



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AQUICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

**SUPLEMENTAÇÃO DIETÁRIA COM PROBIÓTICO EM
TILÁPIA DO NILO COMO PREVENÇÃO À
ESTREPTOCOSE**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura e Recursos Pesqueiros da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Aquicultura.

Orientador: José Luiz Pedreira Mouriño

MARCELA MAIA YAMASHITA

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Yamashita, Marcela Maia

Suplementação dietária com probiótico em tilápia do Nilo como prevenção à estreptococose / Marcela Maia Yamashita ; orientador, José Luiz Pedreira Mouriño - Florianópolis, SC, 2015.

91 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. Lactobacillus plantarum. 3. Streptococcus agalactiae. 4. Infecção. 5. Microscopia eletrônica. I. Mouriño, José Luiz Pedreira . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. III. Título.

**Suplementação dietária com probiótico em tilápia do Nilo como
prevenção à estreptococose**

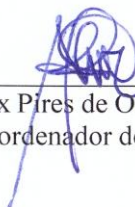
Por

MARCELA MAIA YAMASHITA

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM AQUICULTURA

e aprovada em sua forma final pelo Programa de
Pós-Graduação em Aqüicultura.



Prof. Alex Pires de Oliveira Nuñez, Dr.
Coordenador do Programa

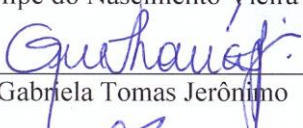
Banca Examinadora:



Dr. José Luiz Pedreira Mourinho – *Orientador*



Dr. Felipe do Nascimento Vieira



Dra. Gabriela Tomas Jerônimo



Dr. Mauricio Laterça Martins

AGRADECIMENTOS

Á Deus, por ter colocado em meu caminho a oportunidade de realizar este trabalho num momento de superação.

Aos meus pais, pelo apoio sempre constante desde quando decidi retomar os estudos. Obrigada, pela dedicação que há tantos anos me foi dada.

À Capes pela concessão da bolsa de estudos para a execução deste trabalho.

Ao professor José Luiz Pedreira Mouriño, pela confiança em mim depositada desde quando decidi retornar à universidade. Por tantos anos de parceria desde a época em que éramos bolsistas do antigo Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos – LAPOA/UFSC. Obrigada pelas conversas, risadas, cafés, conselhos e ensinamentos.

Ao professor Maurício Laterça Martins, pelo conhecimento compartilhado desde 2003, quando fui sua estagiária. Agradeço pela atenção, quando o procurei para retornar aos estudos, pela confiança e por fazer parte da minha história dentro da universidade.

Aos amigos do Laboratório AQUOS/UFSC pela paciência em me ensinar procedimentos que nunca havia realizado, pelo desprendimento, pelas conversas, cafés, risadas e parceria nas coletas. Obrigada por toda ajuda na histologia, Lucas! Obrigada pela paciência em me ensinar, Patrícia! Aline, obrigada pelo seu desprendimento e simplicidade em me ensinar tantas coisas dentro do laboratório!

Aos amigos da microbiologia, do Laboratório de Camarões Marinhos – LCM/UFSC, agradeço pelos conselhos, cafés, desabafos, conhecimento compartilhado, além do espírito de equipe e bom-humor! Obrigada por me ensinarem tantas coisas! Obrigada por terem me auxiliado nas coletas!

Agradeço imensamente à equipe que me ajudou, à equipe que literalmente “vestiu a camisa” durante meu experimento. Marcos e Hugo, vocês são demais! Muito dedicados e bem-humorados sempre! Isso faz toda a diferença! Scheila, te agradeço por todo ensinamento e por ser um exemplo para mim; você é uma menina muito guerreira! Tamires, Fernanda e Marina, obrigada por toda ajuda mesmo, de coração! Formamos uma bela equipe, galera!

Ao Éder e à professora Zenilda, por abrirem as portas do seu laboratório para que eu pudesse realizar uma etapa importante deste trabalho. Obrigada, pelo acolhimento e pelo “café no bêquer”!

À Thaís e Eliana do LCME/UFSC, agradeço pela calma, paciência e solicitude em me ajudar nas análises de microscopia eletrônica.

Obrigada ao Carlos do LCM/UFSC, por ter vindo num dia de muita chuva, com a família toda, montar moto-bomba, organizar o quadro de luz e, enfim, colocar a sala de bioensaio em ordem para meu experimento. Muito obrigada!

Ao Oda, colega do tempo de graduação, que hoje sendo um produtor, forneceu os peixes para a execução deste trabalho. Te agradeço imensamente!

À minha amiga-irmã, desde a época da graduação, Renata. Rê, te agradeço por tudo, amiga! Desde o início da minha vida acadêmica, você já estava lá. E quando resolvi recomeçar o mestrado, você também estava lá me apoiando. Do fundo do coração, eu agradeço a Deus por você ser minha Amiga (com “A” maiúsculo) e fazer parte da minha vida.

Obrigada a todos os professores do Programa de Pós-graduação em Aquicultura. Por serem meus mestres há tanto tempo, por terem me ensinado a amar o que faço. Obrigada!

Enfim, agradeço a todos que, de alguma forma, colaboraram para a execução deste trabalho e tornaram esta caminhada mais suave de ser percorrida.

RESUMO

Neste trabalho, foram avaliados os efeitos da suplementação dietética da bactéria probiótica *Lactobacillus plantarum* no trato intestinal e na saúde de peixes após infecção com *Streptococcus agalactiae*. Os peixes foram alimentados com 3% da biomassa total durante 58 dias, com ração comercial suplementada com probiótico e dieta não-suplementada. Ao término do experimento, os peixes foram desafiados, via gavagem, com *S. agalactiae*. Peixes alimentados com dieta probiótica apresentaram maior concentração de bactérias ácido-láticas totais no intestino e menor concentração de vibrionáceas quando comparados aos peixes não-suplementados ($p < 0,05$). Peixes do grupo probiótico também apresentaram maiores valores de peso final e índice de crescimento específico, além de menor valor de conversão alimentar ($p < 0,05$). Após 96 horas do desafio, o número de trombócitos e neutrófilos aumentou nos peixes suplementados com probiótico ($p < 0,05$). Microscopia eletrônica de transmissão e de luz demonstraram bactérias similares à *S. agalactiae* no tecido hepático e no epitélio intestinal de ambos os grupos. *Lactobacillus plantarum* colonizou o trato gastrointestinal de tilápias, melhorou o desempenho zootécnico, alterou a microbiota intestinal e modulou alguns parâmetros hematológicos após desafio.

Palavras-chave: Aquicultura, Infecção, *Lactobacillus plantarum*, Microscopia eletrônica, *Streptococcus agalactiae*.

ABSTRACT

In this paper, the effects of dietary supplementation with probiotic bacterium *Lactobacillus plantarum* on fish health and in the intestinal tract were evaluated after challenge with *Streptococcus agalactiae*. The fishies were fed at 3% of total biomass during 58 days with probiotic supplemented commercial diet and nonsupplemented diet. At the end of the experiment, the fish were challenged via gavage with *Streptococcus agalactiae*. Fish fed probiotic showed higher concentration of lactic acid bacteria total in the intestine and lower concentration of Vibrionacea than that observed in nonsupplemented fish ($p < 0,05$). Fish fed probiotic have also shown greater values of final weight, specific growth rate and lower feed conversion ($p < 0.05$). 96 h after challenge the number of thrombocytes and neutrophils increased in fish fed supplemented diet ($p < 0.05$). Light and transmission electron microscopy showed bacteria similar to *S. agalactiae* in the liver tissue and intestinal epithelium in both groups. *Lactobacillus plantarum* colonized the gastrointestinal tract of tilapia, enhanced the zootechnical performance, altered the intestinal microbiota and modulated some hematological parameters after challenge.

Keywords: Aquaculture, Electron microscopy, Infection, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus agalactiae*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Produção de pescado (t) da aquicultura continental por Unidade da Federação. *Fonte: MPA (2011). 19
- Figura 2: Desenho esquemático do delineamento experimental de suplementação com o probiótico *L. plantarum*, seguido de desafio experimental com *S. agalactiae*. 39
- Figura 3: Pré Infecção: A. Área do tecido hepático de tilápias suplementadas com dieta probiótica, demonstrando área de necrose multifocal (H&E); B. Tecido hepático de tilápia (*O. niloticus*) alimentada com dieta suplementada com a cepa probiótica *L. plantarum*, demonstrando infiltrado de leucócitos na borda de um vaso sanguíneo (H&E). Pós-infecção: C. Tecido hepático de peixes do grupo controle demonstrando perda da estrutura cordonal dos sinusóides (H&E); D. Tecido hepático de tilápias do grupo probiótico demonstrando aspecto normal da estrutura cordonal dos sinusóides (H&E). 48
- Figura 4: Cortes histológicos do fígado de tilápias infectadas experimentalmente com *S. agalactiae*. Em A: Fígado de peixes do grupo não suplementado (Gram). Em B: Fígado de peixes do grupo Probiótico (Gram). 49
- Figura 5: Cortes histológicos de trato intestinal de tilápias alimentadas com dieta suplementada e não suplementada com probiótico. (A, B) Grupo não suplementado em microscopia de luz (ML); (C, D) Grupo probiótico em ML. 50
- Figura 6: Cortes histológicos do trato intestinal de tilápias alimentadas com dieta suplementada e não suplementada com probiótico, após desafio experimental com *S. agalactiae*. (A, B) Grupo não suplementado em microscopia de luz (ML); (C, D) Grupo probiótico em ML. 51
- Figura 7: Microscopia eletrônica de transmissão (MET) do intestino de tilápia alimentada e não alimentada com suplementação probiótica. Em (A,B) Grupo não suplementado em microscopia eletrônica de transmissão (MET); (C,D) Grupo suplementado em MET. 53

Figura 8: Microscopia eletrônica de transmissão do intestino de tilápias do grupo não suplementado, após desafio com <i>S. agalactiae</i> . Em (A) dano no epitélio intestinal com bactérias que apresentam morfologia de cocos dois a dois na luz do intestino; (B) Detalhe para cocos dois a dois na luz intestinal; (C) Ultraestrutura intestinal do grupo controle; (D) Detalhe para as microvilosidades intestinais do grupo controle.	54
Figura 9: Microscopia eletrônica de transmissão do intestino de tilápias do grupo suplementado, após desafio com <i>S. agalactiae</i> . Em (A) ultraestrutura do epitélio intestinal; (B) Agregado de bactérias com morfologia de cocos na luz intestinal; detalhe para os cocos dois a dois na luz intestinal; (C) Detalhe para as microvilosidades, na superfície dos enterócitos, do grupo suplementado; (D) Dano no epitélio intestinal caracterizado por necrose dos enterócitos.	54
Figura 10: Microbiota intestinal de tilápia do Nilo alimentada com dieta não-suplementada e suplementada com probiótico.	55
Figura 11: Sinais clínicos de estreptococose em tilápias.	89
Figura 12: Bioensaio I do Laboratório de Sanidade de Organismos Aquáticos (AQUOS/UFSC).	89
Figura 13: Infecção experimental com <i>Streptococcus agalactiae</i> em tilápias, via gavagem.	90
Figura 14: Coleta de sangue por punção do vaso caudal.	90
Figura 15: Antagonismo entre <i>L. plantarum</i> e <i>S. agalactiae</i> ; medição dos halos de inibição formados ao redor dos discos da cepa probiótica.	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Produção total, continental e marinha da aquicultura brasileira no ano de 2011. *Fonte: MPA (2011).	18
Tabela 2: Produção de pescado (t) da aquicultura continental por espécie. *Fonte: MPA (2011).	20
Tabela 3: Parâmetros hematológicos (média \pm desvio padrão) de tilápia do Nilo alimentada com ração comercial suplementada com probiótico e sem suplementação (Controle).	45
Tabela 4: Parâmetros hematológicos (média \pm desvio padrão) de tilápia do Nilo alimentada com dieta comercial suplementada com probiótico e sem suplementação (Controle), após desafio com <i>S. agalactiae</i>	46
Tabela 5: Título aglutinante e atividade antimicrobiana do plasma (média \pm desvio padrão) de tilápia do Nilo alimentada com ração comercial suplementada com probiótico e sem suplementação.	46
Tabela 6: Título aglutinante e atividade antimicrobiana do plasma (média \pm desvio padrão) de tilápia do Nilo alimentada com dieta comercial suplementada com probiótico e sem suplementação (Controle), após o desafio com <i>S. agalactiae</i>	47
Tabela 7: Comprimento, largura, perímetro e número das vilosidades intestinais e de células caliciformes por vilo (média \pm desvio padrão), de tilápia do Nilo alimentadas com dieta suplementada e não suplementada com probiótico.	51
Tabela 8: Comprimento, largura, perímetro e número das vilosidades intestinais e de células caliciformes por vilo (média \pm desvio padrão), de tilápia do Nilo alimentada com dieta suplementada e não suplementada com probiótico, após desafio experimental com <i>S. agalactiae</i>	52
Tabela 9: Parâmetros zootécnicos (média \pm desvio padrão) de tilápia do Nilo alimentada com dieta suplementada e não suplementada com probiótico <i>L. plantarum</i>	56

Tabela 10: Redução no consumo alimentar de tilápia do Nilo suplementada e não suplementada com probiótico, após 24 h, 48 h, 72 h e 96 h do desafio experimental com *S. agalactiae*, via gavagem. . 57

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Tilapicultura Mundial	17
1.2. Aquicultura e Tilapicultura brasileiras	17
1.3. Principais doenças no cultivo de tilápias	21
1.4. Estreptococose no cultivo de tilápias.....	22
1.5. Formas de tratamento e prevenção a Estreptococose	24
2. JUSTIFICATIVA.....	27
3. OBJETIVOS.....	27
3.1. Objetivo Geral	27
3.2. Objetivos Específicos	27
4. FORMATAÇÃO	28
Artigo 1.....	29
Suplementação dietária com probiótico em tilápia do Nilo como prevenção à estreptococose.....	29
RESUMO	31
ABSTRACT	31
INTRODUÇÃO	35
MATERIAL E MÉTODOS.....	36
Material biológico.....	36
Ensaio “in vitro”	37
Preparo do inóculo de probiótico e Dieta experimental	38
Delineamento experimental	38
Análises hemato-imunológicas	40

Histologia.....	41
Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	41
Parâmetros microbiológicos	42
Parâmetros zootécnicos	42
Desafio via gavagem.....	43
Reisolamento do patógeno e identificação molecular.....	43
Parâmetros hemato-imunológicos, histologia e microscopia eletrônica de transmissão	43
Análises estatísticas	43
RESULTADOS	44
Ensaio “in vitro”	44
Análises hemato-imunológicas.....	44
Histopatologia.....	47
Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	52
Parâmetros microbiológicos	55
Parâmetros zootécnicos	55
Mortalidade e reisolamento do patógeno.....	56
DISCUSSÃO.....	57
CONCLUSÃO	62
CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
REFERÊNCIAS.....	63
REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO.....	73
ANEXO 1.....	81
ANEXO 2.....	83
ANEXO 3.....	89

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

1.1. Tilapicultura Mundial

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) foi uma das primeiras espécies de peixe a ser cultivada no mundo. Desde o Egito Antigo, têm-se evidências do seu cultivo (AMAL; ZAMRI-SAAD, 2011).

Atualmente, o cultivo desta espécie é uma alternativa de produção para todo o mundo, já que a produção da pesca extrativista encontra-se estagnada. Graças à notável capacidade das tilápias em se adaptarem a criações intensivas, elas são o segundo maior grupo de peixes cultiváveis do mundo, apresentando a cada ano um crescimento de 10 % (FAO, 2012). De fato, a produção de tilápias fez desta espécie uma das mais importantes do século XXI para aquicultura (FITZSIMMONS, 2000).

As tilápias possuem ótimas características para o cultivo e atualmente estão tão domesticadas que já são chamadas de “frango da água” (AMAL; ZAMRI-SAAD, 2011). Esta espécie apresenta crescimento rápido, carne branca, é capaz de sobreviver em cultivos com baixas condições de qualidade de água, além de aceitar grande variedade de alimentos e se reproduzir com facilidade (NANDLAL; PICKERING, 2004).

Em 2012, a produção mundial de tilápias se distribuiu da seguinte forma: 72% na Ásia (China e sudeste asiático), 19% na África e 9% nas Américas (FAO, 2012)

Das 70 espécies conhecidas, quatro ganharam destaque na aquicultura mundial, todas do gênero *Oreochromis*: a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), a tilápia de Moçambique (*O. mossambicus*), a tilápia azul ou áurea (*O. aureus*) e a tilápia de Zanzibar (*O. urolepis hornorum*). Destas, a tilápia do Nilo é a mais cultivada por suas características zootécnicas, rusticidade, qualidade da carne, amplo conhecimento disponível sobre sua fisiologia e biologia, bem como pela evolução da tecnologia de seu cultivo (FITZSIMMONS, 2000).

1.2. Aquicultura e Tilapicultura brasileiras

Segundo dados do Ministério da Pesca e Aquicultura, em 2011 a produção aquícola nacional foi de 628.704,3 t (Tabela 01), representando incremento de 31,1% em relação à produção de 2010. Comparando-se os dados dos últimos anos, fica evidente o crescimento

do setor no país, com incremento de 51,2% na produção, durante o triênio 2009-2011.

Tabela 1: Produção total, continental e marinha da aquicultura brasileira no ano de 2011. *Fonte: MPA (2011).

Aquicultura	2011	
	Produção	%
Total	628.704,30	100
Continental	544.490,00	86,6
Marinha	84.214,30	13,4

A maior parcela desta produção é oriunda da aquicultura continental, da qual se destaca a piscicultura continental, que já representava 86,6% da produção aquícola nacional em 2011 (MPA, 2011).

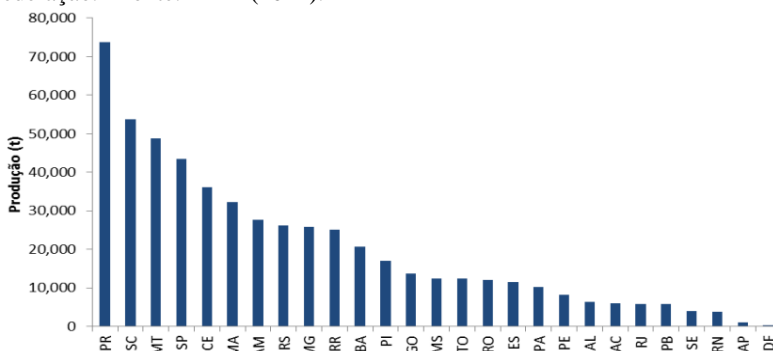
O incremento da produção aquícola continental brasileira de 2010 para 2011 alcançou 38,1%, o que demonstra consistente crescimento deste setor, oriundo do aumento da produção de peixes em sistema de tanques-rede (MPA, 2011). Tal crescimento também pode estar atrelado ao desenvolvimento da aquicultura continental, estimulada pela ampliação de políticas públicas que facilitaram o acesso aos programas governamentais existentes, tais como: o Plano Mais Pesca e Aquicultura, desenvolvido pelo MPA (MPA 2011).

O potencial brasileiro para o desenvolvimento da aquicultura continental, também está no fato de possuímos um vasto território, com condições climáticas favoráveis à criação de peixes de água doce, além dos reservatórios e barragens. Algumas bacias que drenam o território brasileiro, como: a bacia Paraná-Paraguai e a do rio São Francisco, possuem mais de 100 reservatórios para fins de geração de energia e armazenamento de água, compreendendo mais de 5 milhões de hectares de área alagada com potencial para a piscicultura semi-intensiva ou intensiva (CASTAGNOLLI, 1995). Este fato atrelado ao baixo custo de implementação dos tanques-rede, tem feito o governo brasileiro estimular o cultivo de peixes em reservatórios de hidrelétricas (GARCIA et al., 2013). Sendo assim, a partir do ano 2000 que a tilapicultura surgiu com força em tanques-rede, nas águas da União (SCORVO FILHO et al., 2010).

