

ISOLAMENTO DE *Streptococcus agalactiae* EM DIFERENTES ÓRGÃOS DE TILÁPIAS DO NILO (*Oreochromis niloticus*) CRIADAS EM TANQUES-REDE

ISOLATION OF *Streptococcus agalactiae* IN DIFFERENT ORGANS OF NILE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) REARED IN NET CAGES

Paulo Fernandes MARCUSO¹; Silas Fernandes ETO¹; Gustavo da Silva CLAUDIANO¹; Flávia Campos Freitas VIEIRA²; Rogério SALVADOR³; Julieta Rodini Engrácia de MORAES¹; Flávio Ruas de MORAES¹

1. Departamento de Patologia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil. paulomarcusso@gmail.com; 2. Departamento de Tecnologia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil; 3. Departamento de Patologia Geral, Campus Luiz Meneghel, Universidade Estadual do Norte do Paraná – UENP, Bandeirantes, PR, Brasil.

RESUMO: A estreptococose é uma das principais causas de mortalidade na criação de tilápias no Brasil, causando grandes perdas econômicas. Assim, o estudo objetivou determinar a frequência de isolamento e identificação por PCR de *Streptococcus agalactiae* em diferentes órgãos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) naturalmente infectadas, oriundas de oito pisciculturas da região norte do estado do Paraná que apresentavam sinais clínicos característicos de infecção estreptocócica. Para tanto, coletaram-se amostras de sangue e fragmentos de rim, fígado, baço, coração e encéfalo. Essas foram semeadas em meio ágar infusão de cérebro e coração (BHI) adicionado 5% de sangue de ovino e incubados à 29°C, durante 7 dias em aerofilia. Após o crescimento bacteriano e a partir das características macro e microscópicas, foram selecionadas colônias compatíveis com as do gênero *Streptococcus* sp.. As espécies foram identificadas através de PCR e confirmadas por meio do sequenciamento do gene 16S rDNA. Os resultados demonstraram que em tilápias do Nilo infectadas com *S. agalactiae*, o isolamento é mais frequente em encéfalo, rim e fígado em ordem decrescente.

PALAVRAS-CHAVE: Estreptococose. *Oreochromis niloticus*. Bacteriose. Teleósteos.

INTRODUÇÃO

As bacterioses são uma das principais causas de perdas econômicas na criação de tilápias, com destaque para os gêneros *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Flavobacterium*, *Edwardsiella*, *Streptococcus* e *Enterococcus* (MORAES; MARTINS, 2004). Estas bactérias podem ser encontradas em diferentes órgãos de peixes sadios (CAI et al., 2004; LIM; WEBSTER, 2006).

Entre as espécies de *Streptococcus* que acometem os teleósteos, destaca-se *Streptococcus agalactiae*. No Brasil é responsável por altas taxas de morbidade e mortalidade em diferentes sistemas de criação, principalmente em tilápia do Nilo (SALVADOR et al., 2003; 2005; 2012). Os sinais clínicos incluem anorexia, escurecimento da pele, natação errática, letargia, curvatura do corpo, exoftalmia e opacidade de córnea uni ou bilateral, sufusões no opérculo e base das nadadeiras, ulceração da epiderme e morte (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). As lesões internas são caracterizadas por congestão brânquial, hepatomegalia acompanhada de congestão, ascite, esplenomegalia e encefalomalácia (SALVADOR et

al., 2003; 2005; FIGUEIREDO et al., 2006; PRETTO-GIORDANO et al., 2010).

A severidade da doença em tilápias está relacionada a fatores como a estirpe do *S. agalactiae*, dose infectante, temperatura da água, biomassa e manejo zootécnico (CHANG; PLUMB, 1996). A principal via de transmissão é a horizontal pelo contato com peixes e/ou alimentos contaminados, como também pelo contato indireto mediado pela água dos sistemas de criação (LIM; WEBSTER, 2006).

