padronização dos métodos não-letais de coleta de amostras em Tilápia do Nilo.

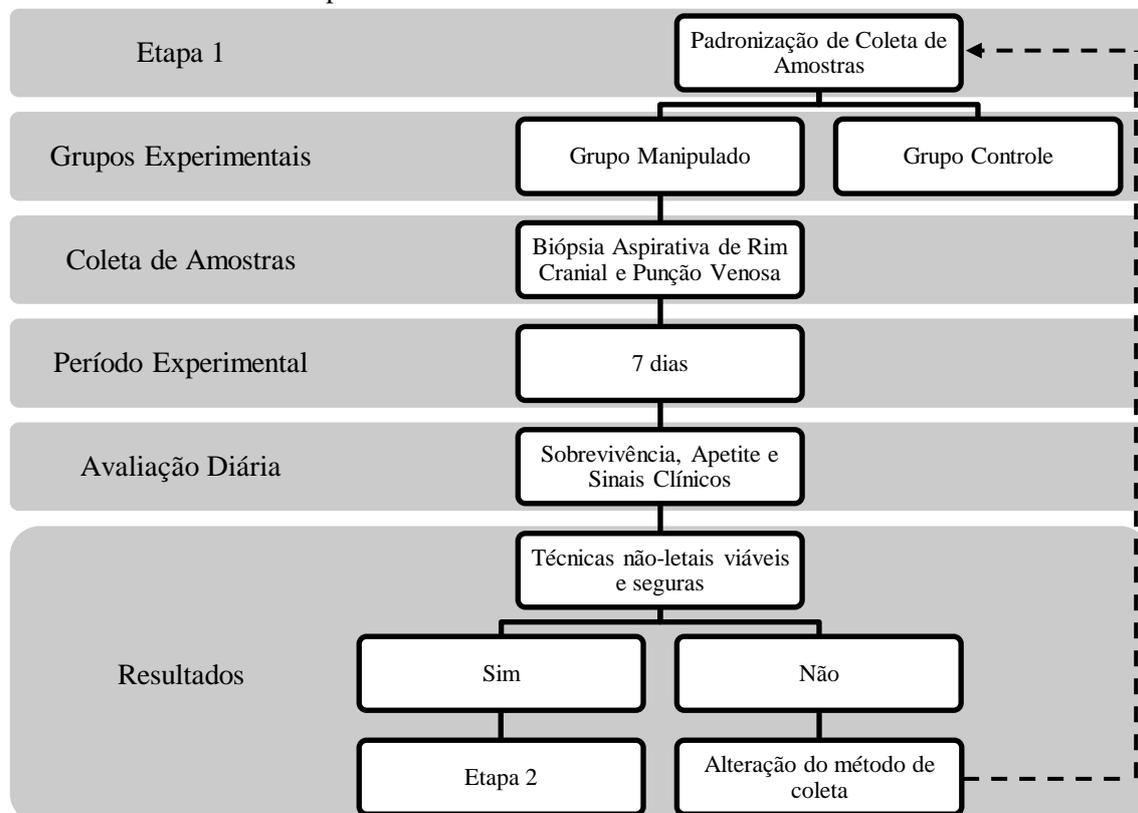
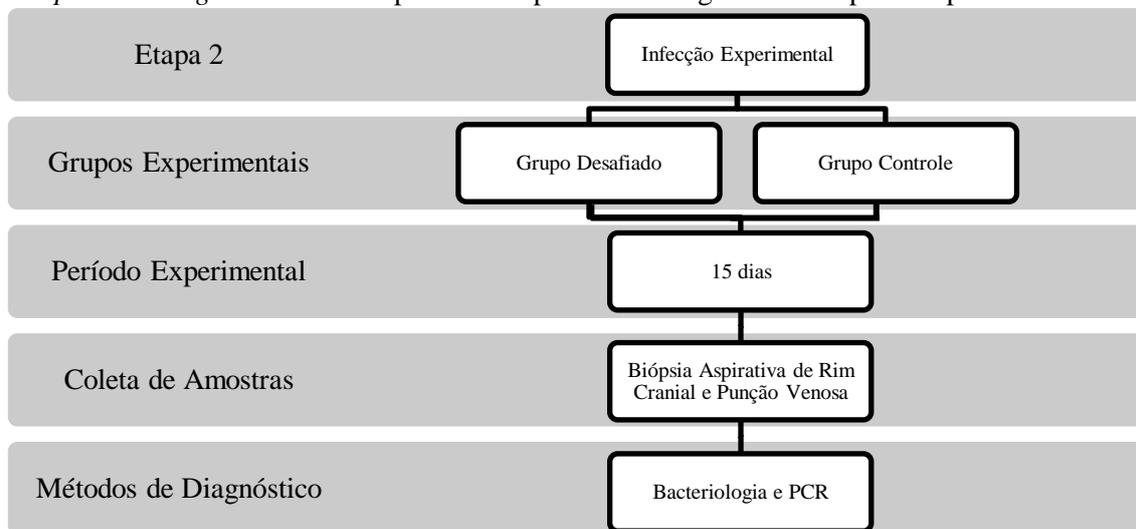


Figura 3. Fluxograma de execução do experimento de infecção experimental para a detecção de *Streptococcus agalactiae* em tilápia do Nilo por bacteriologia e PCR espécie-específica.



3.2. Animais experimentais

Para a realização do experimento, um lote constituído de 100 juvenis de tilápia do Nilo com peso médio de 100 gramas foram adquiridos de pisciculturas comerciais e mantidos sob condições laboratoriais durante 20 dias para adaptação antes do experimento. Os peixes foram alojados em aquários de vidro de 57 L, com fluxo contínuo e taxa de renovação de 0,5 L de água/h. Os peixes foram mantidos sob fotoperíodo de 12:12h luz/escuridão e a temperatura da água de 28°C. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial com 32% de proteína bruta, na quantidade correspondente a 2% do peso vivo/dia. Uma amostra de cinco peixes do lote, coletada de forma aleatória, foi submetida a exame bacteriológico e PCR espécie-específica (MATA *et al.*, 2004) para determinar a existência de infecção prévia por *S. agalactiae*. Adicionalmente foi realizado exame bacteriológico e parasitológico para garantir a higidez do lote frente a outros micro-organismos patogênicos para peixes como *Flavobacterium columnare*, *Aeromonas hydrophila*, *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*,

Ichthyophthirius multifiliis, *Trichodina* sp. e *Epistylis* sp. Antes de qualquer manipulação, os peixes foram sedados por imersão em solução de benzocaína na dose de 10 mg/mL de água. Para o exame bacteriológico fragmentos de cérebro e rim foram coletados de forma asséptica, plaqueados em ágar sangue (triptona de soja com sangue equino a 5%), ágar Hsu-Shotts modificado (MHS) e ágar cistina coração suplementada com solução de hemoglobina bovina (CHAH) e incubados a 28°C por 48 horas. Para o exame parasitológico foram realizadas a coleta de muco de superfície e de brânquia e espalhados em lâmina de vidro em camada fina para observação de parasitos ao microscópio óptico.

3.3. Padronização de métodos não-letais de coleta de amostras

Para a realização da primeira etapa do experimento, foram avaliadas as coletas de amostras de tecido renal e sangue por métodos não-letais como biópsia aspirativa e punção venosa. Para determinar a viabilidade, segurança e sobrevivência dos peixes aos métodos submetidos, adultos de tilápia do Nilo com peso médio de 150,1 ±

32,3 gramas foram selecionados após o período de adaptação. A alimentação foi suspensa 24 horas antes da realização dos ensaios experimentais.

Para a realização do ensaio experimental foram utilizados 40 peixes, sendo 30 peixes utilizados para a coleta de amostras por métodos não-letais e 10 peixes para grupo controle. Todos os peixes foram sedados por imersão em solução de benzocaína (10 mg/mL) e manipulados quando observado que estes apresentavam apenas movimentos operculares.

Os peixes foram submetidos aos métodos de coleta de amostra por biópsia aspirativa de rim cranial e punção venosa, como descrito no item 3.3.1, exceto grupo controle.

Os peixes foram monitorados (inspeção dos aquários e fornecimento de ração) três vezes ao dia por um período de sete dias pós-coleta para avaliação da sobrevivência aos métodos de coletas submetidos, apetite e/ou sinais clínicos.

Todos os procedimentos desta etapa foram realizados de acordo com as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFMG).

3.3.1. Métodos não-letais de coleta de amostras

3.3.1.1. Biópsia Aspirativa do Rim Cranial

A metodologia para biópsia aspirativa do rim cranial de tilápia foi adaptada do procedimento descrito por NOGA *et al.* (1988) para salmonídeos. Os peixes foram capturados, sedados com benzocaína e contidos. A partir da cavidade opercular, caudalmente ao último arco branquial, uma seringa de 1 mL e agulha 22G foi introduzida no sentido ventro-dorsal e, em seguida, direcionada crânio-caudalmente com angulação aproximada de 45°, até atingir o parênquima do rim cranial, localizado ventralmente à coluna vertebral (Figura 4).

Foi coletado aproximadamente 0,2 mL de tecido renal. O conteúdo de parênquima renal de cada aspirado foi confirmado microscopicamente por esfregaço em lâmina de vidro e corado por Panótico Rápido.

Figura 4. Procedimento de coleta de amostra de rim cranial por biópsia aspirativa em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).



3.3.1.2. Punção Venosa

A metodologia de coleta de sangue de tilápias foi realizada de acordo com o procedimento descrito por ALTINOK *et al.* (2001) para trutas. Com o peixe contido, amostras de sangue foram coletadas por punção venosa da veia caudal (Figura 5), em volume aproximado de 0,5 mL, com seringa descartável de 1 mL e armazenadas em tubos de 1,5 mL, sem anticoagulante.

Figura 5. Procedimento de coleta de sangue por punção venosa da veia caudal em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).



3.4. Avaliação da eficiência dos métodos letais e não-letais de coleta para a detecção de *Streptococcus agalactiae* em tilápia do Nilo.

3.4.1. Bactéria e condições de cultivo

A amostra *Streptococcus agalactiae* SA 20-06 foi utilizada para o ensaio de infecção experimental. A amostra foi previamente isolada de caso clínico de estreptococose em tilápias do Nilo e identificada por métodos fenotípicos e moleculares (MIAN *et al.*, 2009). Esta amostra tem sido estudada sobre diversos aspectos de virulência, possui a DL₅₀ previamente determinada, bem como a sua sequência genômica completa (MIAN *et al.*, 2009; GODOY *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.*, 2013). Esta amostra pertence ao banco de bactérias do AQUAVET- Laboratório de Doenças de Animais Aquáticos (EV/UFMG) e estava armazenada a -80°C até a sua utilização.

A amostra SA 20-06 foi descongelada e cultivada em ágar sangue de ovino 5% por 48h a 28°C. Posteriormente, uma colônia foi inoculada em caldo BHI (“*Brain Heart Infusion*”), incubada a 28°C sob agitação (100 rpm) por 18 horas. O inóculo foi ajustado a uma absorbância de 0,053 a densidade óptica de 600 nm e a contagem bacteriana foi realizada através do método de semeadura por espalhamento, de acordo com o descrito por HARTMAN (2011). O inóculo correspondeu a $1,7 \times 10^8$ UFC/mL.

3.4.2. Infecção experimental

Os peixes foram infectados experimentalmente para avaliar a capacidade de diagnóstico da infecção por *S. agalactiae* em tilápias do Nilo a partir de amostras coletadas por métodos não-letais. Foram testadas a associação de métodos não-letais de coleta de amostras e testes microbiológicos e moleculares. Para isso, tilápias do Nilo com peso médio de $170,3 \pm 36,77$ gramas foram selecionados após o

término da primeira etapa do experimento (item 3.3).