A produção brasileira em tanques-rede é baseada, quase que exclusivamente, na criação de tilápias (SCORVO FILHO et al., 2010), porém outros peixes também são cultivados nestes parques aquícolas continentais, como: o pacu, o tambaqui e a pirapitinga (MPA, 2014).

A Figura 1 evidencia o panorama da produção nacional de pescado oriundo da aquicultura continental, por Unidade da Federação. Em 2011, o Estado do Paraná foi o maior produtor de pescado continental do Brasil, seguido pelos estados de Santa Catarina e do Mato Grosso (MPA, 2011).

Figura 1: Produção de pescado (t) da aquicultura continental por Unidade da Federação. *Fonte: MPA (2011).



A região Sul do Brasil foi a que assinalou a maior produção aquícola continental do país, com 153.674,5 t, correspondendo a 28,2% da produção nacional nessa modalidade, seguida pela região Nordeste (24,7%), Norte (17,4%), Sudeste (15,9%) e Centro-Oeste (13,8%) (MPA, 2011).

Quando se trata das espécies cultivadas, a tilápia e o tambaqui são as que mais se destacam na aquicultura continental. Em 2011, as duas espécies somadas, representaram 67,0% da produção nacional. Contudo, também merecem destaque: o tambacu, a carpa e o pacu, que juntos representaram 20,1% da produção (MPA, 2011) (Tabela 2).

Tabela 2: Produção de pescado (t) da aquicultura continental por espécie.

*Fonte: MPA (2011).

Espécie	Produção 2011
TOTAL	544.490,0
Tilápia	253.824,1
Tambaqui	111.084,1
Tambacu	49.818,0
Carpa	38.079,1
Pacu	21.689,3
Tambatinga	14.326,4
Pirapitinga	9.858,7
Pintado	8.824,3
Curimatã	7.143,1
Bagre	7.048,1
Matrinxã	5.702,1
Piau	4.309,3
Truta	3.277,2
Jundiá	1.747,3
Pirarucu	1.137,1
Traíra	926,5
Piraputanga	265,0
Cascudo	58,0
Outros	5.372,2

A produção brasileira de tilápia está tornando-se cada vez mais expressiva nos últimos anos, crescendo 105% somente entre 2003 e 2009 (MPA, 2010)

A tilápia destaca-se no setor produtivo por sua resistência a doenças, tolerância ao cultivo em altas densidades e a ambientes hostis e estressantes. Tais características fazem desta espécie uma das preferidas pela aquicultura brasileira que atualmente utiliza o modelo intensivo de produção na maioria de seus cultivos (SHOEMAKER et al., 2000).

Contudo, o modelo de produção aquícola nacional nem sempre foi o intensivo. Até o final da década de 90, a aquicultura brasileira era formada por pequenos e médios produtores e, baseava-se no sistema semi-intensivo de produção. Foi somente a partir do ano 2000, que a tilapicultura ganhou destaque por seu cultivo intensivo em tanques-rede, nos grandes reservatórios de hidroelétricas. Esta mudança no sistema de produção trouxe alterações na cadeia produtiva, uma vez que são necessários insumos adequados ao sistema, como: rações específicas, material genético compatível com a criação e formas de escoamento da produção (SCORVO FILHO et al., 2010).

As tilápias se adaptaram bem ao novo modelo de produção. Por sua rusticidade e capacidade de adaptação aos mais diversos fatores

estressantes do ambiente, estes peixes são considerados mais resistentes do que as demais espécies cultiváveis (BHUJEL, 2014). No entanto, nos últimos anos as tilápias têm sido acometidas por inúmeras doenças de origem bacteriana, parasitária e fúngica (CONROY, 2001; AMAL; ZAMRI-SAAD, 2011).

1.3. Principais doenças no cultivo de tilápias

A produção intensiva caracteriza-se por altos níveis de arraçoamento e densidades de estocagem, expondo os peixes ao estresse e à deteriorização da qualidade de água, que podem levar a surtos de enfermidades, causados principalmente por bactérias oportunistas ou por parasitos (WU et al., 2013; KAYANSAMRUJ et al., 2014; SUBASINGHE, 2005).

Por sua rusticidade, inicialmente as tilápias foram consideradas mais resistentes às bactérias, fungos, parasitos e doenças virais, quando comparadas às demais espécies de peixes cultiváveis (AMAL; ZAMRI-SAAD, 2011). Porém, mais recentemente, diversas doenças infecciosas e parasitárias são observadas no cultivo intensivo deste peixe.

Dentre os parasitos que acometem as tilápias, podemos destacar os protozoários: *Ichthyophthirius multifiliis*, *Chilodonella* sp., Tricodínídios, *Epistylis* sp., *Ichthyobodo*, *Piscinoodinium* e *Amyloodinium*; os trematodos monogenéticos dos gêneros: *Gyrodactylus* sp. e *Dactylogyrus* sp.; e os crustáceos parasitos *Lernaea* sp., *Ergasilus* sp., *Argulus* sp. e *Dolops* sp. (KUBITZA, 2000).

Quanto aos patógenos bacterianos mais frequentes e de importância econômica no cultivo intensivo de tilápias, podemos citar: *Streptococcus* sp., *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, *Pseudomonas* sp., *Flavobacterium columnare* e *Yersinia ruckeri* (KLESZIUS et al., 2008; BHUJEL, 2014).

Dentre os principais fatores que predispõem os peixes a bacterioses, estão: inadequada qualidade da água, excesso de matéria orgânica, estresse térmico, má nutrição, estresse durante o transporte, infestação por outros parasitos, transferência de peixes entre as unidades de cultivo e altas densidades de estocagem (MORAES; MARTINS, 2004).

Em sistemas de criação intensiva de tilápias, a septicemia por *Streptococcus* spp. é a enfermidade de etiologia bacteriana que se destaca como uma das mais severas (SURESH, 2000). A mortalidade é mais alta e frequente, nos cultivos onde há manejo inadequado da qualidade da água e da nutrição dos peixes, contribuindo para perdas econômicas severas.

1.4. Estreptococose no cultivo de tilápias

O termo estreptococose, em patologia de peixes, abrange uma série de processos causados por diferentes tipos de *Streptococcus* sp., que geram quadros clinicopatológicos semelhantes. Esta enfermidade é sistêmica e já foi encontrada em mais de 20 espécies de peixes de água doce, estuarina e salgada de todo o mundo (JIMÉNEZ et al., 2007).

Estreptococose é um problema crescente na aquicultura mundial, devido à ampla distribuição geográfica de seus agentes causadores, a grande variedade de espécies de peixes que afeta, as altas mortalidades que causa, aos custos elevados com seu tratamento, a redução no crescimento dos animais e a dificuldade na comercialização dos mesmos. As espécies ícticas com elevados volumes de produção são comumente as mais afetadas, entre elas as tilápias (JIMÉNEZ et al., 2007).

O primeiro relato, do isolamento de *Streptococcus* spp. em tilápia, foi descrito por Wu (1970) e desde então, este patógeno tem sido identificado como responsável por elevados prejuízos no mundo todo, particularmente no Japão (KITAO et al., 1981), Taiwan (TUNG et al., 1985), Israel (HUBERT, 1989), Arábia Saudita (AL-HARBI, 1994), Estados Unidos e América Central (PLUMB, 1997), colocando a estreptococose como importante problema sanitário mundial em sistemas de criação intensiva de tilápia. Na década de 30, estimava-se que as perdas mundiais alcançassem 150 milhões de dólares por ano (SHOEMAKER et al., 1997).

Streptococcus sp. são bactérias gram positivas, de formato esférico (cocos), com 0,5 a 2 μm de diâmetro, que podem ocorrer aos pares ou em forma de cadeia, imóveis, não esporuladas, catalase negativas e oxidase positivas (ROSAGAST, 2012). São anaeróbicas facultativas e normalmente lisam os eritrócitos dos peixes, causando α -hemólise (descoloração esverdeada ao redor das colônias), β -hemólise (descoloração completa ao redor das colônias) ou γ -hemólise (ausência de descoloração) nas placas com meio de cultura Ágar Sangue (AMAL, 2011).

Diversos são os relatos, em revistas de divulgação nacional e internacional, sobre casos clínicos da enfermidade em cultivos de tilápia. Baseado neles, pode-se aferir que a transmissão pode ocorrer de forma horizontal, através do contato direto entre o peixe infectado e saudável, ou pelo contato denominado indireto, feito pela água (FIGUEIREDO, 2007). O uso de peixes contaminados por estreptococos

no preparo de rações, também parece ser uma forma de transmissão (CONROY, 2001).

As principais espécies que causam infecção em peixes são: *Streptococcus iniae*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* e *S. ictaluri* (FIGUEIREDO, 2007), das quais, *S. iniae* e *S. agalactiae* são considerados os mais importantes patógenos causadores de estreptococose em tilápias (SHOEMAKER et al., 1997).

Streptococcus iniae atinge diversas espécies de peixe e já foi diagnosticado em seres humanos. Seu primeiro isolamento data de 1976, em botos da Amazônia (PIER; MADIN, 1976), e desde então tem sido isolado de muitas espécies de peixes de água doce, estuarina e salgada, de 15 países de 6 continentes, incluindo: Ásia, África, Austrália, Europa, América do Sul e América do Norte (AMAL; ZAMRI-SAAD, 2011). *Streptococcus iniae* é considerado menos letal às tilápias do que *S. agalactiae* (ROSAGAST, 2012).

S. agalactiae foi identificado pela primeira vez em peixes nos Estados Unidos (ROBINSON; MEYER, 1966), e nos últimos anos é frequentemente isolado em surtos de mortalidade pelo mundo, sendo encontrado em 7 países de 3 continentes: Brasil, Estados Unidos, Japão, Israel, Honduras, Kuwait e Tailândia (AMAL; ZAMRI-SAAD, 2011).

No Brasil, *S. agalactiae* vem se difundindo rapidamente pelas pisciculturas de tilápia e já foi identificado na: Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, São Paulo e Paraná (FIGUEIREDO, 2007).

S. agalactiae também é um patógeno importante para o homem, principalmente por causar meningite em recém-nascidos (BAKER, 1979). Porém, as cepas que causam doença nos seres humanos parecem ser bioquimicamente diferentes das que causam enfermidade nas espécies animais. Sendo assim a transmissão zoonótica seria pouco frequente e se o risco existe, é de pouca importância segundo “Center for Food Security and Public Health. Streptococcus” (2005).

A infecção por *S. agalactiae* nos peixes, causa doença septicêmica, ou seja, a bactéria multiplica-se na corrente sanguínea e em diversos órgãos, como fígado, baço e rim. Contudo o cérebro parece ser o principal alvo da bactéria, levando o peixe infectado a um quadro de encefalite além da septicemia. Dentre os sinais clínicos apresentados pelos peixes, estão: anorexia, natação errática com movimentos giratórios na superfície da água e perda de equilíbrio, escurecimento da pele, olhos opacos, exoftalmia, além de petéquias na superfície corporal e acúmulo de líquido na cavidade abdominal (Anexo 3) (PLUMB, 1999; CONROY, 2001; BHUJEL, 2014).

Existem duas formas de manifestação da estreptococose em peixes: aguda e crônica. A forma aguda da doença é sistêmica e apresenta altas mortalidades (EVANS et al., 2002), geralmente ocorrendo nas estações mais quentes do ano, quando a temperatura da água está elevada (ROSAGAST, 2012). A forma crônica pode começar a se manifestar após a fase aguda da doença e apresentar sinais clínicos variados além de mortalidade reduzida e constante; geralmente ocorre quando a temperatura da água encontra-se mais baixa (BROMAGE et al., 1999; ROSAGAST, 2012).

A doença pode ser observada em peixes de pesos variados porém de acordo com a literatura, parece preferir os indivíduos adultos na fase de engorda que apresentam entre 400 e 600 gramas (FIGUEIREDO, 2007; KOMAR, 2008). Sendo assim, os alevinos e juvenis parecem não manifestar esta enfermidade, embora haja a possibilidade de serem portadores assintomáticos da bactéria.

1.5. Formas de tratamento e prevenção a Estreptococose

A prevenção à estreptococose, assim como a demais bacterioses, está intimamente relacionada às boas práticas de manejo e higiene das propriedades (CONROY, 2001; KOMAR, 2008). Manter os animais bem nutridos, sob adequadas condições ambientais, remover os animais mortos ou moribundos e atentar à qualidade dos alevinos adquiridos, são algumas medidas pertinentes (BHUJEL, 2014).

Porém, quando a enfermidade já está instalada no cultivo, diversos agentes químicos podem ser utilizados como tratamento, tais como sal, ácido acético, cloreto de sódio, amônia quaternária, iodo, formol, verde malaquita, sulfato de cobre, metrifonato, sulfato de magnésio, sulfamerazina, ácido oxolínico e especialmente os antibióticos que atualmente representam a ferramenta mais difundida para o tratamento da septicemia por *Streptococcus* sp (ELER; MILLANI, 2007).

Apesar da maioria dos produtores adotarem o uso de antibióticos como solução para combater a estreptococose e outras bacterioses, há uma tendência mundial em proibir o uso destas drogas na produção animal. Poucos antibióticos têm uso permitido na aquicultura pelos órgãos competentes, como ocorre, por exemplo, nos E.U.A., onde o Centro de Medicina Veterinária autoriza somente o uso de oxitetraciclina e eritromicina para toda a aquicultura (MAC MILLAN et al., 2006). Enfatizando esta premissa, a União Européia desde janeiro de 2006, proibiu o uso de antibióticos na produção animal (LIM et al., 2010). No Brasil a utilização de diversos antibióticos foi proibido com a

finalidade de aditivo alimentar no uso veterinário pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), como por exemplo o cloranfenicol e nitrofuranos (IN nº 09, 27/06/2003); tetraciclina, quinolonas, sulfonamidas sistêmicas (IN nº 26, 09/07/2009 que revoga a Portaria nº 193/1998); e espiramicina e eritromicina (IN nº 14, 17/05/2012).

O uso indiscriminado e errôneo dos antibióticos normalmente ocorre quando não se conhece o agente causador do surto de enfermidade e/ou mortalidade, levando os produtores a utilizar drogas com grande espectro de atuação o que pode conduzir à seleção de bactérias resistentes (FIGUEIREDO et al., 2012). Em 1997, Shoemaker et al. (1997) relatavam dificuldades na utilização de antibióticos para o tratamento de infecções por *Streptococcus* sp. Outra problemática do uso indiscriminado destes quimioterápicos em aquicultura está no impacto negativo que causam ao meio-ambiente, na baixa aceitação dos consumidores aos animais tratados além dos prejuízos à saúde humana (NAKANISHI et al., 2002; SAPKOTA et al., 2008).

Para melhorar o controle e a prevenção de enfermidades em aquicultura, e simultaneamente reduzir os efeitos do uso indiscriminado de antibióticos nos cultivos, cada vez mais pesquisas vêm sendo impulsionadas com o objetivo de desenvolver produtos alternativos que favoreçam os mecanismos de defesa dos animais. Neste contexto, encontramos as vacinas e os aditivos alimentares.

O desenvolvimento de vacinas está em evidência como ferramenta promissora ao combate de bacterioses em peixes, ajudando a reduzir as perdas econômicas (WANG et al., 2013). As vacinas para a prevenção da estreptococose estão sendo avaliadas e podem abrir novas perspectivas para o seu controle (MARTINS et al., 2011; ROSAGAST, 2012) entretanto, até o momento não há uma vacina eficaz pois existem muitas cepas diferentes de *Streptococcus* sp. causadoras de estreptococose em tilápias, e além disso elas sofrem mutações constantes, o que torna dificultoso o controle desta enfermidade (BHUJEL, 2014).

Como aditivos alimentares no combate às bacterioses, podemos citar ervas medicinais (RATTANACHAIKUNSOPON; PHUMKHACHORN, 2009; WU, Y. R. et al., 2013), ácidos orgânicos (KEONG, 2009) e os probióticos que auxiliam no aumento da capacidade imunológica dos peixes, trazem benefícios zootécnicos aos cultivos, além de diminuir o impacto ambiental da atividade. (HARIKRISHN; BALASUNDARAM, 2005).

Atualmente, existem diferentes fórmulas comerciais de probióticos para uso em peixes que podem ser encontradas facilmente no mercado. Porém observa-se que cepas probióticas isoladas de outros animais ou de espécies de peixes que não sejam a espécie-alvo, podem apresentar resultados controversos, sendo necessário o isolamento e desenvolvimento de probióticos espécie-específicos, ou seja, probióticos autóctones (MOURINO, 2010). A utilização de cepas alóctones apresenta uma série de desvantagens como a inserção de micro-organismos exógenos ao ambiente de cultivo, o desconhecimento dos possíveis efeitos no trato intestinal e sua interação com os demais micro-organismos no ambiente, e a capacidade dessas cepas sobreviverem ou se manterem em condições viáveis e em concentrações ótimas no trato intestinal dos animais (NAYAK, 2010). Apesar disto, alguns estudos demonstram que a utilização de bactérias alóctones também podem apresentar bons resultados e um papel positivo no bem estar dos peixes (RIDHA; AZAD, 2012; STANDEN et al., 2013), porém há um consenso geral de que cepas de bactérias autóctones possuem maior chance de colonizar o intestino e trazer benefício à saúde do hospedeiro (SUN et al., 2013).

Diferentes micro-organismos são usados como probiótico para peixes: bactérias ácido-láticas como *Lactobacillus* sp., bactérias esporuladas como *Bacillus* sp., bactérias gram negativas como *Pseudomonas* sp., *Vibrio* sp. e *Aeromonas* sp. e leveduras. Entretanto, algumas destas bactérias como *Pseudomonas* sp., *Vibrios* sp. e *Bacillus* sp. podem ser potencialmente patogênicas para alguns peixes causando mortalidades no cultivo (GEORGE et al., 2005). Portanto, é necessário realizar a caracterização fenotípica e molecular da cepa a fim de se determinar a existência de patogenicidade do microorganismo para a espécie cultivada, antes de sua utilização como probiótico.

Nos últimos anos, probióticos, especialmente as bactérias ácido-láticas (LAB), vêm sendo utilizadas como suplemento dietético para proteger os animais aquáticos cultiváveis de diversas infecções e prevenir que a doença se instale nos cultivos, uma vez que melhoram o estado de saúde dos animais. As LAB's têm seu efeito comprovado em diversas espécies, como: robalos, *Centropomus* spp. (BARBOSA et al., 2011), tilápias, *Oreochromis* spp., (JATOBÁ et al., 2011) e camarões, *Litopenaeus vannamei*, (VIEIRA et al., 2007), devido à sua capacidade de colonizar o trato digestório dos animais, alterando a dominância natural da microbiota intestinal e promovendo melhoria no sistema imune dos animais (CARNEVALI et al., 2006; JATOBÁ et al., 2008; VIEIRA et al., 2008).

2. JUSTIFICATIVA

Estreptococose é uma bacteriose que causa elevados prejuízos econômicos aos cultivos de tilápia em todo mundo e nos últimos anos representa uma das doenças de maior impacto na tilapicultura brasileira. A forma tradicional e normalmente utilizada para o controle desta enfermidade é o uso de antibióticos, que usados em demasia sabe-se que levam ao desenvolvimento de cepas resistentes, causam danos ambientais além da não aceitação do mercado consumidor a animais tratados e ao acúmulo destas drogas no tecido animal.

Neste sentido, pesquisas têm sido conduzidas na procura por métodos alternativos ao uso de antibióticos, que previnam estas enfermidades. Tais estudos têm evidenciado que a suplementação com probióticos na dieta de peixes apresenta efeito benéfico sobre a microbiota e torna-se uma importante ferramenta na redução da ocorrência de patógenos.

