

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE M. FILHO” UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP - CAUNESP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

**PEPTIDEO BIOATIVO NO INCREMENTO DA SAÚDE DE TILAPIA-DO-
NILO E REDUÇÃO DA INFECÇÃO CAUSADA POR *LACTOCOCCUS*
PETAURI E *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE***

Me. Daiane Vaneci da Silva
Engenheira de Pesca

JABOTICABAL – SP
MARÇO, 2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE M. FILHO” UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP - CAUNESP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

**PEPTIDEO BIOATIVO NO INCREMENTO DA SAÚDE DE TILAPIA-DO-
NILO E REDUÇÃO DA INFECÇÃO CAUSADA POR *LACTOCOCCUS*
PETAURI E *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE***

Me. Daiane Vaneci da Silva

Orientadora: Dra. Fabiana Pilarski

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, do Centro de Aquicultura da Unesp - CAUNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Aquicultura.

JABOTICABAL – SP

MARÇO, 2024

D229p

Da Silva, Daiane Vaneci

Peptideo bioativo no incremento da saúde de tilapia-do-Nilo e redução da infecção causada por *Lactococcus petauri* e *Streptococcus agalactiae* / Daiane Vaneci Da Silva. -- Jaboticabal, 2025

94 p. : tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Centro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal

Orientadora: Fabiana Pilarski

1. Aquicultura. 2. *Oreochromis niloticus*. 3. Bactéria. 4. Infecção. 5. Peptídeos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Unidade Complementar - Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: **PEPTÍDEO BIOATIVO NO INCREMENTO DA SAÚDE DE TILÁPIA-DO-NILO E REDUÇÃO DA INFECÇÃO CAUSADA POR *LACTOCOCCUS PETAURI* E *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE***

AUTORA: DAIANE VANEKI DA SILVA

ORIENTADORA: FABIANA PILARSKI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Aquicultura, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. FABIANA PILARSKI (Participação Presencial)
Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos / Centro de Aquicultura da Unesp, CAUNESP, Jaboticabal-SP

Profa. Ass. Dra. MARGARIDA MARIA BARROS (Participação Presencial)
Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal / FMVZ, Unesp, Campus de Botucatu

Documento assinado digitalmente
gov.br MARITA VEDOVELLI CARDOZO
Data: 02/03/2024 09:51:11-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. MARITA VEDOVELLI CARDOZO (Participação Presencial)
Departamento de Ciências Biomédicas e Saúde / Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG)

Dr. PEDRO LUIZ PUCCI FIGUEIREDO DE CARVALHO (Participação Virtual)
Department of Ecology and Conservation Biology / Texas A&M University, College Station, Texas

Prof. Dr. ULISSES DE PÁDUA PEREIRA (Participação Virtual)
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva / Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina-SP

Jaboticabal, 01 de março de 2024

EPÍGRAFE

De tudo ficaram três coisas...

A certeza de que estamos começando.

A certeza de que é preciso continuar.

*A certeza de que podemos ser
interrompidos antes de terminar.*

Fernando Sabino

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo sublime dom da vida.

Agradeço imensamente aos meus pais Tereza e José Pedro, apoiadores incondicionais, por terem adotado para eles um sonho escolhido por mim, acreditando e me dando forças em momentos que pensei não conseguir. O amor, a paciência e empenho de vocês aumentam cada vez mais à certeza de que são o meu porto seguro e minha maior riqueza. Amo vocês imensamente.

As minhas irmãs Luiza e Talita pelos incentivos e alegrias compartilhadas.

Ao meu namorado Marcelo Hiromoto, pelo companheirismo e apoio incondicional na vida pessoal e acadêmica. Obrigada por segurar minha mão e viver os meus sonhos ao meu lado.

Agradeço imensamente a minha orientadora professora Dra. Fabiana Pilarski, que acreditou na minha capacidade, me recebendo de braços abertos, me ensinando com sabedoria, dedicação e generosidade.

Só tenho a agradecer e desejar muita luz e conquistas na sua vida.

Ao professor Dr. Dario Falcon por ter me orientado na graduação e me direcionado para a vida acadêmica, acreditando em mim e me incentivando buscar cada vez mais os meus sonhos. Agradeço pelos momentos de tempestade e calmaria, eles foram fundamentais para o meu crescimento. Sem eles, certamente o resultado seria outro.

Ao Professor Helio Montassie, pelo apoio e pelos ensinamentos valiosos que compartilhou comigo para a realização desse trabalho.

A Dede Loureiro Neto e Renato Freitas, estendendo minha sincera gratidão à INBRA Nutrição Animal pelo seu apoio inabalável e profunda crença no poder transformador da pesquisa. O legado de excelência e compromisso em fazer a diferença incorporado pela empresa continua a inspirar e capacitar indivíduos em todas as áreas de pesquisa. Essa dedicação inabalável à excelência e ao impacto positivo exemplifica os valores fundamentais que distinguem a INBRA Nutrição Animal como um farol de esperança e progresso nas áreas de educação brasileira.

A Cooperativa comigo pelo fornecimento da ração para o desenvolvimento da pesquisa, em especial a Wilson Marchesin pela disponibilidade, atenção e por fazer essa doação acontecer.

Aos amigos de longa data, Thiago Fernandes, Andressa Inocêncio, Evandro Bilha, Deise Falcão, Raul Sá, Andressa Tellechea, Bruno Verri, Evandro Moro, Thalys Cruz, Amom Nascimento e Rafael de Graaf por sempre estarem ao meu lado me apoiando e me incentivando.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos pelo auxílio nas análises da presente tese e de diversos outros trabalhos que executamos durante esse período do doutorado. Em especial a Elielma, Fernando, André, Daniel e Inácio que ajudaram muito neste trabalho. Obrigada pela amizade de todos vocês.

Aos funcionários do Caunesp Valdecir, Perereca (Márcio), Luiz e Donizete, e zeladoras Elaine, Lucia e Suerli, que contribuíram de forma direta e indireta em algumas etapas de desenvolvimento do trabalho e pela amizade ao longo do doutorado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

GRATIDÃO A TODOS VOCÊS!

SUMÁRIO

EPÍGRAFE	5
AGRADECIMENTOS.....	6
CAPITULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	11
RESUMO	12
ABSTRACT	13
1. Introdução.....	14
2. Revisão Bibliográfica	15
2.1. Doenças bacterianas em peixes	15
2.2. <i>Lactococcus petauri</i>.....	19
2.3. <i>Streptococcus agalactiae</i>	20
2.4. Tratamentos comumente utilizados como recurso terapêutico para doenças na piscicultura.....	21
2.5. Uso de peptídeos no tratamento de doenças de peixes	22
3. OBJETIVOS	24
3.1. Geral.....	24
3.2. Específicos.....	24
4. Referências Bibliográficas	25
CAPÍTULO 2 – SOBREVIVÊNCIA DE TILÁPIA-DO-NILO ALIMENTADAS COM DIETA SUPLEMENTADA COM PEPTÍDIO BIOATIVO E DESAFIADAS EXPERIMENTALMENTE COM <i>Streptococcus agalactiae</i>	33
SOBREVIVÊNCIA DE TILÁPIA-DO-NILO ALIMENTADAS COM DIETA SUPLEMENTADA COM PEPTÍDIO BIOATIVO E DESAFIADAS EXPERIMENTALMENTE COM <i>Streptococcus agalactiae</i>	34
RESUMO	34
ABSTRACT	35
1. Introdução.....	36
2. Material e Métodos.....	37
2.1. Comitê de ética	37
2.2. Peixes e condições experimentais	38
2.3. Delineamento experimental	38
2.4. Atividade respiratória dos leucócitos (Burst oxidativo), Atividade sérica da lisozima e Atividade hemolítica do sistema complemento (Via alternativa).....	39
2.4.1. Burst oxidativo	39
2.4.2. Lisozima	39

2.4.3. Atividade do sistema complemento	39
2.5. Perfil bioquímico	40
2.5.1. Concentração plasmática de glicose.....	40
2.5.2. Proteínas totais, Albumina, Globulina e Relação Albumina x Globulina.....	40
2.6. Desafio bacteriano com <i>S. agalactiae</i>	40
2.7. Persistência bacteriana	41
2.8. Análise estatística	41
3. Resultados	42
3.1. Atividade respiratória dos leucócitos (Burst oxidativo)	42
3.2. Atividade Lisozima.....	42
3.3. Atividade do sistema complemento.....	43
3.4. Glicose	45
3.5. Proteínas totais, Albumina, Globulina e Relação Albumina x Globulina.....	45
3.6. Análise histopatológica	46
3.7. Sobrevivência após desafio bacteriano com <i>S. agalactiae</i>	51
3.8. Persistência bacteriana	53
4. Discussão	54
5. Conclusão	60
6. Referências Bibliográficas	60
CAPITULO 3 – PATHOGENICITY OF <i>LACTOCOCCUS GARVIEAE</i> FOR NILE TILAPIA AND THERAPEUTIC EFFICACY OF BIOACTIVE PEPTIDE AGAINST THE PATHOGEN.....	67
PATHOGENICITY OF <i>LACTOCOCCUS GARVIEAE</i> FOR NILE TILAPIA AND THERAPEUTIC EFFICACY OF BIOACTIVE PEPTIDE AGAINST THE PATHOGEN	68
ABSTRACT	68
1. Introduction	69
2. Materials and Methods	71
2.1. Ethics Committee	71
2.2. Fish Sample.....	71
2.3. Microbiological Analysis.....	72
2.4. Polymerase Chain Reaction (PCR).....	72
2.5. Scanning Electron Microscopy (SEM)	72
2.6. Bacterial Pathogenicity	73
2.6.1. Inoculum preparation for bacterial challenge	73
2.6.2. Experimental infection with <i>Lactococcus garvieae</i> (Koch's Postulates).....	73
2.6.3. Histopathological Analysis	74

2.7. Therapeutic efficacy of the bioactive peptide against <i>L. garvieae</i>	74
2.8. Statistical Analysis	75
3. Results	75
3.1. Bacterial isolation and identification: Microbiological analysis, PCR, and scanning electron microscopy (SEM)	75
3.2. Pathogenicity	77
3.3. Histopathological Analysis	79
3.4. Therapeutic efficacy of the bioactive peptide against lactococcosis	80
4. Discussion.....	83
5. Bibliographic Reference	86
CAPITULO 4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS	92

CAPITULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

RESUMO

Este estudo investigou a virulência de *Lactococcus petauri* (*L. petauri*) para a tilápia-do-Nilo e explorou possíveis opções de tratamento para lactococose como os peptídeos bioativos e os efeitos da suplementação dietética nos parâmetros imunológicos e na mortalidade pós-desafio bacteriano. No objetivo inicial, doses variadas de *L. petauri* foram administradas em tilápias saudáveis, resultando em manifestações patológicas graves, indicativas da alta virulência do patógeno. Posteriormente, foram estabelecidos seis grupos experimentais para avaliar a eficácia de diferentes tratamentos, às tilápias inoculadas com *L. petauri*. O tratamento com peptídeo bioativo e florfenicol melhorou significativamente as taxas de sobrevivência dos peixes em comparação com os grupos não tratados. A análise de persistência bacteriana revelou a eliminação de *L. petauri* nos grupos tratados com o peptídeo. No terceiro objetivo, as tilápias foram alimentadas com dietas experimentais contendo doses variadas de peptídeo bioativo (PB) durante 90 dias, seguida de avaliação imunológica e desafio bacteriano com *Streptococcus agalactiae* (*S. agalactiae*). Melhorias significativas na atividade respiratória dos leucócitos, atividade da lisozima e eficiência da via do complemento foram observadas nos grupos suplementados com o peptídeo. Além disso, após a suplementação alimentar, os níveis de glicose no sangue diminuíram enquanto os níveis de proteína total e albumina aumentaram. A histopatologia hepática mostrou alterações moderadas pós-suplementação e desafio. Análises comportamentais indicaram comportamentos pré e pós-desafio distintos, com mortalidade em todos os grupos suplementados pós-desafio bacteriano, embora com taxas de sobrevivência variadas. Notavelmente, a análise de persistência bacteriana identificou a presença de *S. agalactiae* exclusivamente no grupo controle positivo (desafiado e sem tratamento), ressaltando sua susceptibilidade à colonização bacteriana. Os resultados deste estudo demonstraram a eficácia do peptídeo bioativo no controle e eliminação de *L. petauri* na tilápia-do-Nilo, bem como o impacto positivo da suplementação dietética nas respostas imunológicas e nas taxas de mortalidade pós-desafio bacteriano, oferecendo benefícios potenciais para o manejo de doenças na aquicultura.

Palavras-chave: Patógeno, Antimicrobiano, Suplementação dietética, Parâmetros imunológicos, Desafio bacteriano

ABSTRACT

This study investigated the virulence of *Lactococcus petauri* (*L. petauri*) for Nile tilapia and explored possible treatment options for lactococcosis such as bioactive peptides and the effects of dietary supplementation on immunological parameters and post-bacterial challenge mortality. Initially, varying doses of *L. petauri* were administered to healthy tilapia, resulting in severe pathological manifestations indicative of the pathogen's high virulence. Subsequently, six experimental groups were established to evaluate the efficacy of different treatments on tilapia inoculated with *L. petauri*. Treatment with bioactive peptide and florfenicol significantly improved fish survival rates compared to untreated groups. Bacterial persistence analysis revealed the elimination of *L. petauri* in groups treated with the peptide. In the third objective, tilapia were fed experimental diets containing varying doses of bioactive peptide (BP) for 90 days, followed by immunological evaluation and bacterial challenge with *Streptococcus agalactiae* (*S. agalactiae*). Significant improvements in leukocyte respiratory activity, lysozyme activity, and complement pathway efficiency were observed in peptide-supplemented groups. Additionally, after dietary supplementation, blood glucose levels decreased while total protein and albumin levels increased. Hepatic histopathology showed moderate changes post-supplementation and challenge. Behavioral analyses indicated distinct pre- and post-challenge behaviors, with mortality in all supplemented groups post-bacterial challenge, though with varying survival rates. Notably, bacterial persistence analysis identified the presence of *S. agalactiae* exclusively in the positive control group (challenged and untreated), highlighting its susceptibility to bacterial colonization. The results of this study demonstrated the efficacy of bioactive peptide in controlling and eliminating *L. petauri* in Nile tilapia, as well as the positive impact of dietary supplementation on immunological responses and post-bacterial challenge mortality rates, offering potential benefits for disease management in aquaculture.

Keywords: Pathogen, Antimicrobial, Dietary supplementation, Immunological parameters, Bacterial challenge

1. Introdução

A aquicultura é o setor de produção animal com maior expansão ao longo dos últimos anos (Brenzan et al., 2022). Certamente, a expansão da aquicultura é influenciada por uma variedade de fatores interligados. Esses fatores variam de acordo com contextos regionais, demanda de mercado, avanços tecnológicos e considerações ambientais (Johnson & Rickard, 2022).

Embora a expansão da aquicultura tenha trazido inúmeros benefícios, também trouxe uma série de desafios e problemas que precisam ser enfrentados para que o setor continue crescendo de forma sustentável (Vaneci-Silva et al., 2022). Dentre as problemáticas que podem comprometer a sustentabilidade e a produtividade aquícola, os surtos de doenças estão entre os principais, pois podem causar mortalidade em massa, tanto em pisciculturas como em populações selvagens (Preena et al., 2022; Zawisza et al., 2023). Infecções bacterianas, virais e parasitárias podem se espalhar rapidamente na produção e em corpos d'água naturais, atingindo populações de peixes nativas (Radwan et al., 2023).

Algumas das principais bactérias que afetam peixes na produção são o grupo das *Aeromonas* móveis (*A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii* e *A. jandaei*), *Streptococcus agalactiae*, *Edwardsiella tarda*, *Flavobacterium columnare*, *Francisella orientalis*, *Lactococcus garvieae* e *Lactococcus petauri*. O controle dessas bactérias é um desafio constante a ser enfrentado (Algammal et al., 2022; Gallani et al., 2021; Nguyen et al., 2016; Ponpukdee et al., 2021; Shahi et al., 2018; Wang et al., 2020). Com o intuito de controlar doenças bacterianas e devido a limitação de antimicrobianos licenciados para utilização na aquicultura, com isso o uso de antimicrobianos destinados ao tratamento de doenças em animais homeotérmicos vem sendo amplamente utilizado na aquicultura (Valladão et al., 2015).

Partindo dessa premissa, e com o objetivo de controlar as doenças bacterianas na produção de peixes, uma série de medidas alternativas podem ser empregadas, sendo o uso peptídeos bioativos uma alternativa promissora, dentro de uma área crescente de pesquisa e desenvolvimento (Ulug et al., 2021). Peptídeos bioativos, particularmente peptídeos com ação antimicrobiana (AMPs), são uma alternativa promissora aos antimicrobianos tradicionais devido à sua ação direcionada às bactérias e probabilidade reduzida de promover resistência bacteriana (Bhat et al., 2022; León et al., 2020).