Para a realização deste ensaio experimental foram utilizados 50 peixes, sendo 45 peixes desafiados com a bactéria e 5 peixes para grupo controle. Os peixes foram sedados por imersão em solução de benzocaína (10mg/L) e manipulados quando observado que estes apresentavam apenas movimentos operculares. O desafio foi realizado por via intraperitoneal, de acordo com o procedimento descrito por MIAN *et al.* (2009), com 0,1 mL de inóculo bacteriano em caldo BHI, na dose final de $1,7 \times 10^6$ UFC/peixe. No grupo controle foi administrado 0,1 mL de BHI estéril.

Os peixes desafiados foram monitorados (inspeção dos aquários e fornecimento de ração) três vezes ao dia por um período de 15 dias para avaliação da sobrevivência, apetite e/ou visualização de sinais clínicos. Foram realizadas as coletas de rim cranial e sangue por biópsia aspirativa e punção venosa em peixes moribundos (peixes apenas com movimentos operculares e em decúbito lateral), à medida que estes desenvolviam doença clínica, e ao final do experimento nos peixes desafiados remanescentes e no grupo controle. Posteriormente a coleta de sangue e aspirado renal, os peixes moribundos e/ou remanescentes foram submetidos à eutanásia por imersão em solução de benzocaína (250mg/L) e amostras de tecido cerebral e de rim cranial foram coletados de cada peixe após a necropsia e utilizadas para avaliar a eficiência dos métodos microbiológicos e moleculares, comparando a eficácia do diagnóstico de estreptococose a partir de amostras obtidas por métodos letais e não-letais. Todos os procedimentos desta etapa foram realizados de acordo com as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFMG).

3.4.3. Diagnóstico

Para o diagnóstico de infecções por *Streptococcus agalactiae*, as amostras

coletadas foram utilizadas no exame bacteriológico e PCR. O exame bacteriológico foi realizado imediatamente após a coleta, assim como, as amostras para a realização da PCR que foram submetidas imediatamente à extração do DNA bacteriano.

3.4.3.1. Exame bacteriológico

Para o diagnóstico bacteriológico fragmentos de cérebro e rim foram coletados de maneira asséptica, plaqueados em ágar sangue (triptona de soja com sangue equino a 5%) e incubados a 28°C por 48 horas. As amostras coletadas por métodos não-letais foram inoculadas em ágar sangue (5% sangue ovino) e incubadas a 28°C por 48 horas. Os isolados foram caracterizados sorologicamente através do kit Slidex Latex Agglutination (BioMerieux, França), e confirmados por PCR espécie-específica.

3.4.3.2. PCR espécie-específica

3.4.3.2.1. Extração de DNA

Das amostras bacterianas obtidas por cultivo em ágar sangue, por métodos não-letais e letais, foram coletadas colônias e diluídas em 200 µL de solução de lise (20mg/ml lisozima; 20 mM Tris-HCl, pH 8.0; 2 mM EDTA e 1.2% Triton X-100) e incubadas *overnight*. O DNA bacteriano foi extraído utilizando o kit para extração de tecidos e sangue “DNeasy Tissue and Blood” (Qiagen, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante.

O DNA bacteriano dos tecidos coletadas por métodos não-letais e letais durante o experimento foi extraído a partir da utilização de dois kits: “DNeasy Tissue and Blood” (Qiagen, EUA) e o extrator automático de tecidos e sangue “Maxwell® 16 Tissue DNA Purification” (Promega, EUA), ambos de acordo com as recomendações do fabricante.

A quantidade de DNA extraído foi quantificado por espectrofotometria com Nanodrop® (Thermo Scientific). As

amostras de DNA foram armazenadas a -20°C até a sua utilização.

3.4.3.2.2. PCR

O diagnóstico por PCR foi realizado de acordo com o descrito por MATA *et al.* (2004), com algumas modificações. A reação foi realizada com o Kit Hot Start Taq Polymerase (Qiagen, EUA) e consistiu de 1x PCR buffer (10x), 0,25 mM de dNTPs, 2,0 mM de MgCl₂, 1,0 µM dos *primers* Sdi61 (AGGAAACCTGCCATTTGCG) e Sdi252 (CAATCTATTTCTAGATCGTGG) e, 1,5 U Taq polimerase para um volume final de 25 µL de reação. Foram utilizados 100 ng de DNA template (2 µL). A amplificação foi realizada através do processo descrito a seguir: 1 ciclo a 94°C por 15 minutos; 25 ciclos - 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 90 segundos; e a extensão final a 72°C por 5 minutos. A PCR foi realizada em termociclador Veriti 96-well (Applied Biosystems, EUA). Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, revelados com brometo de etídeo e imagens obtidas com o sistema de fotodocumentação L-PIX (Loccus Biotecnologia, Brasil).

3.4.4. Análise estatística

Sensibilidade e especificidade foram calculados para os diferentes métodos de diagnóstico utilizando a bacteriologia de cérebro como padrão (LALKHEN e McCLUSKEY, 2008). As diferenças nas sensibilidades clínicas dos testes foram avaliadas pelo teste de McNemar, sendo considerado significativo $p < 0,05$ (CLEOPHAS e ZWINDERMAN, 2011). A mensuração da congruência entre os diferentes testes foram avaliados pelo método Cohen Kappa, tendo como interpretação do valor obtido a seguinte relação: 0,00 a 0,20 indica fraca congruência; 0,21 a 0,40 indica congruência razoável; 0,41 a 0,60 indica moderada congruência; 0,61 a 0,80 indica boa congruência; e de 0,81 a 1,00 indica excelente congruência (VIERA e

GARRETT, 2005). As análises foram realizadas usando software R (R Foundation for Statistical Computing, Áustria). As análises estatísticas foram realizadas apenas nos peixes desafiados com a bactéria *S. agalactiae*.

4. RESULTADOS

4.1. Viabilidade, segurança e sobrevivência dos peixes submetidos aos métodos não-letais de coleta de amostras

Os peixes adquiridos de piscicultura comercial para a realização do experimento adaptaram com sucesso às condições laboratoriais submetidas. Não houve mortalidade de peixes durante o período de adaptação e não foram isoladas bactérias patogênicas nas tilápias, assim como, nenhum parasito externo foi observado à microscopia óptica.

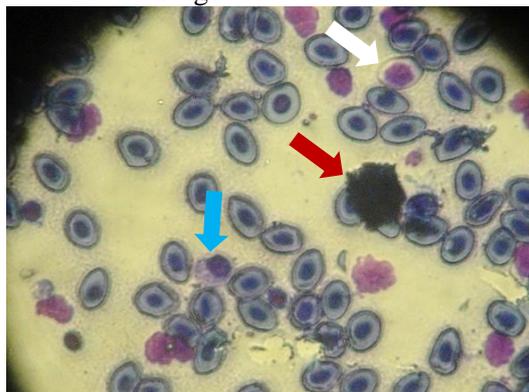
Os métodos não-letais de coleta de amostras em tilápia do Nilo foram padronizados com sucesso. Não houve mortalidade dos peixes submetidos aos métodos não-letais de coleta de amostras. Foi observado que após a biópsia aspirativa de rim cranial os peixes apresentavam uma zona de pigmentação escura no corpo (Figura 6) próximo ao local de coleta da amostra, que desaparecia em torno de 12 horas pós-coleta. Durante o monitoramento destes peixes, observou-se que minutos após a coleta de amostras os mesmos se encontravam letárgicos, não alterando este estado com o oferecimento de ração. Progressivamente, num período entre sete e 24 horas após a coleta, todos os peixes apresentaram apetite normal, semelhante ao grupo controle, mantendo a normorexia até o final do período de avaliação experimental.

Nenhum peixe mostrou sinal visível de infecção no local onde foi realizada a coleta de amostras por biópsia aspirativa ou punção venosa. Adicionalmente, todas as amostras obtidas por biópsia aspirativa foram confirmadas por microscopia a presença de tecido renal (Figura 7).

Figura 6. Tilápia do Nilo após ser submetida a biópsia aspirativa de rim cranial. Área de hiperpigmentação observada no local da coleta de amostra (seta).



Figura 7. Esfregaço de aspirado de rim cranial corado por panótico rápido e visualizado a 40x. Seta branca. Eritroblasto; Seta azul. Pró-eritrócito; Seta vermelha. Melanomacrófago.



4.2. Eficácia dos métodos não-letais de coleta de amostras para o diagnóstico da infecção por *S. agalactiae* em tilápias do Nilo

4.2.1. Infecção experimental

Os peixes infectados experimentalmente com *S. agalactiae* começaram a apresentar sinal clínico cerca de 20 horas pós-infecção. Nos dois primeiros dias pós-infecção foram observados sete peixes moribundos, dos 45 peixes infectados com a bactéria, dos quais

foram realizadas as coletas de amostras por métodos não-letais (rim cranial e sangue) e letais (cérebro e rim cranial). Estes peixes apresentaram natação errática seguida por paralisia, com movimentos operculares lentos. Quadro semelhante foi observado no sexto dia pós-infecção em um peixe, que além dos sinais clínicos supracitados também foi possível observar ascite e hemorragia de nadadeira peitoral (Figura 8). Apenas dois peixes foram encontrados mortos durante o período experimental de 15 dias, não sendo possível a realização da coleta de amostras de forma não-letal, excluindo assim estes

animais das análises estatísticas. Os demais peixes sobreviveram até o final da avaliação, sendo observado que quatro peixes apresentaram sinais clínicos brandos da doença e 31 peixes estavam aparentemente hígidos. De maneira geral, os sinais clínicos observados foram: anorexia, letargia, melanose, opacidade de córnea uni e bilateral, ascite, perda de equilíbrio, movimentos bucais acelerados, hemorragia de nadadeiras, natação errática e paralisia (Figura 8). Nenhum sinal clínico foi observado no grupo controle.

Figura 8. Principais sinais clínicos observados em tilápias do Nilo infectadas experimentalmente com *S. agalactiae*. A. Peixe com ascite e nadadeira hemorrágica; B. Peixes no fundo do aquário e um com opacidade de córnea (seta); C. Peixe com perda de equilíbrio; D. peixe com paralisia bucal.



Os resultados da bacteriologia e PCR espécie-específica obtidos durante a realização do experimento estão apresentados na Tabela 1. Os métodos de diagnóstico foram capazes de detectar *S. agalactiae* em tilápia do Nilo com sinais clínicos, principalmente moribundos (marcados com asterisco na Tabela 1), e sem sinais clínicos (Tabela 1). O reisolamento e a detecção da bactéria por biologia molecular em amostras de cérebro, rim cranial (coletado por método letal e biópsia aspirativa) e sangue de peixes aparentemente saudáveis proporcionou a caracterização de peixes em estado de portador da infecção. Um total de 12 peixes foram diagnosticados como portadores da infecção por *S. agalactiae* (Tabela 1). Não houve detecção da bactéria em nenhum peixe do grupo controle submetido aos métodos bacteriológicos e moleculares.

4.2.2. Sensibilidade clínica dos diferentes métodos de diagnóstico

4.2.2.1. Sensibilidade e especificidade relativas das técnicas de diagnóstico

A sensibilidade e especificidade relativas calculadas para os diferentes métodos de diagnóstico a partir de amostras obtidas por métodos letais e não-letais estão presentes na Tabela 2. O método mais acurado para a detecção de *S. agalactiae* foi a bacteriologia realizada a partir de amostras letais sendo considerado, portanto, padrão para a realização do cálculo de sensibilidade e especificidade. O segundo método mais sensível foi PCR espécie-específica também com amostras letais (sensibilidade, 85,71%, especificidade 95,45%). As amostras obtidas por métodos não-letais apresentaram sensibilidade mais baixa, quando comparada as amostras letais, sendo a bacteriologia mais acurada (sensibilidade, 57,14%, especificidade 100%) que a PCR

(sensibilidade, 38,10%, especificidade 90,91%).

Tabela 1. Resultados da bacteriologia e PCR obtidos durante a realização do experimento.