Tendo em vista o crescimento da tilapicultura no Brasil, a ausência de uma vacina eficaz que previna esta enfermidade causadora de elevados prejuízos econômicos e os benefícios que os probióticos trazem na melhora do sistema de defesa e desempenho zootécnico dos organismos aquáticos, utilizou-se *Lactobacillus plantarum* na alimentação dos peixes, como forma de prevenção a esta doença.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a suplementação dietária com a bactéria *Lactobacillus plantarum* na prevenção à septicemia causada por *Streptococcus agalactiae* em tilápia do Nilo.

3.2. Objetivos Específicos

- i. Avaliar o desempenho zootécnico dos peixes alimentados com dieta suplementada com a cepa probiótica *L. plantarum*;
- ii. Avaliar as alterações hemato-imunológicas dos peixes suplementados com *L. plantarum*;
- iii. Avaliar as possíveis alterações histológicas no fígado e trato intestinal dos peixes suplementados com probiótico;
- iv. Avaliar por microscopia eletrônica de transmissão, a ultraestrutura do trato intestinal após o uso deste aditivo alimentar;

- v. Caracterizar a microbiota do trato gastrointestinal dos peixes suplementados com a cepa probiótica;
- vi. Avaliar as alterações hemato-imunológicas e histológicas dos peixes suplementados com o probiótico, após infecção oral, via gavagem com *Streptococcus agalactiae*.

4. FORMATAÇÃO

O capítulo 1 está formatado nas normas da ABNT. O capítulo 2 está formatado segundo as normas da revista *Brazilian Journal of Oceanography*.

CAPÍTULO 2

Artigo 1

Suplementação dietária com probiótico em tilápia do Nilo como prevenção à estreptococose

Probiotic dietary supplementation in Nile tilapia as prophylaxis against streptococcosis.

Marcela Maia Yamashita ^{*1, 2}, Lucas Cardoso², Scheila Anelise Pereira ^{1,2}, Ana Paula de Araujo ³, Carlos Eduardo Oda⁴, Éder Carlos Schmidt⁵, Zenilda Laurita Bouzon⁵, Maurício Laterça Martins² & José Luiz Pedreira Mourão²

¹Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Departamento de Aquicultura, Laboratório de Camarões Marinhos (LCM), Rod. Admar Gonzada 1346, CEP: 88040-900, Florianópolis/SC, Brasil.;

²Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Departamento de Aquicultura, – Laboratório de Patologia e Sanidade de Organismos Aquáticos (AQUOS), Rod. Admar Gonzaga 1346, CEP: 88040-900 Florianópolis/SC, Brasil;

³ Acquapiscis Consultoria e Medicina Veterinária em Aquicultura. Rua Vieira de Moraes, 1.201, Sobreloja. Campo Belo, São Paulo/SP, Brasil;

⁴ Piscicultura Alevinos do Sabiá. Estrada Geral Ribeirão Sabiá, S/N. Rio Ferro, CEP: 89150-000, Presidente Getúlio/SC, Brasil.;

⁵ Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética (BEG), Trindade CEP: 88040-900, Florianópolis/SC, Brasil,.

* Corresponding author. Tel: +55 48 99120199

E-mail address: marcelamy@gmail.com

ABSTRACT

To avoid the use of antibiotics in controlling bacterial diseases in farmed fish, the probiotic is an promising alternative as prophylaxis. This study evaluated the dietary supplementation with *Lactobacillus plantarum* in Nile tilapia using the hemato-immunological, histological, microbiological analysis and the transmission electron microscopy after challenge via gavage with *Streptococcus agalactiae*. Fish were distributed in two groups: fish fed probiotic supplemented commercial diet and nonsupplemented diet for a period of 58 days. Increased concentration of total lactic acid bacteria and reduction in the Vibrionacea was observed in supplemented fish ($p<0,05$). It was also found enhanced final weight, specific growth rate and lower feed conversion ($p<0.05$) in supplemented fish. After challenge, the number of thrombocytes and neutrophils increased ($p<0.05$) in supplemented animals. Transmission electron microscopy showed damage in the intestinal mucosa and the presence of bacteria similar to *S. agalactiae* in both infected groups. *L. plantarum* colonized the intestine of fish, enhanced the zootechnical performance and modulated some hematological parameters.

Keywords: Hematology, Histology, Immunology, Lactic acid bacteria, Microbiology, *Oreochromis niloticus*, Transmission electron microscopy.

RESUMO

A fim de evitar a utilização de antibióticos no controle de doenças bacterianas na piscicultura, o uso de probiótico tem se revelado uma alternativa promissora como medida profilática. Este estudo avaliou a suplementação dietética de *Lactobacillus plantarum* em tilápia do Nilo por meio de técnicas hemato-imunológicas, histológicas, microbiológicas e de microscopia eletrônica de transmissão, após infecção, via gavagem, com *Streptococcus agalactiae*. Os peixes foram distribuídos em dois grupos: peixes alimentados com dieta comercial suplementada com probiótico e dieta não-suplementada, durante 58 dias. Aumento na concentração de bactérias ácido-láticas totais e redução na concentração de vibrionáceas foram observados nos peixes suplementados ($p < 0,05$). Também foram verificados aumento no peso final e taxa de crescimento específico e menor conversão alimentar ($p < 0,05$) no grupo suplementado. Após o desafio experimental, o número de trombócitos e neutrófilos aumentou no grupo probiótico ($p < 0,05$). Microscopia eletrônica de transmissão demonstrou danos na mucosa intestinal e a presença de bactérias morfológicamente parecidas com *S. agalactiae* em ambos os grupos infectados. *L. plantarum* colonizou o intestino dos peixes, melhorou o desempenho zootécnico e modulou alguns parâmetros hematológicos.

Palavras-chave: Bactérias ácido-láticas, Imunologia, Hematologia, Histologia, Microbiologia, Microscopia eletrônica de transmissão, *Oreochromis niloticus*.

INTRODUÇÃO

Streptococcus agalactiae é uma bactéria gram-positiva, responsável por elevados prejuízos econômicos no mundo, afetando diversas espécies de peixes de água doce e salgada (PASNIK et al., 2006).

Casos de estreptococose no cultivo de tilápias já foram diagnosticados em pelo menos 12 países das Américas Central, Norte e Sul (CONROY, 2009). No Brasil, *S. agalactiae* já foi identificado em diversos estados (Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, São Paulo, Paraná) e vem se difundindo rapidamente pelas pisciculturas de tilápia, em todas as regiões e em diferentes sistemas de criação (SALVADOR et al., 2005).

A ferramenta mais difundida atualmente, para o tratamento da septicemia causada por *Streptococcus* sp., é o uso de antibióticos. Porém, o uso indiscriminado destes produtos quimioterápicos tem conduzido à seleção de bactérias resistentes (FIGUEIREDO et al., 2012) além do risco de transferência desta resistência a bactérias presentes no meio ambiente e a cepas patogênicas que afetam os seres humanos (ABUTBUL et al., 2004), e ao acúmulo de resíduos antibióticos na carne dos peixes que pode ser prejudicial ao meio-ambiente e a quem os consome (SMITH et al., 1994). Por estes motivos, poucos antibióticos têm seu uso aprovado em aquicultura e muitos países recusam importar produtos aquícolas que tenham sido tratados com estas drogas (GASTALHO et al., 2014).

Para evitar estes problemas e substituir o uso de quimioterápicos em aquicultura, o desenvolvimento de medidas profiláticas como vacinas e probióticos tem se mostrado ferramentas promissoras no combate a bacterioses no cultivo de peixes (MOURIÑO et al., 2012). Durante a última década a vacinação tornou-se importante para a prevenção de doenças infecciosas em viveiros de peixes (TU et al., 2009; MARTINS et al., 2011) e o uso de probióticos, principalmente bactérias ácido-láticas (LAB) tem sido utilizado como suplemento dietético para proteger os animais aquáticos cultiváveis contra diversas infecções.

Desde a primeira vez que probiótico foi utilizado em aquicultura, diversos estudos demonstraram sua capacidade em melhorar a taxa de crescimento e bem-estar de organismos aquáticos cultivados, como: peixe marinho (CARNEVALI et al., 2004); molusco (MACEY; COYNE, 2005) e camarão (WANG, 2007). Além disto, outras pesquisas comprovaram que LAB's no cultivo de tilápias promoveram melhora do

desempenho zootécnico e do sistema imune, protegendo os peixes de possíveis infecções por bactérias patogênicas (LARA-FLORES, et al., 2003; PIRARAT et al., 2006; ALY et al., 2008; JATOBÁ et al., 2008; ABD EL-RHMAN et al., 2009; JATOBÁ et al., 2011; PIRARAT et al., 2011; CORNELIO et al., 2013; STANDEN et al., 2013). Com isto, é crescente a evidência de que o uso de bactérias probióticas em aquicultura, seja um método alternativo para a prevenção e controle de doenças bacterianas em peixes.

Estudos prévios, utilizando a cepa *L. plantarum* como probiótico na dieta de camarões e tilápias, indicaram sua ação como probiótico, colonizando o trato gastrointestinal dos animais e melhorando o sistema imune, o desempenho zootécnico e inibindo o crescimento de bactérias patogênicas (VIEIRA et al., 2007; JATOBÁ et al., 2008).

Estudos que abordam infecção experimental normalmente utilizam a via intraperitoneal como metodologia para o desafio, sendo pouco comum o uso da via gástrica para este fim (KLESIUS et al., 2000; ABD EL-RHMAN et al., 2009; RATTANACHAIKUNSOPON; PHUMKHACHORN, 2009; ALSAID et al., 2013; BAUMS et al., 2013; CORNELIO et al., 2013; QIANG et al., 2013). Este método denominado via gavagem é comumente utilizado na experimentação animal para a administração de substâncias por via intragástrica, permitindo o estudo de efeitos biológicos de diversas drogas (FAWELL et al., 1999) e já foi utilizado em peixes para testar os efeitos tóxicos de algumas substâncias como: toxinas produzidas por cianofíceas (DJEDIAT et al., 2010; GUTIERREZ-PRAENA et al., 2013) e pesticidas (FAJT; GRIZZLE, 1993). Para ensaios de infecção, o modelo via gavagem é vantajoso, pois mimetiza a infecção em ambiente natural tornando os resultados obtidos mais próximos da realidade uma vez que no meio-ambiente é a boca uma das principais vias de entrada do patógeno nos peixes.

Sendo assim, este estudo teve como objetivo avaliar a influência da suplementação com o probiótico *Lactobacillus plantarum*, na prevenção a estreptococose, causada por *Streptococcus agalactiae*, em tilápias do Nilo infectadas experimentalmente via gavagem.

MATERIAL E MÉTODOS

Material biológico

Foram utilizados 120 juvenis de tilápia (*Oreochromis niloticus*), provenientes de piscicultura comercial, localizada na cidade de Presidente Getúlio/ SC, Brasil.

A bactéria *Lactobacillus plantarum* (CPQBA 227-08 DRM) utilizada como cepa probiótica, foi isolada por Jatobá *et al.* (2008) do trato gastrointestinal de tilápias sadias e assintomáticas. A cepa foi identificada por amplificação do gene 16S do RNA (Anexo 2), mantida em tubos de ensaio contendo caldo MRS (do inglês “*Man-Rogosa-Sharpe broth*”), reativada em placas de Petri, com o meio MRS Ágar acrescido com 1% de azul de anilina e incubadas a 35°C por 48 h. Esta cepa teve seu potencial probiótico registrado, demonstrando sua inibição à bactérias patogênicas, capacidade de colonização do trato gastrointestinal e melhora da resposta inespecífica do sistema imune de tilápias do Nilo (JATOBÁ *et al.*, 2008).

A cepa patogênica *Streptococcus agalactiae*, foi isolada de tilápias sintomáticas, provenientes de surto de mortalidade em cultivo industrial localizado no estado do Ceará, Brasil. Foi mantida em tubos de ensaio contendo meio de cultura caldo de cérebro e coração (BHI Himedia® do inglês “*Brain Heart Infusion*”), reativadas em placas de Petri contendo Ágar Triptona de Soja (TSA Himedia® do inglês “*Tryptic Soy Agar*”) enriquecido com 5% de sangue de carneiro desfibrilado e incubadas a 28°C por 12 h. A cepa foi identificada por PCR e após a verificação das bandas em gel agarose, o DNA foi purificado utilizando o reagente BigDye® Terminator v3.1. A sequência de nucleotídeos em formato FASTA foi submetida à base de dados BLAST/NCBI (Anexo 1).

Ensaio “in vitro”

Para a avaliação da capacidade inibitória da cepa probiótica frente à *Streptococcus agalactiae*, foi realizado o antagonismo entre as cepas. Utilizou-se o método de Tagg e Mcgiven (1971), adaptado por Ramírez *et al.* (2006), onde a cepa probiótica *L. plantarum* mantida em meio de cultura MRS Broth, foi repicada e semeada em placa de Petri contendo o meio MRS Agar, acrescido de 1% de azul de anilina. A placa foi incubada a 35°C por 48 h. A cepa patogênica, mantida em meio de cultura BHI Broth, foi repicada e semeada em placa de Petri contendo o meio de cultura Müeller-Hinton. Em seguida, discos de 0,8 cm de diâmetro das placas da cepa probiótica foram colocados na placa com a cepa patogênica, a qual foi incubada a 30°C por 24 h. Após este período, os halos de inibição formados ao redor dos discos de bactéria probiótica, foram medidos com o auxílio de um paquímetro (Anexo 3).

Para verificar a resistência da cepa patogênica a diferentes drogas, realizou-se o antibiograma, segundo método de Kirby-Bauer (BAUER *et al.*, 1966). A cepa *S. agalactiae* foi repicada e semeada em

placa de Petri com o meio de cultura Mueller-Hinton. Nesta mesma placa, foram condicionados 1 disco de cada um dos seguintes antibióticos: enrofloxacino, norfloxacino, eritromicina, florfenicol, tetraciclina e azitromicina. A placa foi incubada a 30°C por 24 h. Após este período, os halos formados ao redor dos discos de antibiótico foram mensurados com um paquímetro e comparadas as zonas de inibição.

Preparo do inóculo de probiótico e Dieta experimental

Após período de aclimação de 04 dias, os peixes foram alimentados com ração comercial Kowalski Peixes 35 para animais em fase de crescimento, com a seguinte composição: umidade (Máx.) 120 g.kg⁻¹, proteína bruta (Mín.) 350 g.kg⁻¹, extrato etéreo (Mín.) 50 g.kg⁻¹, cálcio (Máx.) 15 g.kg⁻¹, fósforo (Mín.) 5000 mg.kg⁻¹ e vitamina C (Mín.) 450 mg kg⁻¹.

Para o preparo do inóculo probiótico, a cepa bacteriana *L. plantarum*, foi repicada em meio de cultura caldo MRS Difco[®], e incubada a 35°C por 48 h. O inóculo bacteriano apresentou concentração média de 5,8.10⁹ UFC.mL⁻¹ e foi adicionado à ração na proporção de 100 mL.Kg⁻¹ de ração. Semanalmente, ração e probiótico foram misturados em saco plástico estéril e mantidos à vácuo, durante cinco minutos. Em seguida, a mistura foi retirada do vácuo, e seca em estufa com recirculação de ar a 25°C por 24 h, para retirada do excesso de umidade. A ração utilizada para o grupo não suplementado foi preparada do mesmo modo, porém acrescida somente com o meio de cultura MRS Difco[®].

Para verificar a concentração do probiótico na dieta, após sua inoculação, 1 g de ração foi macerada em 1 mL de solução salina estéril 0,65% e posteriormente diluída serialmente nove vezes em tubos de ensaio em fator 1:10. As diluições de 10⁻⁴ a 10⁻⁹ foram semeadas em placas de Petri contendo o meio de cultura MRS acrescido de 1% de azul de anilina. As placas foram incubadas a 35°C por 48 h. Este processo era repetido duas vezes por semana durante o preparo das dietas, para averiguarmos que a concentração do inóculo bacteriano mantinha-se nas concentrações desejadas. Durante o experimento, a concentração média de *L. plantarum* na dieta do grupo probiótico, foi de: 1,81 x 10⁷ ± 0,68 UFC.g⁻¹.

Delineamento experimental

Cento e vinte juvenis de tilápia sadios, revertidos sexualmente, com peso médio inicial de 32,11 ± 7,60 g e comprimento total de 12,24 ± 1,03 cm, foram aleatoriamente distribuídos em 10 caixas circulares de

100 L, com sistema de aeração e aquecimento constantes, totalizando 12 peixes por unidade experimental. As unidades estavam acopladas ao sistema de recirculação de água do laboratório experimental, o qual contém esterilização ultravioleta, filtros do tipo mecânico e reatores biológicos.

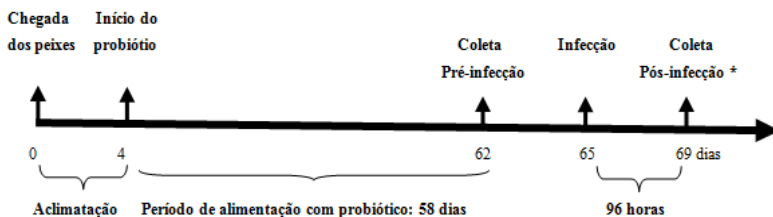
A qualidade da água foi monitorada diariamente com multiparâmetro (modelo HI 9828 – Hanna Instruments) e kit colorimétrico Labcon Test. Os parâmetros mantiveram-se em: oxigênio dissolvido $6,88 \pm 0,22 \text{ mg.L}^{-1}$; pH $6,49 \pm 0,46$; temperatura $24,47 \pm 0,97 \text{ }^\circ\text{C}$; amônia total $1,79 \pm 0,44 \text{ mg.L}^{-1}$; amônia tóxica $0,01 \pm 0,01 \text{ mg.L}^{-1}$; nitrito $1,48 \pm 0,36 \text{ mg.L}^{-1}$ e alcalinidade $37,11 \pm 20,88 \text{ mg CaCO}_3/\text{L}$.

A biometria era realizada semanalmente de seis animais por unidade experimental, para ajuste da quantidade de ração a ser ofertada. A dieta foi fornecida quatro vezes ao dia, totalizando 3,0 % da biomassa. Após o período de aclimação, os peixes foram alimentados durante 58 dias: cinco caixas receberam ração comercial suplementada com inóculo probiótico e as demais receberam apenas ração comercial sem suplementação probiótica, porém com o meio de cultura MRS (Figura 02).

O fotoperíodo durante o experimento foi de 12 h de escuro e 12 h de claro.

Após o período de suplementação, realizou-se a coleta pré-infecção, que consistiu em análises hematológicas, imunológicas, histológicas, microbiológicas e de microscopia eletrônica

Figura 2: Desenho esquemático do delineamento experimental de suplementação com o probiótico *L. plantarum*, seguido de desafio experimental com *S. agalactiae*.



*término do experimento.

Análises hemato-imunológicas

Para as análises hematológicas, dois peixes por unidade experimental foram anestesiados com eugenol (1g :10 L). O sangue foi coletado por punção do vaso caudal (Comissão de Ética – CEUA – nº PP00928) com seringas de 3 mL contendo anticoagulante EDTA (Anexo 3). Alíquotas de sangue foram coletadas para confecção de extensões sanguíneas em duplicatas e as lâminas foram coradas com Giemsa/MayGrunwald (ROSENFELD, 1947) para a contagem diferencial de leucócitos, bem como contagem total de leucócitos (WBC) e trombócitos pelo método indireto (ISHIKAWA et al., 2008). Alíquotas sanguíneas também foram utilizadas para a determinação do hematócrito (RANZANI-PAIVA *et al.*, 2013), para a quantificação do número total de eritrócitos (RBC) em câmara de Neubauer e para a quantificação de hemoglobina sanguínea, segundo o método da cianometahemoglobina (COLLIER, 1944). Com a determinação destes parâmetros, foram calculados os seguintes índices hematimétricos: VCM (Volume Corpuscular Médio), HCM (Hemoglobina Corpuscular Média) e CHCM (Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média), segundo as fórmulas a seguir:

$$\text{VCM} = \text{Hematócrito} \times 10 / \text{Eritrócitos}$$

$$\text{HCM} = \text{Hemoglobina} \times 10 / \text{Eritrócitos}$$

$$\text{CHCM} = \text{Hemoglobina} \times 100 / \text{Hematócrito}$$

Para as análises imunológicas, o sangue de dois peixes de cada unidade experimental foi coletado em pool, sem anticoagulante, e acondicionado em tubos de ensaio estéreis. Os tubos permaneceram em repouso *overnight* a 4°C. Após este período, o material foi centrifugado a 1400 g, durante 10 minutos a 4°C, para obtenção do soro que, foi armazenado a -20°C para posteriores análises imunológicas.