A fim de se obter maior precisão na identificação de *S. agalactiae*, podem-se utilizar técnicas de biologia molecular que permitam relacionar os resultados dos testes fenotípicos e genotípicos (LANGE et al., 2011). Uma dessas técnicas é o sequenciamento do gene do RNA ribossomal 16S, amplamente utilizado com finalidade taxonômica e filogenética e que consiste na análise comparativa da sequência de determinados genes de macromoléculas conservadas como o RNA ribossomal (BECKER et al., 2004). As sequências encontradas são comparadas com aquelas depositadas em bancos de dados, como o *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (LANGE et al., 2011).

O objetivo foi avaliar a frequência de isolamento de *S. agalactiae* identificados por PCR em diferentes órgãos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com sinais clínicos de infecção estreptocócica.

MATERIAL E MÉTODOS

Espécimes de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (n=39) criadas em tanques-rede, (250±10 g), com sinais clínicos de infecção estreptocócica, foram adquiridos de oito pisciculturas comerciais da região norte do estado do Paraná. Após anestesia em banho de solução de benzocaina (1:20.000), diluída em álcool etílico 98° (0,1 g/mL) (WEDEMEYER et al., 1969), foram coletadas amostras de sangue da veia caudal e os peixes submetidos à eutanásia por aprofundamento do plano anestésico, necropsiados e coletados fragmentos de rim, fígado, baço, coração e cérebro. Em seguida, estes foram semeados em meio sólido de infusão de cérebro e coração (BHI) adicionado 5% de sangue de ovino e incubados em estufa à 29°C, durante 7 dias, em aerofilia (SALVADOR et al., 2005).

Após o crescimento foram selecionadas colônias compatíveis com as do gênero *Streptococcus* a partir de suas características macroscópicas e microscópicas (cocos gram positivos) (KONEMAN et al., 2008) e essas foram confirmadas pela reação em cadeia de polimerase (PCR) convencional. Para a identificação das espécies do gênero *Streptococcus*, realizou-se a extração de DNA das colônias isoladas de acordo com Jafar et al. (2009). Quantificou-se o DNA em espectrofotômetro (Nanodrop ND-1000), as quantidades foram ajustadas para a reação de PCR (50-100 µg/µL) e o DNA armazenado à -20 °C até as reações de PCR.

O DNA genômico bacteriano foi submetido à amplificação por PCR com dois *primers* específicos para *S. agalactiae*, amplificando uma sequência específica do gene 16S rDNA (MARTINEZ et al., 2001). Foram utilizados os *primers*: F1 5'GAGTTTGATCATGGCTCAG 3' e IMOD 5'ACCAACATGTGTTAATTACTC 3', que amplificam um fragmento de 220 pb (pares de bases). As reações de PCR continham 1x Taq DNA polimerase *buffer*, DNA genômico, *primers* específicos (0,2 pM de cada *primer*), 100 pM de dNTP e 1,25 U de Taq DNA polimerase. As condições para a ciclagem foram: desnaturação inicial a 94 °C por 4 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento dos *primers* a 55 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 1 min. Após a reação, os fragmentos de DNA

amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose (1,5%, p/v), corados com solução de brometo de etídio (0,005%, p/v) e visualizados em fotodocumentador.

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os principais sinais clínicos observados foram letargia, diminuição do apetite, desvio de coluna vertebral, exoftalmia uni ou bilateral, distensão abdominal e natação errática e circular. Na necropsia foram observadas petéquias na pele, ascite aquosa de coloração amarelada, hepatomegalia leve, vesícula biliar repleta, esplenomegalia moderada, congestão renal, encefalomalácia e congestão cerebral (Figura 1).

Os sinais clínicos observados neste trabalho foram semelhantes nos peixes experimentalmente inoculados com *S. difficile* e *S. agalactiae* descritos na literatura (ELDAR et al., 1995; EVANS et al., 2002; EVANS et al., 2004) e em tilápias experimentalmente ou naturalmente infectadas por *S. iniae* e *S. agalactiae* (PERERA et al., 1994; EVANS et al., 2000; SHELBY et al., 2002; SALVADOR et al., 2005).