Peixes	Bacteriologia				PCR			
	Letal		Não-Letal		Letal		Não-Letal	
	C	R	B	S	C	R	B	S
1*	+	+	+	+	+	+	+	+
2*	+	+	+	+	+	+	+	+
3*	+	+	+	+	+	+	+	+
4*	+	+	+	+	-	-	-	-
5*	+	+	+	-	+	+	-	-
6	+	+	-	-	+	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-
10	+	+	+	+	+	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-
12	+	+	+	+	-	+	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-
14*	+	+	+	+	+	+	+	+
15*	+	+	+	+	+	+	+	+
16*	+	+	+	+	+	+	+	+
17*	+	+	+	+	+	-	-	-
18	+	+	-	-	-	-	+	-
19	-	-	-	-	-	-	-	-
20	+	+	-	-	+	-	-	-
21	+	+	-	-	+	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	+	-	-
24	-	-	-	-	-	-	-	-
25	+	-	-	-	+	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-	-	-	-
29*	+	+	+	+	+	+	+	+
30*	+	-	-	-	+	-	-	-
31	-	-	-	-	-	-	-	-
32	-	-	-	-	-	-	-	-
33	+	-	-	-	+	-	-	-
34*	-	-	-	-	-	-	-	-
35	-	-	-	-	-	-	-	+
36	-	-	-	-	-	-	-	+
37	-	-	-	-	-	-	-	-
38	-	-	-	-	-	-	-	-
39	-	-	-	-	-	-	-	-
40	-	-	-	-	-	-	-	-
41	-	-	-	-	-	-	-	-
42	+	-	-	-	+	-	-	-
43	+	+	-	-	-	-	-	-
44	-	-	-	-	-	-	-	-
45	-	-	-	-	-	-	-	-
46	-	-	-	-	-	-	-	-
47	-	-	-	-	-	-	-	-
48	-	-	-	-	-	-	-	-
TOTAL	21	17	12	11	17	10	8	9

C: Cérebro

R: Rim

B: Biópsia Aspirativa de Rim Cranial S: Sangue

*: Peixes que apresentaram sinal clínico

Tabela 2. Característica de performance da bacteriologia e PCR espécie-específica para a detecção de *Streptococcus agalactiae* a partir de amostras obtidas por métodos letais e não-letais.

Método de Diagnóstico/ Método de coleta de amostra	% Sensibilidade	% Especificidade
Bacteriologia/Letal	100	100
Bacteriologia/Não-letal	57,14	100
PCR/Letal	85,71	95,45
PCR/Não-Letal	38,10	90,91

4.2.2.2. Bacteriologia

A frequência de detecção *S. agalactiae* por bacteriologia obtidos para as diferentes amostras coletadas estão apresentados na Tabela 3. Todos os isolados obtidos aglutinaram quando testados com o kit Slidex Latex Agglutination demonstrando que os isolados eram *Streptococcus* do grupo B de Lancifield. Adicionalmente, todos os isolados foram confirmados como *S. agalactiae* através de PCR espécie-específica.

A frequência de detecção nas amostras de cérebro foi significativamente maior que as demais obtidas (Tabela 3). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as amostras de cérebro e rim (coletada por método letal) ($p = 0,1336$), porém houve diferença estatística entre cérebro e as demais amostras coletadas por método não-letal ($p < 0,05$) para a detecção do patógeno (Tabela 4). Foi observada excelente congruência para a detecção da doença entre a amostra de cérebro e rim (obtidas por método letal) por bacteriologia. A congruência foi moderada entre a amostra de cérebro com as amostras obtidas por métodos não-letais (aspirado renal e sangue) (Tabela 4).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre as amostras de rim cranial obtido tanto por método letal quanto coletada de forma não-letal ($p = 0,0736$) porém houve diferença estatística entre rim cranial (coleta letal) e sangue ($p = 0,0412$) para a detecção da bactéria por bacteriologia (Tabela 5). A congruência entre as amostras de tecido renal obtida por método letal com ambas amostras

obtidas por métodos não-letais (aspirado renal e sangue) para a detecção de *S. agalactiae* foi boa (Tabela 5).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre aspirado renal e sangue ($p = 1$) para detecção por bacteriologia (Tabela 6). O aspirado renal e sangue apresentaram excelente congruência entre si para a detecção de *S. agalactiae* (Tabela 6).

O diagnóstico de *S. agalactiae* por bacteriologia em peixes moribundos e com sinais clínicos brandos após infecção experimental estão presentes na Tabela 1. Os isolados obtidos a partir das amostras de cérebro, rim (coleta letal), aspirado renal e sangue de peixes moribundos e com sinais clínicos brandos demonstraram 11 (91,6%), 10 (83,3%), 10 (83,3%) e 9 (75%) peixes positivos no diagnóstico por bacteriologia. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as amostras para a detecção do patógeno por bacteriologia em peixes com doença clínica ($p > 0,05$).

O diagnóstico de *S. agalactiae* por bacteriologia em peixes portadores da infecção após desafio experimental estão presentes na Tabela 1. Os isolados obtidos de cérebro e rim (coleta letal) em peixes sem sinais clínicos demonstraram que 10 (32,2%) e 7 (22,6%) eram positivos para a infecção por *S. agalactiae*. Já os isolados obtidos de aspirado renal e sangue, nestes peixes, demonstraram que 2 (6,4%) e 2 (6,4%) peixes eram positivos para o patógeno quando detectados por bacteriologia respectivamente. Houve diferença estatisticamente significativa entre as

amostras obtidas de forma letal e as coletadas de forma não-letal ($p < 0,05$) para a detecção

de *S. agalactiae* por bacteriologia em peixes portadores da infecção.

Tabela 3. Isolamento e detecção de *Streptococcus agalactiae* em tilápia do Nilo infectadas experimentalmente a partir de diferentes tecidos coletados e diagnosticado por bacteriologia e PCR.

	Nº de amostras detectadas positivas/testadas	Frequência Absoluta de Positivos (%)
Bacteriologia		
Cérebro	21/43	48,8
Rim Cranial	17/43	39,5
Aspirado Renal	12/43	27,9
Sangue	11/43	25,5
PCR		
Cérebro	17/43	39,5
Rim Cranial	10/43	23,2
Aspirado Renal	8/43	18,6
Sangue	9/43	20,9

Tabela 4. Comparação de tecido cerebral com as amostras de rim (obtidas por método letal e não-letal) e sangue em tilápia do Nilo infectadas experimentalmente com *S. agalactiae* e detectadas por bacteriologia.

		Cérebro			McNemar χ^2 (valor de p)	Kappa	Congruência
		Positivo	Negativo	Total			
Rim	Positivo	17	0	17	4 (0,1336)	0,81	Excelente
	Negativo	4	22	26			
	Total	21	22	43			
Aspirado Renal	Positivo	12	0	12	9 (0,0076)	0,58	Moderada
	Negativo	9	22	31			
	Total	21	22	43			
Sangue	Positivo	11	0	11	10 (0,0044)	0,53	Moderada
	Negativo	10	22	32			
	Total	21	22	43			

Tabela 5. Comparação do tecido renal, obtido por método letal, com amostras obtidas por métodos não-letais em tilápias do Nilo infectadas experimentalmente com *S. agalactiae* e detectadas por bacteriologia.

		Rim (letal)			McNemar χ^2 (valor de p)	Kappa	Congruência
		Positivo	Negativo	Total			
Aspirado Renal	Positivo	12	0	12	5 (0,0736)	0,74	Boa
	Negativo	5	26	31			
	Total	17	26	43			
Sangue	Positivo	11	0	11	6 (0,0412)	0,69	Boa
	Negativo	6	26	32			
	Total	17	26	43			

Tabela 6. Comparação das amostras obtidas por métodos não-letais em tilápias do Nilo infectadas experimentalmente com *S. agalactiae* e detectadas por bacteriologia.

		Aspirado Renal			McNemar χ^2 (valor de p)	Kappa	Congruência
		Positivo	Negativo	Total			
Sangue	Positivo	11	0	11	1	0,94	Excelente
	Negativo	1	31	32	(1,0000)		
	Total	12	31	43			

4.2.2.3. PCR

A extração de DNA dos tecidos coletados de forma letal e não-letal foram realizados de acordo com os protocolos estipulados pelos fabricantes dos kits “DNeasy Tissue and Blood” (Qiagen, EUA) e “Maxwell® 16 Tissue DNA Purification” (Promega, EUA). Porém a detecção de *S. agalactiae* por PCR espécie-específica foi superior a partir do DNA extraído no extrator automático. Portanto, os resultados demonstrados neste presente estudo correspondem a detecção do patógeno nos tecidos obtidos do experimento e extraídos com “Maxwell® 16 Tissue DNA Purification”.

Os resultados da frequência de detecção de *S. agalactiae* por PCR espécie-específica obtidos durante a realização do experimento são apresentados na Tabela 3. Não houve diferença estatisticamente significativa entre cérebro e rim (coleta letal) para a detecção do patógeno por PCR ($p = 0,0704$). Houve diferença estatística entre cérebro e as amostras coletadas de forma não letal ($p < 0,05$). A congruência entre as amostras de cérebro e rim (coleta letal) e entre cérebro e aspirado renal foi moderada. Já a congruência entre cérebro e sangue foi razoável (Tabela 7). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as amostras de tecido renal obtidas por método letal e não-letal ($p = 0,61$) e, entre tecido renal (coleta letal) e sangue ($p = 1$), para a detecção de *S. agalactiae* por PCR espécie-específica. Ambos testes apresentaram boa congruência entre si (Tabela 8). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as

amostras coletadas por métodos não-letais ($p = 0,56$) para detecção por PCR espécie-específica. As amostras de aspirado renal e sangue apresentaram boa congruência entre si (Tabela 9).

O diagnóstico de *S. agalactiae* por PCR em peixes moribundos e com sinais clínicos brandos após infecção experimental estão presentes na Tabela 1. A PCR foi capaz de detectar 10 (83,3%) e 8 (66,6%) peixes positivos a partir de amostras de cérebro e rim (coleta letal), respectivamente, de peixes moribundos e com sinais clínicos brandos. A partir de amostras de aspirado renal e sangue de peixes com doença clínica, a PCR detectou 7 (58,3%) peixes positivos em cada amostra. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as amostras para a detecção do patógeno por PCR espécie-específica em peixes com doença clínica ($p > 0,05$).

O diagnóstico de *S. agalactiae* por PCR em peixes portadores da infecção após desafio experimental estão presentes na Tabela 1. A PCR foi capaz de detectar 7 (22,6%) e 2 (6,4%) peixes positivos a partir de amostras de cérebro e rim (coleta letal), respectivamente, de peixes sem sinais clínicos. A partir de amostras de aspirado renal e sangue de peixes sem sinais clínicos, a PCR detectou 1 (3,2%) e 2 (6,4%) peixes positivos respectivamente. Houve diferença estatisticamente significativa entre cérebro e as demais amostras (rim, aspirado renal e sangue) para a detecção do patógeno por PCR em peixes aparentemente hígidos porém portadores da infecção ($p < 0,05$).

Tabela 7. Comparação de tecido cerebral com as amostras de rim (obtidas por método letal e não-letal) e sangue em tilápia do Nilo infectadas experimentalmente com *S. agalactiae* e detectadas por PCR espécie-específica.

		Cérebro			McNemar χ^2 (valor de <i>p</i>)	Kappa	Congruência
		Positivo	Negativo	Total			
Rim	Positivo	8	2	10	4,45	0,42	Moderada
	Negativo	9	24	33	(0,0704)		
	Total	17	26	43			
Aspirado Renal	Positivo	7	1	8	7,36	0,41	Moderada
	Negativo	10	25	35	(0,0153)		
	Total	17	26	43			
Sangue	Positivo	7	2	9	5,33	0,36	Razoável
	Negativo	10	24	34	(0,0433)		
	Total	17	26	43			

Tabela 8. Comparação do tecido renal, obtido por método letal, com amostras obtidas por métodos não-letais em tilápias do Nilo infectadas experimentalmente com *S. agalactiae* e detectadas por PCR espécie-específica.