A proteína total do plasma sanguíneo foi mensurada com o kit Proteína Total (Lab Test®). A concentração de imunoglobulina total foi mensurada de acordo com o método descrito por Amar et al. (2000), onde misturou-se 100 µL do soro com 100 µL de solução de polyethylene glycol PEG (Sigma-Aldrich) 12% e a mistura incubada à temperatura ambiente por duas horas, a fim de precipitar as moléculas de imunoglobulina. O precipitado de imunoglobulina foi removido por centrifugação 5000 g a 4°C por 10 min e o sobrenadante retirado e

mensurado a quantidade de proteína total também pelo kit Proteína Total (Lab Test®), utilizando-se albumina bovina para confecção da curva padrão. A concentração de imunoglobulina total está expressa em $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, sendo calculada pela fórmula:

$$\text{Total Ig (mg/mL)} = \text{proteína total do soro} - \text{proteína tratada com PEG}$$

A atividade de lisozima foi determinada pela metodologia adaptada de Sankaran & Gurnani, 1972, onde uma suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* liofilizado (Sigma-Aldrich) foi diluída em tampão fosfato salina (PBS: 0,04 M fosfato monobásico, pH 6,2) na concentração de $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, imediatamente antes de sua utilização. Trinta microlitros do soro foram semeados em quintuplicata, em microplaca de fundo chato e, em seguida foram adicionados 200 μL da suspensão de células de *M. lysodeikticus* em cada poço. Logo após, foi feita a leitura da absorbância inicial em 492 nm. Posteriormente incubou-se as microplacas por 10 min a 35°C , e realizou-se a leitura das absorbâncias finais. A redução na absorbância das amostras foi convertida em concentração de lisozima ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) determinada pela curva padrão realizada anteriormente com lisozima de clara de ovos da galinha (HEWL, Sigma-Aldrich).

Histologia

Fígado e parte da região anterior do intestino médio dos animais foram coletados de dois peixes por unidade experimental, totalizando 20 peixes, 10 por tratamento. Os órgãos foram fixados em formalina 10% tamponada. Após a fixação, as amostras foram preparadas segundo técnicas histológicas de rotina com inclusão em parafina. Cortes de 3 μm de espessura foram corados com hematoxilina de Harris e eosina para identificação padrão das estruturas; com tricrômico de Mason para diferenciação dos leucócitos e com coloração Gram para identificação de bactérias. Os cortes foram fotografados com o microscópio Dic (*Differential Interference Contrast*) Zeiss, modelo Axio Imager A2.

Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A fim de verificar a integridade das células intestinais, das microvilosidades e a presença de bactérias probióticas e patogênicas utilizadas na infecção experimental. Amostras dos tratamentos intestinais foram fixadas em solução de glutaraldeído 2.5 %, sacarose 2.0%, tamponadas com cacodilato 0.1 M (pH 7.2) (SCHMIDT *et al.*, 2010), pós-fixadas em 1 % tetróxido de ósmio por 4 horas e desidratadas em

série de soluções aquosas de concentrações crescentes de acetona. Após a desidratação, o material foi infiltrado com resina Spurr. As secções ultrafinas foram feitas em ultramicrotomo e contrastadas em acetato de uranila e citrato de chumbo. As amostras foram observadas e fotografadas em microscópio eletrônico de transmissão (JEOL Ltd., Tokyo, Japão, a 80 kV).

Parâmetros microbiológicos

Para a determinação da microbiota bacteriana presente no trato gastrointestinal dos grupos controle e probiótico, porções do trato médio anterior de dois animais de cada unidade experimental foram coletadas. Estas porções foram maceradas juntas, em gral de porcelana com 1 mL de solução salina estéril 0,65% e posteriormente diluídos serialmente quatro vezes em tubos de ensaio em fator 1:10. As diluições de 10^{-1} a 10^{-4} foram semeadas em placas de Petri contendo os seguintes meios de cultura: MRS acrescido de 1% de azul de anilina (para identificação de bactérias produtoras de ácido-láctico), TSA acrescido de 5% de sangue de carneiro desfibrilado (para o crescimento de bactérias heterotróficas totais), TCBS (para o crescimento de vibrionáceas) e Cetrimid (para crescimento de *Pseudomonas sp.*). As placas de MRS foram incubadas a 35°C por 48 h; as demais foram incubadas a 30°C por 24 h.

Parâmetros zootécnicos

As pesagens iniciais e finais foram feitas individualmente para todos os peixes. Os cálculos para as características de desempenho foram feitos para cada unidade experimental, somente com os dados da primeira e da última pesagem e medição dos peixes. Foram determinados: peso inicial (g), peso final (g), ganho de peso (g), comprimento total inicial (cm), comprimento total final (cm), conversão alimentar e taxa de crescimento específico (% /dia), segundo as fórmulas abaixo:

$$\text{Ganho de Peso (g)} = \text{Peso final (g)} - \text{Peso inicial (g)}$$

$$\text{Conversão alimentar} = \text{Consumo ração (g)} / \text{Ganho de peso (g)}$$

$$\text{Taxa de crescimento específico (\%/dia)} = 100 \times (\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial})$$

Desafio via gavagem

Para a infecção experimental, o inóculo crescido em BHI por 18h em 28°C, foi centrifugado 30 minutos a 1800 g e a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pelete ressuspensionado em solução salina estéril 0,65% na proporção para que a suspensão se mantivesse em 1×10^7 UFC.g⁻¹ de peso vivo, segundo a curva de crescimento feita anteriormente.

Os animais após os 58 dias de tratamento estavam com peso médio de $105,53 \pm 34,25$ g (média \pm desvio padrão) e foram mantidos em jejum de 24 horas antes do desafio. Após anestesia com eugenol (75 mg.L⁻¹), cada indivíduo recebeu 100 μ L de solução bacteriana, via gavagem (Anexo 3). A partir desse momento, o experimento foi monitorado de 6 em 6 horas, durante 96 horas ou até que se alcançasse 30% de mortalidade. Neste período, foram monitoradas a sobrevivência e também a redução no consumo de ração que continuou a ser oferecida normalmente.

Reisolamento do patógeno e identificação molecular

Para o reisolamento da cepa patogênica *S. agalactiae*, ao término do experimento, porções do fígado e do cérebro de dois animais de cada unidade experimental foram coletadas para esfregaço em placas de TSA Sangue 5%. As placas foram incubadas a 30°C por 24 h. Após o crescimento nas placas e do reisolamento das colônias, elas foram identificadas molecularmente através de PCR, conforme descrito anteriormente.

Parâmetros hemato-imunológicos, histologia e microscopia eletrônica de transmissão

Os mesmos procedimentos para a execução das análises hemato-imunológicas, histológicas e de microscopia eletrônica de transmissão, foram realizados ao término do desafio experimental.

Análises estatísticas

Para comparação das médias entre os tratamentos foi realizado o teste de Levene para verificação da homocedasticidade, e em seguida o teste de Shapiro-Wilks para normalidade dos dados. Os dados que não apresentaram homocedasticidade de variâncias foram transformados em $\log_{10}(x+1)$, e posteriormente realizado Teste t de student com nível de significância de 5%, para averiguar a diferença entre os tratamentos.

RESULTADOS

Ensaio “in vitro”

A capacidade inibitória da cepa probiótica frente à *S. agalactiae*, foi mensurada em milímetros. Os halos formados apresentaram diâmetro médio de $15,2 \pm .2,4$ mm.

Quanto à resistência da cepa patogênica a diferentes drogas, os halos formados ao redor de cada disco de antibiótico, foram: 19 mm para enrofloxacino, 18 mm para norfloxacino, 25 mm para eritromicina, 28 mm para florfenicol, 27 mm para tetraciclina e 21 mm para azitromicina.

Análises hemato-imunológicas

Não houve diferença significativa nos parâmetros hematológicos e nos valores dos índices hematimétricos entre os animais tratados com e sem suplementação probiótica (Tabela 3).

Após o desafio com *S. agalactiae*, o número de trombócitos e neutrófilos foram maiores no grupo suplementado com cepa probiótica (Tabela 4). Os demais parâmetros hematológicos e índices hematimétricos não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos.

A concentração de lisozima, proteína e imunoglobulina total do plasma, não apresentaram diferença significativa entre os animais não suplementados e suplementados com cepa probiótica, nem antes e nem após o desafio (Tabelas 5 e 6).

Tabela 3: Parâmetros hematológicos (média \pm desvio padrão) de tilápia do Nilo alimentada com ração comercial suplementada com probiótico e sem suplementação (Controle).

*Diferença significativa de acordo com teste t ($p < 0,05$).

Parâmetros	Controle	Probiótico	Valor -p
Eritrócitos ($\times 10^6 \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	1,77 \pm 0,62	2,07 \pm 0,79	0,396
Trombócitos ($\times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	111,30 \pm 88,19	89,76 \pm 95,65	0,607
Leucócitos ($\times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	79,73 \pm 61,12	60,48 \pm 56,07	0,472
Linfócitos ($\times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	67,81 \pm 57,18	52,97 \pm 52,55	0,553
Monócitos ($\times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	2,64 \pm 2,57	1,37 \pm 2,69	0,294
Neutrófilos ($\times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	9,28 \pm 5,60	6,14 \pm 4,24	0,174
Hematócrito (%)	34,80 \pm 8,18	35,60 \pm 4,81	0,792
Hemoglobina (g \cdot dL ⁻¹)	8,93 \pm 1,42	9,09 \pm 1,05	0,788
Proteínas plasmáticas totais (g.dL ⁻¹)	6,31 \pm 0,62	6,4 \pm 0,72	0,779
VCM (fL)	227,63 \pm 113,37	291,49 \pm 150,00	0,297
HCM (pg)	57,87 \pm 26,18	76,02 \pm 39,61	0,242
CHCM (g.dL ⁻¹)	26,71 \pm 6,26	26,18 \pm 6,10	0,850

Legenda: VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média.

Tabela 4: Parâmetros hematológicos (média \pm desvio padrão) de tilápia do Nilo alimentada com dieta comercial suplementada com probiótico e sem suplementação (Controle), após desafio com *S. agalactiae*.

*Diferença significativa de acordo com teste t ($p < 0,05$).

Parâmetros	Controle	Probiótico	Valor-p
Eritrócitos ($\times 10^6 \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	2,11 \pm 0,28	1,99 \pm 0,42	0,488
Trombócitos ($\times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	3,43 \pm 1,72	6,80 \pm 3,28*	0,036
Leucócitos ($\times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	42,65 \pm 17,28	31,24 \pm 14,92	0,131
Linfócitos ($\times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	38,62 \pm 17,48	27,00 \pm 14,83	0,126
Monócitos ($\times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	2,88 \pm 1,71	2,34 \pm 1,12	0,537
Neutrófilos ($\times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	1,95 \pm 0,30	3,86 \pm 2,09*	0,035
Hematócrito (%)	32,25 \pm 4,41	33,05 \pm 2,43	0,621
Hemoglobina (g \cdot dL ⁻¹)	8,00 \pm 1,20	8,15 \pm 0,78	0,741
Proteínas plasmáticas totais (g.dL ⁻¹)	6,77 \pm 1,09	6,43 \pm 0,62	0,404
VCM (fL)	153,99 \pm 21,39	170,94 \pm 31,58	0,177
HCM (pg)	38,27 \pm 6,20	42,29 \pm 8,69	0,249
CHCM (g.dL ⁻¹)	24,86 \pm 2,17	24,75 \pm 2,72	0,920

Legenda: VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média.

Tabela 5: Título aglutinante e atividade antimicrobiana do plasma (média \pm desvio padrão) de tilápia do Nilo alimentada com ração comercial suplementada com probiótico e sem suplementação.

* Diferença significativa de acordo com teste t ($p < 5\%$).

Parâmetros	Controle	Probiótico	Valor-p
Lisozima ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	51,98 \pm 4,27	46,45 \pm 7,91	0,122
Proteína total (mg.ml ⁻¹)	35,10 \pm 3,82	33,85 \pm 6,75	0,672
Imunoglobulina total (mg.ml ⁻¹)	19,10 \pm 4,21	18,82 \pm 6,50	0,938

Tabela 6: Título aglutinante e atividade antimicrobiana do plasma (média \pm desvio padrão) de tilápia do Nilo alimentada com dieta comercial suplementada com probiótico e sem suplementação (Controle), após o desafio com *S. agalactiae*.

* Diferença significativa de acordo com teste t ($p < 5\%$).

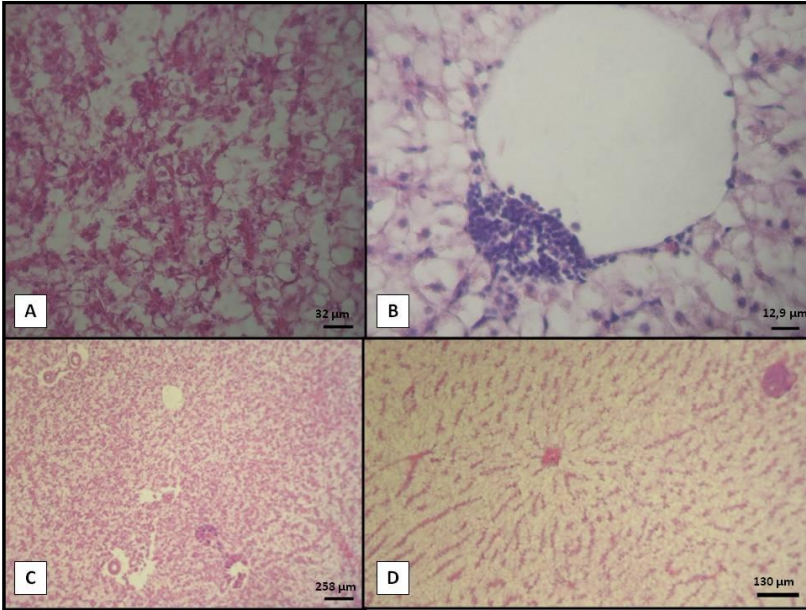
Parâmetros	Controle	Probiótico	Valor-p
Lisozima ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	26,00 \pm 8,04	30,11 \pm 6,98	0,412
Proteína total (mg.ml^{-1})	35,22 \pm 5,56	31,22 \pm 2,03	0,169
Imunoglobulina total (mg.ml^{-1})	18,79 \pm 5,82	17,78 \pm 0,64	0,781

Histopatologia

Nas análises histológicas antes da infecção experimental, o fígado dos animais não suplementados manteve o aspecto cordonal dos sinusóides normal. Pouco mais da metade dos animais, 60%, apresentaram fígado com aparência normal; apesar de terem sido observadas algumas necroses multifocais no tecido, elas não comprometiam o animal por se tratarem de um processo regenerativo natural do órgão.

Nos animais suplementados com probiótico, aproximadamente 8% dos animais, perderam o aspecto cordonal dos sinusóides, apresentaram destruição do tecido pancreático e hepatócitos hipertrofiados. Um quarto dos animais apresentou extensa necrose do tecido hepático (Figura 03 - A) e em 41% havia necrose multifocal. Também foram observados infiltrados de melanócitos e linfócitos agranulares, em 83% dos peixes (Figura 03 - B).

Figura 3: Pré Infecção: A. Área do tecido hepático de tilápias suplementadas com dieta probiótica, demonstrando área de necrose multifocal (H&E); B. Tecido hepático de tilápia (*O. niloticus*) alimentada com dieta suplementada com a cepa probiótica *L. plantarum*, demonstrando infiltrado de leucócitos na borda de um vaso sanguíneo (H&E). Pós-infecção: C. Tecido hepático de peixes do grupo controle demonstrando perda da estrutura cordonal dos sinusóides (H&E); D. Tecido hepático de tilápias do grupo probiótico demonstrando aspecto normal da estrutura cordonal dos sinusóides (H&E).



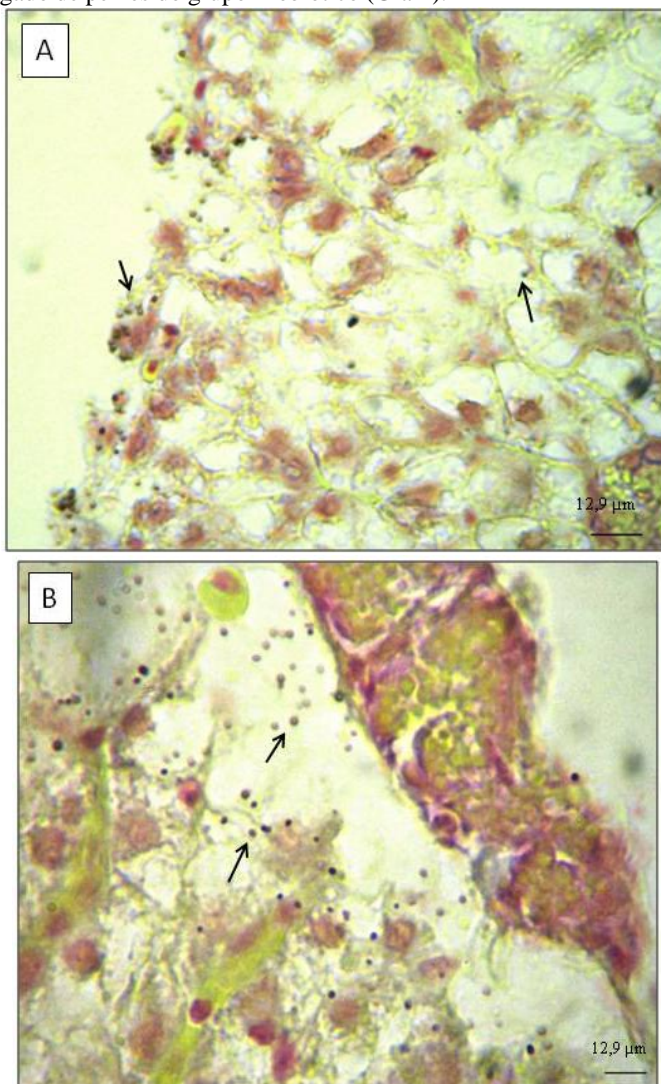
Após a infecção com *S. agalactiae*, 30% dos animais do grupo controle perderam o aspecto cordonal dos sinusóides no tecido hepático (Figura 03 – C). Cinquenta por cento dos animais apresentaram hepatócitos atrofiados e edema. Além disso, 40% demonstraram necrose multifocal do fígado.

Nos animais alimentados com suplementação probiótica, o fígado de todos os animais após a infecção, manteve o aspecto cordonal dos sinusóides normal (Figura 03 – D). Constatou-se a presença de infiltrado de melanócitos e leucócitos granulares em 18% dos peixes amostrados e edemas em 27%.

Também foi observada degeneração das células pancreáticas tanto no grupo controle, como no grupo probiótico, após a infecção.

Na coloração Gram das lâminas histológicas, constatou-se a presença de cocos positivos no tecido hepático de peixes de ambos os tratamentos (Figura 04).

Figura 4: Cortes histológicos do fígado de tilápias infectadas experimentalmente com *S. agalactiae*. Em A: Fígado de peixes do grupo não suplementado (Gram). Em B: Fígado de peixes do grupo Probiótico (Gram).



A histologia do trato intestinal dos peixes demonstrou que o comprimento, largura e perímetro das vilosidades intestinais não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos, nem pré e pós infecção experimental. Do mesmo modo, o número de vilos e de células caliciformes/vilo não diferiram significativamente entre os tratamentos (Tabelas 7 e 8).