Apesar da patogenia e achados de necropsia provocada pela infecção por *S. agalactiae* em tilápias ainda não estar totalmente caracterizada, as alterações iniciais em peixes infectados naturalmente foram observadas pela associação da presença das colônias bacterianas e exotoxinas com as lesões do fígado, baço, rins e cérebro (CHEN et al., 2007; SUANYUK et al., 2008; ZAMRI-SAAD et al., 2010).

As bactérias causam necrose local, invadem e se multiplicam dentro de macrófagos que podem atuar como veículo do *S. agalactiae*, que invade a corrente sanguínea e o dissemina para vários órgãos, inclusive com transposição da barreira hematoencefálica, com características de septicemia (ELDAR et al., 1994; EVANS et al., 2001; NGUYEN et al., 2001; EVANS et al., 2002; MUSA et al., 2009). A partir de amplificação por PCR, os amplicons do fragmento 16S rDNA, das amostras indicaram que todos os peixes estavam positivos para a infecção por *S. agalactiae* (Tabela 1).

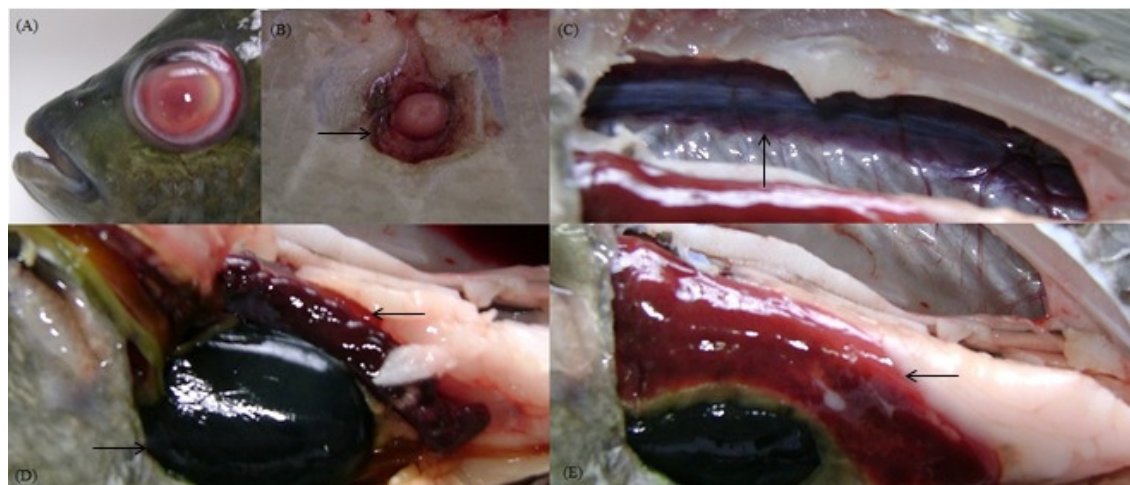


Figura 1. Exoftalmia hemorrágica (A); cérebro hiperêmico (B); rim congesto (C); vesícula biliar repleta e esplenomegalia (D) e hepatomegalia moderada (E).

Tabela 1. Proporção e percentual de isolamento do *Streptococcus agalactiae* nos diferentes órgãos

Órgão	Proporção	Percentual	Amostras	Isolamentos
Encéfalo	0,744	74,4	39	29
Rim	0,410	41,0	39	16
Fígado	0,333	33,3	39	13
Baço	0,154	15,4	39	6
Coração	0,026	2,6	39	1
Sangue	0,026	2,6	39	1

A maior frequência de isolamento foi no encéfalo (74,4%), fato que demonstra a necessidade de pesquisa do agente neste órgão quando há suspeita de estreptococose e sinais neurológicos decorrentes de meningoencefalite. Os resultados corroborando com estudos epidemiológicos que apontam o *Streptococcus agalactiae* como sendo o principal agente etiológico meningoencefalite em teleósteos (ELDAR et al., 1994; EVANS et al., 2006).