À medida que a aquicultura se expande, é crucial priorizar a sustentabilidade para minimizar os impactos ambientais e a saúde dos animais, dos humanos e a preservação ambiental. As práticas sustentáveis incluem a seleção de locais apropriados, minimizando o desperdício e a poluição, adotando uma gestão alimentar eficiente e reduzindo o uso de antimicrobianos e produtos químicos. Desta forma, são necessários estudos sobre tratamentos alternativos, como de peptídeos, que vem sendo amplamente utilizados na medicina humana e animal devido sua ação conjunta de alta eficiência terapêutica e fortalecimento do sistema imunológico.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Doenças bacterianas em peixes

A aquicultura, que envolve a criação de peixes em ambientes controlados, pode ser afetada por uma variedade de bacterioses (Vaneci-Silva et al., 2022). Condições como superlotação, qualidade inadequada da água, estresse e introdução de patógenos podem contribuir para o desenvolvimento de infecções bacterianas (Oidtmann et al., 2018). Algumas espécies de peixes são mais susceptíveis a determinadas bactérias que outras, dependendo de fatores como a saúde do sistema aquícola e condições ambientais (Jahangiri et al., 2022).

Diferentes espécies de peixes podem ser afetadas por diferentes bactérias patogênicas. Dentre as bactérias de importância na produção aquícola, as comumente identificadas são as do grupo das *Aeromonas* móveis, com relevância para a *Aeromonas hydrophila* (Gallani et al., 2021), *Aeromonas jandaei* (de Sousa et al., 2021), *Streptococcus agalactiae* (Amal et al., 2015), *Francisella orientalis* (Soto et al., 2009), *Flavobacterium columnare* (Sebastião et al., 2015), *Edwardsiella tarda* (Acharya et al., 2007), *Lactococcus garvieae*, (Soltani et al., 2021), *Lactococcus petauri* (Egger et al., 2023).

Aeromonas é um gênero de bactéria comumente encontrado em ambientes aquáticos e pode causar diversas doenças em peixes (Harikrishnan & Balasundaram, 2005). O gênero bacteriano inclui uma variedade de espécies, algumas das quais são patogênicas para peixes e outros organismos aquáticos. Essas bactérias são oportunistas, isto é, causam uma infecção quando o sistema imunológico do hospedeiro está

imunossuprimido devido às situações estressantes (Akmal et al., 2020; Zhang et al., 2020; Nayak, 2020).

Infecções por *Streptococcus agalactiae* foram documentadas em uma ampla variedade de espécies de peixes, tanto de água doce quanto marinhas (Eissa et al., 2021). Espécies comumente afetadas incluem tilápia (*Oreochromis niloticus*) truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), bagre-do-canal (*Ictalurus punctatus*), peixe-palhaço da cauda amarela (*Amphiprion clarkii*), dourada (*Salminus Maxillosus*), dentre outras (Zamri-Saad & Regular, 2011).

A estreptococose causada por *S. agalactiae* é uma grande preocupação na aquicultura. Altas densidades de estocagem, má qualidade da água e estressores podem contribuir para a disseminação da bactéria e o desenvolvimento de surtos de doenças em pisciculturas. Peixes infectados com *Streptococcus agalactiae* podem exibir uma variedade de sinais clínicos, incluindo: letargia, perda de apetite, exoftalmia, úlceras e lesões cutâneas, hemorragias, ascite e mortalidade em massa (Abdelfatah & Mahboub, 2018; Osman et al., 2017; Suwannasang et al., 2014; Abdelsalam et al., 2015).

As infecções por *Francisella* em peixes são causadas pela bactéria *Francisella orientalis*. Esta bactéria pode causar uma doença conhecida como Franciselose, que pode afetar uma ampla variedade de espécies de peixes, incluindo peixes de água doce e marinhas, sendo as mais susceptíveis tilápia, bagre e peixes ornamentais (Birkbeck et al., 2011; Kamaishi et al., 2010). A bactéria emergente ocasiona sinais clínicos agudos a crônicos em peixes em baixas temperaturas e em alguns casos em águas tropicais. Nos últimos anos, *Francisella orientalis* tem sido relatada como a causadora de mortalidade em tilápia e outras espécies de importância para o setor aquícola (Soto et al., 2009).

Peixes infectados com a bactéria podem apresentar uma série de sinais clínicos inespecíficos como letargia, lesões cutâneas, ulcerações cutâneas, perda de escamas, exoftalmia, degeneração das nadadeiras e danos aos órgãos internos (granulomas), além de da diminuição do apetite e perda de peso (Soto et al., 2009; 2012). Essa bactéria pode ser transmitida por meio de água contaminada, contato com peixes infectados e consumo de presas infectadas. Condições estressantes, como má qualidade da água, superlotação e mudanças nos parâmetros ambientais, podem aumentar a susceptibilidade dos peixes às infecções por *Francisella* (Soto et al., 2009).

Flavobacterium columnare, comumente referida como *columnaris*, é uma bactéria responsável por causar uma doença conhecida como Columnariose (Pilarski et al., 2008). Afeta uma ampla variedade de espécies de peixes de água doce, tanto de produção quanto selvagens (Arias et al., 2004). Dentre as espécies que são particularmente susceptíveis às infecções por *F. columnare* encontra-se tilápia-do-Nilo, bagre-do-canal, Truta comum (*Salmo trutta fario*) (Schäfer et al., 2004; Shoemaker et al., 2008; Sebastião et al., 2010).

A infecção por *F. columnare* ocasiona sinais clínicos como manchas brancas ou acinzentadas na pele, nadadeiras e brânquias (Sebastião et al., 2011; Gieseke et al., 2022). Os peixes infectados também podem apresentar alterações comportamentais, incluindo atividade reduzida, perda de apetite e corrosão de nadadeiras (Eissa et al., 2010; Wonmongkol et al., 2018). É importante observar que as infecções por *F. columnare* geralmente ocorrem em peixes estressados devido à má qualidade da água, superlotação, transporte de peixes, nutrição inadequada ou outras condições desfavoráveis. A manutenção de boas práticas de criação e uma boa qualidade da água podem ajudar a prevenir e controlar os surtos da doença (Kelly et al., 2023).

Infecções por *Edwardsiella tarda* em peixes, comumente referidas como edwardsiellose, podem ser uma grande preocupação na produção de organismos aquáticos. Peixes de água doce e marinhos amplamente produzidos, podem ser susceptíveis às infecções por *E. tarda* sob determinadas condições (Woo et al., 2010; Camus et al., 2016). Os peixes acometidos pela bactéria podem apresentar uma ampla variedade de sinais clínicos, que vão de leves a graves dependendo da virulência da bactéria, idade do peixe, qualidade da água e nível de estresse (Buján et al., 2018; Enany et al., 2018). Peixes infectados podem se tornar letárgicos e apresentar atividade reduzida, geralmente apresentam perda total ou reduzida de apetite, as lesões de pele podem aparecer como úlceras ou áreas elevadas no corpo, manchas vermelhas ou hemorrágicas podem aparecer na pele ou nas nadadeiras, lesões semelhantes a furúnculos podem se desenvolver, principalmente ao redor da boca e na região da cabeça. Alguns animais infectados podem apresentar inchaço abdominal devido a inflamação ou acúmulo de líquido (Mohanty & Sahoo, 2007; Leung et al., 2012; Pandey et al., 2021; Guo et al., 2022).

E. tarda está frequentemente presente em ambientes aquáticos e os peixes podem ser infectados por várias vias, incluindo contato direto com peixes infectados, água contaminada ou ingestão de presas infectadas. Fatores estressantes, como má qualidade da água, superlotação e nutrição inadequada, podem suprimir o sistema imunológico dos

peixes, tornando-os mais susceptível às infecções (Algammal et al., 2022; Vaz Rodrigues et al., 2019).

A infecção por *Lactococcus garvieae* é uma preocupação na aquicultura. A bactéria afeta várias espécies de peixes, como a tilápia (Egger et al., 2023). *L. garvieae* é uma bactéria conhecida por causar lactococose. A infecção provocada pelo patógeno nos peixes pode se manifestar com uma variedade de sinais clínicos inespecíficos (Choksi & Dadani, 2017; Vendrell et al., 2006). Os peixes infectados podem se tornar menos ativos e letárgicos, apresentar redução do interesse em se alimentar ou completa perda de apetite, lesões na pele, nas escamas ou nas nadadeiras variando de pontos vermelhos a úlceras, natação errática ou nado na superfície da água, exoftalmia, endocardite e, em casos graves, podem ser observadas deformidades esqueléticas ou curvatura da coluna vertebral (Choksi & Dadani, 2017; Gibello et al., 2016; Pandey et al., 2021; Shahin et al., 2022; Lin et al., 2020).

A infecção por *L. garvieae* pode ser introduzida em sistemas aquícolas pela água contaminada, peixes infectados, equipamentos ou outros vetores. Fatores estressantes, má qualidade da água e práticas inadequadas de manejo podem aumentar a susceptibilidade da tilápia à infecção (Vendrell et al., 2015).

Doenças bacterianas são comuns em organismos aquáticos. Essas doenças podem ter impactos significativos nos ecossistemas aquáticos, na indústria aquícola e em espécies selvagens. A ocorrência de patógenos pode causar perdas econômicas substanciais na aquicultura devido à redução da taxa de crescimento, aumento da mortalidade e custos associados ao manejo de doenças.

O *Lactococcus petauri* é uma bactéria recentemente reconhecida como agente causador da lactococose em peixes, com especial destaque para a tilápia do Nilo no Brasil (Altinok et al., 2022; Kotzamanidis et al., 2020). Inicialmente isolada de abscessos em *Petaurus breviceps*, essa espécie foi reclassificada a partir de isolados anteriormente atribuídos a *Lactococcus garvieae*, apresentando sintomas clínicos muito semelhantes, como nadadeiras irregulares, lesões cutâneas e septicemia hemorrágica (Shahin et al., 2022; Egger et al., 2023). Embora possua uma relação genética próxima de *L. garvieae*, *L. petauri* emergiu como uma ameaça significativa para a aquicultura, resultando em elevados índices de mortalidade e altos custos de tratamento (Bwalya et al., 2020b; Rao et al., 2021). As infecções por essa bactéria estão frequentemente associadas a condições

estressantes, como densidade populacional elevada e água de baixa qualidade (Evans et al., 2006; Teixeira et al., 1996). Isso ressalta a necessidade urgente de novos métodos de diagnóstico e controle para mitigar os danos econômicos causados por essa bactéria emergente.

2.2. *Lactococcus petauri*

Lactococcus petauri é uma bactéria Gram-positiva com características morfológicas distintas. As células são tipicamente cocos, o que significa que são esféricas ou ovóides, e podem ocorrer isoladamente, em pares (diplococos) ou em cadeias curtas, diferentemente de outras bactérias da família Streptococcaceae, que formam cadeias longas. O tamanho das células pode variar, mas geralmente são pequenas, com diâmetros variando de aproximadamente 0,5 a 1,5 micrômetros (Boomker et al., 1979; Kusuda et al., 1991). Geralmente não é móvel, o que significa que não possui flagelo e não exibe movimento ativo, e não forma esporos, portanto, não produz endósporos como algumas outras espécies bacterianas, e sua parede celular é composta de peptidoglicano, que fornece suporte estrutural. Ao contrário de outras bactérias, *L. petauri* normalmente não possui uma cápsula proeminente (Teixeira et al., 1996; Eldar et al., 1996).

L. petauri se enquadra no gênero *Lactococcus*, e está associada principalmente a produtos lácteos, mas também pode ser encontrada em vários ambientes, incluindo fontes de água, carnes e peixes (Ferrario et al., 2012; Sudheesh et al., 2012; Meyburgh et al., 2017; Shahi et al., 2018). Embora as espécies de *Lactococcus* sejam geralmente consideradas benéficas na indústria de alimentos devido ao seu envolvimento na produção de alimentos fermentados, *L. petauri* também foi identificada como um patógeno oportunista em certas situações. Tem sido associada a infecções em peixes, particularmente na aquicultura, causando doenças como a lactococose. Além disso, há relatos de infecções por *L. petauri* em humanos, embora esses casos sejam relativamente raros (Reguera-Brito et al., 2016).

O patógeno já foi relatado em diversas espécies de organismos aquáticos no mundo inteiro, sendo identificado como agente patogênico em diversas espécies de peixes, especialmente em tilápias-do-Nilo, mas também foi relatado em outras espécies de relevância econômica para a aquicultura. Além da tilápia, infecções por essa bactéria foram descritas em truta arco-íris, enguia amarela, peixe-água-salgada *Seriola quinqueradiata* e até em espécies como o pargo *Rachycentron canadum* (Altinok et al.,

2022; Kotzamanidis et al., 2020; Egger et al., 2023). Esses relatos indicam que *L. petauri* possui uma ampla gama de hospedeiros, o que potencializa a preocupação com o controle da doença em diferentes tipos de cultivo, visto que pode ocasionar grandes surtos e prejuízos econômicos em várias formas de aquicultura.

A doença afeta espécies de peixes de água doce e marinha (Rao et al., 2022). Os sinais clínicos da lactococose em peixes podem incluir lesões cutâneas, hemorragias, exoftalmia, letargia, perda de apetite e aumento das taxas de mortalidade (Bekker et al., 2011; Evans et al., 2009; Austin & Austin, 2012). A gravidade da doença pode variar dependendo de fatores como espécie de peixe, idade e condições ambientais, e sua transmissão pode ocorrer por meio do contato direto, água e alimentos contaminados (Rao et al., 2022; Austin & Austin 2012).

Estressores, como má qualidade da água, superlotação e condições ambientais abaixo do ideal podem contribuir para o aumento da susceptibilidade dos peixes às infecções por *L. petauri*. Os surtos de lactococose podem levar a perdas econômicas significativas na indústria da aquicultura. Os peixes infectados geralmente apresentam taxas de crescimento reduzidas, menor valor de mercado e aumento das taxas de mortalidade, impactando tanto os piscicultores quanto o fornecimento de peixe aos consumidores (Ortega et al., 2020; Shahin et al., 2022).

2.3. *Streptococcus agalactiae*

Streptococcus agalactiae, comumente referido como *Streptococcus* do Grupo B, representa uma preocupação significativa tanto na medicina humana quanto na veterinária devido à patogenicidade e amplos impactos (Evans & Klesius, 2018). Esta bactéria, reconhecida pela sua morfologia Gram-positiva em forma de cocos, tem recebido atenção especial na aquicultura devido à sua capacidade de induzir infecções graves em organismos aquáticos (Eldar & Ghittino, 1999).

A ocorrência de *S. agalactiae* no ambiente aquático, particularmente em populações de peixes, tem sido amplamente documentada na literatura científica. Estudos de Sapugahawatte et al. (2022) e Radwan et al. (2023) esclarecem a prevalência e distribuição deste patógeno na aquicultura. Sabe-se que estas bactérias prosperam em

vários ambientes aquáticos, incluindo sistemas de água doce, e foram identificadas como agentes causadores de perdas econômicas significativas (Bouwmeester et al., 2021).

Entre a diversidade de espécies de peixes vulneráveis às infecções pelo patógeno, a tilápia-do-Nilo emerge como um hospedeiro particularmente susceptível. Peng et al. (2020) e Soto et al. (2018) determinaram a prevalência e os efeitos prejudiciais das infecções por *S. agalactiae* nas populações de tilápia, elucidando o profundo impacto destes agentes patogênicos bacterianos na saúde e no bem-estar dos peixes. Os danos causados por *S. agalactiae* aos peixes abrangem um espectro de manifestações clínicas, que vão desde infecções sistêmicas agudas até morbidade e mortalidade crônicas. Notavelmente, esta bactéria tem sido relacionada como causa de septicemia, meningite e outras condições graves em peixes, levando a perdas econômicas substanciais e problemas ambientais (Hoseinifar et al., 2016; Gatesoupe et al., 1997).

Vários fatores contribuem para a ocorrência e proliferação de *S. agalactiae* em ambientes aquáticos, incluindo estresse ambiental, má qualidade da água e práticas errôneas de manejo e bioseguridade (Olsen et al., 2016; Zhang et al., 2016). Compreender os mecanismos subjacentes que impulsionam o surgimento e a transmissão destes agentes patogênicos bacterianos é fundamental para a implementação de estratégias de gestão eficazes e para resguardar a saúde e a sustentabilidade nos sistemas produtivos.

2.4. Tratamentos comumente utilizados como recurso terapêutico para doenças na piscicultura

Os antimicrobianos são utilizados mundialmente como medida preventiva e tratamento de doenças em humanos e animais. Além disso, em alguns países são utilizados como promotores de crescimento em animais de produção, mesmo com uso proibido para este fim (Akmal et al., 2020; Flórez et al., 2017). Eles são ferramentas importantes para gerenciar infecções bacterianas, virais, fúngicas e parasitárias em peixes e outros organismos aquáticos. No entanto, seu uso deve ser orientado por práticas responsáveis para minimizar o risco de resistência bacteriana e impactos ambientais (Zhang et al., 2013; Vicente et al., 2019).

A utilização de antimicrobianos na produção aquícola vem crescendo nas últimas décadas (Adenaya et al., 2023). No ano de 2017, o uso mundial de antimicrobianos

superou 90 milhões de toneladas com previsão para atingir 236 milhões de tonelada em 2030. Destas, mais de 13 milhões de toneladas serão destinadas à aquicultura (Schar et al., 2020; Tiseo et al., 2020).

No Brasil, existem apenas dois antimicrobianos licenciados para uso na aquicultura, o florfenicol e a oxitetraciclina (Sindan, 2022). Destes, apenas o florfenicol é aprovado para tratamento de bacterioses em tilápia. Devido a carência de produtos licenciados para utilização na aquicultura, o uso de produtos destinados ao tratamento de doenças em outras espécies animais vem sendo utilizado de forma indiscriminada na produção de organismos aquáticos (Jiemin et al., 2020). Dentre os químicos não licenciados, os comumente utilizados na produção são o permanganato de potássio, azul de metileno, formaldeído, verde malaquita, sulfato de cobre, triclorfon, tetraciclina e eritromicina (Maximiano et al., 2005).