A microscopia de luz revelou a barreira epitelial do intestino do grupo probiótico danificada, ao contrário do grupo controle (Figuras 05). Em ambos tratamentos, observa-se a mucosa intestinal com sua camada epitelial e lâmina própria no centro da vilosidade e leucócitos intraepiteliais inseridos nela. As seções histológicas do trato gastrointestinal também nos revelam que as células caliciformes de ambos os tratamentos estão preenchidas com grande quantidade de mucinas ácidas, revestindo o epitélio de uma barreira de muco (Figuras 5 e 6).

Figura 5: Cortes histológicos de trato intestinal de tilápias alimentadas com dieta suplementada e não suplementada com probiótico. (A, B) Grupo não suplementado em microscopia de luz (ML); (C, D) Grupo probiótico em ML.

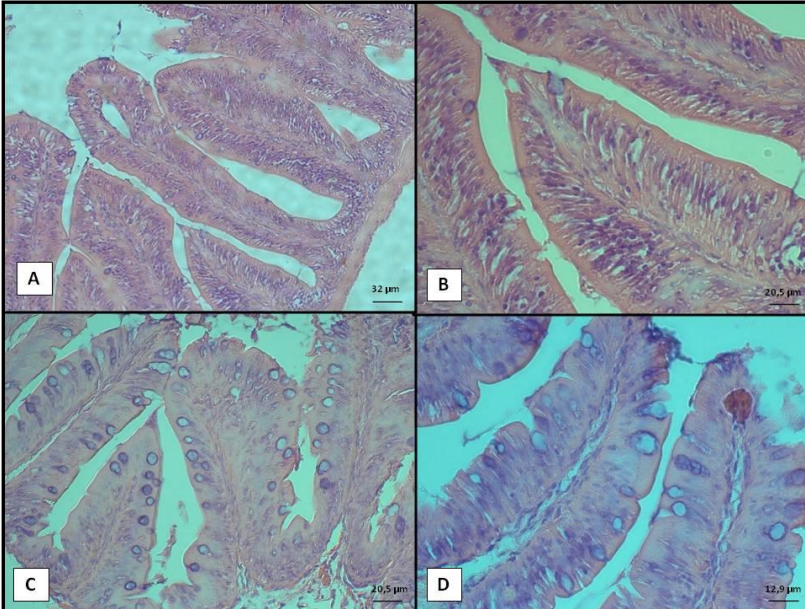


Figura 6: Cortes histológicos do trato intestinal de tilápias alimentadas com dieta suplementada e não suplementada com probiótico, após desafio experimental com *S. agalactiae*. (A, B) Grupo não suplementado em microscopia de luz (ML); (C, D) Grupo probiótico em ML.

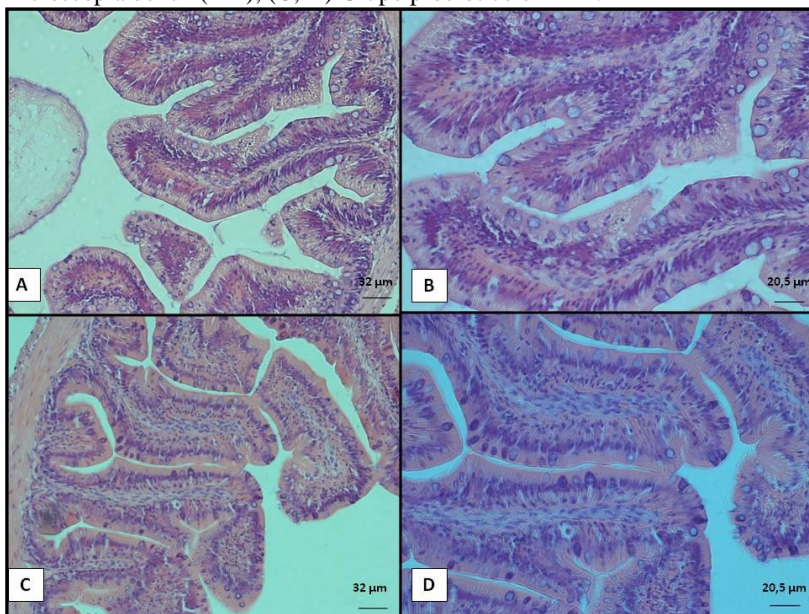


Tabela 7: Comprimento, largura, perímetro e número das vilosidades intestinais e de células caliciformes por vilão (média \pm desvio padrão), de tilápia do Nilo alimentadas com dieta suplementada e não suplementada com probiótico.

*Diferença significativa de acordo com teste t ($p < 5\%$).

Histomorfometria	Controle	Probiótico	Valor – p
Comprimento (μm)	269,01 \pm 71,79	239,04 \pm 36,60	0,246
Largura (μm)	73,47 \pm 12,71	75,14 \pm 9,70	0,753
Perímetro (μm)	568,91 \pm 147,13	489,02 \pm 62,51	0,150
Número de vilos	35,6 \pm 7,16	39,5 \pm 9,47	0,316
Células caliciformes/vilão	14,89 \pm 23,21	16,78 \pm 23,39	0,861

Tabela 8: Comprimento, largura, perímetro e número das vilosidades intestinais e de células caliciformes por vilo (média \pm desvio padrão), de tilápia do Nilo alimentada com dieta suplementada e não suplementada com probiótico, após desafio experimental com *S. agalactiae*.

*Diferença significativa de acordo com teste t ($p < 5\%$).

Histomorfometria	Controle	Probiótico	Valor- p
Comprimento (μm)	258,06 \pm 48,09	238,15 \pm 66,06	0,509
Largura (μm)	77,83 \pm 8,84	80,44 \pm 15,89	0,687
Perímetro (μm)	513,48 \pm 108,58	482,84 \pm 106,57	0,598
Número de vilos	42,66 \pm 10,19	37,33 \pm 4,84	0,257
Células Caliceformes/vilo	10,67 \pm 5,05	9,85 \pm 5,99	0,778

Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A MET revelou que os animais alimentados com as duas dietas, antes do desafio experimental, apresentaram total integridade da mucosa intestinal. O epitélio intestinal apresentou células intactas e bem definidas, sem espaços intercelulares, com bordas de escova organizadas e bem desenvolvidas. Nota-se a presença de mais vacúolos intracelulares nas células intestinais do grupo controle (Figura 7).

Após a infecção experimental, os peixes do grupo controle mantiveram a mesma estrutura celular observada antes do desafio: presença de vacúolos intracelulares e microvilosidades mantidas nas bordas das células. Porém, foram observados alguns danos na mucosa intestinal com a presença de bactérias morfologicamente parecidas com a cepa patogênica utilizada no desafio (*S. agalactiae*) (Figura 8). Os peixes do grupo suplementado, após o desafio experimental, apresentaram as mesmas características do grupo não suplementado (Figura 9).

Figura 7: Microscopia eletrônica de transmissão (MET) do intestino de tilápia alimentada e não alimentada com suplementação probiótica. Em (A,B) Grupo não suplementado em microscopia eletrônica de transmissão (MET); (C,D) Grupo suplementado em MET.

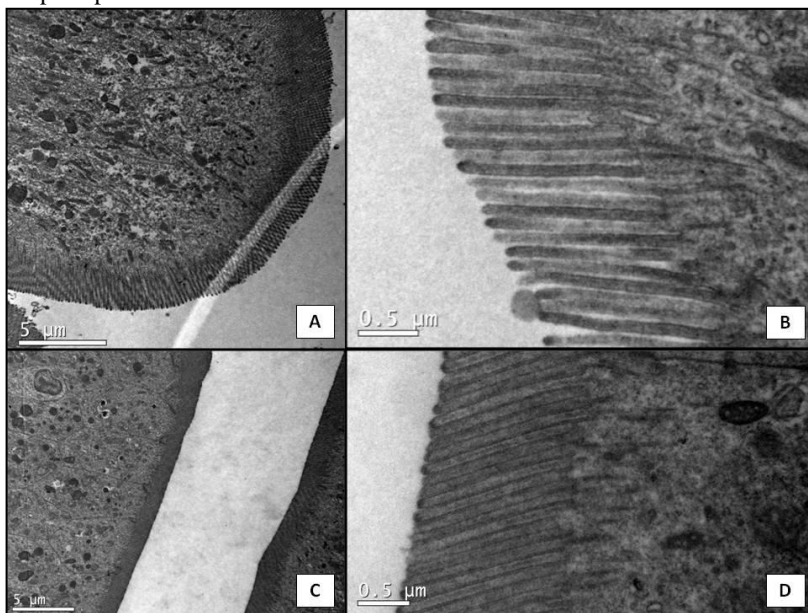


Figura 8: Microscopia eletrônica de transmissão do intestino de tilápias do grupo não suplementado, após desafio com *S. agalactiae*. Em (A) dano no epitélio intestinal com bactérias que apresentam morfologia de cocos dois a dois na luz do intestino; (B) Detalhe para cocos dois a dois na luz intestinal; (C) Ultraestrutura intestinal do grupo controle; (D) Detalhe para as microvilosidades intestinais do grupo controle.

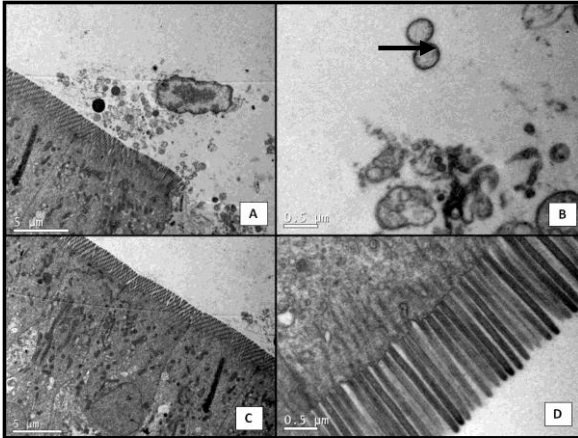
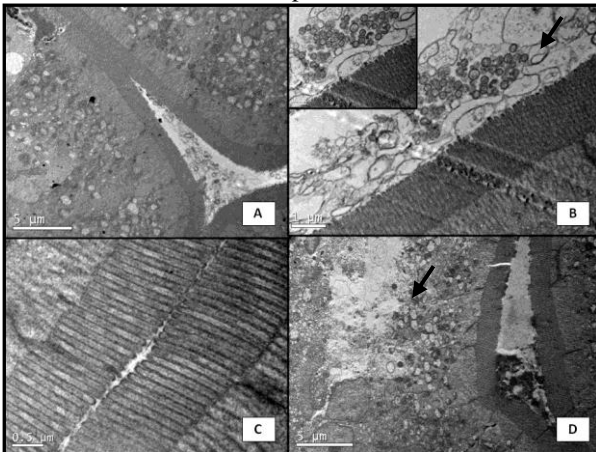


Figura 9: Microscopia eletrônica de transmissão do intestino de tilápias do grupo suplementado, após desafio com *S. agalactiae*. Em (A) ultraestrutura do epitélio intestinal; (B) Agregado de bactérias com morfologia de cocos na luz intestinal; detalhe para os cocos dois a dois na luz intestinal; (C) Detalhe para as microvilosidades, na superfície dos enterócitos, do grupo suplementado; (D) Dano no epitélio intestinal caracterizado por necrose dos enterócitos.



Parâmetros microbiológicos

Observou-se aumento na concentração de bactérias ácido-láticas no trato dos animais suplementados com cepa probiótica, com relação aos tratados com dieta sem suplementação. A concentração média alcançada no trato do grupo probiótico, após 58 dias de suplementação, foi de $4,23 \times 10^3$ UFC.mL⁻¹.

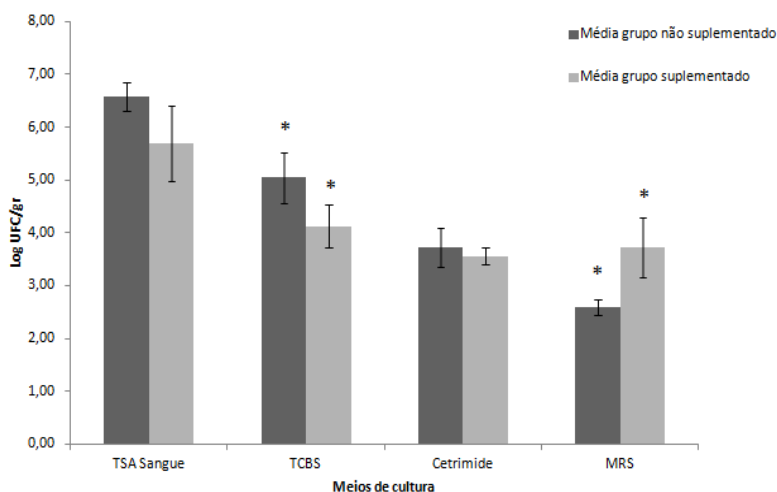
Além disso, a quantidade de vibriónáceas foi menor no tratamento probiótico quando comparado aos animais do grupo controle (Figura 10).

Figura 10: Microbiota intestinal de tilápia do Nilo alimentada com dieta não-suplementada e suplementada com probiótico.

*As barras demonstram o desvio padrão das amostras.

* Diferença significativa de acordo com teste t ($p < 5\%$).

*Os valores foram transformados em \log_{10} UFC/g de trato intestinal.



Parâmetros zootécnicos

Os peixes que foram alimentados com dieta suplementada com cepa probiótica durante 58 dias apresentaram peso final de $107,84 \pm 32,46$ g, enquanto os que receberam dieta não suplementada apresentaram apenas $75,16 \pm 38,93$ g de peso final ($p < 2,46 \times 10^{-6}$). Isto demonstra que o probiótico *L. plantarum* melhorou a performance de crescimento de tilápias, *O. niloticus*, neste estudo.

A taxa de crescimento específico e o ganho de peso dos animais tratados com dieta probiótica também foram superiores às do tratamento controle (Tabela 10), já a conversão alimentar dos animais suplementados com cepa probiótica foi inferior à dos animais do grupo controle.

A sobrevivência antes do desafio experimental foi de 100% em ambos os tratamentos.

Tabela 9: Parâmetros zootécnicos (média \pm desvio padrão) de tilápia do Nilo alimentada com dieta suplementada e não suplementada com probiótico *L. plantarum*.

*Diferença significativa de acordo com teste t ($p < 5\%$).

Parâmetros	Controle	Probiótico	Valor-p
Peso inicial (g)	28,55 \pm 6,39	24,31 \pm 6,99	0,206
Peso final (g)	75,16 \pm 38,93	107,84 \pm 32,46*	2,46 x 10 ⁻⁶
Comprimento total final (cm)	16,90 \pm 1,72	17,47 \pm 1,75	0,080
Ganho de peso (g)	53,02 \pm 5,30	63,80 \pm 10,10*	0,029
Conversão alimentar	1,71 \pm 0,22	1,48 \pm 0,22*	0,040
Taxa de Crescimento Específico (%/ dia)	1,81 \pm 0,19	2,07 \pm 0,23*	0,020

Mortalidade e reisolamento do patógeno

Após 96 horas do desafio experimental, não foi constatada mortalidade em nenhum dos tratamentos, porém foi observada redução no consumo alimentar do grupo controle nas primeiras 24 horas pós-infecção (Tabela 11).

O reisolamento, por esfregaço em TSA sangue de amostras do cérebro e fígado de animais infectados, e a identificação molecular do patógeno, revelaram a presença de *S. agalactiae* (Anexo 1).

Tabela 10: Redução no consumo alimentar de tilápia do Nilo suplementada e não suplementada com probiótico, após 24 h, 48 h, 72 h e 96 h do desafio experimental com *S. agalactiae*, via gavagem.

Horas após desafio experimental	Controle	Probiótico
24 h	11,50%	0%
48 h	9,80%	10,70%
72 h	13,70%	16,30%
96 h	6,20%	15,18%

DISCUSSÃO

No Brasil, em aquicultura apenas a tilapicultura e triticultura possuem antibiótico autorizado para ser utilizado nas unidades de produção, o florfenicol. Neste estudo as drogas escolhidas para a realização do antibiograma são os principais agentes antimicrobianos utilizados em aquicultura mundial (GASTALHO et al., 2014) e o resultado encontrado que demonstra o maior halo de inibição para o antibiótico florfenicol frente à *S. agalactiae* vai de acordo com a eficácia desta droga frente à bactérias deste gênero (GAUNT et al, 2010; DARWISH, 2007).

No diagnóstico do estado de saúde dos peixes, os parâmetros sanguíneos são fundamentais e quando alguns aditivos são utilizados na alimentação, como os probióticos, estes irão refletir diretamente sobre estes parâmetros. Jatobá *et al.* (2008), observaram aumentos significativos não somente no número de trombócitos e neutrófilos que corroboram com os encontrados neste trabalho, mas no de eritrócitos, leucócitos, linfócitos e monócitos circulantes, de tilápias alimentadas com *L. plantarum* após infecção experimental com *Enterococcus durans*. Os autores inferiram que o probiótico possivelmente tenha favorecido maior produção dos trombócitos em resposta à infecção. O fato do número de trombócitos ter diminuído em ambos os grupos após a infecção, sugere que estas células que são diretamente envolvidas na defesa, na resposta inflamatória e na aglutinação (MARTINS et al., 2006), possivelmente tenham migrado para o sítio de infecção nos peixes desafiados

O aumento no número de neutrófilos também foi registrado por Standen et al. (2013), em tilápias que receberam dieta probiótica, e em *Piaractus mesopotamicus* infectados com *Aeromonas hydrophila*

(GARCIA et al., 2007). Por outro lado, Ranzani-Paiva et al. (2004) não encontraram alterações no número de neutrófilos de tilápias, após infecção com *Mycobacterium marinum*. Os neutrófilos são células envolvidas na resposta imune inata, pois são as primeiras células a responderem a inflamação. A elevação no seu número no grupo suplementado com *L. plantarum* indica resposta sistêmica dos peixes, que deve envolver resposta imune não específica mais rápida à infecção patogênica. Estes autores, assim como no presente trabalho, não observaram diferença significativa nos demais parâmetros hematológicos.

Lisozima é considerada uma das enzimas mais importantes por sua capacidade bactericida, sendo assim é uma ferramenta indispensável dos peixes no combate a agentes infecciosos. Sintetizada e secretada por neutrófilos, monócitos e macrófagos, uma maior concentração de lisozima normalmente está associada à contagem de leucócitos. Standen et al. (2013) e Wang et al. (2008), não verificaram diferença significativa entre a atividade da lisozima do soro de tilápias alimentadas com probiótico comparadas às não suplementadas, porém os valores encontrados corroboram com os resultados deste trabalho pois foram maiores nos animais suplementados durante 42 e 40 dias, respectivamente. Contrariamente, Aly et al. (2008) constataram significativo aumento da atividade da lisozima em tilápias tratadas com probiótico *L. acidophilus* durante 1 e 2 meses de suplementação e igualmente por Wu et al. (2013) que suplementaram tilápias com erva medicinal por 30 dias. A divergência nestes resultados pode ser explicada pelas diferentes metodologias utilizadas na administração do probiótico ou pelo microrganismo probiótico utilizado.

O estudo das alterações histopatológicas em peixes é uma ferramenta importante, que auxilia no diagnóstico e na identificação de doenças bacterianas.

Segundo Zamri-Saad et al. (2010), existem diferenças nos padrões das lesões histopatológicas encontradas em peixes infectados experimentalmente e em peixes infectados naturalmente por *S. agalactiae*. Estes autores sugerem que a infecção experimental resultaria em infecção subaguda e crônica, enquanto a infecção natural levaria a infecção sistêmica aguda, culminando na morte súbita dos animais. Isto pode explicar o fato de não ter ocorrido mortalidade súbita dos animais após 96 horas do desafio experimental do presente trabalho.