No rim e fígado a frequência de isolamento também foi significativa e da ordem de 41,0% e 33,3%, respectivamente, ficando clara a necessidade da pesquisa bacteriana também nestes órgãos, que se apresentaram macroscopicamente aumentados de volume e com retenção sanguínea. Segundo Zamri-Saad et al. (2010), o fígado de tilápias infectadas por *S. agalactiae*, fica congesto, com necrose focal, o rim também congesto, com hemorragia e nefrite intersticiais.

Ainda que os baços dos animais apresentassem congestão, sua função como filtro que faz a depuração de bactérias da corrente sanguínea e produção de anticorpos, parece não estar comprometida, pois o isolamento do *S. agalactiae* ocorreu em 15,4% e do sangue em 2,6% dos casos, semelhantes aos encontrados por Salvador et al. (2005) em tilápias oriundas da mesma região.

A severidade da doença em teleósteos está relacionada a fatores como: a estirpe da bactéria, dose infectante, temperatura da água, biomassa e manejo zootécnico (CHANG; PLUMB, 1996; OBA et al., 2009), nas quais condições de alto adensamento e baixa qualidade da água causam diminuição da resistência a patógenos (EVANS et al., 2002), fato observado em algumas pisciculturas estudadas no trabalho.

Estudos epidemiológicos identificaram a presença de treze biótipos diferentes de *S. agalactiae* isolados em teleósteos de diferentes

regiões do mundo (OLIVARES-FUSTER et al., 2008). No estado do Paraná foi isolado dois biótipos de *S. agalactiae* em tilápia (SALVADOR et al., 2005; OLIVARES-FUSTER et al., 2008), confirmando os resultados encontrados neste trabalho.

CONCLUSÃO

Em tilápias do Nilo infectadas com *S. agalactiae* o isolamento é mais frequente no encéfalo, rim e fígado em ordem decrescente. Recomendando-se pesquisas bacteriológicas nestes órgãos.

ABSTRACT: Streptococcosis is one of the major causes of mortality in tilapia's creation in Brazil, inducing great economic losses. As soon, the study objectived to determinate the frequency of isolation and identification the *Streptococcus agalactiae* in organs different of *Oreochromis niloticus* naturally infected, derived from eight fish farms in the northern region of the state of Paraná, that presented clinical signs characteristics of streptococcal disease. However, blood samples and fragments (kidney, liver, spleen, heart and brain) were collected. These all samples were plated on solid medium of brain and heart infusion (BHI) added 5% ovine blood and incubated at 29°C for 7 days in aerophilic conditions. Behind, the bacterial growth and from the macro and microscopic features, colonies compatibles with *Streptococcus* sp. gender, were selected. The species were identified by PCR reaction and confirmed by sequencing of 16S rDNA gene. The results exhibited that in tilapia of Nile infected with *S. agalactiae* the isolation is more common in brain, kidney and liver in descending order.