		Rim (letal)			McNemar χ^2 (valor de <i>p</i>)	Kappa	Congruência
		Positivo	Negativo	Total			
Aspirado Renal	Positivo	7	1	8	1	0,72	Boa
	Negativo	3	32	35	(0,6171)		
	Total	10	33	43			
Sangue	Positivo	7	2	9	0,20	0,66	Boa
	Negativo	3	31	34	(1,0000)		
	Total	10	33	43			

Tabela 9. Comparação das amostras obtidas por métodos não-letais em tilápias do Nilo infectadas experimentalmente com *S. agalactiae* e detectadas por PCR espécie-específica.

		Aspirado Renal			McNemar χ^2 (valor de <i>p</i>)	Kappa	Congruência
		Positivo	Negativo	Total			
Sangue	Positivo	7	2	9	0,33	0,78	Boa
	Negativo	1	33	34	(0,5637)		
	Total	8	35	43			

4.2.2.4. Bacteriologia X PCR

A frequência de diagnóstico positivo a partir de amostras colhidas por métodos letais e não-letais e avaliadas por PCR espécie-específica, foi significativamente menor quando comparada a bacteriologia (Tabela 3). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os métodos de diagnóstico para a detecção de *S. agalactiae* a partir de

amostras de cérebro ($p = 0,1336$), porém houve diferença estatística entre bacteriologia de cérebro e PCR das outras amostras obtidas no experimento (rim, aspirado renal e sangue) para o diagnóstico de *S. agalactiae* ($p < 0,005$). Foi observado uma excelente congruência entre bacteriologia e PCR a partir de amostras de cérebro, porém as demais amostras apresentaram congruência razoável (Tabela 10).

Tabela 10. Comparação da bacteriologia de cérebro com as amostras obtidas por método letal e não-letal em tilápia do Nilo infectadas experimentalmente com *S. agalactiae* e detectadas por PCR espécie-específica.

		Bacteriologia de Cérebro			McNemar χ^2 (valor de <i>p</i>)	Kappa	Congruência
		Positivo	Negativo	Total			
PCR Cérebro	Positivo	17	0	17	4 (0,1336)	0,81	Excelente
	Negativo	4	22	26			
	Total	21	22	43			
PCR Rim	Positivo	9	1	10	9,31 (0,0055)	0,38	Razoável
	Negativo	12	21	33			
	Total	21	22	43			
PCR Aspirado Renal	Positivo	8	0	8	13 (0,0008)	0,38	Razoável
	Negativo	13	22	35			
	Total	21	22	43			
PCR Sangue	Positivo	7	2	9	9 (0,0059)	0,25	Razoável
	Negativo	14	20	34			
	Total	21	22	43			

5. DISCUSSÃO

A biópsia aspirativa de rim cranial e a punção venosa demonstraram ser métodos aplicáveis à coleta não-letal de amostras em tilápias do Nilo, destinadas ao diagnóstico microbiológico. Não houve mortalidade nos peixes submetidos a tais procedimentos, nem infecção local após a coleta das amostras, o que demonstra que essas técnicas podem ser usadas para obtenção de tecido renal e sangue de tilápias de forma segura, permitindo a sobrevivência dos peixes após o procedimento.

NOGA *et al.* (1988), ao avaliarem a segurança da coleta de rim cranial por biópsia em trutas, observaram mortalidade em quatro de 150 peixes (2,6%), 24 horas após serem submetidos ao procedimento. WHITE *et al.* (1996) realizaram a coleta de rim cranial em dez reprodutores de truta arco-íris e neste procedimento, um peixe morreu imediatamente após a coleta e o outro morreu após 7 dias (20% de mortalidade). Portanto, o presente estudo apresentou resultado de mortalidade semelhante ao obtido por NOGA *et al.* (1988) e foi superior ao obtido por WHITE *et al.* (1996). Mortalidades podem

ser observadas durante a realização da biópsia aspirativa de rim cranial decorrente de contenção inadequada, imperícia e tempo de exposição ao ar. Um peixe contido inadequadamente se debate durante o procedimento, o que gera lesões por traumas e perfurações pela agulha. A imperícia, ou a falta de capacidade específica para a realização da coleta da amostra, pode resultar em lesões da coluna espinhal e/ou nervos adjacentes após a introdução da agulha na tentativa de atingir o parênquima renal. LUZ *et al.* (2012) testaram diferentes tempos de exposição ao ar em larvas e alevinos de tilápias do Nilo e observaram que houve uma diminuição progressiva de sobrevivência do peixe com o aumento do tempo de exposição submetido. Portanto, ao manipular peixes com objetivo de realizar coleta de amostras, deve-se executar o procedimento em menor tempo de exposição ao ar possível. Dessa forma, é estritamente necessário que haja um treinamento prévio para a execução do procedimento de biópsia visando uma coleta rápida e segura para os peixes.

Neste estudo foi observado zona de hiperpigmentação no corpo do peixe, próximo a região submetida à biópsia. Este

sinal clínico também foi observado por NOGA *et al.* (1988) e citado por eles como indicativo de lesão neurológica em trutas. Entretanto, neste estudo, essa zona de hiperpigmentação desapareceu em torno de 12 horas após a coleta da amostra renal e os peixes, neste intervalo de tempo, já começaram a apresentar sinais de apetite. A hiperpigmentação transiente é comum na tilápia do Nilo e está relacionada à resposta adrenérgica ao estresse agudo, resposta imune e inflamatória de injúria local e para diferenciação de hierarquia social (FERNANDES e VOLPATO, 1993; AGIUS e ROBERTS, 2003; GULZAR *et al.*, 2013). Essa mudança da coloração do tegumento da tilápia é basicamente derivada da mobilização intracelular de grânulos de pigmento presentes em cromatóforos, que são células especializadas em sintetizar e armazenar pigmentos, e que estão distribuídos por toda epiderme e derme desta espécie de peixe. A concentração e dispersão do pigmento geralmente é mediado por neurotransmissores e hormônios que modulam a coloração corporal como por exemplo, hormônio concentrador de melanina, hormônio estimulador de alfa-melanócito, melatonina e catecolaminas (OLIVEIRA *et al.*, 1996). A injúria local provocada pelo procedimento de coleta de amostra ativa dois eixos neuroendócrinos: HSC (hipotálamo – sistema nervoso simpático – célula cromafim) que estimula a liberação de catecolaminas pelas células cromafins, presentes no rim cranial de tilápias e HHI (hipotálamo – hipófise – célula interrenal) que estimula a produção e liberação de cortisol pelas células inter-renais, também presentes no rim cranial de tilápias (OBA *et al.*, 2009). Cortisol e catecolaminas são liberados na corrente sanguínea e iniciam uma série de efeitos secundários nos peixes, através da ativação adrenérgica, principalmente sobre a circulação sanguínea, respiração, osmorregulação e metabolismo (CASTRO e FERNANDES, 2009), como também media a agregação e dispersão de melanóforos no tegumento das tilápias

(GULZAR *et al.*, 2013). Portanto, sugere-se que a hiperpigmentação observada no presente estudo após a realização de biópsia aspirativa de rim cranial seja decorrente da resposta adrenérgica ao estresse agudo causado pela captura, hipóxia (decorrente do tempo de exposição ao ar) e à injúria local provocada pelo método de coleta de amostra nos peixes.

A letargia observada nos peixes após a realização da coleta de amostra pode ser decorrente do estresse agudo provocado pela manipulação do peixe, que rompeu a homeostase dos animais com o ambiente em que estavam, pela inexistência do efeito redutor de estresse com a utilização do anestésico à base de benzocaína, tempo de exposição ao ar para a coleta de aspirado renal e sangue, como também pelo tempo de retorno da sedação à qual os peixes foram submetidos. Sabe-se que o estresse agudo causado pela manipulação dos peixes resulta num rápido aumento dos níveis de lactato plasmático e muscular, diminui o pH sanguíneo e a concentração de oxigênio no sangue, eleva a glicemia e a concentração de amônia plasmática (OBA *et al.*, 2009; INOUE *et al.*, 2011). Não foram feitas determinações sanguíneas de hematócrito e hemoglobina, assim como, mensuração da glicose, amônia e lactato para verificação do estresse nos peixes submetidos à sedação e ao procedimento de coletas de amostras padronizadas neste estudo. O tempo de exposição à benzocaína foi inferior aos dez minutos sendo bem tolerada pelas tilápias, que não apresentaram dificuldade respiratória decorrente desta exposição. Após a redução da concentração de benzocaína no organismo do peixe e o restabelecimento da homeostase foi observado o desaparecimento da zona de hiperpigmentação do local de coleta de amostras, assim como os peixes voltaram a alimentar adequadamente e com comportamento semelhante ao grupo controle.

As amostras obtidas por biópsia aspirativa em tilápia do Nilo foram confirmadas ser de origem renal a partir da avaliação microscópica de cada esfregaço, onde foi possível visualizar a presença de melanomacrófagos e eritrócitos imaturos, que são normalmente encontradas no tecido hematopoiético de peixes. Os melanomacrófagos também foram visualizados nos estudos realizados por NOGA *et al.* (1988) e WHITE *et al.* (1996).

A punção venosa é uma metodologia comumente utilizada para obtenção de sangue de tilápias para avaliação de parâmetros hematológicos e bioquímicos, eficácia vacinal e atividade bactericida às diferentes enfermidades (PASNIK *et al.*, 2005; SOTO *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2012). Este procedimento geralmente não causa mortalidade nos peixes, sendo uma metodologia de fácil e rápida execução. A coleta de sangue foi realizada adequadamente, não sendo observado infecções secundárias decorrente da metodologia de coleta. Como a coleta de sangue por punção venosa foi realizada simultaneamente à biópsia aspirativa de rim cranial, não houve distinção das alterações comportamentais decorrentes de cada método não-letal realizado.

Para avaliação da eficácia dos métodos não-letais de coleta de amostras para o diagnóstico da infecção por *S. agalactiae* em tilápias do Nilo, um ensaio de infecção experimental foi conduzido com este patógeno. A amostra utilizada neste ensaio experimental foi a *Streptococcus agalactiae* SA 20-06, que em estudos prévios do próprio AQUAVET (MIAN *et al.*, 2009) mostrou ser uma amostra extremamente virulenta para as tilápias do Nilo, na qual baixa dose infectante ($6,14 \times 10^1$ UFC) foi capaz de induzir mortalidade de aproximadamente 100% dos peixes infectados. Porém, em outros estudos desenvolvidos pela equipe do AQUAVET, com dados recentes e ainda não publicados, observou-se redução da virulência desta

amostra bacteriana e, conseqüentemente, a redução da mortalidade observada. Acredita-se que essa redução da virulência seja decorrente do efeito de passagens seriadas em meio de cultivo. Fato semelhante ocorre na evolução do patógeno ao campo onde, após a introdução de *S. agalactiae* em uma propriedade comercial, a bactéria é capaz de provocar mortalidade elevada, porém, nos surtos subsequentes ocorre uma redução da taxa de mortalidade devido à resistência adquirida dos peixes ao patógeno e pela utilização de antibioticoterapia pelos produtores, assim que visualizam animais com sinais clínicos (FIGUEIREDO *et al.*, 2007a). Sabe-se que a administração de antibiótico à base de oxitetraciclina é capaz de induzir estado de portador da infecção em tilápias, acarretando na persistência de *S. agalactiae* na fazenda produtiva (FARIA *et al.*, 2014). A redução da virulência da amostra SA 20-06 foi importante para a escolha desta amostra na realização dos ensaios experimentais, já que as outras amostras de *S. agalactiae* com DL50 previamente estabelecidos (MIAN *et al.*, 2009) apresentam alta virulência em experimentos *in vivo*. Com a utilização da amostra SA 20-06 era desejável a observação de peixes aparentemente saudáveis, peixes doentes com anorexia e peixes com sinais clínicos da doença, após a infecção experimental, o que poderia não acontecer caso fosse utilizada uma outra amostra dessa espécie bacteriana.