No presente estudo, a necrose multifocal encontrada no tecido hepático dos animais infectados experimentalmente, corrobora à observada por Suanyuk et al. (2008). A presença de reação inflamatória,

com infiltrado de melanócitos e leucócitos granulares encontrada nos animais suplementados com probiótico após o desafio experimental, sugere um processo patológico crônico segundo Pulido et al. (2004). Além disso, sabe-se que a resposta inflamatória induzida pela migração de fagócitos para o sítio de infecção é potente mecanismo de defesa inato dos peixes contra bactérias (ELLIS, 2001). Esta resposta granulomatosa observada nas análises histológicas dos animais suplementados com probiótico também foi observada por Pirarat et al. (2006) que avaliaram o efeito protetor de *L. rhamnosus* em tilápias infectadas experimentalmente com a cepa *Edwardsiella tarda*. As lesões encontradas no presente estudo, estão de acordo com as registradas por outros autores em tilápias infectadas pelo gênero *Streptococcus* sp. (BOWSER et al., 1998; SUANYUK et al., 2010; ALSAID et al., 2013). Este fato demonstra que o modelo de infecção via gavagem utilizado neste estudo, foi bem sucedido além de causar menor estresse no manejo dos animais e ser de fácil execução, quando comparado ao modelo intra-peritoneal largamente utilizado em desafios experimentais. Além disso, os cocos observados nos cortes histológicos de porções do fígado dos animais infectados confirmaram que a enfermidade já era sistêmica em 96 horas após desafio, e comprovam a eficiência deste modelo de infecção.

Quanto à integridade das vilosidades intestinais e número de células caliciformes por vilão, este estudo foi diferente de Standen et al. (2013), que após seis semanas de suplementação probiótica em tilápias, observaram aumento no número de células caliciformes e barreira epitelial intacta nos peixes que receberam a suplementação probiótica quando comparados aos do grupo não suplementado, demonstrando a capacidade do probiótico em influenciar a alteração da morfologia do trato intestinal dos animais.

Ao contrário dos dados apresentados no presente estudo, Pirarat et al. (2011) observaram significativa diferença na altura das vilosidades intestinais de tilápias alimentadas com dieta probiótica durante 30 dias; verificando as maiores alturas no intestino proximal e distal. Os mesmos autores também observaram aumento significativo no número de células caliciformes dos peixes do grupo probiótico quando comparados aos do grupo controle. Quanto ao perímetro das vilosidades, os resultados encontrados por Standen et al. (2013) estão de acordo com os do presente estudo, não havendo diferença significativa entre os tratamentos.

Os resultados de Standen et al. (2013) corroboram os encontrados no presente estudo: epitélio intestinal de aspecto normal, com

enterócitos apresentando bordas de escova intactas e sem espaços intracelulares, após suplementação probiótica em tilápias do Nilo. Harper et al. (2011) observaram claros sinais de prejuízos no tecido intestinal de trutas suplementadas com probiótico e expostas à *Vibrio anguillarum*, demonstrando que a eficácia da microscopia eletrônica como ferramenta de diagnóstico em peixes.

Nos últimos anos, os probióticos, principalmente as bactérias ácido-láticas, vêm sendo utilizadas como suplemento alimentar com a finalidade de proteger os peixes de várias infecções (PIRARAT et al., 2006).

Standen et al. (2013) também observaram maiores valores na concentração de bactérias ácido-láticas, em tilápias que receberam suplementação probiótica com *Pediococcus acidilactici*, semelhante ao verificado por Jatobá et al. (2008) que suplementaram tilápias com *L. plantarum*. Apesar do aumento verificado na concentração de LAB no trato gastrointestinal das tilápias suplementadas, os valores encontrados no presente estudo, são menores quando comparados a outros trabalhos (STANDEN et al., 2013). Esta baixa concentração de LAB encontradas no grupo probiótico, pode ser explicada pela baixa concentração de bactéria probiótica que chegou ao trato dos animais, seja pela lixiviação na água dos tanques de cultivo antes da ingestão do pellete pelos peixes, ou pelas condições adversas do trato gastrointestinal encontradas pelas bactérias probióticas, como: redução do pH no estômago, enzimas digestivas e sais biliares ou ainda pela metodologia utilizada no momento da coleta de parte do trato gastrointesinal.

A microbiota bacteriana intestinal de organismos aquáticos é constituída, predominantemente por bactérias Gram negativas (GOMEZ-GIL et al., 2000) e pode variar de acordo com o ambiente, com a escassez de nutrientes ou pelo uso de bactérias probióticas (GATESOUBE, 2008). Em tilápias, *Vibrio* sp. normalmente dominam a microbiota intestinal (JATOBÁ et al., 2008), o que pode explicar o resultado observado no presente estudo, onde os animais do grupo controle apresentaram maior quantidade de vibriónáceas ao contrário do grupo probiótico, isto pode estar associado ao fato da cepa probiótica utilizada ter inibido o crescimento das bactérias patogênicas, seja pela exclusão competitiva por espaço e nutrientes ou pela produção de substâncias inibidoras, ou ainda pela alteração do metabolismo microbiano no intestino. Este fato também foi registrado por Vieira et al. (2007) em camarões marinhos (*Litopenaeus vannamei*) suplementados com *L. plantarum*.

Resultados semelhantes aos observados neste estudo quanto ao desempenho zootécnico de tilápias que receberam dieta probiótica, foram reportados por outros autores. Pirarat et al. (2011) também observaram menor índice de conversão alimentar e maior peso médio final, taxa de crescimento específico e ganho de peso em animais alimentados com *Lactobacillus* sp. durante 30 dias, embora não tenha sido encontrada significância estatística. Maiores valores de peso médio final e eficiência alimentar também foram verificados por Jatobá et al. (2011) em tilápias alimentadas com *L. plantarum* durante 84 dias e do mesmo modo, por Cornelio et al. (2013) que obtiveram melhores valores em ganho de peso e conversão alimentar suplementando tilápias com o mesmo probiótico. Em termos práticos, estes resultados sugerem que o uso de probiótico na dieta pode diminuir a quantidade de ração necessária para o crescimento do animal, o que pode levar à redução nos custos de produção. Outros resultados positivos quanto ao desempenho zootécnico de animais que receberam dietas probióticas foram observados por Aly et al. (2008) que alimentaram tilápias com *L. acidophilus* e *Bacillus subtilis* durante dois meses e registraram maior ganho de peso nestes animais quando comparados aos do grupo sem suplementação. Da mesma maneira, Wang et al. (2008), após 40 dias de suplementação probiótica de *Enterococcus faecium* em tilápias, verificaram maior peso final no grupo tratado quando comparado ao controle, corroborando resultado encontrado no presente estudo. Os efeitos benéficos no desempenho zootécnico dos animais tratados com o probiótico sugerem que a adição de *L. plantarum* na dieta pode melhorar a atividade digestiva como um todo, por meio do aumento da síntese de vitaminas, cofatores e atividades enzimáticas, favorecendo a digestão, absorção de nutrientes e conseqüentemente o ganho de peso (GATESOUBE, 1999).

Quanto a sobrevivência após o desafio experimental, o fato de não observarmos nenhuma mortalidade, pode ser explicado pela temperatura da água dos tanques de cultivo que se manteve em torno de 24,4 °C e pelo curto período de tempo da infecção de 96 horas. Segundo Kayansamruaj et al. (2014) o aumento na temperatura da água de cultivo aumenta a patogenicidade de *S. agalactiae*. Estes autores verificaram que tilápias infectadas experimentalmente com esta cepa e mantidas a 35°C apresentaram mortalidades de 85%, enquanto que as mantidas a 28°C apresentaram 45% (estes valores de mortalidade foram alcançados no 14º dia após a infecção). As altas mortalidades, por *Streptococcus* sp, frequentemente ocorrem no verão, quando a temperatura da água é superior à 26°C (MIAN et al., 2009). Resultados semelhantes foram

verificados por Figueiredo (2007), confirmando a associação da estreptococose com o estresse térmico dos peixes. Por sua vez, Cornelio et al. (2013) observaram o papel dos probióticos na melhora da resistência a infecções bacterianas uma vez que verificaram significativa redução na mortalidade de tilápias suplementadas com probiótico *L. plantarum* e desafiadas com *A. hydrophila*.

Após as primeiras 24 horas da infecção experimental, o grupo probiótico não teve seu consumo alimentar alterado, porém reduziu nas horas subsequentes, este fato talvez seja explicado pela elevada concentração de bactérias patogênicas utilizada no desafio via gavagem (1×10^7 UFC.g⁻¹ peso vivo). A suplementação probiótica foi capaz de manter o consumo dos animais suplementados dentro da normalidade no primeiro dia após o desafio, ao contrário dos animais do grupo controle mas devido à grande quantidade de bactéria utilizada no desafio, o consumo alimentar destes animais foi reduzindo após este período.

CONCLUSÃO

Foi possível concluir que a adição de *L. plantarum* na dieta de tilápia do Nilo alterou a microbiota intestinal e melhorou o desempenho zootécnico dos animais. Além de alterar parâmetros hematológicos envolvidos na resposta do sistema imune dos peixes, após o desafio com a cepa patogênica *S. agalactiae*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para que se alcance maior concentração de bactérias ácido lácticas no trato gastrointestinal de tilápias suplementadas com dieta probiótica, futuros estudos poderiam ser conduzidos utilizando a microencapsulação das bactérias como forma de incorporação das mesmas na dieta. Este método pode minimizar as perdas das bactérias ácido lácticas para a água de cultivo através da lixiviação, além de conferir maior sobrevivência destes micro-organismos na dieta e no meio-ambiente do trato gastrointestinal (ROSAS-LEDESMA et al., 2012).

O modelo de infecção via gavagem utilizado neste estudo poderia ser posteriormente comparado com o modelo intra-peritoneal comumente utilizado em desafios experimentais, e ser validado como modelo de infecção para peixes.

Para o resoltamento da cepa patogênica após o desafio experimental, novas técnicas moleculares podem ser utilizadas em estudos futuros, como a “nested-PCR” ou mesmo FISH (“Fluorescent in situ hybridization”) que detecta bactérias patogênicas à partir de

amostras de tecidos congelados de animais infectados (JIMÉNEZ et al., 2011). Esta técnica representa uma ferramenta importante no diagnóstico e identificação de bacterioses no cultivo de peixes.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo suporte financeiro, a Capes pela bolsa de mestrado, à Piscicultura Alevinos do Sabiá pelo fornecimento dos peixes, à Acquapiscis Consultoria e Medicina Veterinária em Aquicultura pelo fornecimento de cepa, ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica/UFSC pelo apoio e estrutura para realização das análises de microscopia eletrônica e ainda, ao Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética/UFSC, ao Laboratório de Camarões Marinhos/UFSC e ao Laboratório de Patologia e Sanidade de Organismos Aquáticos/UFSC pelo preparo de amostras e realização das análises microbiológicas, histológicas e hemato-imunológicas.

REFERÊNCIAS

- ABD EL-RHMAN, A. M.; KHATTAB, Y. A. E.; SHALABY, A. M. E. *Micrococcus luteus* and *Pseudomonas* species as probiotics for promoting the growth performance and health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 27, n. 2, p. 175-180, Aug 2009.
- ABUTBUL, S.; GOLAN-GOLDHIRSH, A.; BARAZANI, O.; ZILBERG, D. Use of *Rosmarinus officinalis* as a treatment against *Streptococcus iniae* in tilapia (*Oreochromis* sp.). **Aquaculture**, v. 238, n. 1-4, p. 97-105, 2004.
- ALSAID, M.; DAUD, H. H. M.; MUSTAPHA, N. M.; BEJO, S. K.; ABDELHADI, Y. M.; ABUSELIANA, A. F.; HAMDAN, R. H. Pathological findings of experimental *Streptococcus agalactiae* infection in red hybrid tilapia (*Oreochromis* sp.). **Internacional Conference on Chemical, agricultural and Medical Sciences**, v. CAMS 2013, p. 70-73, 2013.

ALY, S. M., AHMED, Y. A. G., GHAREEB, A. A. A., MOHAMED, M. F. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 25, n. 1-2, p. 128-136, 2008.

AMAR, E. C. K., V.; SATOH, S.; OKAMOTO, N.; WATANABE, T. Effect of dietary β -carotene on the immune response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Fisheries Science**, v. 66, p. 1068-1075, 2000.

BAUER, A. W., KIRBY, W. M. M., SHERRIS, J. C. T., TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American journal of clinical pathology**, v. 45, n. 4, p. 493, 1966.

BAUMS, C. G., HERMEYER, K., LEIMBACH, S., ADAMEK, M., CZERNY, C. P., HÖRSTGEN-SCHWARK, G., VALENTIN-WEIGAND, P., BAUMGÄRTNER, W., STEINHAGEN, D. Establishment of a model of *Streptococcus iniae* meningoencephalitis in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Journal of Comparative Pathology**, v. 149, n. 1, p. 94-102, 2013.

BOWSER, P. R., WOOSTER, G. A., GETCHELI, R. G. *Streptococcus iniae* infection of tilapia *Oreochromis niloticus* in a recirculation production facility. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 29, n. 3, p. 335-339, 1998.

CARNEVALI, O., ZAMPONI, M. R., SULPIZIO, R., ROLLO, A., NARDI, M., ORPIANESI, C., SILVI, S., CAGGIANO, M., POLZONETTI, A. M., CRESCI, A. Administration of probiotic strain to improve sea bream wellness during development. **Aquaculture International**, v. 12, n. 4-5, p. 377-386, 2004.

Center for Food Security and Public Health. Streptococcus. Iowa State University 2005.

COLLIER, H.B. The standardization of blood haemoglobin determinations. **Canadian Medical Association Journal**, v. 50, p. 550-552, 1944.

CONROY, G. Prevalence of *Streptococcus* in Latin America. **The Fish Site** 2009.

CORNELIO, F. H. G., CARGNIN-FERREIRA, E., BORBA, M. R., MOURIÑO, J. L. P., FERNANDES, V. A. G., FRACALOSSO, D. M. Growth, digestibility and resistance to pathogen infection in Nile tilapia fed with probiotics. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 48, n. 8, p. 863-870, 2013.

DARWISH, A. M. Laboratory efficacy of florfenicol against *Streptococcus iniae* infection in Sunshine Bass **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 19, n. 1, 2007.

DJEDIAT, C., MALÉCOT, M., DE LUZE, A., BERNARD, C., PUISEUX-DAO, S., EDERY, M. Localization of microcystin-LR in medaka fish tissues after cyanotoxin gavage. **Toxicon**, v. 55, n. 2, p. 531-535, 2010.

ELLIS, A. E. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 25, n. 8-9, p. 827-839, 2001.

FAJT, J. R.; GRIZZLE, J. M. Oral toxicity of rotenone for common carp. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 122, n. 2, p. 302-304, 1993.

FAWELL, J. K., MITCHELL, R. E., D. J. EVERETT, HILL, R. E. The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: I Microcystin-LR. **Human & Experimental Toxicology**, v. 18, p. 162-167, 1999.

FIGUEIREDO, H. C. P., NOBREGA NETTO, L., LEAL, C. A. G., PEREIRA, U. P., MIAN, G. F. *Streptococcus iniae* outbreaks in brazilian Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) farms. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 576-580, 2012.

FIGUEIREDO, H. C. P.; GODOY, D. T.; MIAN, G. F.; LEAL, C. A. G. Estreptococose em tilápia do Nilo - parte 2. **Panorama da Aquicultura**, v. 104, p. 42-45, 2007.

GARCIA, F., PILARSKI, F., ONAKA, E. M., DE MORAES, F. R., MARTINS, M. L. Hematology of *Piaractus mesopotamicus* fed diets supplemented with vitamins C and E, challenged by *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture**, v. 271, n. 1-4, p. 39-46, 2007.

GASTALHO, S.; SILVA, G. J. D.; RAMOS, F. Antibiotics in aquaculture and bacterial resistance: Health care impact. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, v. 3, n. 1, p. 28-44, 2014.

GATESOUBE, F. J. The use of probiotics in aquaculture. **Aquaculture**, v. 180, n. 1-2, p. 147-165, 1999.

GATESOUBE, F. J.. Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: Natural occurrence and probiotic treatments. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 14, n. 1-3, p. 107-114, 2008.

GAUNT P. S., ENDRIS, R., MCGINNIS, A., BAUMGARTNER, W., CAMUS, A., STEADMAN, J., SWEENEY, D., SUN, F. Determination of florfenicol dose rate in feed for control of mortality in Nile tilapia infected with *Streptococcus iniae*. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 22, n. 3, 2010.

GOMEZ-GIL, B.; ROQUE, A.; TURNBULL, J. F. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. **Aquaculture**, v. 191, n. 1-3, p. 259-270, 2000.

GUTIERREZ-PRAENA, D., JOS, A., PICHARDO, S., PUERTO, M., CAMEÁN, A. M. Influence of the exposure way and the time of sacrifice on the effects induced by a single dose of pure Cylindrospermopsin on the activity and transcription of glutathione peroxidase and glutathione-S-transferase enzymes in Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Chemosphere**, v. 90, n. 3, p. 986-992, 2013.

HARPER, G. M., MONFORT, M., SAOUD, I. P., EMERY, M. J., MUSTAFA, S., RAWLING, M. D., EYNON, B., DAVIES, S. J., MERRIFIELD, D. L. An ex vivo approach to studying the interactions of probiotic *Pediococcus acidilactici* and *Vibrio* (*Listonella*) *anguillarum* in the anterior intestine of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Journal of Aquaculture Research & Development**, v. 1, p. 7.5-0.5, 2011.

ISHIKAWA, N. M.; RANZANI-PAIVA, M. J.; LOMBARDI, J. V. Total leukocyte counts methods in fish, *Oreochromis niloticus*. **Archives of Veterinary Sciences**, v. 13, p. 54-63, 2008.

JATOBÁ, A., VIEIRA, F. N., NETO, C. B., SILVA, B. C., MOURIÑO, J. L. P., JERÔNIMO, G. T., DOTTA, G., MARTINS, M. L. Lactic-acid bacteria isolated from the intestinal tract of Nile tilapia utilized as probiotic. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 43, n. 9, p. 1201-1207, 2008.

JATOBÁ, A., VIEIRA, F. N., BUGLIONE-NETO, C. C., MOURIÑO, J. L. P., SILVA, B. C., SEIFTER, W. Q., ANDREATTA, E. R. Diet supplemented with probiotic for Nile tilapia in polyculture system with marine shrimp. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 37, n. 4, p. 725-732, 2011.

JIMÉNEZ, A. TIBATÁ, V., JUNCA, H., ARIZA, F., VERJAN, N., IREGUI, C. Evaluating a nested-PCR assay for detecting *Streptococcus agalactiae* in red tilapia (*Oreochromis* sp.) tissue. **Aquaculture**, v. 321, n. 3-4, p. 203-206, 2011.

KAYANSAMRUJ, P. PIRARAT, N., HIRONO, I., RODKHUM, C. Increasing of temperature induces pathogenicity of *Streptococcus agalactiae* and the up-regulation of inflammatory related genes in infected Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Veterinary Microbiology**, v. 172, n. 1-2, p. 265-271, 2014.

KLESIOUS, P. H.; SHOEMAKER, C. A.; EVANS, J. J. Efficacy of single and combined *Streptococcus iniae* isolate vaccine administered by intraperitoneal and intramuscular routes in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 188, n. 3-4, p. 237-246, 2000.

LARA-FLORES, M. OLVERA-NOVOA, M. A., GUZMÁN-MÉNDEZ, B. E., LÓPEZ-MADRID, W. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 216, n. 1-4, p. 193-201, 2003.

MACEY, B. M.; COYNE, V. E. Improved growth rate and disease resistance in fanned *Haliotis midae* through probiotic treatment. **Aquaculture**, v. 245, n. 1-4, p. 249-261, 2005.

MARTINS, M. L., MORAES, F. D., FUJIMOTO, R. Y., ONAKA, E. M., BOZZO, F. R., MORAES, J. D. Carrageenin induced inflammation

in *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae) cultured in Brazil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 32, n. 1, p. 31-39, 2006.