KEYWORDS: Streptococcosis. *Oreochromis niloticus*. Bacteriosis. Teleosts

REFERÊNCIAS

- BECKER, K.; HARMSSEN, D.; MELLMANN, A.; MEIER, C.; SCHUMANN, P.; PETERS, G.; VON EIFF, C. Development and evaluation of a quality controlled ribosomal sequence database for 16S ribosomal DNA based identification of *Staphylococcus* species. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 11, p. 4988-4995, 2004. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.42.11.4988-4995.2004>
- CAI, W.; LI, S.; MA, J. Diseases resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), blue tilapia (*Oreochromis aureus*) and their hybrid (female Nile tilapia male blue tilapia) to *Aeromonas sobria*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 229, n. 1- 4, p. 79-87, 2004.
- CHANG, P. H.; PLUMB, J. A. Effects of salinity on *Streptococcus* infection of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Journal of Applied Aquaculture**, Binghamton, v. 6, n. 1, p. 39-45, 1996. http://dx.doi.org/10.1300/J028v06n01_04
- CHEN, C. Y.; CHAO, C. B.; BOWSER, P. R. Comparative histopathology of *Streptococcus iniae* and *Streptococcus agalactiae* infected tilapia. **Bulletin of the European Association of Fish Pathologists**, Aberdeen, v. 27, n. 1, p. 2-9, 2007.
- ELDAR, A.; BEJERANO, Y.; BERCOVIER, H. *Streptococcus shiloi* and *Streptococcus difficile*: two new streptococcal species causing a meningoencephalitis in fish. **Current Microbiology**, New York, v. 28, n. 3, p. 139-143, 1994. <http://dx.doi.org/10.1007/BF01571054>
- ELDAR, A.; BEJERANO, Y.; LIVOFF, A.; HOROVITCZ, A.; BERCOVIER, H. Experimental streptococcal meningo-encephalitis in cultured fish. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 43, n. 1, p. 33-40, 1995. [http://dx.doi.org/10.1016/0378-1135\(94\)00052-X](http://dx.doi.org/10.1016/0378-1135(94)00052-X)
- EVANS, J. J.; SHOEMAKER, C. A.; KLESIOUS, P. H. Experimental *Streptococcus iniae* infection of hybridstriped bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*) by naresinoculation. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 189, n. 3/4, p. 197-210, 2000. [http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00376-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00376-8)

- EVANS, J. J.; SHOEMAKER, C. A.; KLESIUS, P. H. Distribution of *Streptococcus iniae* in hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*) following nare inoculation. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 194, n. 3/4, p. 233-243, 2001. [http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00522-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00522-6)
- 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 b-hemolytic group B *Streptococcus agalactiae* in cultured sea bream, *Sparus auratus* L., and wild mullet, *Liza klunzingeri*, in Kuwait. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 25, n. 9, p. 505–513, 2002. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2761.2002.00392.x>
- EVANS, J. J.; WIEDENMAYER, A. A.; KLESIUS, P. H.; SHOEMAKER, C. A. Survival of *Streptococcus agalactiae* from frozen fish following natural and experimental infections. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 233, n. 1/4, p. 15–21, 2004. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.09.024>
- EVANS, J. J.; KLESIUS, P. H.; SHOEMAKER, C. A. An overview of *Streptococcus* in warm-water fish. **Aquaculture Health International**, Manukau, v. 7, n.1, p. 10-14, 2006.
- FIGUEIREDO, H. C. P.; CARNEIRO, D. O.; FARIA, F. C.; COSTA, G. M. *Streptococcus agalactiae* associado à meningoencefalite e infecção sistêmica em tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 4, p. 678-680, 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352006000400036>
- JAFAR, Q. A.; SAMEER, A. Z.; SALWA, A. M.; SAMEE, A. A.; AHMED, A. M.; FAISAL, A. S. Molecular investigation of *Streptococcus agalactiae* isolates from environmental samples and fish specimens during a massive fish kill in Kuwait Bay, **African Journal of Microbiology Research**, Pietermaritzburg, v. 3, n. 1, p. 22-26, 2009.
- KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JUNIOR, W. C.; PROCOP, G.; WOODS, G. **Color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. 6. ed., Philadelphia: J. B. Lippincott, 2008. 1565p.
- LANGE, C. C.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; ARCURI, E. F.; SOUZA, G. N.; MACHADO, M. A.; DOMINGUES, R.; SALIMENA, P. S. Uso de PCR e sequenciamento do rDNA 16S para identificação de bactérias do gênero *Staphylococcus* isoladas de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 1, p. 36-40, 2011.
- LIM, C.; WEBSTER, C. D. **Tilápia: biology, culture and nutrition**. New York: Haworth Press, 2006. 678 p.
- MARTINEZ G.; HAREL J.; GOTTSCHALK M. Specific detection by PCR of *Streptococcus agalactiae* in milk. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 65, n. 1, p. 68-72, 2001.
- MORAES, F. R.; MARTINS, M. L. Condições predisponentes e principais enfermidades de teleósteos em piscicultura intensiva. In: CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSI, D. M.; CASTAGNOLLI, N. (Eds.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. 1. ed., São Paulo: Editora TecArt, 2004. Cap. 12, p. 343-386.
- MUSA, N.; WEI, L. S.; MUSA, N.; HAMDAN, R. H.; LEONG, L. K.; WEE, W.; AMAL, M. N.; KUTTY, B. M.; ABDULLAH, S. Z. Streptococcosis in red hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*) commercial farms in Malaysia. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 40, n. 5, p. 630-632, 2009. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.02142.x>
- NGUYEN, H. T.; KANAI, K.; YOSHIKOSHI, K. Immunohistochemical examination of experimental *Streptococcus iniae* infection in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. **Fish Pathology**, Nagasaki, v. 36, n. 3, p. 169-178, 2001.