Os peixes infectados experimentalmente com *S. agalactiae* apresentaram sinais clínicos semelhantes aos relatados nos diferentes surtos da doença no mundo em tilápias, como natação errática, ascite, hemorragia de nadadeira, paralisia bucal e opacidade de córnea, dentre os outros citados nos resultados (AMAL *et al.*, 2013; HERNANDEZ *et al.*, 2009; MIAN *et al.*, 2009; PASNIK *et al.*, 2008; YE *et al.*, 2011). A doença se manifestou de forma aguda em alguns peixes, sendo necessário à realização dos métodos não-letais de coleta de amostras

antes que esses viessem ao óbito. Adicionalmente, após a coleta das amostras, estes peixes foram submetidos à eutanásia para obtenção de tecido cerebral e renal. A coleta de sangue e tecido renal por métodos não-letais em peixes moribundos foi justificada para que se tentasse provar o quadro de septicemia aguda e detecção do patógeno, nestas amostras, na fase inicial da doença.

No presente estudo, a bacteriologia e PCR espécie-específica para o diagnóstico da infecção por *S. agalactiae* em tilápia do Nilo, a partir de amostras colhidas por métodos letais e não-letais, foram realizados. A frequência de amostras positivas para o diagnóstico de *S. agalactiae* a partir de amostra cerebral foi significativamente superior para a detecção da bactéria quando comparada com as demais amostras obtidas no experimento, independentemente do método de diagnóstico utilizado. Dentre os sítios coletados, os resultados obtidos neste estudo sugerem a utilização do cérebro como órgão de eleição para a realização do diagnóstico de estreptococose em peixes por bacteriologia e/ou PCR, já que não houve diferença estatística de detecção do patógeno entre os métodos de diagnóstico.

Estudos prévios foram capazes de detectar *S. agalactiae* por bacteriologia a partir de amostras de cérebro, rim e sangue de peixes naturalmente infectados (EVANS *et al.*, 2002; HERNANDEZ *et al.*, 2009), porém não compararam a eficiência de detecção do patógeno entre as amostras coletadas de forma letal e não-letal. O presente estudo é o primeiro a realizar essa comparação para a detecção de *S. agalactiae* em peixes.

Técnicas de diagnóstico para a detecção de *S. agalactiae* em peixe são usualmente baseadas em isolamento bacteriano em meio de cultivo. Neste ensaio experimental observamos uma sensibilidade clínica de 48,8% para a avaliação do método letal associado à bacteriologia. Dentre os métodos

de diagnóstico avaliados com amostras oriundas de técnicas letais e não-letais, a bacteriologia foi a mais sensível. Provavelmente, a alta sensibilidade é decorrente do isolamento da bactéria a partir de amostra cerebral, que parece ser órgão de predileção deste agente infeccioso. Porém, o isolamento bacteriano em meio de cultivo é um procedimento que requer tempo para obtenção de diagnóstico definitivo, o que possibilita um aumento do número de indivíduos infectados dentro de uma propriedade. Técnicas de biologia molecular para o diagnóstico desse patógeno foram desenvolvidas, como PCR espécie-específica e nested-PCR, que permitem maior sensibilidade no diagnóstico da infecção em menor tempo de execução (MATA *et al.*, 2004; JIMENEZ *et al.*, 2011). A partir dessa afirmação, foi avaliada a sensibilidade de detecção de *S. agalactiae* a partir de PCR espécie-específica e observamos que este método de diagnóstico quando associado ao método letal de coleta de amostras foi menos sensível que a bacteriologia (44,18%). A redução da sensibilidade desta técnica de diagnóstico em relação a bacteriologia pode ser decorrente da baixa carga bacteriana presente no tecido amostrado, reduzindo, dessa forma, a detecção do patógeno pela técnica molecular. Dentre as amostras obtidas por métodos não-letais, a detecção de *S. agalactiae* por bacteriologia apresentou sensibilidade clínica superior (27,90%) a PCR (23,25%). Não há estudos comparando a eficiência da técnica de PCR *S. agalactiae* espécie-específica e bacteriologia para amostras obtidas por biópsia aspirativa de rim cranial e punção venosa em peixes, porém a baixa detecção por PCR, observada no presente estudo, pode ser decorrente da baixa carga bacteriana nos peixes infectados, da sensibilidade analítica, presença de inibidores de PCR e problemas de extração de ácidos nucléicos dos tecidos amostrados.

A partir dos resultados obtidos para a detecção e isolamento de *S. agalactiae* nas amostras coletadas de forma letal e não-letal

em tilápias do Nilo infectadas experimentalmente, foi possível observar a equivalência do diagnóstico da infecção em peixes com doença clínica e a superioridade da bacteriologia em relação à PCR para o diagnóstico da doença em peixes portadores da infecção. Isso pode ter ocorrido devido ao quadro de infecção aguda, onde as bactérias atingem rapidamente a corrente sanguínea e se disseminam por todos os órgãos internos, sendo possível, dessa forma, detectar a infecção por *S. agalactiae* em amostras de sangue, cérebro e tecido renal de peixes moribundos. Porém, com a cronicidade da infecção, há uma redução da carga bacteriana presente na circulação sanguínea e nos órgãos internos, o que reduziu o diagnóstico da infecção nos peixes que permaneceram vivos até o final do período experimental.

MATA *et al.* (2004) determinaram a sensibilidade analítica de 250 células ou genoma equivalente para detecção de *S. agalactiae* por PCR espécie-específica. Este valor demonstra o tão sensível a metodologia de PCR é para o diagnóstico da doença. Ao realizar a reação de PCR para a detecção de *S. agalactiae* nos isolados obtidos dos peixes desafiados experimentalmente, observou-se que 100% dos isolados eram *S. agalactiae*. Porém, quando realizado a reação de PCR a partir de amostras clínicas, neste caso, as amostras coletadas de forma letal e não-letal, não houve uma equivalência nos resultados obtidos por bacteriologia e PCR. Apesar de MATA *et al.* (2004) terem determinado a sensibilidade analítica *in vitro* da técnica de PCR para a detecção de *S. agalactiae*, estes autores não determinaram a sensibilidade analítica da técnica em amostras clínicas, nem compararam a sensibilidade clínica da PCR à bacteriologia, o que reforça a importância deste presente estudo.

A presença de inibidores de PCR, geralmente provenientes do próprio material coletado, proporciona erros na interpretação de resultados e obtenção de animais falso-negativos, principalmente em amostras

sanguíneas (VILJOEN *et al.*, 2005; ZOYSA *et al.*, 2012). Estes inibidores podem se ligar diretamente ao DNA, podem afetar a ação da Taq-DNAPolimerase ou reduzir a disponibilidade de íons Mg^{2+} . A presença do grupo heme, hemoglobina, lactoferrina e imunoglobulinas presentes nas amostras de sangue e aspirado renal poderiam atuar como inibidores de PCR e proporcionar resultados negativos para peixes positivos por bacteriologia, porém, os kits de extração de DNA utilizados, neste estudo, são considerados aplicáveis de utilização em amostras sanguíneas, minimizando a presença de inibidores de PCR (KHOKHAR *et al.*, 2012; DHALIWAL, 2013).

DHALIWAL (2013) ressalta que a escolha correta do kit de extração pode ser crucial para a otimização e para a execução de um experimento. A sensibilidade de detecção por PCR mostrou-se diferente para cada um dos tipos de kits de extração de DNA utilizados neste estudo. A detecção de *S. agalactiae* a partir de amostras de sangue e aspirado renal foi nula quando utilizado o kit “DNeasy Tissue and Blood” para a extração manual de ácidos nucleicos, enquanto que, ao utilizar o extrator automático com o kit “Maxwell® 16 Tissue DNA Purification” foi possível uma frequência absoluta de 18,6% de peixes positivos para a infecção a partir de aspirado renal e 20,9% a partir de sangue. Estudos prévios compararam a extração manual e automática de ácidos nucleicos a partir de sangue total e tecidos fixados em parafina (KHOKHAR *et al.*, 2012), como também, para a detecção e quantificação de *Leptospira* em sangue de ser humano (BOURHY *et al.*, 2011). KHOKHAR *et al.* (2012) demonstraram que o extrator automático apresentou concentração e qualidade de DNA superior às amostras extraídas com sílica. Enquanto que BOURHY *et al.* (2011) demonstraram uma performance similar entre os métodos manual e automático para extração de DNA a partir de sangue total, permitindo a detecção de *Leptospira interrogans* em todas as amostras avaliadas.

Não há na literatura científica estudos que comparem a detecção de *S. agalactiae* a partir de extração de DNA manual e automática de tecidos. No presente estudo a média de concentração (ng/μL), pureza e qualidade (A_{260}/A_{280}) do DNA total a partir da extração automática (220,08; 1,82) foi maior quando comparada a extração manual (84,66; 2,06), corroborando com os resultados obtidos por KHOKHAR *et al.* (2012). Porém, ao realizar a detecção de *S. agalactiae* por PCR espécie-específica, foi observado equivalência de resultados apenas entre as amostras de cérebro e rim, coletadas de forma letal, de peixes moribundos quando avaliada a forma de extração às quais estas amostras foram submetidas. Apesar da alta concentração do DNA total extraído das amostras coletadas neste estudo, acredita-se que devido à presença da parede celular espessa de peptidoglicano, presente na bactéria *S. agalactiae*, possa não ter sido rompida pela utilização dos kits de extração e permitido a adequada extração do DNA bacteriano. Portanto, estudos futuros visando a otimização da extração de DNA bacteriano em amostras de sangue e aspirado renal se tornam necessários para a validação do protocolo de diagnóstico da infecção por *S. agalactiae* a partir de amostras coletadas de forma não-letal.

Estudos prévios compararam a eficiência de detecção de *Streptococcus agalactiae* por diferentes métodos de diagnóstico. HERNANDEZ *et al.* (2009) compararam a eficiência da microbiologia, histopatologia e imunoperoxidase indireta para o diagnóstico de *S. agalactiae* em tilápia vermelha (*Oreochromis* sp.) naturalmente infectadas e verificaram uma sensibilidade clínica de 30,8% para o exame bacteriológico e 100% para as outras metodologias de diagnóstico. LEAL (2011) comparou a detecção de *S. agalactiae* por bacteriologia, PCR espécie-específica e PCR em tempo real em tilápia do Nilo infectadas experimentalmente e obteve sensibilidade clínica de 50% para a bacteriologia, 63,3% para PCR espécie-

específica e 93,3% para a PCR em tempo real. A sensibilidade clínica do presente estudo foi superior ao observado por HERNANDEZ *et al.* (2009) e semelhante àquele obtido por LEAL (2011) para o diagnóstico de *S. agalactiae* por bacteriologia (48,8% de peixes diagnosticados positivos por esta metodologia). Porém, a sensibilidade clínica da detecção do patógeno por PCR espécie-específica foi inferior ao observado por LEAL (2011) (51,1% de peixes positivos).

JIMENEZ *et al.* (2011) avaliaram a detecção da bactéria *S. agalactiae* por nested-PCR em peixes doentes e em tecidos congelados e fixados em parafina, concluindo que esta é a melhor metodologia para a detecção do patógeno. LEAL (2011) desenvolveu uma PCR em tempo real que mostrou sensibilidade clínica similar ao nested-PCR desenvolvido por JIMENEZ *et al.* (2011) e superior à PCR espécie-específica desenvolvida por MATA *et al.* (2004). Nested-PCR e PCR em tempo real são métodos de diagnóstico promissores e que deverão ser avaliados em estudos futuros para a detecção de *S. agalactiae* associados às amostras coletadas de forma não-letal padronizadas neste estudo.

Os métodos de diagnóstico foram eficazes na detecção de peixes com doença clínica, não havendo diferença estatisticamente significativa entre as formas de obtenção de amostras, e apresentando boa concordância entre as amostras obtidas de forma letal e não-letal, independentemente do método de diagnóstico utilizado. Este resultado sugere que os métodos não-letais de coleta de amostras podem ser utilizados para a detecção de *S. agalactiae*. Porém a utilização de peixes doentes em programas de monitoramento sanitário, com coleta de amostras por métodos não-letais, é dependente do estágio de progressão da doença. Peixes com quadro de doença neurológica não revertem este estado, sendo necessário a sua eliminação nos plantéis

assim que visualizados. Porém, peixes em fase inicial de infecção podem ser submetidos à coleta de amostras por métodos não-letais para a realização do diagnóstico da enfermidade e ser instituído tratamento com antibiótico após confirmação do agente bacteriano envolvido. Essa medida terapêutica pode evitar a contaminação de outros peixes, assim como, tentar reverter o quadro de doença clínica em peixes em fase inicial da doença.