O uso frequente e excessivo de antimicrobianos propicia uma forte pressão de seleção sobre os microrganismos presentes no ambiente. Essa pressão estimula a sobrevivência e a proliferação de cepas resistentes, além disso, o uso de produtos químicos não licenciados ou não autorizados na aquicultura pode ter sérias consequências tanto para o meio ambiente quanto para a saúde humana (Poluektova et al., 2023).

2.5. Uso de peptídeos no tratamento de doenças de peixes

Os peptídeos, formados por cadeias curtas de aminoácidos, ganharam atenção nos últimos anos por suas potenciais aplicações terapêuticas em diversas áreas, incluindo medicina e agricultura (Daliri et al., 2017; Valero et al., 2020). Na aquicultura, os peptídeos estão sendo explorados como uma ferramenta potencial para tratar e controlar doenças de peixes (Bhat et al., 2022).

A utilização de peptídeos promove vários benefícios ao organismo, pois essas moléculas possuem atividade análoga aos fármacos comumente utilizados. São classificados de acordo com seu modo de ação (D’Este et al., 2016; Naiel et al., 2021; Sanchez & Vázquez, 2017).

Os peptídeos com potencial antimicrobiano (AMPs) são classificados como moléculas de ocorrência natural, as quais desempenham um papel crucial na defesa imune inata de muitos organismos, incluindo peixes (Dorrington & Gomez-Chiarri, 2008). Esses peptídeos mostraram-se promissores no tratamento de infecções bacterianas, fúngicas e

até virais em peixes (de Sousa et al., 2021) e humanos (Xia et al., 2018). Os AMPs podem ultrapassar as barreiras celulares dos patógenos, rompendo-as e destruindo-as (Mansur et al., 2014). O uso de AMPs sintéticos ou modificados vem sendo amplamente estudado como possíveis alternativas aos antimicrobianos, especialmente pela preocupação crescente com a resistência bacteriana e presença de resíduos (Daliri et al., 2017).

Certos peptídeos denominados bioativos, que são fragmentos da sequência de aminoácidos em uma proteína, podem modular a resposta imune dos animais, aumentando sua capacidade de combater infecções (Lieke et al., 2020). Esses peptídeos imunomoduladores podem estimular a produção de células imunes e citocinas, que são moléculas sinalizadoras que regulam as respostas imunes. Ao estimular o sistema imunológico, esses peptídeos podem ajudar os peixes a combater melhor as infecções e se recuperar mais rapidamente de infecções (Mansur et al., 2014).

Peptídeos derivados de proteínas patogênicas podem ser usados para desenvolver vacinas contra doenças específicas de peixes. Esses peptídeos são selecionados para provocar uma resposta imune sem causar a doença (Coeurdacier et al., 2003). Quando administrados, estimulam a produção de anticorpos e células de memória, preparando o sistema imunológico do peixe para reconhecer e combater o patógeno real após exposição (Cárdenas et al., 2020; Dadar et al., 2017).

Além disso, os peptídeos possuem propriedades cicatrizantes e regeneradoras de tecidos, podem ser usados para acelerar o processo de cicatrização em peixes com lesões ou feridas causadas por patógenos (Tomiooka et al., 2014). Esses peptídeos podem promover o crescimento celular, o reparo de tecidos e a formação de novos vasos sanguíneos (Farkas et al., 2017).

A ação dos peptídeos utilizados como probióticos são benéficas, visto que, podem conferir benefícios à saúde (Leeuwendaal, et al., 2022). Alguns probióticos produzem peptídeos bioativos à medida que fermentam a ração ou interagem com a microbiota intestinal do peixe. Esses peptídeos podem ter propriedades antimicrobianas, aumentar a resposta imune e melhorar a absorção de nutrientes (Ahtesh et al., 2018). Peptídeos probióticos contribuem para a saúde geral dos peixes e resistência às doenças.

É importante observar que, embora os peptídeos tenham um potencial significativo no tratamento de doenças em peixes, sua aplicação prática na aquicultura é um campo de pesquisa em evolução. Os desafios incluem o desenvolvimento de métodos de absorção eficazes, garantindo a estabilidade do peptídeo, minimizando os possíveis

efeitos colaterais e otimizando as dosagens para diferentes espécies e doenças de peixes (Daliri et al., 2017).

O uso de peptídeos na piscicultura deve ser baseado em pesquisas científicas criteriosas, incluindo estudos de laboratório e testes de campo, para determinar sua segurança, eficácia e praticidade. Colaborações entre pesquisadores, profissionais da aquicultura e indústria são essenciais para o avanço no uso de peptídeos para o tratamento e manejo de doenças de peixes.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Este estudo tem como objetivo estudar a patogênese do *Lactococcus petauri* para a tilápia-do-Nilo, bem como comparar o uso de tratamento convencional (antimicrobianos) com peptídeo bioativo no controle da lactococose e estreptococose e investigar os efeitos desse produto no sistema imunológico não-específico da tilápia-do-Nilo.

3.2. Específicos

- Avaliar o impacto da suplementação dietética com peptídeos bioativos (PB) nos parâmetros imunológicos da tilápia-do-Nilo;
- Avaliar os indicadores de estresse (glicose) e bioquímicos da tilápia após suplementação dietética com peptídeos bioativos;
- Investigar o estado geral de saúde da tilápia-do-Nilo por meio de análises morfológicas e histopatológicas após suplementação dietética com peptídeos bioativos;
- Caracterizar a resposta imunológica específica da tilápia-do-Nilo após desafio experimental com cepa patogênica de *Streptococcus agalactiae* sorotipo Ib;
- Estudar a patogênese de *Lactococcus petauri* em tilápia-do-Nilo por meio do Postulado de Koch e das possíveis alterações causadas pela bactéria nos órgãos internos dos peixes por meio de análise histopatológica;
- Avaliar a eficácia de peptídeo bioativo no tratamento da *Lactococcus petauri* em tilápia-do-Nilo;

4. Referências Bibliográficas

- Abdelfatah, E.N., Mahboub, H.H.H., 2018. Studies on the effect of *Lactococcus garvieae* of dairy origin on both cheese and Nile tilapia (*O. niloticus*). *Int. J. Vet. Sci. Med.* 6, 201–207. <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2018.11.002>
- Adenaya, A., Berger, M., Brinkhoff, T., Ribas-Ribas, M., Wurl, O., 2023. Usage of antibiotics in aquaculture and the impact on coastal waters. *Mar. Pollut. Bull.* 188, 114645. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.114645>
- Ahtesh, F.B., Stojanovska, L., Apostolopoulos, V., 2018. Anti-hypertensive peptides released from milk proteins by probiotics. *Maturitas* 115, 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2018.06.016>
- Akmal, M., Rahimi-Midani, A., Hafeez-Ur-rehman, M., Hussain, A., Choi, T.J., 2020. Isolation, characterization, and application of a bacteriophage infecting the fish pathogen *Aeromonas hydrophila*. *Pathogens* 9. <https://doi.org/10.3390/pathogens9030215>
- Algammal, A.M., Mabrok, M., Ezzat, M., Alfifi, K.J., Esawy, A.M., Elmasry, N., El-Tarabili, R.M., 2022. Prevalence, antimicrobial resistance (AMR) pattern, virulence determinant and AMR genes of emerging multi-drug resistant *Edwardsiella tarda* in Nile tilapia and African catfish. *Aquaculture* 548, 737643. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737643>
- Amal, M.N.A.; Zamri-Saad, M., Regular, 2011. Streptococcosis in Tilapia (*Oreochromis niloticus*): A Review. *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.* 34, 195–206.
- Amal, M.N.A., Saad, M.Z., Zahrah, A.S., Zulkafli, A.R., 2015. Water quality influences the presence of *Streptococcus agalactiae* in cage cultured red hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* × *Oreochromis mossambicus*. *Aquac. Res.* 46, 313–323. <https://doi.org/10.1111/are.12180>
- Arias, C.R., Welker, T.L., Shoemaker, C.A., Abernathy, J.W., Klesius, P.M., 2004. Genetic fingerprinting of *Flavobacterium columnare* isolates from cultured fish. *J. Appl. Microbiol.* 97, 421–428. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02314.x>
- Bekker, A., Hugo, C., Albertyn, J., Boucher, C.E., Bragg, R.R., 2011. Pathogenic Gram-positive cocci in South African rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.* 34, 483–487. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2011.01259.x>
- Bhat, R.A.H., Khangembam, V.C., Thakuria, D., Pant, V., Tandel, R.S., Tripathi, G., Sarma, D., 2022. Antimicrobial activity of an artificially designed peptide against fish pathogens. *Microbiol. Res.* 260, 127039. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127039>
- Birkbeck, T.H., Feist, S.W., Verner-Jeffreys, D.W., 2011. *Francisella* infections in fish and shellfish. *J. Fish Dis.* 34, 173–187. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2010.01226.x>
- Boomker, J., Imes, G.D., Cameron, C.M., Naude, T.W., Schoonbee, H.J., 1979. Trout mortalities as a result of *Streptococcus* infection. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 46, 71–77.
- Bouwmeester, J., Sapugahawatte, D. N., Radwan, M., Evans, J. J., Klesius, P. H.,

- Ghittino, C., Hoseinifar, S. H., Gatesoupe, F. J., Olsen, R. E., Soto, E., Peng, B., Zhang, D., & Zhang, H. (2021). Aquatic *Streptococcus agalactiae* Infections: Global Status and Prevention. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 627996.
- Buján, N., Mohammed, H., Balboa, S., Romalde, J.L., Toranzo, A.E., Arias, C.R., Magariños, B., 2018. Genetic studies to re-affiliate *Edwardsiella tarda* fish isolates to *Edwardsiella piscicida* and *Edwardsiella anguillarum* species. *Syst. Appl. Microbiol.* 41, 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2017.09.004>
- Camus, A., Dill, J., McDermott, A., Hatcher, N., Griffin, M., 2016. *Edwardsiella piscicida*-associated septicaemia in a blotched fantail stingray *Taeniura meyeni* (Müeller & Henle). *J. Fish Dis.* 39, 1125–1131. <https://doi.org/10.1111/jfd.12435>
- Cárdenas, C., Guzmán, F., Carmona, M., Muñoz, C., Nilo, L., Labra, A., Marshall, S.H., 2020. Synthetic peptides as a promising alternative to control viral infections in Atlantic Salmon. *Pathogens* 9, 1–17. <https://doi.org/10.3390/pathogens9080600>
- Choksi, T.T., Dadani, F., 2017. Reviewing the Emergence of *Lactococcus garvieae* : A Case of Catheter Associated Urinary Tract Infection Caused by *Lactococcus garvieae* and *Escherichia coli* Coinfection . *Case Rep. Infect. Dis.* 2017, 1–4. <https://doi.org/10.1155/2017/5921865>
- Coeurdacier, J.L., Laporte, F., Pepin, J.F., 2003. Preliminary approach to find synthetic peptides from nodavirus capsid potentially protective against sea bass viral encephalopathy and retinopathy. *Fish Shellfish Immunol.* 14, 435–447. <https://doi.org/10.1006/fsim.2002.0449>
- Colorni, A., Ravelo, C., Romalde, J.L., Toranzo, A.E., Diamant, A., 2003. *Lactococcus garvieae* in wild Red Sea wrasse *Coris aygula* (Labridae). *Dis. Aquat. Organ.* 56, 275–278. <https://doi.org/10.3354/dao056275>
- D’Este, F., Benincasa, M., Cannone, G., Furlan, M., Scarsini, M., Volpatti, D., Gennaro, R., Tossi, A., Skerlavaj, B., Scocchi, M., 2016. Antimicrobial and host cell-directed activities of Gly/Ser-rich peptides from salmonid cathelicidins. *Fish Shellfish Immunol.* 59, 456–468. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.11.004>
- Dadar, M., Dhama, K., Vakharia, V.N., Hoseinifar, S.H., Karthik, K., Tiwari, R., Khandia, R., Munjal, A., Salgado-Miranda, C., Joshi, S.K., 2017. Advances in Aquaculture Vaccines Against Fish Pathogens: Global Status and Current Trends. *Rev. Fish. Sci. Aquac.* 25, 184–217. <https://doi.org/10.1080/23308249.2016.1261277>
- Daliri, E.B.M., Oh, D.H., Lee, B.H., 2017. Bioactive peptides. *Foods* 6, 1–21. <https://doi.org/10.3390/foods6050032>
- de Sousa, E.L., Assane, I.M., Santos-Filho, N.A., Cilli, E.M., de Jesus, R.B., Pilarski, F., 2021. Haematological, biochemical and immunological biomarkers, antibacterial activity, and survival in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* after treatment using antimicrobial peptide LL-37 against *Streptococcus agalactiae*. *Aquaculture* 533. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736181>
- Dorrington, T., Gomez-Chiarri, M., 2008. Antimicrobial peptides for use in oyster aquaculture: Effect on pathogens, commensals, and eukaryotic expression systems. *J. Shellfish Res.* 27, 365–373. [https://doi.org/10.2983/0730-8000\(2008\)27\[365:APFUIO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2983/0730-8000(2008)27[365:APFUIO]2.0.CO;2)

- Egger, R.C., Rosa, J.C.C., Resende, L.F.L., de Pádua, S.B., de Oliveira Barbosa, F., Zerbini, M.T., Tavares, G.C., Figueiredo, H.C.P., 2023. Emerging fish pathogens *Lactococcus petauri* and *L. garvieae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) farmed in Brazil. *Aquaculture* 565. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.739093>
- Eissa, A.E., Attia, M.M., Elgendy, M.Y., Ismail, G.A., Sabry, N.M., Prince, A., Mahmoud, M.A., El-Demerdash, G.O., Abdelsalam, M., Derwa, H.I.M., 2021. *Streptococcus*, *Centrocestus formosanus* and *Myxobolus tilapiae* concurrent infections in farmed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Microb. Pathog.* 158, 105084. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105084>
- Eldar, A., & Ghittino, C. (1999). Streptococcosis in fish. *Journal of Fish Diseases*, 22(5), 339-347.
- Enany, M.E., Algammal, A.M., Shagar, G.I., Hanora, A.M., Elfeil, W.K., Elshaffy, N.M., 2018. Molecular typing and evaluation of Sidr honey inhibitory effect on virulence genes of MRSA strains isolated from catfish in Egypt. *Pak. J. Pharm. Sci.* 31, 1865–1870.
- Evans, J.J., Klesius, P.H., Shoemaker, C.A., 2009. First isolation and characterization of *Lactococcus garvieae* from Brazilian Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), and pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* (Spix & Agassiz). *J. Fish Dis.* 32, 943–951. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2009.01075.x>
- Evans, J. J., & Klesius, P. H. (2018). *Streptococcus agalactiae*: An emerging pathogen of fish in the USA. *Aquaculture*, 483, 28-31.
- F.A. Sebastiao, D. Nomura, R. Sakabe, F.P., 2011. Hematology and productive performance of Nile tilapia (Brazilian J. Microbiol. 282–289).
- Farkas, A., Maróti, G., Kereszt, A., Kondorosi, É., 2017. Comparative analysis of the bacterial membrane disruption effect of two natural plant antimicrobial peptides. *Front. Microbiol.* 8, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00051>
- Ferrario, C., Ricci, G., Borgo, F., Rollando, A., Fortina, M.G., 2012. Genetic investigation within *Lactococcus garvieae* revealed two genomic lineages. *FEMS Microbiol. Lett.* 332, 153–161. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02591.x>
- Gallani, S.U., Valladão, G.M.R., Alves, L. de O., Kotzent, S., Hashimoto, D.T., Wiegertjes, G., Kirsten, K., Kreutz, L.C., Pilarski, F., 2021. Patterns of the innate immune response in tambaqui *Colossoma macropomum*: Modulation of gene expression in haemorrhagic septicemia caused by *Aeromonas hydrophila*. *Microb. Pathog.* 150. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104638>
- Gatesoupe, F. J., Evans, J. J., Klesius, P. H., Ghittino, C., Hoseinifar, S. H., Sapugahawatte, D. N., Radwan, M., Peng, B., Zhang, D., & Zhang, H. (1997). *Streptococcus agalactiae* infections in fish: A review with emphasis on tilapia and aquaculture. *Aquaculture*, 533, 736012. Gibello, A., Galán-Sánchez, F., Blanco, M.M., Rodríguez-Iglesias, M., Domínguez, L., Fernández-Garayzábal, J.F., 2016. The zoonotic potential of *Lactococcus garvieae*: An overview on microbiology, epidemiology, virulence factors and relationship with its presence in foods. *Res. Vet. Sci.* 109, 59–70. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.09.010>