OBA, E. T.; MARIANO, W. S.; SANTOS, L. R. B. Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para manejo. In: TAVARES-DIAS, M. (Org.) **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. Macapá: Embrapa Amapá, 2009. p. 226-247

OLIVARES-FUSTER, O.; KLESISUS, P. H.; ARIAS, C. R. Molecular typing of *Streptococcus agalactiae* isolates from fish. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 31, n. 4, p. 277-283, 2008. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2761.2007.00900.x>

PERERA, R. P.; COLLINS, M. D.; JOHNSON, S. K.; LEWIS, D. H. *Streptococcus iniae* associated with mortality of *Tilapia nilotica* x *T. aurea*. **Journal Aquatic Animal Health**, Bethesda, v. 6, n. 4, p. 335-340, 1994. [http://dx.doi.org/10.1577/1548-8667\(1994\)006<0335:SIAWMO>2.3.CO;2](http://dx.doi.org/10.1577/1548-8667(1994)006<0335:SIAWMO>2.3.CO;2)

PRETTO-GIORDANO, L. G.; MÜLLER, E. E.; FREITAS, J. C.; SILVA, V. G. Evaluation on the pathogenesis of *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 53, n. 1, p. 87-92, 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132010000100011>

SALVADOR, R.; MÜLLER, E. E.; FREITAS, J. C.; LEONHARDT, J. H.; PRETTO-GIORDANO, L. G.; DIAS, J. A.; MORENO, A. M. Isolation of *Streptococcus* spp from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and quality of water in hapas nets in north region of Parana state, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 1, p. 35-42, 2003. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782005000600023>

SALVADOR, R.; MÜLLER, E. E.; FREITAS, J. C.; LEONHARDT, J. H.; PRETTO-GIORDANO, L. G.; DIAS, J. A. Isolation and characterization of *Streptococcus* spp. group B in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in hapas nets and earth nurseries in the northern region of Parana State, Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 6, p. 1374-1378, 2005.

SALVADOR, R.; TOAZZA, C. S.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R. Inflammatory responses of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* to *Streptococcus agalactiae*: effects of vaccination and yeast diet supplement. **Diseases of Aquatic Organisms**, Oldendorf, v. 98, n. 3, p. 235-241, 2012.

SHELBY, R. A.; KLESISUS, P. H.; SHOEMAKER, C. A.; EVANS, J. J. Passive immunization of tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), with anti-*Streptococcus iniae* whole sera. **Journal of fish diseases**, Oxford, v. 25, n.1, p. 1-6, 2002.

SUANYUK, N.; KANGHEAR, H.; KHONGPRADIT, R.; SUPAMATTAYA, K. *Streptococcus agalactiae* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, Songkhla, v. 27, s. 1, p. 307-319, 2005.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5.ed., São Paulo: Atheneu, 2008. 718p.

WEDEMEYER, G.; ROSS, A.J.; SMITH, L. Some metabolic effects of bacterial endotoxin in salmonid fishes. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, Ottawa, v. 26, n. 1, p. 115 - 122. 1969. <http://dx.doi.org/10.1139/f69-010>

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**, Edinburg, v. 143, n. 2/3, p. 227-229, 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcpa.2010.01.020>