O entendimento sobre a capacidade de um patógeno em induzir estado de portador em um hospedeiro é essencial para delineamento das formas de controle e prevenção de uma doença. Em condições naturais, EVANS *et al.* (2002) obtiveram peixes portadores da infecção por *S. agalactiae* através da detecção de bacteriologia positiva em peixes sem sinais clínicos. Em condições experimentais, FARIA *et al.* (2014) induziram o estado de portador da infecção em tilápias, através da utilização de oxitetraciclina, como tratamento profilático e terapêutico da infecção por *S. agalactiae*. O presente estudo foi capaz de identificar 12 peixes portadores da infecção quando testados por bacteriologia e/ou PCR. A detecção de portadores da infecção por *S. agalactiae* foi significativamente menor quando comparada aos peixes com quadro de doença clínica, independentemente da forma de coleta de amostra e método de diagnóstico utilizado. Em peixes portadores, as amostras obtidas por métodos não-letais foram capazes de detectar *S. agalactiae*, porém com sensibilidade clínica muito menor ao comparar com a bacteriologia de cérebro. Os resultados obtidos neste presente estudo corroboram a hipótese de que estado de portador ocorre em tilápia e que isso pode ter impacto nas fazendas, decorrente da manutenção da bactéria no sistema de produção. Adicionalmente, cabe ressaltar que há uma diversidade genética considerável entre as amostras de *S. agalactiae* que causam doenças em peixes e que diferentes linhagens podem ter também diferentes

habilidades de induzir estado de portador (GODOY *et al.*, 2013; ROSINSKI-CHUPIN, 2013). Estudos futuros com o objetivo de avaliar a capacidade de indução do estado de portador da infecção por *S. agalactiae*, a partir de amostras geneticamente distintas da SA 20-06, poderão ser realizadas.

Previamente a esse estudo, somente um método de coleta não-letal em tilápia do Nilo, para a detecção de agente parasitário a partir de amostra de muco branquial, foi desenvolvido (EK-HUCHIM *et al.*, 2012). A padronização da biópsia aspirativa de rim cranial e punção venosa nesta espécie, realizada neste estudo, visa auxiliar produtores e técnicos dos serviços veterinários oficiais para o controle e prevenção das infecções por *S. agalactiae* nas tilapiculturas brasileiras, bem como possibilitar o monitoramento de plantéis em futuros programas nacionais de controle dessa enfermidade.

A frequência de amostras detectadas positivas por coleta não-letal foi significativamente mais baixa que as obtidas por coleta letal, independentemente do método de diagnóstico utilizado. Porém, dentre as amostras coletadas por técnicas não-letais, a frequência de detecção de *S. agalactiae* a partir de aspirado renal foi maior que o sangue na bacteriologia, porém, na PCR, a frequência de detecção no sangue foi superior ao aspirado renal. Os resultados obtidos por este estudo sugerem que a biópsia aspirativa de rim cranial e a punção venosa podem ser usados como metodologias efetivas de coleta não-letal de amostras biológicas para a detecção de *S. agalactiae* em peixes com doença clínica e peixes aparentemente saudáveis em fase inicial de infecção. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as duas amostras, sendo elas igualmente eficazes para a detecção do patógeno. Uma excelente congruência entre as técnicas não-letais foi observada quando utilizadas para a detecção por bacteriologia. A congruência entre estas

amostras foi boa pela técnica de PCR espécie-específica.

A coleta de sangue, por ser menos traumática e laboriosa que a biópsia aspirativa de rim cranial, pode ser a opção de escolha em programas de monitoramento sanitário em tilapiculturas comerciais para a detecção de *S. agalactiae*. Adicionalmente, cabe ressaltar que a biópsia aspirativa foi estatisticamente eficaz para a detecção do patógeno quando comparada à eficiência de diagnóstico por bacteriologia e PCR, a partir de rim, coletado de forma letal. Este resultado reforça a afirmação de que o tecido coletado por biópsia aspirativa é mesmo de origem renal e que esta forma de coleta não-letal de amostra também pode ser utilizada em programas de diagnóstico da doença. Portanto, este estudo sugere que a associação de coleta de sangue e aspirado renal devem ser utilizados para a detecção de *S. agalactiae* em programas de monitoramento sanitário, assim como, metodologia alternativa de coleta de amostras para futuros estudos de detecção de outros patógenos infecciosos em tilápias. Em suma, as amostras obtidas por métodos não-letais são alternativas promissoras mas não substituem o cérebro como amostra de eleição para o diagnóstico de *S. agalactiae*.

A partir dos resultados obtidos neste estudo, a bacteriologia associada à métodos não-letais de coleta de amostras é uma metodologia promissora para detecção de peixes portadores da infecção por *S. agalactiae*, o que permitiria o estabelecimento de programas específicos de monitoramento da estreptococose nos plantéis brasileiros, sem a necessidade de submeter peixes à eutanásia, principalmente reprodutores, e garantiria a comercialização de tilápias saudáveis. Porém, para um programa de monitoramento sanitário eficiente para *S. agalactiae*, a partir da baixa sensibilidade de detecção observada neste estudo para as amostras coletadas de forma não-letal, se torna necessário o ajuste do número de animais a serem submetidos à

punção venosa e biópsia aspirativa de rim cranial, sendo o tamanho da amostra calculado a partir da prevalência da doença no local e a sensibilidade de diagnóstico da metodologia utilizada, com o objetivo de aumentar a probabilidade de detecção de no mínimo um peixe positivo e subsequente eliminação do mesmo do plantel (SIMON e SCHILL, 1984). Essa medida também pode ser adotada para emissão de certificação sanitária na piscicultura, atestando a ausência do patógeno nos peixes produzidos em uma determinada propriedade, a partir de coletas de amostras periódicas.

6. CONCLUSÃO

As técnicas de biópsia aspirativa e punção venosa foram viáveis e seguras para a obtenção de amostras de rim e sangue, em tilápias do Nilo. Tais amostras foram eficientes na detecção da infecção por *Streptococcus agalactiae*, por bacteriologia e PCR espécie-específica em peixes com doença clínica e em portadores. A associação da coleta não-letal de amostras e os métodos de diagnóstico podem ser utilizados em programas de monitoramento sanitário para *S. agalactiae* desde que a amostragem seja ajustada aos valores de sensibilidade e especificidade determinados por este estudo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGIUS, C.; ROBERTS, R. J. Melanophagocyte centres and their role in fish pathology. *J. Fish Dis.*, v. 26, n. 9, p. 499-509, 2003.
- AGNEW, W.; BARNES, A. C. *Streptococcus iniae*: An aquatic pathogen of global veterinary significance and challenging candidate for reliable vaccination. *Vet. Microbiol.*, v. 122, n. 1-2, p. 1-15, 2007.
- ALTINOK, I.; GRIZZLE, J. M.; LIU, Z. Detection of *Yersinia ruckeri* in rainbow trout blood by use of the polymerase chain

- reaction. *Dis. Aquat. Org.*, v. 44, n. 1, p. 29-34, 2001.
- AMAL, M. N. A.; ZAMRI-SAAD, M.; SITI-ZAHRAH, A. *et al.* An outbreak of *Streptococcus agalactiae* infection in cage-cultured golden pompano, *Trachinotus blochii* (Lacépede), in Malaysia. *J. Fish Dis.*, v. 35, n.11, p. 849-852, 2012.
- AUSTIN, B; AUSTIN, D.A. *Bacterial Fish Pathogens. Diseases of Farmed and Wild Fish*, 4. ed. Chichester: Springer/Prazis Publishing, 2007. 553p.
- BARROS, A. A. B. G.; MAGALHAES, G. R.; CAVALCANTE, V. F. N. *Ocorrência de endoparasitos em peixes consumidos no município de Curralinho, Ilha do Marajó, Estado do Pará, e sua importância na inspeção do pescado*. 2009, 40f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização) – Universidade Castelo Branco, Belém.
- BERRIDGE, B. R.; BERCOVIER, H.; FRELIER, P. F. *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus difficile* 16S-23S intergenic rDNA: genetic homogeneity and species-specific PCR. *Vet. Microbiol.*, v. 78, n. 2, p. 165-173, 2001.
- BISHARAT, N.; CROOK, D. W.; LEIGH, J. *et al.* Hyperinvasive Neonatal Group B streptococcus has arisen from a bovine ancestor. *J. Clin. Microbiol.*, v. 42, n. 5, p. 2161-2167, 2004.
- BISHOP, E. J.; SHILTON, C.; BENEDICT, S. *et al.* Necrotizing fasciitis in captive juvenile *Crocodylus parasus* caused by *Streptococcus agalactiae* an outbreak and review of the animal and human literature. *Epidemiol. Infect.*, v. 135, n. 8, p. 1248-1255, 2007.
- BOMBARDELLI, R. A.; SYPPERRECK, M. A.; SANCHES, E. A. Situação atual e perspectivas para o consumo, processamento e agregação de valor ao pescado. *Arq. Ciên. Vet. zool.*, v. 8, n. 2, p. 181-195, 2005.
- BOURHY, P.; BREMONT, S.; ZININI, F. *et al.* Comparison of real-time PCR assays for detection of pathogenic *Leptospira* spp. in blood and identification of variations in target sequences. *J. Clin. Microbiol.*, v. 49, n. 6, p. 2154-2160, 2011.
- BOWATER, R. O.; FORBES-FAULKNER, J.; ANDERSON, I. G. *et al.* Natural outbreak of *Streptococcus agalactiae* (GBS) infection in wild giant Queensland grouper, *Epinephelus lanceolatus* (Bloch), and other wild fish in northern Queensland, Australia. *J. Fish Dis.*, v. 35, n. 2, p. 173-186, 2012.
- BOZANO, G. L. N.; CYRINO, J. E. P. Produção intensiva de peixes em tanques-rede e gaiolas: estudo de casos. *Panorama da Aquicultura*, v. 56, n. 6, p. 36-41, 1999.
- BROCHET, M.; COUVÉ, E.; ZOUINE, M. *et al.* Genomic diversity and evolution within the species *Streptococcus agalactiae*. *Microbes Infect.*, v. 8, n. 5, p. 1227-1243, 2006.
- BROWN, L. *Aquaculture for Veterinarians: fish husbandry and medicine*. 1. ed. Oxford: Pergamon Press, 1993. 447p.
- CARVALHO, R.; LEMOS, D. Fatos e Figuras: aquicultura e consumo de carnes no Brasil e no Mundo. *Panorama da Aquicultura*, v. 19, n. 112, p. 46-49, 2009.
- CHEN, C. Y.; CHA, C. B.; BOWSER, P. R. Comparative histopathology of *Streptococcus iniae* and *Streptococcus agalactiae* infected tilapia. *Bull. Eur. Assn. Fish P.*, v. 27, n. 1, p. 2-9, 2007.
- CIPRIANO, R. C.; FORD, L. A.; TESKA, J. D. *et al.* Use of non-lethal procedures to detect and monitor *Aeromonas salmonicida* in potentially endangered or threatened populations of migrating and post-spawning salmon. *Dis. Aquat. Org.*, v. 27, n. 3, p. 233-236, 1996.