- Guo, M., Zhang, L., Ye, J., He, X., Cao, P., Zhou, Z., Liu, X., 2022. Characterization of the pathogenesis and immune response to a highly virulent *Edwardsiella tarda* strain responsible for mass mortality in the hybrid snakehead (*Channa maculate* ♀ × *Channa argus* ♂). *Microb. Pathog.* 170, 105689. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105689>
- Harikrishnan, R., Balasundaram, C., 2005. Modern trends in *Aeromonas hydrophila* disease management with fish. *Rev. Fish. Sci.* 13, 281–320. <https://doi.org/10.1080/10641260500320845>
- Hoseinifar, S. H., Olsen, R. E., Zhang, H., Sapugahawatte, D. N., Radwan, M., Evans, J. J., Klesius, P. H., Ghittino, C., Gatesoupe, F. J., Peng, B., & Zhang, D. (2016). Aquatic *Streptococcus agalactiae* Infections and their Control in Tilapia. *Journal of Aquaculture Research & Development*, 7(8), 1000427.
- Johnson, B.B., Rickard, L.N., 2022. Sense of place and perceived community change in perceived impacts of and cooperation with local aquaculture development in the US. *J. Environ. Psychol.* 84, 101882. <https://doi.org/10.1016/j.jenvp.2022.101882>
- Kamaishi, T., Miwa, S., Goto, E., Matsuyama, T., Oseko, N., 2010. Mass mortality of giant abalone *Haliotis gigantea* caused by a *Francisella* sp. bacterium. *Dis. Aquat. Organ.* 89, 145–154. <https://doi.org/10.3354/dao02188>
- Kawanishi, M., Yoshida, T., Yagashiro, S., Kijima, M., Yagyu, K., Nakai, T., Murakami, M., Morita, H., Suzuki, S., 2006. Differences between *Lactococcus garvieae* isolated from the genus *Seriola* in Japan and those isolated from other animals (trout, terrestrial animals from Europe) with regard to pathogenicity, phage susceptibility and genetic characterization. *J. Appl. Microbiol.* 101, 496–504. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02951.x>
- Kelly, A.M., Renukdas, N., Barnett, L.M., Beck, B.H., Abdelrahman, H.A., Roy, L.A., 2023. The Use of Kaolin as a Prophylactic Treatment to Prevent Columnaris Disease (*Flavobacterium cova*) in Commercial Baitfish and Sportfish Species. *Vet. Sci.* 10. <https://doi.org/10.3390/vetsci10070441>
- Kusuda, R., Kawa, K., Salat, F., Banner, C.R., Fryer, J.L., 1991. *Enterococcus seriolicida* 406–409.
- León, R., Ruiz, M., Valero, Y., Cárdenas, C., Guzman, F., Vila, M., Cuesta, A., 2020. Exploring small cationic peptides of different origin as potential antimicrobial agents in aquaculture. *Fish Shellfish Immunol.* 98, 720–727. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.11.019>
- Leung, K.Y., Siame, B.A., Tenkink, B.J., Noort, R.J., Mok, Y.K., 2012. *Edwardsiella tarda* - Virulence mechanisms of an emerging gastroenteritis pathogen. *Microbes Infect.* 14, 26–34. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.08.005>
- Lieke, T., Meinelt, T., Hoseinifar, S.H., Pan, B., Straus, D.L., Steinberg, C.E.W., 2020. Sustainable aquaculture requires environmental-friendly treatment strategies for fish diseases. *Rev. Aquac.* 12, 943–965. <https://doi.org/10.1111/raq.12365>
- Maximiano, A. de A., Fernandes, R.O. de, Nunes, F.P., Assis, M.P. de, Matos, R.V. de, Barbosa, C.G.S., Oliveira-Filho, E.C., 2005. Utilização de drogas veterinárias, agrotóxicos e afins em ambientes hídricos: demandas, regulamentação e considerações sobre riscos à saúde humana e ambiental. *Cien. Saude Colet.* 10, 483–

491. <https://doi.org/10.1590/s1413-81232005000200026>
- Meyburgh, C.M., Bragg, R.R., Boucher, C.E., 2017. *Lactococcus garvieae*: An emerging bacterial pathogen of fish. Dis. Aquat. Organ. 123, 67–79. <https://doi.org/10.3354/dao03083>
- Mohanty, B.R., Sahoo, P.K., 2007. Edwardsiellosis in fish: A brief review. J. Biosci. 32, 1331–1344. <https://doi.org/10.1007/s12038-007-0143-8>
- Naiel, M.A.E., Khames, M.K., Abdel-Razek, N., Gharib, A.A., El-Tarabily, K.A., 2021. The dietary administration of miswak leaf powder promotes performance, antioxidant, immune activity, and resistance against infectious diseases on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquac. Reports 20, 100707. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100707>
- Nguyen, V.V., Dong, H.T., Senapin, S., Pirarat, N., Rodkhum, C., 2016. Francisella noatunensis subsp. orientalis, an emerging bacterial pathogen affecting cultured red tilapia (*Oreochromis* sp.) in Thailand. Aquac. Res. 47, 3697–3702. <https://doi.org/10.1111/are.12802>
- Oidtman, B., Dixon, P., Way, K., Joiner, C., Bayley, A.E., 2018. Risk of waterborne virus spread – review of survival of relevant fish and crustacean viruses in the aquatic environment and implications for control measures. Rev. Aquac. 10, 641–669. <https://doi.org/10.1111/raq.12192>
- Olsen, R. E., Zhang, H., Sapugahawatte, D. N., Radwan, M., Evans, J. J., Klesius, P. H., Ghittino, C., Hoseinifar, S. H., Gatesoupe, F. J., Peng, B., & Zhang, D. (2016). Environmental stress and Streptococcus agalactiae infections in tilapia. Journal of Aquaculture Research & Development, 7(5), 1000413.
- Ortega, C., Irgang, R., Valladares-Carranza, B., Collarte, C., Avendaño-Herrera, R., 2020. First identification and characterization of *Lactococcus garvieae* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cultured in Mexico. Animals 10, 1–15. <https://doi.org/10.3390/ani10091609>
- Osman, K.M., Al-Maary, K.S., Mubarak, A.S., Dawoud, T.M., Moussa, I.M.I., Ibrahim, M.D.S., Hessain, A.M., Orabi, A., Fawzy, N.M., 2017. Characterization and susceptibility of streptococci and enterococci isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) showing septicemia in aquaculture and wild sites in Egypt. BMC Vet. Res. 13, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1289-8>
- Pandey, V., Hussain Bhat, R.A., Chandra, S., Tandel, R.S., Dubey, M.K., Sharma, P., Gehlot, B., Dash, P., Joshi, R., 2021. Clinical signs, lethal dose and histopathological lesions in grass carp, *Ctenopharyngodon idella* experimentally infected with Edwardsiella tarda. Microb. Pathog. 161, 105292. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105292>
- Peng, B., Zhang, D., Sapugahawatte, D. N., Radwan, M., Evans, J. J., Klesius, P. H., Ghittino, C., Hoseinifar, S. H., Gatesoupe, F. J., Olsen, R. E., & Zhang, H. (2020). Streptococcus agalactiae infections in tilapia: Prevalence and impact. Aquaculture, 515, 734529.
- Poluektova, O., Robertson, D.A., Rafferty, A., Cunney, R., Lunn, P.D., 2023. A scoping review and behavioural analysis of factors underlying overuse of antimicrobials. JAC-Antimicrobial Resist. 5, 1–11. <https://doi.org/10.1093/jacamr/dlad043>

- Ponpukdee, N., Wangman, P., Rodkhum, C., Pengsuk, C., Chaivisuthangkura, P., Sithigorngul, P., Longyant, S., 2021. Detection and identification of a fish pathogen *Flavobacterium columnare* using specific monoclonal antibodies. *Aquaculture* 545, 737231. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737231>
- Preena, P.G., Dharmaratnam, A., Swaminathan, T.R., 2022. A peek into mass mortality caused by antimicrobial resistant *Edwardsiella tarda* in goldfish, *Carassius auratus* in Kerala. *Biologia (Bratisl)*. 77, 1161–1171. <https://doi.org/10.1007/s11756-022-01007-9>
- Radwan, M., El-Sharkawy, M.A., Alabssawy, A.N., Ghanem, S.F., Mohammadein, A., Al Malki, J.S., Al-Thomali, A.W., Manaa, E.A., Soliman, R.A., Yassir, S., Mekky, A.E., Bashar, M.A.E., Darweesh, K.F., 2023. The synergy between serious parasitic pathogens and bacterial infestation in the cultured Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): a severe threat to fish immunity, causing mass mortality and significant economic losses. *Aquac. Int.* <https://doi.org/10.1007/s10499-023-01093-9>
- Rao, S., Pham, T.H., Poudyal, S., Cheng, L.W., Nazareth, S.C., Wang, P.C., Chen, S.C., 2022. First report on genetic characterization, cell-surface properties and pathogenicity of *Lactococcus garvieae*, emerging pathogen isolated from cage-cultured cobia (*Rachycentron canadum*). *Transbound. Emerg. Dis.* 69, 1197–1211. <https://doi.org/10.1111/tbed.14083>
- Reguera-Brito, M., Galán-Sánchez, F., Blanco, M.M., Rodríguez-Iglesias, M., Domínguez, L., Fernández-Garayzábal, J.F., Gibello, A., 2016. Genetic analysis of human clinical isolates of *Lactococcus garvieae*: Relatedness with isolates from foods. *Infect. Genet. Evol.* 37, 185–191. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.11.017>
- Sapugahawatte, D. N., Radwan, M., Evans, J. J., Klesius, P. H., Ghittino, C., Hoseinifar, S. H., Peng, B., Zhang, D., & Zhang, H. (2022). *Streptococcus agalactiae* in aquaculture: Prevalence and distribution. *Aquaculture Reports*, 22, 100884.
- Schar, D., Klein, E.Y., Laxminarayan, R., Gilbert, M., Van Boeckel, T.P., 2020. Global trends in antimicrobial use in aquaculture. *Sci. Rep.* 10, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78849-3>
- Sebastião, F.A., Furlan, L.R., Hashimoto, D.T., Pilarski, F., 2015. Identification of Bacterial Fish Pathogens in Brazil by Direct Colony PCR and 16S rRNA Gene Sequencing. *Adv. Microbiol.* 05, 409–424. <https://doi.org/10.4236/aim.2015.56042>
- Shahi, N., Mallik, S.K., Sahoo, M., Chandra, S., Singh, A.K., 2018. First report on characterization and pathogenicity study of emerging *Lactococcus garvieae* infection in farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), from India. *Transbound. Emerg. Dis.* 65, 1039–1048. <https://doi.org/10.1111/tbed.12843>
- Shahin, K., Veek, T., Heckman, T.I., Littman, E., Mukkatira, K., Adkison, M., Welch, T.J., Imai, D.M., Pastenkos, G., Camus, A., Soto, E., 2022. Isolation and characterization of *Lactococcus garvieae* from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, from California, USA. *Transbound. Emerg. Dis.* 69, 2326–2343. <https://doi.org/10.1111/tbed.14250>
- Soto, E., Fernandez, D., Hawke, J.P., 2009. Attenuation of the fish pathogen *Francisella* sp. by mutation of the *iglC** gene. *J. Aquat. Anim. Health* 21, 140–149.

<https://doi.org/10.1577/H08-056.1>

- Soto, E., Abrams, S.B., Revan, F., 2012. Effects of temperature and salt concentration on *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* infections in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Dis. Aquat. Organ.* 101, 217–223. <https://doi.org/10.3354/dao02533>
- Soto, E., Gatesoupe, F. J., Olsen, R. E., Zhang, H., Sapugahawatte, D. N., Radwan, M., Evans, J. J., Klesius, P. H., Ghittino, C., Hoseinifar, S. H., Peng, B., & Zhang, D. (2018). *Streptococcus agalactiae* infections in tilapia: Harmful effects and management strategies. *Journal of Aquaculture Research & Development*, 9(10), 1000522.
- Suwannasang, A., Dangwetngam, M., Issaro, A., Phromkunthong, W., Suanyuk, N., 2014. Pathological manifestations and immune responses of serotypes Ia and III *Streptococcus agalactiae* infections in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 36, 499–506.
- Teixeira, L.M., Merquior, V.L.C., Vianni, M.D.C.E., Carvalho, M.D.G.S., Fracalanza, S.E.L., Steigerwalt, A.G., Brenner, D.J., Facklam, R.R., 1996. Phenotypic and genotypic characterization of atypical *Lactococcus garvieae* strains isolated from water buffalos with subclinical mastitis and confirmation of *L. garvieae* as a senior subjective synonym of *Enterococcus seriolicida*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 664–668. <https://doi.org/10.1099/00207713-46-3-664>
- Tiseo, K., Huber, L., Gilbert, M., Robinson, T.P., Van Boeckel, T.P., 2020. Global trends in antimicrobial use in food animals from 2017 to 2030. *Antibiotics* 9, 1–14. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9120918>
- Tomioka, H., Nakagami, H., Tenma, A., Saito, Y., Kaga, T., Kanamori, T., Tamura, N., Tomono, K., Kaneda, Y., Morishita, R., 2014. Novel anti-microbial peptide SR-0379 accelerates wound healing via the PI3 kinase/Akt/mTOR pathway. *PLoS One* 9, 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092597>
- Valladão, G.M.R., Gallani, S.U., Pilarski, F., 2015. Phytotherapy as an alternative for treating fish disease. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 38, 417–428. <https://doi.org/10.1111/jvp.12202>
- Vaneci-Silva, D., Assane, I.M., de Oliveira Alves, L., Gomes, F.C., Moro, E.B., Kotzent, S., Pitondo-Silva, A., Pilarski, F., 2022. *Klebsiella pneumoniae* causing mass mortality in juvenile Nile tilapia in Brazil: Isolation, characterization, pathogenicity and phylogenetic relationship with other environmental and pathogenic strains from livestock and human sources. *Aquaculture* 546, 2–8. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737376>
- Vaz Rodrigues, M., Falcone-Dias, M.F., Juliana Francisco, C., Silva David, G., da Silva, R.J., Araújo Júnior, J.P., 2019. *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from Brazilian aquaculture: a public health problem. *Emergent Life Sci. Res.* 5, 48–55. <https://doi.org/10.31783/elsr.2019.514855>
- Vendrell, D., Balcázar, J.L., Ruiz-Zarzuela, I., de Blas, I., Gironés, O., Múzquiz, J.L., 2006. *Lactococcus garvieae* in fish: A review. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 29, 177–198. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2006.06.003>
- Wang, Q., Fu, T., Li, X., Luo, Q., Huang, J., Sun, Y., Wang, X., 2020. Cross-immunity in Nile tilapia vaccinated with *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus iniae*

- vaccines. Fish Shellfish Immunol. 97, 382–389. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.12.021>
- Wonmongkol, P., Sukhavachana, S., Ampolsak, K., Srisapoome, P., Suwanasopee, T., Poompuang, S., 2018. Genetic parameters for resistance against *Flavobacterium columnare* in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). J. Fish Dis. 41, 321–328. <https://doi.org/10.1111/jfd.12728>
- Xia, X., Cheng, L., Zhang, S., Wang, L., Hu, J., 2018. The role of natural antimicrobial peptides during infection and chronic inflammation. Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol. 111, 5–26. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0929-0>
- Yamashita, H., Evans, J. J., Klesius, P. H., Ghittino, C., Hoseinifar, S. H., Sapugahawatte, D. N., Radwan, M., Peng, B., Zhang, D., & Zhang, H. (2020). Economic losses due to *Streptococcus agalactiae* infections in aquaculture. Aquaculture, 542, 736890.
- Zawisza, M., Chadzinska, M., Steinhagen, D., Rakus, K., Adamek, M., 2023. Gill disorders in fish: Lessons from poxvirus infections. Rev. Aquac. 1–20. <https://doi.org/10.1111/raq.12835>
- Zhang, H., Radwan, M., Sapugahawatte, D. N., Evans, J. J., Klesius, P. H., Ghittino, C., Hoseinifar, S. H., Gatesoupe, F. J., Peng, B., & Zhang, D. (2016). Husbandry practices and *Streptococcus agalactiae* infections in tilapia. Journal of Aquaculture Research & Development, 7(6), 1000417.
- Zhang, D., Sapugahawatte, D. N., Radwan, M., Evans, J. J., Klesius, P. H., Ghittino, C., Hoseinifar, S. H., Gatesoupe, F. J., Peng, B., & Zhang, H. (2019). Mechanisms of *Streptococcus agalactiae* infections in tilapia. Aquaculture, 513, 734423.
- Zhang, X., Sun, Z., Cai, J., Wang, J., Wang, G., Zhu, Z., Cao, F., 2020. Effects of dietary fish meal replacement by fermented moringa (*Moringa oleifera* Lam.) leaves on growth performance, nonspecific immunity and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* in juvenile gibel carp (*Carassius auratus gibelio* var. CAS III). Fish Shellfish Immunol. 102, 430–439. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.04.051>.