MATUSHIMA, E.; MARIANO, M. Kinetics of the inflammatory reaction induced by carrageenin in the swimbladder of *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 33, n. 1, p. 5-10, 1996.

MIAN, G. F., GODOY, D. T., LEAL, C. A. G., YUHARA, T. Y., COSTA, G. M., FIGUEIREDO, H. C. P. Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia. **Veterinary Microbiology**, v. 136, n. 1-2, p. 180-183, 2009.

MOURIÑO, J. L. P., VIEIRA, F. D., JATOBÁ, A. B., DA SILVA, B. C., JESUS, G. F. A., SEIFFERT, W. Q., MARTINS, M. L. Effect of dietary supplementation of inulin and *W. cibaria* on hemato-immunological parameters of hybrid surubim (*Pseudoplatystoma* sp.). **Aquaculture Nutrition**, v. 18, p. 73-80, 2012.

PASNIK, D. J.; EVANS, J. J.; KLESIUS, P. H. Passive immunization of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) provides significant protection against *Streptococcus agalactiae*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 21, n. 4, p. 365-371, 2006.

PIRARAT, N., KOBAYASHI, T., KATAGIRI, T., MAITA, M., ENDO, M. Protective effects and mechanisms of a probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* against experimental *Edwardsiella tarda* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 113, n. 3-4, p. 339-347, 2006.

PIRARAT, N., PINPIMAI, K., ENDO, M., KATAGIRI, T., PONPORNPIKIT, A., CHANSUE, N., MAITA, M. Modulation of intestinal morphology and immunity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by *Lactobacillus rhamnosus* GG. **Research in Veterinary Science**, v. 91, n. 3, p. 92-97, 2011.

PULIDO, A., IREGUI, C., FIGUEROA, J., KLESIUS, P. Streptococcosis in tilapia (*Oreochromis* spp.) grown in Colombia. **Revista AquaTIC**, v. 20, p. 97-106, 2004.

QIANG, J., YANG, H., WANG, H., KPUNDEH, M. D., XU, P. Interacting effects of water temperature and dietary protein level on hematological parameters in Nile tilapia juveniles, *Oreochromis niloticus* (L.) and mortality under *Streptococcus iniae* infection. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 34, n. 1, p. 8-16, 2013.

RAMÍREZ, C., BOLÍVAR, A., CIFFONI, G. A., PANCHENIAK, E., SOCCOL, E. F. R. C. Dairy probiotic microorganisms for application in feeding larval shrimp and fish as a substitute for antibiotic. **La alimentación latinoamericana**, v. 264, p. 70-78, 2006.

RANZANI-PAIVA, M. J. T., PÁDUA, S. B., TAVARES-DIAS, M., EGAMI, M. I. **Métodos para análise hematológica em peixes**. Maringá, EdUEM, p. 135, 2013.

RANZANI-PAIVA, M. J. T., ISHIKAWA, C. M., EIRAS, A. C. D., SILVEIRA, V. R. D. Effects of an experimental challenge with *Mycobacterium marinum* on the blood parameters of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, p. 945-953, 2004.

RATTANACHAIKUNSOPON, P.; PHUMKHACHORN, P. Prophylactic effect of *Andrographis paniculata* extracts against *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 107, n. 5, p. 579-582, 2009.

ROSAS-LEDESMA, P., LÉON-RUBIO, J. M., ALARCÓN, F. J., MORIÑO, M. A., BALEBONA, M. C. Calcium alginate capsules for oral administration of fish probiotic bacteria: assessment of optimal conditions for encapsulation. **Aquaculture Research**, v. 43, n. 1, p. 106-116, 2012.

ROSENFELD, G. Pancromic stain for haematology and clinical cytology. A new combination of the components May-Grünwald and Giemsa in just one formula for rapid staining. **Memorias Instituto do Butantan**, v. 20, p. 329-334, 1947.

SALVADOR, R., MULLER, E. E., FREITAS, J. C. D., LEONHADT, J. H., PRETTO-GIORDANO, L. G., DIAS, J. A. Isolation and characterization of *Streptococcus* spp. group B in Nile tilapias

(*Oreochromis niloticus*) reared in hapas nets and earth nurseries in the northern region of Parana State, Brazil. **Ciência Rural**, v. 35, n. 6, p. 1374-1378, 2005.

SANKARAN, K.; GURNANI, S. Variation in catalytic activity of lysozyme in fishes. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 9, n. 2, p. 162, 1972.

SCHMIDT, E. C., DOS SANTOS, R., HORTA, P. A., MARASCHIN, M., BOUZON, Z. L. Effects of UVB radiation on the agarophyte *Gracilaria domingensis* (Rhodophyta, Gracilariales): Changes in cell organization, growth and photosynthetic performance. **Micron**, v. 41, n. 8, p. 919-930, 2010.

SHOEMAKER, C.; KLESIUS, P.; FITZSIMMONS, K. Streptococcal disease problems and control: a review. **II Fourth international symposium on tilapia in aquaculture**, 1997.

SMITH, P.; HINEY, M. P.; SAMUELSEN, O. B. Bacterial resistance to antimicrobial agents used in fish farming: A critical evaluation of method and meaning. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 4, n. 0, p. 273-313, 1994.

STANDEN, B. T., RAWLING, M. D., DAVIES, S. J., CASTEX, M., FOEY, A., GIOACCHINI, G., CARNEVALI, O., MERRIFIELD, D. L. Probiotic *Pediococcus acidilactici* modulates both localised intestinal- and peripheral-immunity in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 35, n. 4, p. 1097-1104, 2013.

SUANYUK, N., KONG, F., KO, D., GILBERT, G. L., SUPAMATTAYA, K. Occurrence of rare genotypes of *Streptococcus agalactiae* in cultured red tilapia *Oreochromis* sp. and Nile tilapia *O. niloticus* in Thailand—Relationship to human isolates? **Aquaculture**, v. 284, n. 1, p. 35-40, 2008.

SUANYUK, N., SUKKASAME, N., TANMARK, N., YOSHIDA, T., ITAMI, T., THUNE, R. L., TANTIKITTI, C., SUPAMATTAYA, K. *Streptococcus iniae* infection in cultured Asian sea bass (*Lates calcarifer*) and red tilapia (*Oreochromis* sp.) in southern Thailand. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 32, n. 4, p. 341-348, 2010.

TAGG, J.; MCGIVEN, A. Assay system for bacteriocins. **Applied microbiology**, v. 21, n. 5, p. 943, 1971.

TU, F. P., CHU, W. H., ZHUANG, X. Y., LU, C. P. Effect of oral immunization with *Aeromonas hydrophila* ghosts on protection against experimental fish infection. **Letters in Applied Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 13-17, 2009.

VIEIRA, F. D., PEDROTTI, F. S., BUGLIONE NETO, C. C., MOURIÑO, J. L. P., BELTRAME, E., MARTINS, M. L., RAMIREZ, C., ARANA, L. A. V. Lactic-acid bacteria increase the survival of marine shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after infection with *Vibrio harveyi*. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 55, n. 4, p. 251-255, 2007.

WANG, Y.-B. Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 269, n. 1-4, p. 259-264, 2007.

WANG, Y.-B. et al. Effect of probiotics, *Enterococcus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. **Aquaculture**, v. 277, n. 3-4, p. 203-207, 2008.

WU, Y. R., GONG, Q. F., FANG, H., LIANG, W. W., CHEN, M., HE, R. J. Effect of *Sophora flavescens* on non-specific immune response of tilapia (GIFT *Oreochromis niloticus*) and disease resistance against *Streptococcus agalactiae*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 34, n. 1, p. 220-227, 2013.

ZAMRI-SAAD, M.; AMAL, M. N. A.; SITI-ZAHRAH, A. Pathological changes in red tilapias (*Oreochromis* spp.) naturally infected by *Streptococcus agalactiae*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 143, n. 2-3, p. 227-229, 2010.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

AL-HARBI, A. H. First isolation of *Streptococcus* sp. from hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) in Saudi Arabia. **Aquaculture**, v. 128, n. 3-4, p. 195-201, 1994.

AMAL, M.; ZAMRI-SAAD, M. Streptococcosis in tilapia (*Oreochromis niloticus*): A review. **Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science**, v. 34, n. 2, p. 195-206, 2011.

BAKER, C. J. Group B Streptococcal infections in neonates. **Pediatrics in Review**, v. 1, n. 1, p. 5-15, 1979.

BARBOSA, M. C., JATOBÁ, A., VIEIRA, F. D. N., SILVA, B. C., MOURIÑO, J. L. P., ANDREATTA, E. R., SEIFFERT, W. Q., CERQUEIRA, V. R. Cultivation of juvenile Fat Snook (*Centropomus parallelus* Poey, 1860) fed probiotic in laboratory conditions. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 4, p. 795-801, 2011.

BHUJEL, R. C. A Manual for tilapia business management. **CABI**, 2014. ISBN 9781780641362. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=p8aWBAAAQBAJ>>.

BROMAGE, E. S.; THOMAS, A.; OWENS, L. *Streptococcus iniae*, a bacterial infection in barramundi *Lates calcarifer*. **Diseases of aquatic organisms**, v. 36, n. 3, p. 177-181, 1999.

CARNEVALI, O., DE VIVO, L., SULPIZIO, R., GIOACCHINI, G., OLIVOTTO, I., SILVI, S., CRESCI, A. Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*, L.), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression. **Aquaculture**, v. 258, n. 1-4, p. 430-438, 2006.

CASTAGNOLLI, N. Status of aquaculture in Brazil. **World Aquaculture**, v. 26, n. 4, p. 35-39, 1995.

Center for Food Security and Public Health. **Streptococcus**. Iowa State University 2005.

CONROY, G. Diseases found in tilapia culture in Latin America. **The Advocate**, Global Aquaculture Alliance, p. 52-55, 2001.

ELER, M., N.; MILLANI, T., J. Métodos de estudos de sustentabilidade aplicados a aquicultura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 33-44, 2007.

EVANS, J. J., KLESIUS, P. H., GILBERT, P. M., SHOEMAKER, C. A., AL SARAWI, M. A., LANDSBERG, J., DUREMDEZ, R., AL MARZOUK, A., AL ZENKI, S. Characterization of beta-haemolytic Group B *Streptococcus agalactiae* in cultured seabream, *Sparus auratus* L., and wild mullet, *Liza klunzingeri* (Day), in Kuwait. **Journal of Fish Diseases**, v. 25, n. 9, p. 505-513, 2002.

FAO. Fishery and Aquaculture Statistics. **FAO annuaire**. FAO. Rome: 76 p. 2012.

FIGUEIREDO, H. C. P.; MIAN, G. F., GODOY, D. T. Estreptococose em tilápia do Nilo - parte 1. **Panorama da Aquicultura**, v. 103, p. 36-38, 2007.

FIGUEIREDO, H. C. P., NETTO, L. N., LEAL, C. A. G., PEREIRA, U. P., MIAN, G. F. *Streptococcus iniae* outbreaks in brazilian Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) farms. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 43, n. 2, p. 576-580, 2012.

FITZSIMMONS, K. Tilapia: the most important aquaculture species of the 21st century. **Panorama da Aquicultura**. Rio de Janeiro, Brazil: K. Fitzsimmons & J.C.Filho: p. 3-8 , 2000.

GARCIA, F., ROMERA, D. M., GOZI, K. S., ONAKA, E. M., FONSECA, F. S., SCHALCH, S. H., CANDEIRA, P. G., GUERRA, L. O. M., CARMO, F. J., CARNEIRO, D. J., MARTINS, M. I. E. G., PORTELLA, M. C. Stocking density of Nile tilapia in cages placed in a hydroelectric reservoir. **Aquaculture**, v. 410-411, p. 51-56, 2013.

GEORGE, M. R., JOHN, K. R., IYAPPAN, T., JEYASEELAN, M. J. P. Genetic heterogeneity among *Vibrio alginolyticus* isolated from shrimp farms by PCR fingerprinting. **Letters in Applied Microbiology**, v. 40, n. 5, p. 369-372, 2005.

HARIKRISHNAN, R.; BALASUNDARAM, C. Modern trends in *Aeromonas hydrophila* disease management with fish. **Reviews in Fisheries Science**, v. 13, n. 4, p. 281-320, 2005.

HUBERT, R. M. Bacterial diseases in warm water aquaculture. . In: CRC, B. R. (Ed.). **In SHILO, M.; SARIG, S. (Ed.) Fish Culture in Warm Water Systems. Problems and Trends**, p.194-197, 1989.

JATOBÁ, A., VIEIRA, F. N., NETO, C. B., SILVA, B. C., MOURIÑO, J. L. P., JERÔNIMO, G. T., DOTTA, G., MARTINS, M. L. Lactic-acid bacteria isolated from the intestinal tract of Nile tilapia utilized as probiotic. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 43, n. 9, p. 1201-1207, 2008.

JATOBÁ, A., VIEIRA, F. N., BUGLIONE-NETO, C. C., MOURIÑO, J. L. P., SILVA, B. C., SEIFTER, W. Q., ANDREATTA, E. R. Diet supplemented with probiotic for Nile tilapia in polyculture system with marine shrimp. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 37, n. 4, p. 725-732, 2011.

JIMÉNEZ, A.; REY, A. L.; PENAGOS, G.; ARIZA, M. F.; FIGUEROA, J.; IREGUI, C. A. *Streptococcus agalactiae*: Hasta ahora el único Streptococcus patógeno de tilapias cultivadas en Colombia. **Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia**, v. 54, n. 2, p. 285-294, 2007.

KAYANSAMRUJ, P. PIRARAT, N., HIRONO, I., RODKHUM, C. Increasing of temperature induces pathogenicity of *Streptococcus agalactiae* and the up-regulation of inflammatory related genes in infected Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Veterinary Microbiology**, v. 172, n. 1-2, p. 265-271, 2014.

KEONG, W., KOH, C., SUDESH, K., ZAHRAH, A. Organic acids potential replacement for antibiotic treatments of tilapia. **Global Aquaculture Advocate**, p. 93-94, 2009.

KITAO, T.; AOKI, T.; SAKOH, R. Epizootic caused by beta - haemolytic *Streptococcus* species in cultured freshwater fish. **Fish Pathology**, v. 15, n. 3/4, p. 301-307, 1981.

KLESIOUS, P.; SHOEMAKER, C.; EVANS, J. Streptococcus: A worldwide fish health problem. **8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture**, Cairo, Egypt, p.83-107, 2008.

KOMAR, C. Disease Management in Tilapia. **Global Aquaculture Advocate**, p. 77-79, 2008.

KUBITZA, F. Main parasites and diseases in tilapia. **Panorama da Aquicultura**. Rio de Janeiro, Brazil: v. 60, p.39-53, 2000.

LIM, C.; LÜCKSTÄDTS, C.; KLESIUS, P.H. Review: use of organic acids, salts in fish diets. **Global Aquaculture Advocate**, v. 5, n. 9-10, p. 45-46, 2010.

MACMILLAN, J.R.; SCHNICK, R.; FORNSHELL, G. Volume of Antibiotics Sold (2001-2002) in US Domestic Aquaculture Industry. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 73, n. 1, p. 197-202, 2006.

MARTINS, M. L., SHOEMAKER, C. A., XU, D., KLESIUS, P. H. Effect of parasitism on vaccine efficacy against *Streptococcus iniae* in Nile tilapia. **Aquaculture**, v. 314, n. 1-4, p. 18-23, 2011.

MPA. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura**. MPA. Brasil, 2010.

MPA. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura**. MPA. Brasil: p. 60, 2011.

MPA. **Ministério da Aquicultura e Pesca**. Aquicultura - Espécies Cultivadas. Publicado em Junho de 2014. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/index.php/aquicultura/especies-cultivadas>

MORAES, F. R.; MARTINS, M. L. Condições predisponentes e principais enfermidades de teleósteos em piscicultura intensiva. **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, p. 343-383, 2004.

MOURINO, J. L. P. **Suplementação dietética com simbiótico para o híbrido de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) e cachara (*P. fasciatum*)**. 2010. 124 Aquicultura, UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina

NAKANISHI, T.; KIRYU, I.; OTOTAKE, M. Development of a new vaccine delivery method for fish: percutaneous administration by immersion with application of a multiple puncture instrument. **Vaccine**, v. 20, n. 31-32, p. 3764-3769, 2002.

NANDLAL, S.; PICKERING, T. Tilapia fish farming in Pacific Island countries. Volume 1. **Tilapia Hatchery Operation**, 2004.

NAYAK, S. K. Role of gastrointestinal microbiota in fish. **Aquaculture Research**, v. 41, n. 11, p. 1553-1573, 2010.

PIER, G. B.; MADIN, S. H. *Streptococcus iniae* sp. nov., a Beta-Hemolytic *Streptococcus* isolated from an amazon freshwater dolphin, *Inia geoffrensis*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 26, n. 4, p. 545-553, 1976.

PLUMB, J. A. Chapter 11 infectious diseases of striped bass. In: REGINAL, M. H. (Ed.). **Developments in Aquaculture and Fisheries Science**: Elsevier, v. 30, p.271-313, 1997.

PLUMB, J. A. Overview of Warmwater Fish Diseases. **Journal of Applied Aquaculture**, v. 9, n. 2, p. 1-10, 1999. Access in: 2015/01/05.

RATTANACHAIKUNSOPON, P.; PHUMKHACHORN, P. Prophylactic effect of *Andrographis paniculata* extracts against *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 107, n. 5, p. 579-582, 2009.

RIDHA, M. T.; AZAD, I. S. Preliminary evaluation of growth performance and immune response of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* supplemented with two putative probiotic bacteria. **Aquaculture Research**, v. 43, n. 6, p. 843-852, 2012.

ROBINSON, J. A.; MEYER, F. P. Streptococcal fish pathogen. *Journal of Bacteriology*, v. 92, n. 2, p. 512, 1966.

ROSAGAST, M. **Tilapia Fish Farming ~ Practical Manual**. Available in:< <https://books.google.com.br/books?id=n7kVBgAAQBAJ> > EduSolutions, Second Edition, p. 57, 2012.

SAPKOTA, A., SAPKOTA, A. R., KUCHARSKI, M., BURKE, J., MCKENZIE, S., WALKER, P., LAWRENCE, R. Aquaculture practices and potential human health risks: Current knowledge and future priorities. **Environment International**, v. 34, n. 8, p. 1215-1226, 2008.

SCORVO FILHO, J. D., FRASCÁ-SCORVO, C. M. D., ALVES, J. M. C., SOUZA, F. R. A. D. The tilapia and its inputs, economic relations. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 112-118, 2010.

SHOEMAKER, C. A.; KLESIUS, P.; FITZSIMMONS, K. Streptococcal disease problems and control: a review. **2 Fourth international symposium on tilapia in aquaculture**, 1997.

SHOEMAKER, C. A.; EVANS, J. J.; KLESIUS, P. H. Density and dose: factors affecting mortality of *Streptococcus iniae* infected tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v.188, n.3-4, p.229-235, 2000.

STANDEN, B. T., RAWLING, M. D., DAVIES, S. J., CASTEX, M., FOEY, A., GIOACCHINI, G., CARNEVALI, O., MERRIFIELD, D. L. Probiotic *Pediococcus acidilactici* modulates both localised intestinal- and peripheral-immunity in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 35, n. 4, p. 1097-1104, 2013.

SUBASINGHE, R. P. Epidemiological approach to aquatic animal health management: opportunities and challenges for developing countries to increase aquatic production through aquaculture. **Preventive Veterinary**, v. 67, p. 117-124, 2005.

SUN, Y. Z., YANG, H. L., HUANG, K. P., YE, J. D., ZHANG, C. X. Application of autochthonous *Bacillus* bioencapsulated in copepod to grouper *Epinephelus coioides* larvae. **Aquaculture**, v. 392, p. 44-50, 2013.