- CLEOPHAS, T. J.; ZWINDERMAN, A. H. McNemar's test. In: CLEOPHAS, T. J.; ZWINDERMAN, A. H. *Statistical analysis of clinical data on a pocket calculator*. Dordrecht: Springer, 2011. p. 39-40.
- CORNWELL, E. R.; BELLMUND, C. A.; GROOCOCK, G. H. *et al.* Fin and gill biopsies are effective nonlethal samples for detection of *Viral hemorrhagic septicemia virus* genotype IVb. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 25, n. 2, p. 203-209, 2013.
- CUTRIN, J. M.; LOPEZ-VAZQUEZ, C.; OLIVEIRA, J. G. *et al.* Isolation in cell culture and detection by PCR-based technology of IPNV-like virus from leucocytes of carrier turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *J. Fish Dis.*, v. 28, n. 12, p. 713-722, 2005.
- DHALIWAL, A. DNA extraction and purification. *Mater. Methods*, v. 3, n. 191, 2013.
- DOMEÉNECH, A.; DERENAAANDEZ-GARAYZABAL, J. F.; PASCUAL, C. *et al.* Streptococcosis in cultured turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), associated with *Streptococcus parauberis*. *J. Fish Dis.*, v. 19, n. 1, p. 33-38, 1996.
- DRENNAN, J. D.; LAPRATA, S. E.; SAMSON, C. A. *et al.* Evaluation of lethal and non-lethal sampling methods for the detection of white sturgeon iridovirus infection in White sturgeon, *Acipenser transmontanus* (Richardson). *J. Fish Dis.*, v. 30, n. 6, p. 367-379, 2007.
- DUREMDEZ, R.; AL-MARZOUK, A.; QASEM, J. A. *et al.* Isolation of *Streptococcus agalactiae* from cultured silver pomfret, *Pampus argenteus* (Euphrasen), in Kuwait. *J. Fish Dis.*, v. 27, n. 5, p. 307-310, 2004.
- EK-HUCHIM, J. P.; JIMENEZ-GARCIA, I.; PEREZ-VEIGA, J. A. *et al.* Non-lethal detection of DNA from *Cichlidogyrus* spp. (Monogea, Ancyrocephalinae) in gill mucus of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Dis. Aquat. Org.*, v. 98, n. 2, p. 155-162, 2012.
- ELDAR, A. Experimental streptococcal meningo-encephalitis in cultured fish. *Vet. Microbiol.*, v. 43, n. 1, p. 33-40, 1995.
- EVANS, J. J.; BOHNSACK, J. F.; KLESIUS, P. H. *et al.* Phylogenetic relationships among *Streptococcus agalactiae* isolated from piscine, dolphin, bovine and human sources: a dolphin and piscine lineage associated with a fish epidemic in Kuwait is also associated with human neonatal infections in Japan. *J. Med. Microbiol.*, v. 57, n. 11, p. 1369-1376, 2008.
- EVANS, J. J.; KLESIUS, P. H.; GILBERT, P. M. *et al.* Characterization of β -haemolytic Group B *Streptococcus agalactiae* in cultured seabream, *Sparus auratus* L., and wild mullet, *Liza klunzingeri* (Day), in Kuwait. *J. Fish Dis.*, v. 25, n. 9, p. 505-513, 2002.
- EVANS, J. J.; PASNIK, D. J.; KLESIUS, P. H. A commercial rapid optical immunoassay detects *Streptococcus agalactiae* from aquatic cultures and clinical specimens. *Vet. Microbiol.*, v. 144, n. 3-4, p. 422-428, 2010.
- EVANS, J. J.; PASNIK, D. J.; KLESIUS, P. H. *et al.* First report of *Streptococcus agalactiae* and *Lactococcus garviae* from a wild bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *J. Wildl. Dis.*, v. 42, n. 3, p. 561-569, 2006.
- FARIA, F. C.; LEAL, C. A. G.; CARVALHO-CASTRO, G. A. *et al.* Carrier state induced by oxytetracycline therapy against streptococcosis in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *J. Fish Dis.*, v. 37, n. 9, p. 853-857, 2014.
- FERNANDES, M. O.; VOLPATO, G. L. Heterogeneous growth in the Nile tilapia: social stress and carbohydrate metabolism. *Physiol. Behav.*, v. 54, n. 2, p. 319-323, 1993.

- FIGUEIREDO, H. C. P.; CARNEIRO, D. O.; FARIA, F. C. *et al.* *Streptococcus agalactiae* associado à meningoencefalite e infecção sistêmica em tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 58, n. 4, p. 678-680, 2006.
- FIGUEIREDO, H. C. P.; GODOY, D. T.; MIAN, G. F. *et al.* Estreptococose em tilápia do Nilo - parte 2. *Panorama da Aqüicultura*, v. 17, n. 104, p. 42-45, 2007b.
- FIGUEIREDO, H. C. P.; LEAL, C. A. G. Infecções por *Streptococcus* spp. em peixes. In: SILVA-SOUZA, A. T.; LIZAMA, M. A. P.; TAKEMOTO, R. M. *Patologia e Sanidade de organismos Aquáticos*. Maringá: Ed. Massoni, 2012, p. 275-292.
- FIGUEIREDO, H. C. P.; MIAN, G. F.; GODOY, D.T. Estreptococose em tilápia do Nilo - parte 1. *Panorama da Aqüicultura*, v. 17, n. 103, p. 36-38, 2007a.
- FIGUEIREDO, H. C. P.; NOBREGA-NETTO, L.; LEAL, C. A. G. *et al.* *Streptococcus iniae* outbreaks in brazilian Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) farms. *Braz. J. Microbiol.*, v. 43, n. 2, p. 576-580, 2012.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. The state of world fisheries and aquaculture. Rome, 2012. 230 p.
- GAHLAWAT, S. K.; MUNRO, E. S.; ELLIS, A. E. A non-destructive test for detection of IPNV-carriers in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.). *J. Fish Dis.*, v. 27, n. 4, p. 233-239, 2004.
- GENG, Y., WANG, K. Y.; HUANG, X. L. *et al.* *Streptococcus agalactiae*, an emerging pathogen for cultured ya-fish, *Schizothorax prenanti*, in China. *Transbound. Emerg. Dis.*, v. 59, n. 4, p. 369-375, 2012.
- GIBELLO, A.; MATA, A. I.; BLANCO, M. M. *et al.* First identification of *Streptococcus phocae* isolated from Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *J. Clin. Microbiol.*, v. 43, n. 1, p. 526-527, 2005.
- GIRAY, C.; OPITZ, H. M.; MACLEAN, S. *et al.* Comparison of Lethal versus non-lethal sample sources for the detection of infectious salmon anemia virus (ISAV). *Dis. Aquat. Org.*, v. 66, n. 3, p.181-185, 2005.
- GLAZUNOVA, O. O.; RAOULT, D.; ROUX, V. Partial sequence comparison of the *rpoB*, *soda*, *groEL*, and *gyrB* genes within the genus *Streptococcus*. *Int. J. Syst. Evol. Bacteriol.*, v. 59, n. 9, p. 2317-2322, 2009.
- GODOY, D. T.; CARVALHO-CASTRO, G. A.; LEAL, C. A. G. *et al.* Genetic diversity and new genotyping scheme for fish pathogenic *Streptococcus agalactiae*. *Lett. Appl. Microbiol.*, v.57, n.6, p. 476-483, 2013.
- GONÇALVES, A. A.; PASSOS, M. G.; BIEDRZYCKI, A. Percepção do consumidor com relação à embalagem de pescado: estudo de caso com os alunos do curso de Engenharia de Alimentos. *Estudos Tecnológicos*, v. 5, n. 1, p. 14-32, 2009.
- GONÇALVES, A. A.; PASSOS, M. G.; BIEDRZYCKI, A. Tendência do consumo de pescado na cidade de Porto Alegre: um estudo através de análise de correspondência. *Estudos Tecnológicos*, v. 4, n. 1, p. 21-36, 2008.
- GULZAR, R.; YAQOUB, A.; JAIN, A. K. Peripheral adrenergic neuro-melanophore transmission with some basic observation son adrenergic receptors in melanophores of the fish, *Cyprinus carpio*. *Intern. J. Recent Scient. Res.*, v. 4, n. 11, p. 1839-1846, 2013.
- HARTMAN, D. Perfecting your spread plate technique. *J. Microbiol. Biol. Educ.*, v. 12, n. 2, p. 204-205, 2011.
- HASSON, K.W., WYLD, E. M.; FAN, Y. *et al.* Streptococcosis in farmed *Litopenaeus vannamei*: a new emerging bacterial disease

- of penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, v. 86. n. 2, p. 93-106, 2009.
- HERNANDEZ, E.; FIGUEROA, J.; IREGUI, C. Streptococcosis on a red tilapia, *Oreochromis* sp., farm: a case study. *J. Fish Dis.*, v. 32, n. 3, p. 247-252, 2009.
- HEUER, O. E.; KRUSE, H. GRAVE, K. *et al.* Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture. *Clin. Infect. Dis.*, v. 49, n. 8, p. 1248-1253, 2009.
- INOUE, L. A. K. A.; BOIJINK, C. L., RIBEIRO, P. T. *et al.* Avaliação de respostas metabólicas do tambaqui exposto ao eugenol em banhos anestésicos. *Acta Amazonica*, v. 21, n. 2, p. 327-332, 2011.
- ITSARO, A.; SUANYUK, N.; TANTIKITTI, C. Multiplex PCR for simultaneous detection of *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus iniae* and *Lactococcus garviae*: a case of *S. agalactiae* infection in cultured Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and red tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis mossambicus*). *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, v. 34, n. 5, p. 495-500, 2012.
- JIMENEZ, A.; TIBATA, V.; JUNCA, H. *et al.* Evaluating a nested-PCR assay for detection *Streptococcus agalactiae* in red tilapia (*Oreochromis* sp.) tissue. *Aquaculture*, v. 321, n. 3-4, p. 203-206, 2011.
- JOHRI, A. K.; PAOLETTI, L. C.; GLASER, P. *et al.* Group B Streptococcus: global incidence and vaccine development. *Nat. Rev. Microbiol.*, v. 4, n. 12, p. 932-942, 2006.
- KEEFE, G. P. *Streptococcus agalactiae* mastitis: a review. *Can. Vet. J.*, v. 38, n. 7, p. 429-437, 1997.
- KHOKHAR, S. K.; MITUI, M.; LEOS, N. K. *et al.* Evaluation of Maxwell® 16 for automated DNA extraction from whole blood and formalina-fixed paraffin embedded (FFPE) tissue. *Clin. Chem. Lab. Med.*, v. 50, n. 2, p. 267-272, 2012.
- KORSNES, K.; KARLSBAKK, E.; DEVOLD, M. *et al.* Tissue tropism of nervous necrosis virus (NNV) in Atlantic cod, *Gadus morhua* L., after intraperitoneal challenge with a virus isolate from diseased Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.). *J. Fish Dis.*, v. 32, n. 8, p. 655-665, 2009.
- KUBITZA, F. Antecipando-se às doenças na tilapicultura. *Panorama da Aquicultura*, v. 15, n. 89, p. 15-23, 2005.
- KUBITZA, F. Principais parasitoses e doenças em tilápias. *Panorama da Aquicultura*, v. 10, n. 60, p. 39-53, 2000.
- LALKHEN, A. G.; MCCLUSKEY, A. Clinical tests: sensitivity and specificity. *Contin. Educ. Anaesth. Crit. Care Pain*, v. 8, n. 6, p. 221-223, 2008.
- LEAL, C. A. G. *Desenvolvimento e otimização de protocolos de PCR em Tempo Real para o diagnóstico de patógenos emergente para aqüicultura nacional*. 2011. 91f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- LI, Y. W.; LIU, L.; HUANG, P. R. *et al.* Chronic streptococcosis in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), caused by *Streptococcus agalactiae*. *J. Fish Dis.* (in print), 2013.
- LIU, L.; LI, Y. W.; HE, R. Z. *et al.* Outbreak of *Streptococcus agalactiae* infection in barcoo grunter, *Scortum barcoo* (McCulloch & Waite), in an intensive fish farm in China. *J. Fish Dis.* (in print), 2013.
- LOPEZ-JIMENA, B.; GARCIA-ROSADO, E.; INFANTE, C.; *et al.* Detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) from asymptomatic redbanded seabream, *Pagrus auriga* Valenciennes, and common seabream, *Pagrus pagrus* (L.), using a non-