**CAPÍTULO 2 – SOBREVIVÊNCIA DE TILÁPIA-DO-NILO ALIMENTADAS
COM DIETA SUPLEMENTADA COM PEPTÍDIO BIOATIVO E DESAFIADAS
EXPERIMENTALMENTE COM *Streptococcus agalactiae***

SOBREVIVÊNCIA DE TILÁPIA-DO-NILO ALIMENTADAS COM DIETA SUPLEMENTADA COM PEPTÍDIO BIOATIVO E DESAFIADAS EXPERIMENTALMENTE COM *Streptococcus agalactiae*

^a Graduate program in Aquaculture, Laboratory of Microbiology and Parasitology of Aquatic Organisms, São Paulo State University (UNESP), Aquaculture Center of Unesp (CAUNESP), Jaboticabal, São Paulo, Brazil, 14.884-900

^b Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Zambeze (UniZambeze), Ulónguê, Tete, Mozambique 0713-02

^cGraduate Program in Agricultural and Livestock Microbiology, São Paulo State University (UNESP), School of Agricultural and Veterinarian Sciences, Jaboticabal, São Paulo, Brazil, 14884-900

*Corresponding author at Laboratory of Microbiology and Parasitology of Aquatic Organisms, São Paulo State University (UNESP), Aquaculture Center of Unesp, Jaboticabal, São Paulo, 14884-900, Brazil email: fabiana.pilarski@unesp.br

RESUMO

O crescente aumento na demanda por produtos oriundos da aquicultura destaca o seu papel vital na segurança alimentar global. No entanto, as doenças bacterianas representam ameaças significativas à sustentabilidade e à rentabilidade desta cadeia em expansão. Os peptídeos bioativos (PB) oferecem uma alternativa promissora aos antimicrobianos convencionais, com diversas propriedades antimicrobianas, potencial imunomodulador e compatibilidade ambiental. Partindo desta premissa, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da suplementação dietética com PB nas respostas imunológicas da tilápia-do-Nilo desafiada com *Streptococcus agalactiae*. Um delineamento experimental inteiramente casualizado incluiu quatro tratamentos recebendo doses variadas de PB (1,0, 2,0, 3,0 e 4,0 kg/ton) T1 a T4 respectivamente e um tratamento controle sem adição do produto, cada um com quatro repetições. Os peixes foram alimentados com as dietas experimentais durante 90 dias, e avaliados parâmetros imunológicos antes e após o desafio bacteriano. Após 90 dias, foram observadas variações na atividade respiratória dos leucócitos, significativamente menores no tratamento 4, que recebeu maior quantidade de PB, e expressou um resultado de (0,397) e maiores no controle com resultado de (0,477). Pós-desafio bacteriano, o controle exibiu a menor explosão respiratória (0,375), diferindo significativamente dos tratamentos suplementados com peptídeo, particularmente nos tratamentos 1 (0,524) e 2 (0,505). A atividade da lisozima apresentou diferenças significativas, maiores nos tratamentos suplementados ($p < 0,001$). A via alternativa do sistema complemento apresentou disparidades, com menores tempos de lise pós-

suplementação, principalmente no G1 e G2 (2.040 e 2.004 minutos). Os níveis de glicemia diminuíram significativamente pós-dieta ($p < 0,001$), persistindo após o desafio, com valores inferiores ao controle. A concentração de proteína total aumentou significativamente no grupo 2 pós-dieta, enquanto os níveis de albumina aumentaram no G2 e G3. A histopatologia hepática mostrou alterações moderadas pós-suplementação. Após o desafio, todos os grupos suplementados apresentaram alterações moderadas. Observações comportamentais indicaram comportamentos pré-desafio no controle, enquanto alterações graves nos órgãos foram observadas no controle positivo. Após o desafio bacteriano, foi observada mortalidade em todos os grupos suplementados, com G1 e G2 apresentando mortalidade mais precoce às 288 horas. As taxas de sobrevivência foram de 63,8% para G1, 58,7% para G2, 59,5% para G3 e 56,9% para G4, enquanto o grupo controle positivo teve uma taxa de sobrevivência menor de 46,5%. Por outro lado, o grupo controle negativo não apresentou mortalidade. A análise de persistência bacteriana identificou a presença de *S. agalactiae* exclusivamente no grupo controle positivo, destacando sua susceptibilidade à colonização bacteriana. A suplementação dietética de PB melhora as respostas imunológicas e reduz a mortalidade da tilápia após-desafio bacteriano com *S. agalactiae*, sugerindo benefícios potenciais para o manejo da estreptococose.

Palavras-chave: Aquicultura, Peptídeos bioativos, Respostas imunológicas, Persistência bacteriana

ABSTRACT

Key words: Aquaculture, Bioactive peptides, Immune responses, Bacterial persistence

1. Introdução

A aquicultura tornou-se uma indústria essencial para satisfazer a crescente demanda global por produtos aquícolas (Boyd et al., 2020). No entanto, um dos desafios significativos enfrentados pelos aquicultores é o manejo de doenças bacterianas que podem afetar gravemente peixes, camarões e outras espécies aquáticas (Raja & Jithendran, 2015). As infecções bacterianas representam uma ameaça substancial à sustentabilidade e rentabilidade na aquicultura (Hemamalini et al., 2021). Estas doenças podem propagar-se rapidamente em ambientes aquáticos densamente povoados, provocando mortalidade em massa e perdas econômicas (Bouwmeester et al., 2021).

Os antimicrobianos convencionais têm sido uma opção de tratamento primária, mas as suas desvantagens, tais como o desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos, preocupações com resíduos e danos à microbiota benéfica, ressaltam a necessidade de soluções alternativas (Hossain et al., 2021; Zhou et al., 2023). Em resposta, o uso de peptídeos bioativos (PB) como abordagem terapêutica alternativa ganhou atenção nos últimos anos, uma vez que os peptídeos têm se mostrado promissores devido sua versatilidade de uso e por serem ecologicamente seguros para o manejo de doenças bacterianas na aquicultura, e fortalecimento do sistema imunológico dos animais (Brunner et al. 2020; Kouhonde et al., 2022; Langlois et al., 2022).

Os peptídeos, cadeias curtas de aminoácidos, surgiram como ferramentas promissoras na aquicultura devido à suas inúmeras propriedades bioativas (Salhoff et al., 2019; Piovesana, et al., 2019). Muitos peptídeos possuem atividades antimicrobianas potentes contra vários patógenos aquáticos, incluindo bactérias responsáveis por doenças como franciselose, aeromoniose, lactococose, vibriose, columnariose e estreptococose (Lehrer et al., 2003; Marr et al., 2006; Steckbeck et al., 2014; Yang et al., 2020; Ma et al., 2020; Vaneci-Silva et al., 2022). Sendo essa última, ocasionada pela bactéria *Streptococcus agalactiae* e responsável por causar surtos de mortalidade mundialmente (Sapugahawatte et al., 2022; Radwan et al., 2023).

Esses peptídeos podem romper as membranas celulares bacterianas, inibir a síntese proteica e interferir em seus processos metabólicos essenciais. Além disso, apresentam uma baixa probabilidade de induzir resistência bacteriana em comparação aos antimicrobianos tradicionais. Isto se deve aos seus diversos modos de ação, tornando um

desafio para as bactérias desenvolverem mecanismos de resistência (Zhu et al., 2022; Yang et al., 2022; Li et al., 2022).

Os peptídeos são biodegradáveis e não persistem nos ecossistemas aquáticos, reduzindo as preocupações com a contaminação ambiental, e podendo apresentar seletividade para bactérias patogênicas, ao mesmo tempo que poupam microrganismos benéficos, preservando assim o equilíbrio do microbioma aquático (Muthukumar et al., 2021; Ashokkumar et al., 2022; Yang et al., 2022).

Outro ponto importante a ser destacado, é o vasto potencial dos peptídeos na consolidação da saúde animal, visto que pode modular o sistema imunológico ativando células imunológicas e aumentando sua capacidade de reconhecer e combater patógenos, mitigando os efeitos negativos do estresse, aumentando o crescimento e produtividade (Gyan et al., 2019; Deng et al., 2021; Zacccone et al., 2022). Também possuem atividades antioxidantes, ajudando a reduzir o estresse oxidativo, que pode enfraquecer o sistema imunológico, e anti-inflamatórias, o que pode reduzir os impactos negativos da inflamação (Pan et al., 2017; Tu et al., 2022; Yang et al., 2022).

Desta forma, os peptídeos bioativos representam um caminho promissor para reduzir os impactos negativos de doenças bacterianas na aquicultura. A sua eficácia antimicrobiana, o desenvolvimento mínimo de resistência, o fortalecimento do sistema imunológico e a segurança ambiental tornam os peptídeos uma ferramenta valiosa para garantir a saúde e a sustentabilidade na aquicultura frente aos patógenos bacterianos.

2. Material e Métodos

2.1. Comitê de ética

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos (LAPOA) do Centro de Aquicultura da Unesp - CAUNESP, campus de Jaboticabal. O protocolo utilizado neste experimento está de acordo com as diretrizes estipuladas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob protocolo de nº 9472/22.

2.2. Peixes e condições experimentais

Os peixes foram adquiridos em piscicultura comercial localizada no estado de São Paulo, com peso aproximado de $33,8 \pm 4,96$ g. Foram utilizados um total de 1.200 tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), distribuídas em 24 tanques de 500 L com aeração constante, sistema de renovação de água independente e aclimatados durante 15 dias. Durante o período experimental, a temperatura da água, pH, condutividade e os níveis de oxigênio foram mensurados conforme tabela 1.

Tabela 1. Média dos parâmetros físico-químicos da água mensurados durante a o período de experimentação.

Temperatura °C	28,02±1,64
pH	7,82±0,14
Condutividade µS/cm	171,3±2,55
Oxigênio Dissolvido mg/L	7,1± 0,65

2.3. Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos (1,0 kg de peptídeo bioativo/tonelada (T1), 2,0 kg de peptídeo bioativo /tonelada (T2), 3,0 kg de peptídeo bioativo /tonelada (T3) e 4,0 kg de peptídeo bioativo /tonelada (T4)) e duas dietas controle (sem adição do produto na dieta) sendo uma utilizada anterior ao desafio bacteriano e as duas utilizadas posterior ao desafio bacteriano como controle positivo e controle negativo (C – e C+), com quatro repetições (tanques). Os animais foram alimentados com dieta controle por 15 dias para o processo de aclimação, e posteriormente por 90 dias com as dietas experimentais supracitadas, as quais foram fornecidas quatro vezes ao dia (8h00min, 11h00min, 14h00min e 17h00min).

Ao fim dos 90 dias de alimentação, os peixes foram pesados, medidos, e foram realizadas coletas de amostras sanguíneas de três animais de cada unidade experimental (tanque) para análises imunológicas, bioquímicas e indicadores de estresse (glicemia), coleta do fígado, rim e baço para análises histopatológicas e posteriormente desafiados com *S. agalactiae*.

Após estabilização da mortalidade após desafio bacteriano, foram coletadas amostras de sangue de três peixes de cada tratamento e realizada as mesmas análises descritas na realização de coleta de 90 dias.

2.4. Atividade respiratória dos leucócitos (Burst oxidativo), Atividade sérica da lisozima e Atividade hemolítica do sistema complemento (Via alternativa)

2.4.1. Burst oxidativo

A atividade respiratória dos leucócitos (Burst oxidativo) foi mensurada a partir da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) seguindo a metodologia descrita por Anderson e Siwicki (1995) e modificada por Biller-Takahashi et al., (2013). Para tanto, 50 µL de sangue heparinizado foi adicionado a um volume igual de tampão azul de nitrotetrazólio (NBT; Sigma-Aldrich, MO, USA) (0,2%) por 30 min a temperatura ambiente. Após a incubação, 50µL da solução foi adicionada à 1mL de N,N-dimetilformamida (Sigma- Aldrich, MO, USA), e em seguida centrifugada a 3.000 G por 5 min. O sobrenadante foi lido em espectrofotômetro (Unico, Feixe série 2100) a 540nm de absorbância.

2.4.2. Lisozima

A concentração da lisozima foi determinada segundo metodologia proposta por Ellis (1990), modificada por Abreu (2009) e Biller-Takahashi et al., (2013). Brevemente, 50 µL de soro foi adicionado a 75 µL de tampão fosfato monobásico (lysozyme - Sigma-Aldrich, Germany), posteriormente, 100 µL de solução contendo *Micrococcus lysodeikticus* (0,2 mg mL⁻¹), em seguida homogeneizada e incubada por 1 hora. A leitura foi realizada em leitor de microplacas ELISA (ThermoPlate Reader MN) e medida pela redução da absorbância da solução à 450 nm a cada cinco minutos, durante dez minutos.

2.4.3. Atividade do sistema complemento

A atividade do sistema complemento (ACH50 - via alternativa) foi mensurada conforme a metodologia descrita por Zanuzzo et al., (2015). Para tanto, 25 µl de cada

amostra de soro foi adicionada a 75µl de solução tampão contendo TEA-EGTA-Mg²⁺ (ácido trietanolamina etilenoglicol tetracético, 8 mM, 2 mM de Mg²⁺ e 0,1 % de gelatina) e posteriormente adicionados à 200 µl de solução contendo hemácias de coelho (2x10⁸ células por mL). A análise foi realizada em leitor de microplacas ELISA (EPOCH 2, BioTek) para avaliação do tempo requerido em segundos para a densidade óptica ser reduzida pela metade (50 % de hemólise de hemácias de coelho pela via alternativa do complemento). A atividade foi transformada pela seguinte fórmula: ACH50 = 1 / leitura da amostra de acordo com Zanuzzo et al., (2017).

2.5. Perfil bioquímico

2.5.1. Concentração plasmática de glicose

A concentração de glicose foi aferida por meio de glicosímetro digital Accu-Chek® Performa (Roche Diagnostics GmbH, BW, Alemanha), este método é baseado em reações eletroquímicas, conhecidas como sistema amperométrico.

2.5.2. Proteínas totais, Albumina, Globulina e Relação Albumina x Globulina

A avaliação das proteínas totais foi mensurada pelo método de biureto e albumina pelo método de bromocresol, utilizando-se kits comerciais (Labtest, Minas Gerais, Brasil). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro marca Unico Spectrophotometer 2100 em comprimento de onda 540 nm.

Para determinar os valores de globulina presentes nas amostras de sangue, foi utilizado cálculo matemático de subtração, onde os valores de absorvência encontrado nas amostras de proteína foram subtraídos dos valores obtidos na albumina. Logo:

Proteínas totais - Albumina = Globulina.

Já a relação Albumina x Globulina, se deu pela divisão do valor da albumina pela globulina.

2.6. Desafio bacteriano com *S. agalactiae*

Colônias da bactéria (cepa D115C) sob chave de acesso Genbank - KU605571 foram cultivadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion, KASV, K25-1400) e incubadas em estufa microbiológica a 28°C por 48 horas. Posteriormente, o caldo foi lavado duas vezes

com solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH = 7,4) por centrifugação (3000 ×g, 4°C por 10 min) e a suspensão bacteriana foi ajustada em concentração de 0,3nm (OD625nm), equivalente a $2,4 \times 10^6$ estabelecida em estudo prévio de DL50 e confirmadas pelo método de contagem em placas de Petri.

Posteriormente, os peixes foram inoculados com 0,1mL de solução bacteriana para cada 10g de peso vivo e o grupo controle negativo recebeu a mesma concentração de PBS. Os sinais clínicos da infecção nos animais e mortalidade foram acompanhados diariamente durante 21 dias, e amostras de rim cranial e cérebro dos animais recém mortos foram coletados para reisolamento da bactéria e confirmação da infecção pelo patógeno.

2.7. Persistência bacteriana

Após cessar a mortalidade, as tilápias sobreviventes foram direcionados ao laboratório de microbiologia (LAPOA) para reisolamento bacteriano, com intuito de verificar presença/ausência do patógeno no organismo dos animais.

Amostras de rim cranial e cérebro foram coletados com alça de Platina de forma asséptica e estriados em placa de Petri contendo BHI (Brain Heart Infusion, KASV, K25-1400) com adição de 1,5% de ágar, e incubados por 48 horas em estufa microbiológica.

2.8. Análise estatística

Os dados foram submetidos a análises estatísticas utilizando o programa SAS Studio (University Edition). Foi adotado o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijm} = \mu + T_i + C_j + A_m + (TC)_{ij} + \epsilon_{ijm}$$

Em que Y_{ijm} é o valor observado para a variável resposta no m-ésimo animal submetido ao i-ésimo tratamento de peptídeos e no j-ésimo tempo de coleta; μ é a média geral; T_i é o efeito do i-ésimo tratamento de peptídeos; C_j é o efeito do j-ésimo tempo de coleta; A_m é o efeito aleatório do m-ésimo animal; $(TC)_{ij}$ é o efeito da interação entre o i-ésimo tratamento de peptídeos e o j-ésimo tempo de coleta e, ϵ_{ijm} é o erro experimental associado ao m-ésimo animal, i-ésimo tratamento de peptídeos, e j-ésimo tempo de coleta

A análise de variância foi conduzida por meio do teste F (ANOVA). As pressuposições de normalidade dos resíduos, homogeneidade de variância e

independência das observações foram avaliadas de forma gráfica e por meio dos testes de Shapiro-Wilk (SHAPIRO; WILK, 1965), Bartlett (BARTLETT, 1937) e Durbin-Watson (DURBIN; WATSON, 1950, 1951), respectivamente e adotando um nível de significância de 5% de probabilidade. A transformação de Box-Cox (BOX; COX, 1964) foi empregada para variáveis onde as pressuposições não foram atendidas ($P < 0,05$).

3. Resultados

3.1. Atividade respiratória dos leucócitos (Burst oxidativo)

A atividade respiratória dos leucócitos apresentou diferença significativa ($P=0,013$) entre os tratamentos durante o período de alimentação com as dietas experimentais de 90 dias. Observou-se uma menor atividade (0,397) nos peixes pertencentes a T4, dieta suplementada com 4,0 kg de peptídeo bioativo /tonelada, e maior atividade no controle - C (0,477). As tilápias pertencentes aos tratamentos (T1, T2 e T3) dieta suplementada com 1,0 kg, 2,0 kg e 3,0 kg de peptídeo bioativo /tonelada respectivamente não diferiram entre si. Bem como não diferiram do T4 (Figura 1). Após desafio bacteriano, o burst respiratório apresentou diferença significativa ($P>0,0001$), e o menor valor observado (0,375) foi conferido ao tratamento controle, diferindo significativamente dos demais grupos alimentados com dieta suplementada com peptídeo, em que os valores foram superiores em todos os grupos alimentados com o PB, com maiores atividades expressas no T1 (0,524) e T2 (0,505) (Figura 1).