SURESH, A. Tilapia Update 1999. **WORLD AQUACULTURE-BATON ROUGE-**, v. 31, n. 4, p. 16-19, 2000.

TUNG, M.; CHEN, S.; TSAI, S. General septicemia of streptococcal infection in cage-cultured tilapia, *Tilapia mossambica*, in southern Taiwan. **COA Fisheries Series**, n. 4, p. 95-105, 1985.

VIEIRA, F. D., PEDROTTI, F. S., BUGLIONE NETO, C. C., MOURIÑO, J. L. P., BELTRAME, E., MARTINS, M. L., RAMIREZ, C., ARANA, L. A. V. Lactic-acid bacteria increase the survival of marine shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after infection with *Vibrio harveyi*. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 55, n. 4, p. 251-255, 2007.

VIEIRA, F. D. N., NETO, C. C. B., MOURIÑO, J. L. P., JATOBÁ, A., RAMIREZ, C., MARTINS, M. L., BARRACCO, M. A. A. M., VINATEA, L. A. Time-related action of *Lactobacillus plantarum* in the bacterial microbiota of shrimp digestive tract and its action as immunostimulant. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 43, n. 6, p. 763-769, 2008.

WANG, N., YANG, Z., ZANG, M. F., LIU, Y. J., LU, C. P. Identification of Omp 38 by immunoproteomic analysis and evaluation as a potential vaccine antigen against *Aeromonas hydrophila* in Chinese breams. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 34, n. 1, p. 74-81, 2013.

WU, S. New bacterial disease of tilapia. **Fish Culture Bulletin**, v. 23, p. 3-40, 1970.

WU, Y. R., GONG, Q. F., FANG, H., LIANG, W. W., CHEN, M., HE, R. J. Effect of *Sophora flavescens* on non-specific immune response of tilapia (GIFT *Oreochromis niloticus*) and disease resistance against *Streptococcus agalactiae*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 34, n. 1, p. 220-227, 2013.

ANEXO 1

Identificação Molecular da cepa utilizada na infecção experimental e do reisolado. Amostra: *S. agalactiae*.



Consultoria e Medicinas Veterinárias em Aquicultura

LAUDO Nº 0209

Data: 05/12/2014

Propriedade: UFSC

Requisitante : Dr. José Luis Pedreira Mourião.

IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADO BACTERIANO A PARTIR DE SEQUENCIAMENTO DE DNA.

MATERIAL: 1 (um) isolado bacteriano em meio sólido.

IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS: *S. agalactiae*

MÉTODO: Inoculação dos isolados em meio líquido (BHI) que após o crescimento foram semeados em meio sólido (BHI) para teste de Gram e verificação da pureza das colônias. Foi preparada reação de PCR e após a verificação das bandas em gel agarose o DNA foi purificado utilizando o reagente BigDye[®] Terminator v3.1. A sequência de nucleotídeos em formato FASTA foi submetida à base de dados BLAST/NCBI.

RESULTADOS

Amostra: *S. agalactiae*

Sequência FASTA

```
CGGGGGGGGGTGTATACATGCAAGTAGAACGCTGAGGTTTGGTGTTCACACTAGACTGATGAGT
TGCGAACGGGTGAGTAACGCGTAGGTAACCTGCCTCATAGCGGGGGATAACTATTGAAAACGATAG
CTAATACCGCATAAGAGTAATTAACACATGTTAGTTATTTAAAGGAGCAATTGCTCACTGTGAGAT
GGACCTGCGTTGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGCTCACCAGGCGACGATACAAAGCCGACC
TGAGAGGGTGATCGCCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGACAGTAG
GGAATCTTCGGCAATGGACGGAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAAGGTTTTCGGAT
CGTAAAGCTCTGTTGTAGAGAAGAACGTTGGTAGGAGTGGAAAATCTACCAAGTGACGGTAACTA
ACCAGAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGTCCCGAGCGTTGTCCG
GATTTATTTGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTCTTTAAGTCTGAAGTTAAAGGCAGTGGCTTAACC
ATTGTACGCTTTGAAAACCTGGAGGACTTGAGTGCAGAACGGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGG
TGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCGGTGGCGAAAAGCGGCTCTCTGGTCTGTAACGACGCT
GATGCTCGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAG
TGCTAGGTGTTAGGCCCTTTCTGGGCTTAGTGCCGACGTAACGCATAAGCACTCCGCCCTGGTGA
GTACGAAACGACGTTGATACTCAAAGGGAATTGGACTGAGGCCGCCACAGCGTGATCATGTGATTT
AATTGAAAGCAACGCCGAAGAAAACT
```




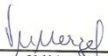

Ana Paula de Araujo
CRMV-SP 09714

Em caso de dúvidas, reclamações, sugestões ou para maiores esclarecimentos, favor entrar em contato pelo telefone (11) 5041-2116 ou pelo endereço de e-mail acquapiscis@acquapiscis.com.br

Rua Vieira de Moraes 1201, Campo Belo, São Paulo, SP
e-mail: acquapiscis@acquapiscis.com.br
Tel: 11-9-92914143 / 5041-2116.

ANEXO 2

Identificação Molecular da cepa probiótica *Lactobacillus plantarum* utilizada no experimento.

 UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS RELATÓRIO TÉCNICO		 CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS Edição/Revisão: 2/2
FMQ-07 Emissão: CQT		
NÚMERO PROCESSO: CPQBA 227-08 DRM		PÁGINA: 1 de 5
1 – DADOS CADASTRAIS DA EMPRESA SOLICITANTE		
RAZÃO SOCIAL: Universidade Federal de Santa Catarina		
ENDEREÇO: Beco dos Coroaos, (Fundos) LCM		
CIDADE: Florianópolis		UF: SC CEP: 88062-601
CNPJ/CPF: Projeto FAPEU 100/2008		INSCRIÇÃO ESTADUAL:
2 – DADOS DAS AMOSTRAS		
IDENTIFICAÇÃO DO PRODUTO: CPQBA 228-08 DRM: uma placa contendo bactéria crescida em meio de cultura. (Cepa 1)		No.CPS: 124/08
TOTAL DE AMOSTRAS: 01		LOCAL DE PRODUÇÃO:
LOTE:		VALIDADE:
3 – ENSAIOS		
ENSAIOS REALIZADOS: Identificação de Bactéria por Taxonomia Molecular		
NÚMERO DOS PROCEDIMENTOS (E/R)		
PTMDRM-05 (0200)		
4 – EXECUÇÃO DOS ENSAIOS		
DIVISÃO de Recursos Microbianos CPQBA – UNICAMP AV. Alexandre Caztelato, 999 - Vila Betel – Paulínia – SP - CEP: 13140-000		
RESPONSÁVEL PELO ENSAIO: Fabiana Fantinatti Garboggini		
DATA DO RECEBIMENTO DA AMOSTRA: 28/08/2008		
PERÍODO REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS		DE: 28/08/2008 A 11/09/2008
DATA DE EMISSÃO DO RELATÓRIO 12/09/2008		
CPQBA - UNICAMP, 12/09/2008		
 Fabiana Fantinatti Garboggini RESPONSÁVEL PELO ENSAIO		 Valéria Mária Merzel COORDENADOR DA DIVISÃO
 Ana Maria Frattini Fileti DIRETOR DO CPQBA		
Os resultados e conclusões deste relatório se restringem exclusivamente às condições de ensaio e produtos analisados, sendo vetado sua utilização parcial para qualquer fim. O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es) e não representam opinião do produto ou empresa sob qualquer forma.		
FONE: (19) 3884 7500		FAX: (19) 3884 7811
e-mail: cempesq@cpqba.unicamp.br		



FMQ-07
Emissão: CQT

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS
QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS

RELATÓRIO TÉCNICO



CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS
QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS
Edição/Revisão: 2/2

NÚMERO PROCESSO: CPQBA 227-08 DRM

PÁGINA: 2 de 5

Identificação de Bactérias

Objetivos

- Identificação de linhagem bacteriana utilizando dados moleculares de seqüenciamento e análise filogenética de fragmentos do gene RNA ribossomal 16S.

Metodologia utilizada

- **Amplificação do gene RNA ribossomal 16S.** A metodologia consistiu na amplificação do gene do RNA ribossomal 16S pela metodologia de PCR, utilizando como molde o DNA genômico extraído diretamente da amostra. Os *primers* (oligonucleotídeos sintéticos) utilizados para a reação de PCR foram p27f e p1401r, homólogos às extremidades conservadas do gene RNA ribossomal 16S de bactérias.
- **Seqüenciamento.** Os fragmentos de DNAr 16S amplificados foram a seguir purificados e submetidos diretamente ao seqüenciamento em seqüenciador automático MegaBACE 1000 (GE Healthcare). Os *primers* utilizados para o seqüenciamento foram p10f, 765f, 782r e p1100r.
- **Análise filogenética.** As seqüências parciais do gene RNA ribossomal 16S obtidas com os diferentes *primers* foram montadas em um *contig* (seqüência única combinando os diferentes fragmentos obtidos), o qual foi comparado com as seqüências de organismos representados nas bases de dados do Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e do RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/>). Foram então selecionadas seqüências de organismos relacionados ao organismo desconhecido para realização das análises filogenéticas. As seqüências foram alinhadas utilizando o programa CLUSTAL X (Thompson et al., 1997) e as análises filogenéticas foram conduzidas utilizando o programa MEGA versão 2.0 (Kumar et al., 2001). A matriz de distância evolutiva foi calculada com o modelo de Kimura (1980) e a construção da árvore filogenética a partir das distâncias evolutivas foi feita pelo método de *Neighbor-Joining* (Saitou & Nei, 1987), com valores de *bootstrap* calculados a partir de 1.000 re-amostragens, utilizando o software incluído no programa MEGA 2.0.

Resultados

- As colônias isoladas da amostra CPQBA 227-08 DRM obtidas em cultivo em meio sólido (MRS) apresentaram aspecto homogêneo, sem evidências de contaminação. A análise microscópica revelou a presença de bastonetes com coloração Gram positiva para a amostra CPQBA 227-08 DRM.
- Fragmentos do gene RNA ribossomal 16S foram amplificados com sucesso a partir do DNA genômico extraído da amostra. O material foi purificado em coluna (*GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*, GE Healthcare) e submetido ao seqüenciamento no sistema MegaBACE (GE Healthcare).

Os resultados e conclusões deste relatório se restringem exclusivamente às condições de ensaio e produtos analisados, sendo vetado sua utilização parcial para qualquer fim. O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es) e não representam opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem. O nome do CPQBA/UNICAMP não pode ser utilizado para divulgação ou publicidade do produto ou empresa sob qualquer forma.

FONE: (19) 3884 7500

FAX: (19) 3884 7811

e-mail: cenpesq@cpqba.unicamp.br



UNICAMP
FMQ-07
Emissão: COT

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS
QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS

RELATÓRIO TÉCNICO



CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS
QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS

Edição/Revisão: 2/2

NÚMERO PROCESSO: CPQBA 227-08 DRM

PÁGINA: 3 de 5

- A seqüência parcial do gene RNA ribossomal 16S obtida para a amostra **CPQBA 227-08 DRM** está apresentada no Anexo I. A árvore filogenética construída a partir das seqüências recuperadas da base de dados do GenBank e da amostra **CPQBA 227-08 DRM** está apresentada na Figura 1.
- O resultado de identificação é apresentado a seguir.

Amostra	Descrição do Serviço/Amostra	Identificação
CPQBA 227-08 DRM	Placa com crescimento bacteriano (Cepa 01) 9	<i>Lactobacillus plantarum</i> , Orla-Jensen 1919.

Comentários

- A seqüência parcial do gene RNA ribossomal 16S da amostra **CPQBA 227-08 DRM** apresentou 98% de similaridade com as seqüências do gene RNA ribossomal 16S de espécies de *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus* e *L. paraplantarum*, assim como com seqüências do gene RNA ribossomal 16S de linhagens de *Lactobacillus* sp. não identificadas contidas nas bases de dados consultadas.

A análise filogenética (Figura 1) recuperou as amostras **CPQBA 227-08 DRM** em um agrupamento coeso e com o valor de *bootstrap* (teste de confiança) de 79% com a linhagem tipo de *Lactobacillus plantarum*, confirmando os resultados de busca nas bases de dados.

Referências Bibliográficas



- Kimura, M. (1980) A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I. B., Nei, M. (2001) MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA. *Bioinformatics* 17: 1244-1245.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & D. G. Higgins. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 24:4876-4882.

Os resultados e conclusões deste relatório se restringem exclusivamente às condições de ensaio e produtos analisados, sendo vetado sua utilização parcial para qualquer fim. O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es) e não representam opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem. O nome do CPQBA/UNICAMP não pode ser utilizado para divulgação ou publicidade do produto ou empresa sob qualquer forma.

PHONE: (19) 3884 7500

FAX: (19) 3884 7811

e-mail: cenpesq@cpqba.unicamp.br

 UNICAMP FMQ-07 Emissão: CQT	UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS	 CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS Edição/Revisão: 2/2
	RELATÓRIO TÉCNICO	
NÚMERO PROCESSO: CPQBA 227-08 DRM		PÁGINA: 4 de 5

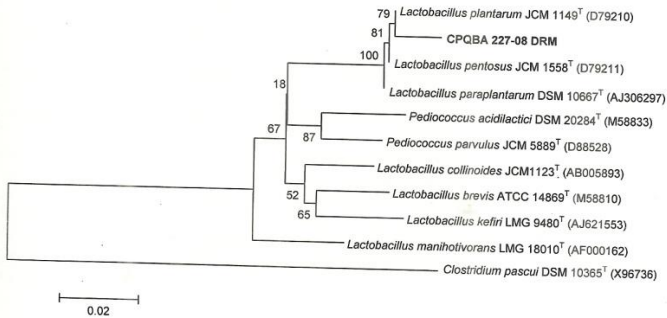


Figura 1. Árvore filogenética demonstrando as relações evolutivas entre a amostra CPQBA 227-08 DRM e linhagens de microrganismos relacionados com base em seqüências do gene RNA ribossomal 16S.

Os resultados e conclusões deste relatório se restringem exclusivamente às condições de ensaio e produtos analisados, sendo vetado sua utilização parcial para qualquer fim. O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es) e não representam opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem. O nome do CPQBA/UNICAMP não pode ser utilizado para divulgação ou publicidade do produto ou empresa sob qualquer forma.

FONE: (19) 3884 7500

FAX: (19) 3884 7811

e-mail: cenpesq@cpqba.unicamp.br



UNICAMP
FMQ-07
Emissão: CQT

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS
QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS

RELATÓRIO TÉCNICO



CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS
QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS

Edição/Revisão: 2/2

NÚMERO PROCESSO: CPQBA 227-08 DRM

PÁGINA: 5 de 5

Anexo I. Sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S da amostra analisada.

```
>CPQBA 227-08 DRM
GGGATAACACCTGGAAAAGATGCTAATACCGCATAACAACCTTGGACCGCATGGTCCGAG
CTTGAAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTGGATGGTCCCGCGCGTATTAGCTAGATGTT
GGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGTTAATCGGCCACAT
TGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTTTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATG
GACGAAAAGTCTGATGGGCAACCGCCGCTGAGTGAAGAAGGTTTCGGCTCGTAAAATC
TGTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACGTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAG
AAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACTAGTGGCAAGCGTTGTCC
GGATTATTTGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTAACTCTGATGTGAAAGCCTTCG
GCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAACTGGGAACTTGAATGCAGAAGAGGACAGTGGAA
CTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCACTGGCGAAGCGGCT
GTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAACAGGATTAGATACC
CTGCCCTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGC
TGCAGCTAACGCATTAAAGCATTCGCCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAG
GAAGTGACGGGGGCGCGACAAGCGGTGGAGCATGTGCCTCAATTCGAAGCTACCGGAAG
AACCTTACCAGGTTTGAC
```

Os resultados e conclusões deste relatório se restringem exclusivamente às condições de ensaio e produtos analisados, sendo vetado sua utilização parcial para qualquer fim. O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es) e não representam opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem. O nome do CPQBA/UNICAMP não pode ser utilizado para divulgação ou publicidade do produto ou empresa sob qualquer forma.

FONE: (19) 3884 7500

FAX: (19) 3884 7811

e-mail: cenpesq@cpqba.unicamp.br

ANEXO 3

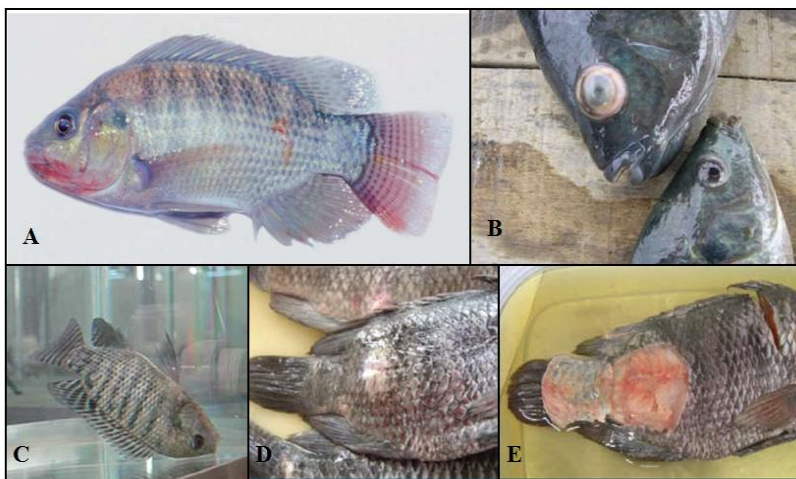


Figura 11: Sinais clínicos de estreptococose em tilápias.

Em A: Tilápia do Nilo infectada com *Streptococcus* sp demonstrando hemorragias na superfície do corpo. Disponível em:(CONROY, 2001).

Em B, C, D e E: Tilápias do Nilo infectadas por *Streptococcus agalactiae* apresentando exoftalmia em comparação com animal normal; perda de equilíbrio; lesão modular na musculatura com aumento de volume; e lesão muscular após abertura com necrose do músculo e acúmulo de secreção semelhante ao pus, respectivamente. Disponível em: (Figueiredo, 2007a).



Figura 12: Bioensaio I do Laboratório de Sanidade de Organismos Aquáticos (AQUS/UFSC).



Figura 13: Infecção experimental com *Streptococcus agalactiae* em tilápias, via gavagem.



Figura 14: Coleta de sangue por punção do vaso caudal.

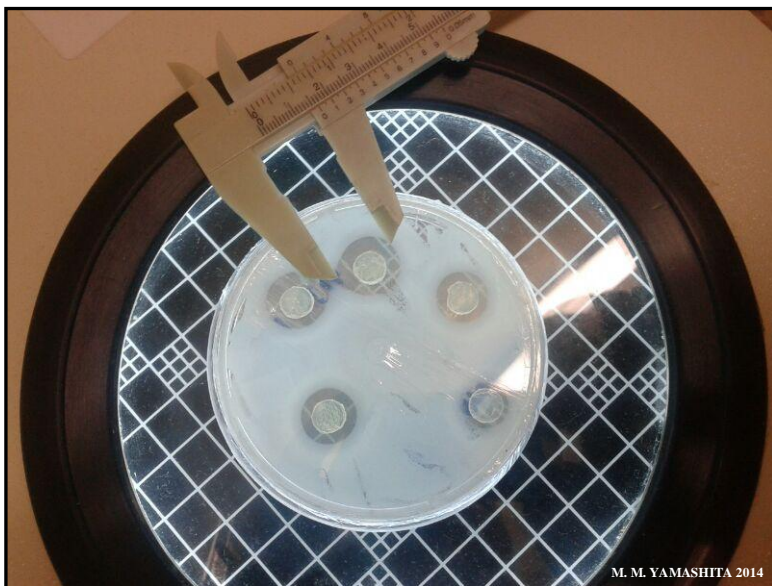


Figura 15: Antagonismo entre *L. plantarum* e *S. agalactiae*; medição dos halos de inibição formados ao redor dos discos da cepa probiótica.