- destructive procedure. *J. Fish Dis.*, v. 33, n. 4, p.311-319, 2010.
- LPSN. List of prokaryotic names with standing in nomenclature: Genus *Streptococcus*. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/streptococcus.html>>. Acesso em: 30 jan. 2014.
- LUZ, R. K.; RIBEIRO, P. A. P.; IKEDA, A. L. *et al.* Performance and stress resistance of Nile tilapias fed different crude proteins levels. *R. Bras. Zootec.*, v. 41, n. 2, p. 457-461, 2012.
- MAIONE, D.; MARGARIT, I; RINAUDO, C. D. *et al.* Identification of a universal Group B *Streptococcus* Vaccine by Multiple Genome Screen. *Science*, v. 309, n. 5731, p. 148-150, 2005.
- MATA, A. I.; GIBELLO, A.; CASAMAYOR, A. *et al.* Multiplex PCR assay for detection of bacterial pathogens associated with warm-water streptococcosis in fish. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 70, n. 5, p. 3183-3187, 2004.
- MIAN, G. F.; GODOY, D. T.; LEAL, C. A. G. *et al.* Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia. *Vet. Microbiol.* v. 136, n. 1-2, p. 180-183, 2008.
- MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura: Brasil 2011. 2013. Disponível em: <http://mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20MPA%202011_FINAL3.pdf>. Acesso em: 21 dez. 2013.
- NIZET, V. Streptococcal β -hemolysins: genetics and role in disease pathogenesis. *Trends Microbiol*, v. 10, n. 12, p. 575-580, 2002.
- NOBREGA-NETTO, L.; LEAL, C.A.G.; FIGUEIREDO, H.C.P. *Streptococcus dysgalactiae* as an agent of septicemia in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *J. Fish Dis.*, v. 34. n. 3, p. 251-254, 2011.
- NOGA, E. J. *Fish disease: diagnosis and treatment*. 1.ed, Iowa: Blackwell Publishing, 2000, 367p.
- NOGA, E. J.; LEVINE, J. F.; TOWNSEND, K. *et al.* Kidney biopsy: a nonlethal method for diagnosing *Yersinia ruckeri* infection (enteric redmouth disease) in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Am. J. Vet. Res.*, v. 49, n. 3, p.363-365, 1988.
- NOMOTO, R., MUNASINGHE, L. I.; JIN, D. H. *et al.* Lancefield group C *Streptococcus dysgalactiae* infection responsible for fish mortalities in Japan. *J. Fish Dis.*, v. 27, n. 12, 679-686, 2004.
- OBA, E. T.; MARIANO, W. S.; SANTOS, L. R. B. Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para o manejo rentável. In: TAVARES-DIAS, M. *Manejo e sanidade de peixes em cultivo*. Macapá: Embrapa Amapá, 2009. p. 226-247.
- OLIVEIRA, A. R.; CASTRUCCI, A. M.; VISCONTI, M. A. Cellular signalling in vertebrate pigment cells. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 29, n. 12, p.1743-1749, 1996.
- OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R.; SOTO, D. Aquicultura no Brasil: o desafio é crescer. Brasília: Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO), 2007. v. 1. 276p.
- PADUA, S. B.; MENEZES FILHO, R. N.; CRUZ, C. Alevinos saudáveis: o ponto de partida para uma produção estável. *Panorama da Aquicultura*, v. 22, n. 134, p. 30-37, 2012.
- PASNIK, D. J.; EVANS, J. J.; KLESZIUS, P. H. Fecal strings associated with *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Open Vet. Sci. J.*, v. 3, p. 6-8, 2008.

- PASNIK, D. J.; EVANS, J. J.; PANANGALA, V. S. *et al.* Antigenicity of *Streptococcus agalactiae* extracellular products and vaccine efficacy. *J. Fish Dis.*, v. 28, n. 4, p. 205-212, 2005.
- PATTERSON, H.; SARALAHTI, A.; PARIKKA, M. *et al.* Adult zebrafish model of bacterial meningitis in *Streptococcus agalactiae* infection. *Dev. Comp. Immunol.*, v. 38, n. 3, p. 447-455, 2012.
- PEREIRA, U. P.; MIAN, G. F.; OLIVEIRA, I. C. M. *et al.* Genotyping of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from fish, human and cattle and their virulence potential in Nile tilapia. *Vet. Microbiol.*, v. 140, n. 1-2, p.186-192, 2010.
- PEREIRA, U. P.; SANTOS, A. R.; HASSAN, S. S. *et al.* Complete genome sequence of *Streptococcus agalactiae* strain SA20-06, a fish pathogen associated to meningoencephalitis outbreaks. *Stand. Genomic Sci.*, v. 8, n. 2, p. 188-197, 2013.
- PLUMB, J. A.; SCHACHTE, J. H.; GAINES, J. L. *et al.* *Streptococcus* sp. from marine fishes along the Alabama and Northwest Florida coast of the Gulf of Mexico. *Trans. Am. Fish Soc.*, v. 103, n. 2, p. 358-361, 1974.
- QUINN, R. A.; STEVENSON, R. M. W. Denaturing gradient gel electrophoresis for nonlethal detection of *Aeromonas salmonicida* in salmonid mucus and its potential for other bacterial fish pathogens. *Can. J. Microbiol.*, v. 58, n. 5, p. 563-571, 2012.
- RASHEED, V.; PLUMB, J. A. Pathogenicity of a non-hemolytic group B *Streptococcus* sp. in gulf killifish (*Fundulus grandis* Baird and Girard). *Aquaculture*, v. 37, n. 2, p. 97-105, 1984.
- RIGOS, G.; NENGAS, I.; TYRPENOU, A. E. *et al.* Pharmacokinetics and bioavailability of oxytetracycline in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) after a single dose. *Aquaculture*, v. 221, n.1-4, p. 75-83, 2003.
- RODRIGUES, E. *Pesquisa de Aeromonas spp. em tilápia (Oreochromis niloticus), cultivada no Estado do Rio de Janeiro – Brasil: Isolamento, identificação de espécies e avaliação da sensibilidade antimicrobiana.* 2007. 210f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói.
- ROMALDE, J. L.; RAVELO, C.; VALDES, I. *et al.* *Streptococcus phocae*, an emerging pathogen for salmonid culture. *Vet. Microbiol.*, v. 130. N. 1-2, p. 198-207, 2008.
- ROSINSKI-CHUPIN, I., SAUVAGE, E.; MAIREY, B. *et al.* Reductive evolution in *Streptococcus agalactiae* and the emergence of a host adapted lineage. *BMC Genomics*, v. 14, n. 1, e252, 2013.
- RUANE, N. M.; COLLINS, E. M.; GEARY, M. *et al.* Isolation of *Streptococcus agalactiae* and an aquatic birnavirus from doctor fish *Garra rufa* L. *Ir. Vet. J.*, v. 66, n. 1, 16p., 2013.
- SALVADOR, R. Impact of Streptococcosis on Tilapia in Brazil, Aquavac Strep Sa for management. 2012. Disponível em: <<http://www.thefishsite.com/articles/1/fish-health/1449/impact-of-streptococcosis-on-tilapia-in-brazil-aquavac-strep-sa-for-management>>. Acesso em: 01 dez. 2013.
- SALVADOR, R.; MULLER, E. E.; FREITAS, J. C. *et al.* Isolamento e caracterização de *Streptococcus* spp. do grupo B em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) criadas em tanques rede e em viveiros de terra na região norte do Estado do Paraná, Brasil. *Ciênc. Rural*, v. 35, n. 6, p. 1374-1378, 2005.
- SALVADOR, R.; MULLER, E. E.; LEONHARDT, J. H. *et al.* Isolamento de *Streptococcus* spp. de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e qualidade da água

- de tanques rede na região norte do estado do Paraná, Brasil. *Semina: Ciênc. Agrárias*, v. 24, n.1, p. 35-42, 2003.
- SANTOS, C. A. M. L. Qualidade do Pescado. In: GONÇALVES, A. A. *Tecnologia do Pescado: Ciência, Tecnologia, Inovação e Legislação*. São Paulo: Editora Atheneu, 2011. p. 95-105.
- SHEWMAKER, P. L.; CAMUS, A. C.; BAILIFF, T. *et al.* *Streptococcus ictaluri* sp. nov., isolated from Channel Catfish *Ictalurus punctatus* broodstock. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 57, n. 7, p. 1603-1606, 2007.
- SHOEMAKER, C. A.; LAFRENTZ, B. R.; KLESIUS, P. H. *et al.* Protection against heterologous *Streptococcus iniae* isolates using a modified bacterin vaccine in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *J. Fish Dis.*, v. 33, n. 7, p. 537-544, 2010.
- SILVA, J. V.; CARDOSO, J. R.; SOUSA, M. M. Qualidade sensorial de peixes comercializados em mercados públicos de Teresina-PI. *Rev. Hig. Alimentar*, v. 27, n. 3, p. 36-40, 2013.
- SILVA, R. D.; ROCHA, L. O.; FORTES, B. D. A. *et al.* Parâmetros hematológicos e bioquímicos da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) sob estresse por exposição ao ar. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 32, n.1, p. 99-107, 2012.
- SIMON, R. C.; SCHILL, W. B. Tables of sample size requirements for detection of fish infected by pathogens: three confidence levels for different infection prevalence and various population sizes. *J. Fish Dis.*, v. 7, n. 6, p. 515-520, 1984.
- SONODA, D. Y. Demanda por pescados no Brasil entre 2002 e 2003. 2006. 119f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.
- SOTO, E.; FERNANDEZ, D.; THUNE, R. *et al.* Interaction of *Francisella asiatica* with tilapia (*Oreochromis niloticus*) innate immunity. *Infect. Immun.*, v. 78, n. 5, p. 2070-2078, 2010.
- SUANYUK, N., KANGHEAR, H., KHONGPRADIT, R. *et al.* *Streptococcus agalactiae* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Songklanakarin J. Sci. Technol. Aquat. Sci.*, v. 27, n. 1, 307–319, 2005.
- TRESISE, M. M.; MOKAE, M. L. L.; WAGENAAR, G. M. *et al.* A proposed liver needle core biopsy technique for the sharptooth catfish *Clarias gariepinus* (Burchell) for use in fish health research. *J. Fish Dis.* (in print), 2013.
- VIERA, A. J.; GARRETT, J. M. Understanding interobserver agreement: the kappa statistic. *Fam. Medic.*, v. 37, n. 5, p. 360-363, 2005.
- VILJOEN, G. J; NEL, L. H.; CROWTHER, J. R. *Molecular diagnostic PCR handbook*. Dordrecht: Springer, 2005. 307p.
- WASKO, A. P.; MARTINS, C.; OLIVEIRA, C. *et al.* Non-destructive genetic sampling in fish. An improved method for DNA extraction from fish fins and scales. *Hereditas*, v. 138, n. 3, p. 161-165, 2003.
- WHITE, M. R.; ALBREGTS, S. R.; WU, C. C. *et al.* The use of kidney biopsy of broodstock steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) to determine the status of bacterial kidney disease infection. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 8, n. 4, p. 519-522, 1996.
- YE, X.; LI, J.; LU, M. *et al.* Identification and molecular typing of *Streptococcus agalactiae* isolated from pond-cultured tilapia in China. *Fish. Sci.*, v. 77, n. 4, p. 623-632, 2011.
- YILDIRIM, A. Ö.; LÄMMLER, C. H.; WEIS, R. Identification and characterization of *Streptococcus agalactiae* isolated from horses. *Vet. Microbiol.*, v. 85, n. 1, p. 31-35, 2002.

ZAINATHAN, S. C.; CARSON, J.; CRANE, M. S. J. *et al.* F. Laboratory evaluation of sample collection methods (organs vs swabs) for Tasmanian salmon reovirus detection in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.*, v. 36, n. 4, p. 427-436, 2013.

ZOYSA, A.; EDWARDS, K.; GHARBIA, S. *et al.* Non-culture detection of *Streptococcus agalactiae* (Lancefield group B *Streptococcus*) in clinical samples by real-time PCR. *J. Med. Microbiol.*, v. 61, n. 8, p. 1086-1090, 2012