3.2. Atividade Lisozima

A atividade da lisozima não demonstrou diferença significativa ($p<0,05$) entre os tratamentos que receberam dietas suplementadas com peptídeos e o controle após 90 dias (Figura 1). Entretanto, os animais que receberam dietas suplementadas com o peptídeo demonstraram diferença significativa ($p<0,001$) quando comparados ao controle, que exibiu o menor valor de atividade da lisozima (123,565). Os tratamentos 1 (444.937) e 2 (405.148) apresentaram os valores mais elevados de atividade da lisozima, diferindo significativamente tanto do controle como dos demais tratamentos (Figura 1).

3.3. Atividade do sistema complemento

A atividade da via alternativa do sistema complemento apresentou diferença ($P > 0,001$) em ambos os períodos analisados (Figura 1). Os tratamentos T1 e T2, suplementados com 1,0 e 2,0 kg de peptídeo bioativo por tonelada de ração, exibiram tempos de lise mais curtos (2,040 e 2,004 minutos) após 90 dias de suplementação dietética. Por outro lado, as tilápias dos tratamentos T3 e T4 demonstraram tempos de lise celular de (2,941 e 4,226 minutos), significativamente menores que o controle (C), que apresentou tempo de lise de (6,221 minutos), excedendo o triplo de tempo demonstrado pelo T1 e T2 para ativar o sistema complemento e induzir a lise celular (Figura 1).

Após o desafio bacteriano, fato semelhante foi observado nas tilápias que receberam dietas suplementadas com peptídeos, indicando tempos de lise celular mais curtos em comparação com o controle. Os tratamentos T1, T2, T3 e T4 reduziram notavelmente o tempo necessário para ativar as células de defesa (1,485; 1,656; 1,613; e 1,953 minutos). Em contraste, o controle necessitou de um tempo mais longo (4.041 minutos) para ativar o sistema complemento (Figura 1).

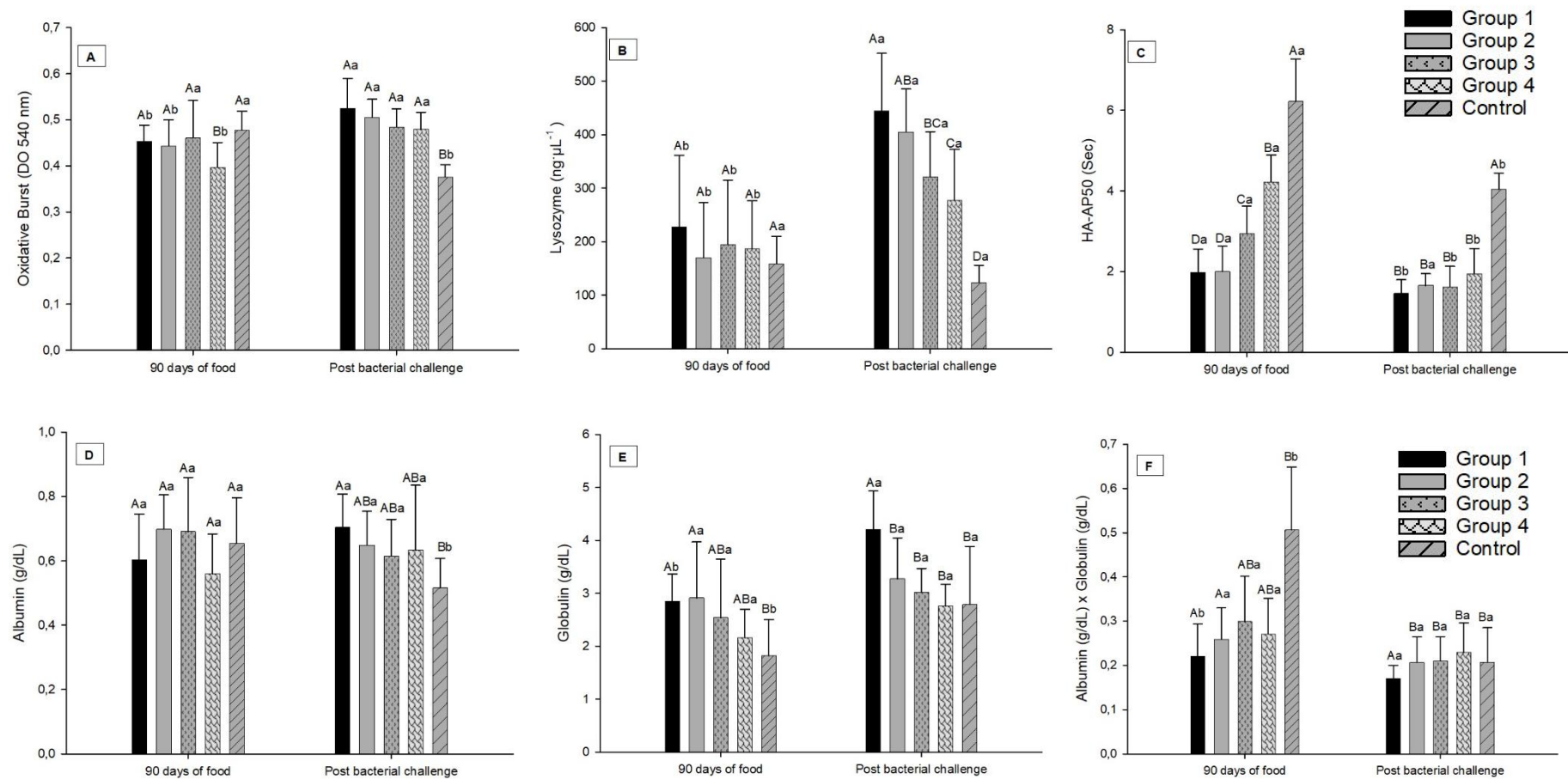


Figura 1. Atividade respiratória de leucócitos (A), atividade da Lisozima (B), atividade hemolítica do sistema complemento (Via alternativa) (C), albumina (D), globulina (E), relação albumina e globulina (F) de tilapia-do-Nilo alimentadas por 90 dias com dietas contendo peptídeo bioativo, e após desafio com *S. agalactiae*. Letras minúsculas distintas indicam diferenças entre os tempos de coleta. Letras maiúsculas indicam diferenças entre grupos em um mesmo tempo de amostragem, pelo teste SNK ($P < 0,05$).

3.4. Glicose

Após um período de alimentação de 90 dias, os níveis de glicemia dos T1, T2, T3 e T4 apresentaram redução significativa em comparação ao (C) ($p < 0,001$). Este fenômeno persistiu após o desafio bacteriano, em que os níveis de glicemia permaneceram notavelmente mais baixos nos animais tratados em comparação ao (C). No entanto, foi observada uma elevação nos níveis de glicose no sangue em todos os tratamentos quando comparados apenas dentro de grupos equivalentes após o desafio bacteriano. Notavelmente, a discrepância entre os tratamentos que receberam suplementação dietética com o peptídeo bioativo (T1, T2, T3 e T4) e o controle foi acentuada, em que os tratamentos que receberam a suplementação com o PB reduzindo quase pela metade os valores observados no (C) em ambos os momentos, conforme ilustrado na Tabela 2.

3.5. Proteínas totais, Albumina, Globulina e Relação Albumina x Globulina

Diferenças significativas ($p > 0,006$) foram evidentes nas variáveis bioquímicas analisadas (Tabela 2). Após 90 dias de alimentação, a concentração de proteína total foi maior (3,613 g/dL) nas tilápias alimentadas com dieta suplementada com 2,0 kg de peptídeo bioativo por tonelada e menor no controle (2,473 g/dL). T1, T3 e T4, que receberam dietas suplementadas com 1,0, 3,0 e 4,0 kg de peptídeo bioativo por tonelada apresentaram valores maiores que o (C) (3,456, 3,232 e 2,715). No entanto, foram considerados estatisticamente semelhantes ao controle (Tabela 2).

Após o desafio bacteriano, foi observada diferença ($p > 0,0001$) tanto nos peixes alimentados com dieta suplementada como PB quanto no controle. A concentração de proteína total no T1 aumentou 1,461 g/dL após o desafio com *S. agalactiae*, atingindo 4,917 g/dL. Por outro lado, o controle apresentou menor valor (3,097 g/dL), menos da metade da magnitude observada no T1. Apesar de se destacar após 90 dias de alimentação, o T2, suplementado com 2,0 kg de peptídeo bioativo, apresentou menor valor após o desafio bacteriano em relação ao T1 e T4, conforme apresentado na Tabela 2.

Os valores de albumina após 90 dias de alimentação revelaram aumento nos tratamentos T2 e T3, com valores de 0,699 g/dL e 0,691 g/dL. Embora diferenças estatísticas tenham sido evidentes ($p > 0,044$), não foram observados valores significativos

quando comparado ao (C), que apresentou valor de 0,655 g/dL. Os menores valores de albumina foram observados no T4, conforme detalhado na Tabela 2.

Os valores de globulina apresentaram diferença (P,0,01), com aumento acentuado no tratamento controle (2,913 g/dL).

Tabela 2. Parâmetros bioquímicos da tilápia-do-Nilo alimentadas com dieta suplementada com peptídeo bioativo e desafiadas com *S. agalactiae*

Tratamentos	Proteína total (g/dL)				Albumina (g/dL)				Globulina (g/dL)				Albumina X Globulina (g/dL)			
T1	3,456	±	0,463	ab	0,603	±	0,142	ab	2,853	±	0,510	a	0,220	±	0,073	b
T2	3,613	±	1,060	a	0,699	±	0,106	a	2,913	±	1,057	a	0,259	±	0,071	b
T3	3,232	±	1,131	ab	0,691	±	0,168	a	2,541	±	1,104	ab	0,299	±	0,103	ab
T4	2,715	±	0,552	ab	0,559	±	0,125	b	2,156	±	0,542	ab	0,271	±	0,081	ab
Controle (C)	2,473	±	0,670	b	0,655	±	0,142	ab	1,818	±	0,686	b	0,506	±	0,142	a
T1	4,917	±	0,766	a	0,704	±	0,103	a	4,213	±	0,718	a	0,170	±	0,030	
T2	4,386	±	0,679	b	0,649	±	0,106	a	3,277	±	0,770	b	0,207	±	0,057	
T3	3,859	±	0,376	c	0,615	±	0,114	ab	3,019	±	0,450	b	0,210	±	0,055	
T4	3,873	±	0,539	c	0,633	±	0,202	a	2,756	±	0,415	b	0,229	±	0,067	
Controle (C)	3,097	±	0,459	d	0,516	±	0,092	b	2,789	±	1,100	b	0,207	±	0,078	
<i>P-value</i>																
90 dias	0,006				0,044				0,008				0,013			
Pós desafio	<.0001				0,020				<.0001				0,265			
Trat xTempo	0,085				0,012				0,042				0,022			

3.6. Análise histopatológica

Após 90 dias de suplementação dietética com PB, foram observadas alterações histológicas moderadas no tecido hepático de todos os peixes (Tabela 3 e 4).

Tabela 3. Alterações histológicas de acordo com o grau de intensidade: ausência de alteração (-), alteração leve (+), alteração moderada (++) e alteração grave (*) em tilápia-do-Nilo alimentadas por 90 dias com Peptídeo Bioativo (PB).

Alterações	Baço					Fígado					Rim				
	T1	T2	T3	T4	C	T1	T2	T3	T4	C	T1	T2	T3	T4	C
Presença de degeneração Glicogênica	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Presença de Centro de melanomacrófago	+	+	+	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Infiltrados inflamatórios	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Presença de degeneração hidrópica	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 4. Alterações histológicas de acordo com o grau de intensidade: ausência de alteração (-), alteração leve (+), alteração moderada (++) e alteração grave (*) em tilápia-do-Nilo alimentadas por 90 dias com Peptídeo Bioativo (PB) e desafiadas com *Streptococcus agalactiae*.

Alterações	Baço						Fígado						Rim					
	T1	T2	T3	T4	C+	C-	T1	T2	T3	T4	C+	C-	T1	T2	T3	T4	C+	C-
Presença de degeneração Glicogênica	-	-	-	-	-	-	++	++	++	++	-	+	-	-	-	-	-	-
Presença de Centro de melanomacrófago	++	++	++	++	++	++	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	+	-
Infiltrados inflamatórios	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Alterações histopatológicas leves a moderadas também foram observadas nos tecidos esplênicos de todos os grupos experimentais. Curiosamente, a patologia renal permaneceu inalterada. Por outro lado, alterações histopatológicas leves foram evidenciadas no baço e no fígado do grupo controle não tratado (C-), conforme ilustrado na Figura 3.

Após o desafio bacteriano, foi observada uma progressão para alterações moderadas no baço e no fígado de todos os peixes que receberam dieta suplementada com peptídeo bioativo (T1, T2, T3 e T4), conforme ilustrado na Figura 4. Notavelmente, as alterações renais foram observadas apenas no controle positivo (C+) pós-desafio.

Foi observado leve alteração no fígado e baço do controle negativo (C-) antes do desafio bacteriano. Em contraste, os animais do grupo controle positivo (C+) exibiram alterações renais leves juntamente com alterações esplênicas e hepáticas moderadas a graves, conforme representado na Figura 3.

Centros de melanomacrófagos (MMCs) foram observados no baço de todos os tratamentos experimentais e controle (T1, T2, T3, T4, C- e C+), com infiltrados inflamatórios evidentes nos peixes do C+.

O fígado das tilápias do (C+) apresentou lesões conspícuas, incluindo degeneração glicogênica e presença de centros melanomacrófagos. Por outro lado, outros grupos experimentais exibiram alterações hepáticas variando de leves aos 90 dias após a suplementação dietética a moderadas após o desafio com a bactéria, conforme representado na Figura 3 e 4.

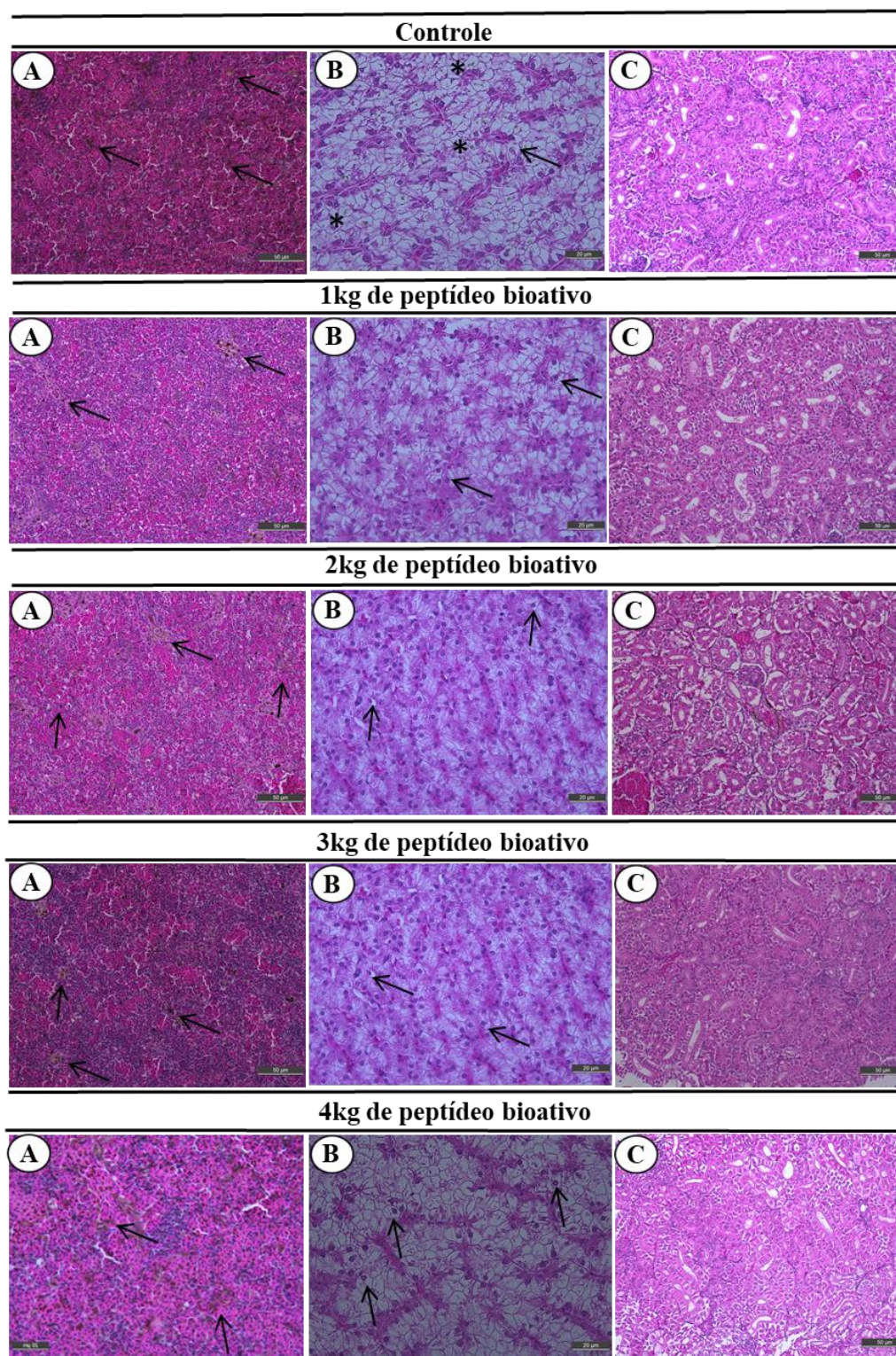


Figura 3. Alterações histológicas identificadas por setas e asteriscos observadas em tilápia-do-Nilo pós 90 dias de suplementação alimentar. As imagens são descritas por Colunas (A, B e C) referentes ao Baço, Fígado e Rim. E em sequência de linhas em ordem de tratamento: Linha 1: Controle -; Linhas de 2 a 6: T1, T2, T3 e T4. [A]. Baço com acúmulo de centros de melanomacrófagos de maneira discreta (Seta); [B] Fígado com degeneração Glicogênica nos grupos tratados e Presença de degeneração hidrópica, de forma discreta no controle; [C]. Nada digno de Nota. Coloração com Hematoxilina & Eosina.

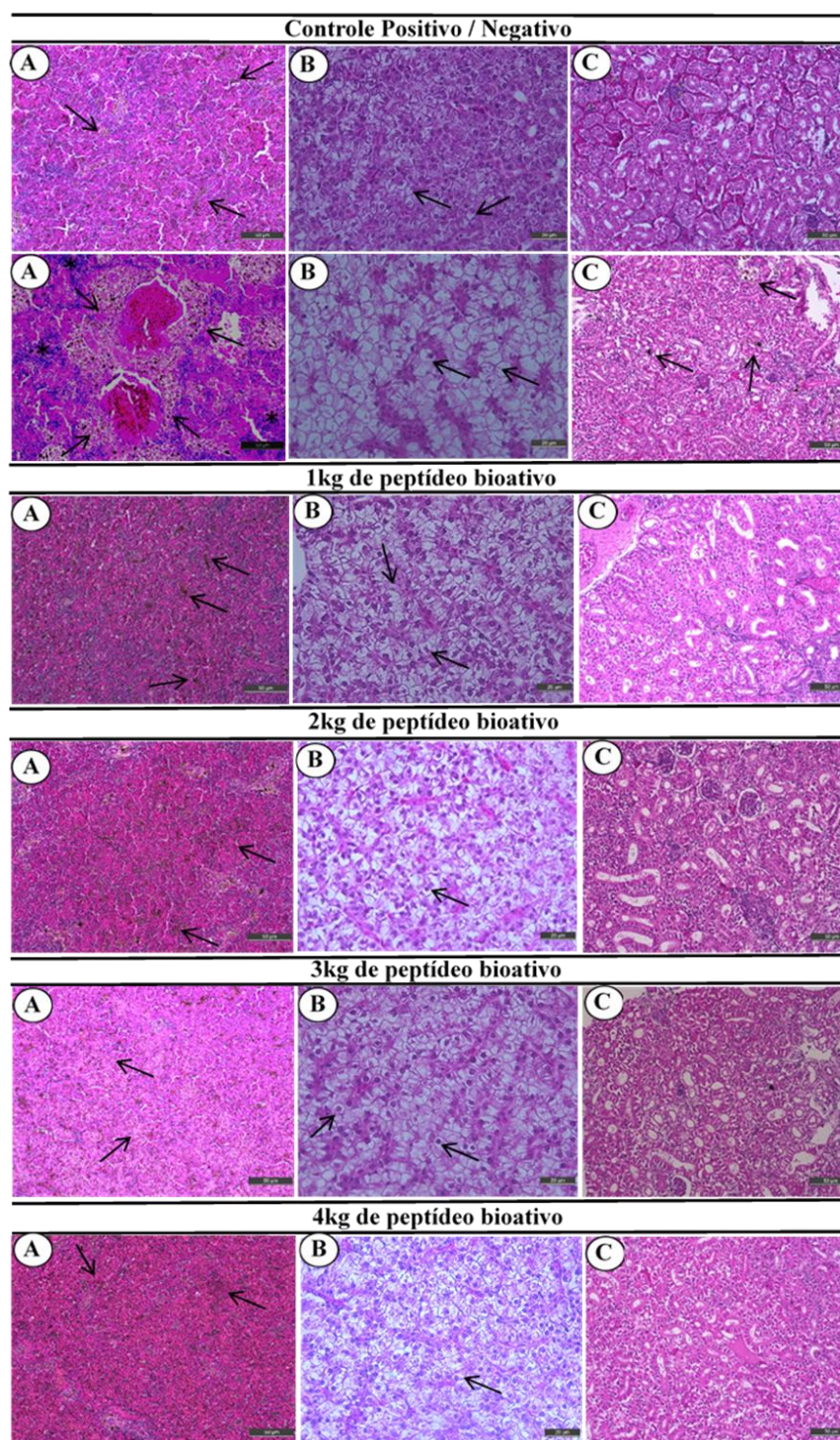


Figura 4. Alterações histológicas identificadas por setas e asteriscos observadas em tilápia-do-Nilo inoculada intracelomaticamente com *S. agalactiae*. As imagens são descritas por colunas (A, B e C) referentes ao baço, fígado e rim. E em sequência de linhas em ordem de tratamento: linha 1: C -; linha 2: C +; linhas de 3 a 6: T1, T2, T3 e T4 respectivamente. [A]. Baço com acúmulo de centros de melanomacrófagos discreta a moderado (Seta); Presença de infiltrados inflamatórios (*); [B] Fígado com degeneração Glicogênica nos grupos tratados e Presença de degeneração hidrópica, bem como centros de melanomacrófagos de forma discreta no C +; [C]. Nada digno de nota no rim dos

grupos tratados, e apresentando acúmulo de centros de melanomacrófagos de forma discreta. Coloração com Hematoxilina & Eosina.

3.7. Sobrevivência após desafio bacteriano com *S. agalactiae*

Não foram registradas mortalidades ou alterações de comportamento no controle (C). Tilápias-do-Nilo saudáveis foram submetidas à inoculação com cepa D115c de *S. agalactiae*, verificada via sequenciamento parcial do gene 16S rRNA (número de acesso do GenBank KU605571). Em contrapartida, os tratamentos experimentais (T1, T2, T3, T4 e C-) exibiram manifestações clínicas consistentes com aquelas previstas para indivíduos afetados pelo patógeno acima mencionado.

Manifestações clínicas iniciais da doença, abrangendo alterações na alimentação e na locomoção, juntamente com indicadores patológicos externos, como exoftalmia unilateral e bilateral, hemorragias superficiais sistêmicas e manifestações de ascite (Figura 5) foram observadas 72 horas após a inoculação, com mortalidade iniciando no grupo controle positivo (C+) no tempo de 96 horas. Nos tratamentos alimentados com dieta suplementada com PB, as mortalidades iniciaram 120 horas após o desafio.

A necropsia realizada nos animais recém mortos revelou lesões na pele, exoftalmia, ascite, hepatomegalia, bem como órgãos friáveis e pálidos, concomitantes com manifestações clínicas apresentadas 72 horas após a infecção.

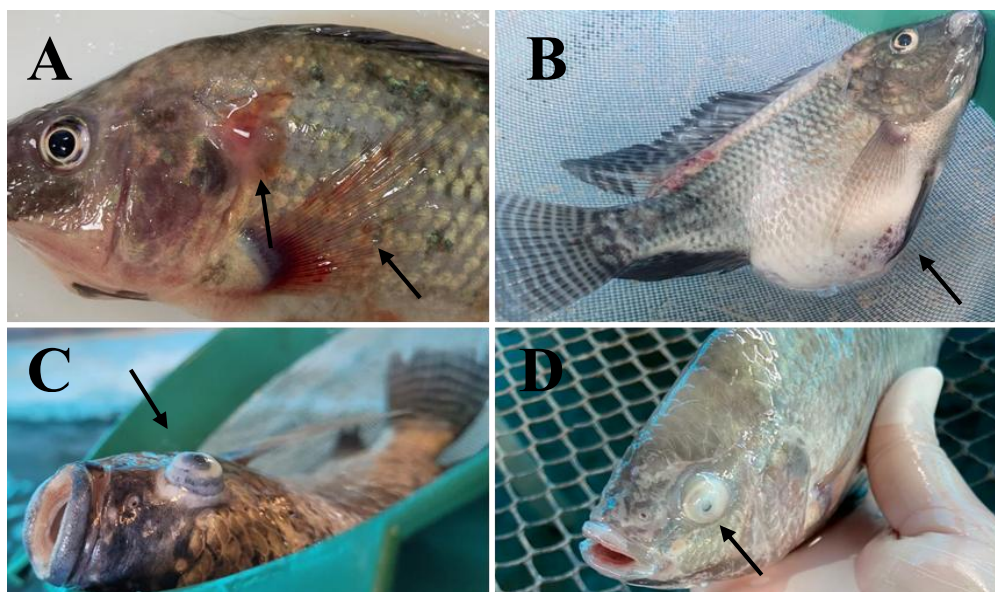
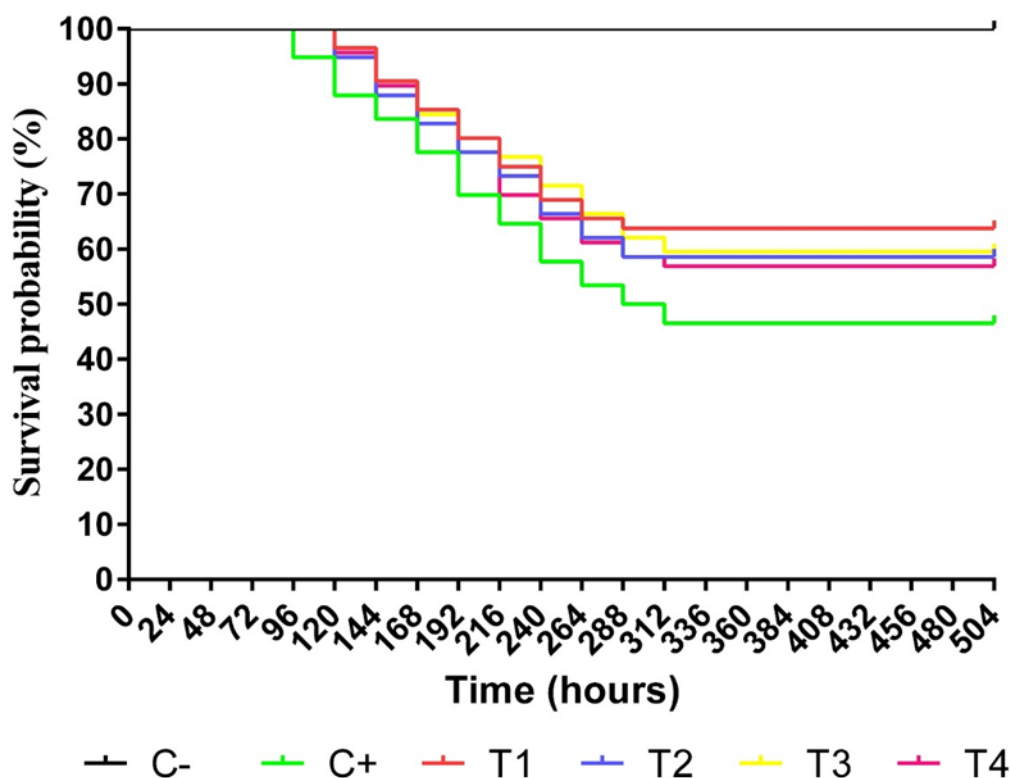


Figura 5. Sinais clínicos identificados em tilápia-do-Nilo inoculada intracelomaticamente com *S. agalactiae* [A] Hemorragias na superfície corporal, [B] Acúmulo de líquido no estômago (seta), [C] Exoftalmia ocular, [D] Palidez na superfície ocular.

Tilápias dos tratamentos T1 e T2, as quais receberam dieta suplementada com 1 e 2 kg de peptídeo bioativo por tonelada de ração, cessaram a mortalidade no 12º dia (288 horas após o desafio bacteriano). Em contrapartida T3, T4 e grupo controle (C+) cessaram a mortalidade 312 horas após o desafio bacteriano (Figura 6).

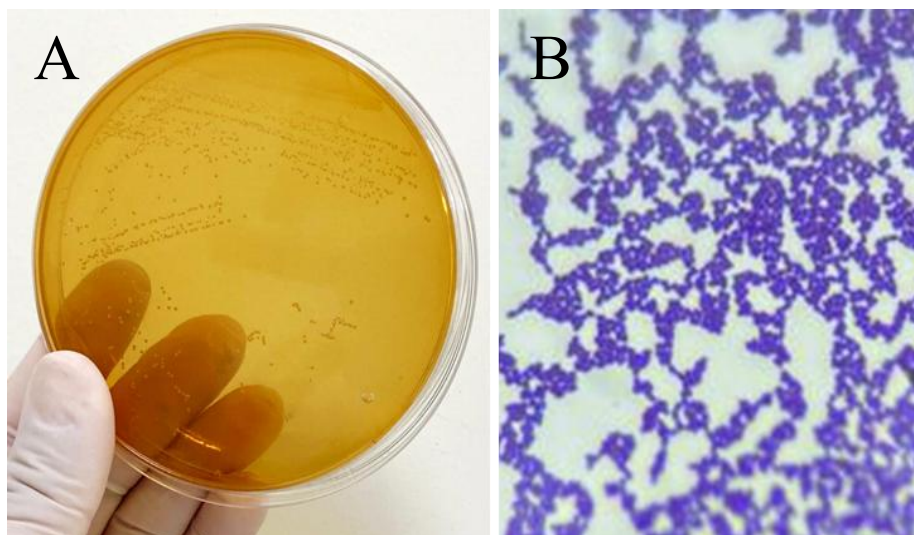
Figura 6. Curva de mortalidade de tilápia-do-Nilo após infecção com *S. agalactiae*. As mortes foram estabilizadas 312 horas após a infecção bacteriana.



3.8. Persistência bacteriana

A mortalidade após desafio com *S. agalactiae* foi estabilizada em todos os tratamentos experimentais após 21 dias. A análise microbiológica realizada nos peixes sobreviventes de todos os tratamentos revelou a presença do patógeno apenas em peixes do controle positivo. A bactéria não foi isolada nos peixes que receberam a suplementação dietética com o PB. Isto demonstra o potencial bactericida do peptídeo bioativo (Figura 7). Após isolamento microbiológico convencional, a bactéria teve seu DNA extraído e o sequenciamento realizado para confirmar a espécie.

Figura 7. Características morfológicas de *S. agalactiae* após isolamento microbiológico. [A] Colônia individual plana, arredondada de coloração creme-acinzentada, cultivada em Ágar Infusão Cérebro Coração - BHI; [B] coloração de Gram ao microscópio óptico de células bacterianas individuais.



4. Discussão

Durante o período de alimentação de 90 dias, foram observadas diferenças na atividade respiratória dos leucócitos entre os diferentes tratamentos experimentais. Peixes que receberam dieta com 4,0 kg de peptídeo bioativo/tonelada apresentaram atividade respiratória menor que os controles (positivo e negativo), indicando um efeito dose-dependente do PB na função leucocitária (Li et al., 2007; Yamashita et al., 2020; Peng et al., 2020; Peng et al., 2018). Após o desafio bacteriano, foi observada maior atividade de explosão respiratória de leucócitos nos tratamentos suplementados com o peptídeo bioativo, sugerindo incremento do sistema imune, consistente com pesquisas anteriores (Hoseinifar et al., 2016).

Inicialmente, não foram observadas alterações imediatas na atividade da lisozima após 90 dias de alimentação, resultado semelhante ao descrito para outras espécies de peixes (Gatesoupe et al., 1997; Villegas et al., 2012; Sahu et al., 2015; Dong et al., 2012; Sahu et al., 2015; Dong et al., 2015). No entanto, foi observada variação significativa na atividade da lisozima após 90 dias de alimentação, particularmente nos tratamentos que receberam doses mais elevadas do peptídeo, indicando um efeito dependente do tempo

(Ghosh et al., 2018; Chakraborty et al., 2020). Estas descobertas apoiam uma relação dose-dependente entre a suplementação de peptídeo bioativo e os parâmetros imunológicos da tilápia, enfatizando a importância do momento e da duração da suplementação na aquicultura.

O sistema imunológico inato serve como primeira linha de defesa contra patógenos, compreendendo vários mecanismos celulares e moleculares que visam identificar e eliminar microbianos (Medzhitov, 2007). Sendo a lisozima um componente importante, visto que se trata de uma enzima antimicrobiana que desempenha um papel crucial na defesa do hospedeiro, catalisando a degradação das paredes celulares bacterianas (Mckenzie & White, 1991). O nível de atividade da lisozima serve como um indicador da capacidade do organismo de combater infecções microbianas.

A diferença na atividade da lisozima entre os tratamentos suplementados com peptídeos e o controle ressalta as propriedades imunoestimulantes dos peptídeos dietéticos. Esses peptídeos podem atuar como imunomoduladores, ativando células do sistema imunológico e melhorando suas funções antimicrobianas, incluindo a produção de lisozima. O mecanismo subjacente a esse efeito pode envolver a ativação de vias de sinalização imunológica, como aquelas mediadas por citocinas e receptores de reconhecimento de padrões, levando ao aumento da expressão do gene da lisozima e da atividade enzimática (Nedaei et al., 2019).

O sistema alternativo do complemento destaca-se como um componente crucial, desempenhando um papel fundamental na eliminação de patógenos através de uma cascata de reações proteolíticas (Ricklin et al., 2010). Compreender a dinâmica da via alternativa do complemento e sua modulação por fatores dietéticos é essencial para elucidar as interações patógeno-hospedeiro e otimizar as respostas imunes em ambientes de aquicultura.

A suplementação dietética de peptídeos, e as diferenças observadas na atividade alternativa do complemento esclarecem os efeitos imunomoduladores dos peptídeos bioativos no sistema imunológico inato dos peixes. O estudo demonstrou uma diferença na atividade do complemento entre os tratamentos experimentais, com variações distintas nos tempos de lise celular após 90 dias de suplementação dietética com peptídeos bioativos.

Os tratamentos T1 e T2, que receberam doses mais baixas de peptídeos bioativos, apresentaram tempos de lise celular significativamente mais curtos em comparação ao controle, indicativo de uma resposta imune inata aumentada. Por outro lado, as tilápias dos T3 e T4, que receberam doses maiores de peptídeos bioativos, também demonstraram tempos de lise celular reduzidos em comparação ao grupo controle, embora em menor grau. Isto sugere um efeito dose-dependente da suplementação peptídica na atividade do complemento, com doses baixas produzindo melhores resultados.

Após o desafio bacteriano, foi observado um padrão semelhante, com animais suplementados com peptídeos apresentando tempos de lise celular notavelmente mais curtos em comparação com o controle. T1, T2, T3 e T4 exibiram tempos significativamente reduzidos, necessários para ativar as células de defesa, ressaltando ainda mais as propriedades imunoestimuladoras dos peptídeos no aumento das respostas imunes inatas. Em contraste, o grupo de controle exibiu tempos de ativação prolongados, indicativos de uma função imunitária inata diminuída.

Estas descobertas apontam que o potencial da suplementação dietética de peptídeos para modular as respostas imunes inatas em peixes, particularmente através da via alternativa do complemento. Ao acelerar a ativação das células de defesa e facilitar a eliminação de patógenos, os peptídeos bioativos oferecem caminhos promissores para aumentar a resistência a doenças e promover a saúde geral dos animais.

Os efeitos observados na atividade do complemento podem ser atribuídos às propriedades imunomoduladoras dos peptídeos bioativos, que demonstraram estimular a proliferação de células imunes, aumentar a atividade fagocítica e modular a produção de citocinas (Medzhitov et al., 2007; Nedae et al., 2019). Os peptídeos podem interagir com receptores imunológicos e vias de sinalização, como receptores Toll-like (TLRs) e receptores de citocinas, desencadeando respostas imunes e amplificando os mecanismos de defesa do hospedeiro (Srivastava et al., 2015).

O impacto significativo da suplementação dietética de peptídeo bioativo nos níveis de glicose no sangue e nos parâmetros bioquímicos da tilápia, demonstram potenciais benefícios à saúde e à imunidade desta espécie. Esta discussão é apoiada por evidências que elucidam como os peptídeos bioativos afetam o metabolismo da glicose e a função imunológica em organismos aquáticos. Os resultados mostram uma diminuição dos níveis de glicose no sangue dos animais suplementados com peptídeos, tanto após o

período de alimentação de 90 dias quanto após o desafio bacteriano. Isto demonstra o efeito da suplementação de peptídeos na regulação da glicose, melhorando potencialmente a eficiência metabólica e o controle do estresse. A redução nos níveis de glicose no sangue implica maior metabolismo ou utilização da glicose em peixes tratados, o que pode melhorar a saúde metabólica geral e a função imunológica na tilápia. Jin et al. (2016), Gong et al. (2018), Chen et al. (2020), Wu et al. (2015), Bai et al. (2019) e Sharma et al. (2019) demonstraram que a inclusão de PB pode modular a homeostase da glicose e parâmetros metabólicos em peixes, elucidando mecanismos como regulação da insulina, captação de glicose e melhora da sensibilidade à insulina e tolerância à glicose.

A diminuição dos níveis de glicose no sangue da tilápia, observada neste estudo é semelhante ao demonstrado em pesquisas anteriores, indicando o potencial dos PB para influenciar positivamente o metabolismo da glicose em peixes. No entanto, o ligeiro aumento nos níveis de glicose no sangue após o desafio bacteriano nos mesmos grupos merece uma investigação mais aprofundada. Este fenômeno pode ser influenciado por fatores como respostas fisiológicas induzidas pelo estresse, ativação imunológica e dinâmica do metabolismo da glicose.

Estudos de Iqbal et al. (2018) e Olsen et al. (2016) exploraram os efeitos da ativação imunológica e do estresse no metabolismo da glicose em peixes, destacando o papel dos hormônios do estresse e das citocinas na indução de hiperglicemia transitória. Além disso, pesquisas de Karsenty e Oury (2014), Brown et al. (2017), Pedersen et al. (2019) e Sandoval et al. (2020) examinaram a intrincada relação entre a função imunológica e o metabolismo da glicose, fornecendo contexto para a compreensão das flutuações nos níveis de glicose no sangue após o desafio bacteriano.

O efeito dose-resposta observado em nosso estudo, em que o PB administrado em diferentes doses resultou em respostas variadas na tilápia, é apoiado por vários fatores bem estabelecidos na literatura. Os peptídeos interagem com receptores ou enzimas específicas, desencadeando respostas fisiológicas como regulação metabólica, função imunológica e resposta ao estresse (Zhang et al., 2018). Diferentes doses de peptídeos podem levar a variadas afinidades de ligação ou níveis de ativação desses receptores, resultando em efeitos dose-dependentes.

A saturação das vias metabólicas fornece informações sobre a relação dose-resposta observada. Doses mais baixas modulam efetivamente as vias metabólicas

envolvidas no metabolismo da glicose, na síntese proteica ou na função imunológica, enquanto doses mais altas podem saturar essas vias, levando à diminuição dos efeitos ou resultados adversos (Plaza-Díaz et al., 2020). Isto explica porque doses mais elevadas de peptídeos no nosso estudo resultaram em tempos de lise mais longos ou outros desvios da resposta ideal.

O conceito de resposta hormonal explica ainda mais o fenômeno dose-resposta. Doses baixas podem provocar efeitos benéficos, enquanto doses altas podem ser prejudiciais ou não produzir nenhum efeito, como observado em vários sistemas biológicos, incluindo a resposta imune (Calabrese et al., 2008). Doses baixas de peptídeos podem estimular a função imunológica ou processos metabólicos, enquanto doses mais altas podem sobrecarregar o sistema, resultando em resposta diminuída ou imunossupressão.

A variabilidade individual entre as populações de peixes é outro determinante que contribui para o efeito dose-resposta observado. Diferenças na fisiologia, metabolismo e estado imunológico podem tornar alguns peixes mais sensíveis à suplementação de peptídeos do que outros (Gismondi et al., 2020). Esta diversidade ressalta a importância de considerar as diferenças individuais ao avaliar os impactos dos suplementos dietéticos em ambientes aquáticos.

Alterações histopatológicas leves a moderadas no baço e no fígado dos diferentes grupos experimentais sugerem uma influência da suplementação dietética de peptídeos bioativos nesses órgãos. A presença de centros melanomacrófagos (MMCs) no baço indica ativação da resposta imune, consistente com os efeitos imunomoduladores conhecidos dos peptídeos bioativos, que aumentam a capacidade antioxidante e reduzem a inflamação (Pihlanto-Leppälä, 2017). No entanto, a mudança de alterações histopatológicas leves para moderadas pós-desafio bacteriano sugere resposta imune intensificada ou processos inflamatórios exacerbados nesses órgãos devido à invasão de patógenos. A ausência de alterações renais em resposta à suplementação dietética contrasta os resultados pós-desafio bacteriano observada no grupo de controle positivo. As alterações observadas no rim do controle positivo podem ser resultado de efeitos citotóxicos provocados pelas toxinas bacterianas ou pela resposta inflamatória sistêmica desencadeada pelo patógeno (Sun et al., 2020). Além disso, a ausência de alterações no rim dos grupos experimentais pode indicar um efeito protetor desencadeado pela suplementação dietética ou um incremento do sistema imune que consegue rapidamente

eliminar a bactéria. Estas alterações podem refletir distúrbios fisiológicos subjacentes ou desconforto dos animais. A persistência de comportamentos pré-desafio no (C-) sugere ausência de estressores fisiológicos significativos ou alterações patológicas. Por outro lado, as alterações comportamentais no (C+) podem estar ligadas a alterações patológicas observadas no baço e no fígado, afetando potencialmente o bem-estar geral e o comportamento dos peixes (Braithwaite & Boulcott, 2007).

O controle positivo revelou o impacto das intervenções experimentais na saúde dos peixes. Os sinais clínicos nos peixes dos tratamentos T1, T2, T3 e T4 após exposição a *S. agalactiae* são consistentes com manifestações descritas para infecção estreptocócica em tilápia, indicando progressão sistêmica da doença e danos aos órgãos induzidos pelo patógeno (Soto et al., 2018; Councilman, 2014). Mudanças na alimentação, comportamento locomotor e indicadores patológicos externos sugerem uma resposta sistêmica ao desafio bacteriano (Alderman, 2014). Notavelmente, a maior taxa de sobrevivência entre grupos experimentais que receberam suplementação dietética de peptídeo bioativo (T1, T2, T3 e T4) ressalta a proteção ocasionada pela suplementação com o PB na redução da mortalidade após infecção bacteriana.

A maior sobrevivência observada no T1 e T2, que receberam as menores doses de peptídeo sugere uma resposta dependente da dose, em que menores doses (T1 =63,8%, T2= 58,7%, T3=59,5%, T4=56,9%, C+<46,5%) apresentam propriedades imunomoduladoras e antimicrobianas (Qin et al., 2020). Os achados de necropsia, incluindo lesões branquiais, ascite, hepatomegalia e palidez de órgãos internos, apoiaram as manifestações clínicas observadas, enfatizando a natureza sistêmica e a gravidade das infecções por *S. agalactiae* na tilápia-do-Nilo. Estes resultados sugerem um aumento promissor da saúde e da sobrevivência da tilápia às infecções bacterianas após suplementação dietética de PB.

No entanto, são necessárias mais pesquisas para compreender os mecanismos específicos da suplementação com PB na tilápia e otimizar as estratégias de suplementação para a sustentabilidade da produção aquícola. Além disso, maiores porcentagens de sobrevivência com doses crescentes de peptídeos sugerem uma potencial relação dose-resposta, consistente com descobertas anteriores sobre propriedades imunomoduladoras e antimicrobianas dos peptídeos bioativos (Harnedy e FitzGerald, 2012; He et al., 2016).

A variabilidade nas taxas de sobrevivência pode ser resultado da composição peptídica, da resposta dos peixes e influências ambientais (Zhou et al., 2016). A análise de persistência bacteriana revelou ausência de *S. agalactiae* em todos os peixes que receberam suplementação dietética com PB e no grupo controle negativo. A bactéria foi reisolada apenas nos peixes do grupo controle positivo, isto é, que não receberam suplementação dietética com PB e foram inoculados com a bactéria. Este resultado demonstra que o PB inibe o crescimento e a colonização bacteriana nos peixes.

Os peptídeos bioativos, conhecidos por suas propriedades antimicrobianas, rompem as membranas celulares bacterianas, inibem a síntese de proteínas e previnem a adesão bacteriana e a formação de biofilme (Wang et al., 2020). Isto destaca o potencial bactericida dos peptídeos, demonstrando a sua eficácia na eliminação de patógenos dos organismos hospedeiros. Vários peptídeos bioativos de diferentes fontes apresentam atividade antimicrobiana contra um amplo espectro de patógenos (Chen et al., 2019), rompendo as membranas celulares bacterianas e causando a morte celular (Gupta et al., 2021).

Além disso, alguns peptídeos podem incrementar as respostas imunológicas do hospedeiro, ajudando a eliminar a bactéria do organismo mais rapidamente.

5. Conclusão

Os resultados demonstram que o peptídeo bioativo incrementou o sistema imunológico da tilápia-do-Nilo, reduziu a glicemia e aumentou a sobrevivência dos peixes após infecção por *S. agalactiae*. No entanto, é necessário o entendimento da dose-resposta dos peptídeos para evitar efeitos adversos na função imunológica, destacando a necessidade de mais pesquisas para refinar as estratégias de suplementação de peptídeos na piscicultura.

6. Referências Bibliográficas

Alderman, D. J. (2014). Fish vaccination. John Wiley & Sons.

- Ashokkumar, M., et al. (2022). Bioactive peptides: Environmental fate and impact on aquatic ecosystems. *Aquatic Ecology*, 45(1), 87-101.
- Bouwmeester, J., et al. (2021). Bacterial diseases in aquaculture: Economic impact and prevention strategies. *Reviews in Aquaculture*, 13(1), 44-67.
- Boyd, C. E., et al. (2020). *Aquaculture, resource use, and the environment*. John Wiley & Sons.
- Braithwaite, V. A., & Boulcott, P. (2007). Pain perception, aversion and fear in fish. *Diseases of aquatic organisms*, 75(2), 131-138.
- Brown, R. E., Sharma, A., Eng, D. G., & Juarez, M. (2017). Age- and sex-dependent changes in osmotic regulation of plasma glucose in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 204, 172-178.
- Brunner, L., et al. (2020). Bioactive peptides in aquaculture: Potential applications and challenges. *Aquaculture Nutrition*, 26(3), 611-627.
- Calabrese, E. J., Mattson, M. P., Calabrese, V. (2008). Resveratrol commonly displays hormesis: occurrence and biomedical significance. *Human & Experimental Toxicology*, 27(3), 231-234.
- Chakraborty, S. B., Kamilya, D., & Haldar, S. (2020). Effect of dietary supplementation of black tea (*Camellia sinensis* L.) on growth performance, haematology, immune response and disease resistance in *Labeo rohita* fingerlings. *Aquaculture Research*, 51(9), 3851-3861.
- Chen, X., Wang, F., & Wan, J. (2019). New strategy for antimicrobial peptide identification using an integrated feature mechanism. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 17(4), 438-450.
- Chen, X., Zheng, B., Zhao, L., Ding, Z., & Mu, W. (2020). Purification and identification of novel α -glucosidase inhibitory peptides from squid skin gelatin hydrolysate and molecular docking study. *Food & function*, 11(8), 7007-7017.
- Councilman, M. L. (2014). Infectious diseases in fish. In *Fish Pathology* (5th ed., pp. 238-303). John Wiley & Sons.
- Deng, S., et al. (2021). Immunomodulatory effects of bioactive peptides in aquaculture: Current understanding and future perspectives. *Aquaculture Immunomodulation*, 36(2), 511-526.

- Dong, X., Zhang, D., & Zhang, J. (2012). Study on lysozyme activity and antipathogen in immunity of allogynogenetic crucian carp. *Journal of Dalian Fisheries University*, 27(4), 283-287.
- Gatesoupe, F. J., Zambonino, J., & Cahu, C. (1997). The effects of dietary factors on the development of the digestive tract and its microflora in larval fish. *Aquaculture*, 155(1-4), 11-22.
- Ghosh, A., Banerjee, P., Ghosh, D., & Roy, S. (2018). Effects of dietary supplementation of probiotics on growth performance, nutrients digestibility, haemato-biochemical parameters, immune and antioxidant status of Indian major carp, *Labeo rohita* fingerlings. *Aquaculture Research*, 49(3), 1332-1343.
- Gismondi, A., Di Marco, G., Canuti, L., Novelli, S., Fattorini, L., & Canini, A. (2020). The phytochemical profiles and antimicrobial activities of Italian single cultivar extra virgin olive oils as assessed by a metabolomic approach. *Molecules*, 25(17), 4020.
- Gong, X., Zou, Y., Bai, Z., & Lin, H. (2018). Dietary supplementation with xanthophyllomyces dendrorhous powder regulates blood glucose metabolism in high-fat diet/streptozotocin-induced type 2 diabetic mice. *Nutrients*, 10(9), 1194.
- Gupta, A., Dixit, A., & Gupta, S. (2021). Antimicrobial peptides: Advances in development of therapeutic applications. *Current Protein & Peptide Science*, 22(1), 78-89.
- Gyan, B. A., et al. (2019). Immunological effects of bioactive peptides in aquaculture: A meta-analysis. *Aquaculture Immunology*, 46, 101278.
- Harnedy, P. A., & FitzGerald, R. J. (2012). Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: A review. *Journal of Functional Foods*, 4(1), 6-24.
- He, S., Franco, C., Zhang, W., & Perez, M. J. (2016). Bioactive compounds derived from microalgae to improve human health. In *Marine Bioactive Compounds* (pp. 419-441). Springer, Cham.
- Hemamalini, R., et al. (2021). Bacterial infections in aquaculture: Causes, implications and preventive measures. *Aquaculture Research*, 52(3), 1243-1259.
- Hoseinifar, S. H., Sun, Y. Z., Wang, A., & Zhou, Z. (2016). Probiotics as means of diseases control in aquaculture, a review of current knowledge and future perspectives. *Frontiers in microbiology*, 7, 1-18.
- Hossain, M. S., et al. (2021). Challenges and alternatives to conventional antimicrobials in aquaculture: A review. *Aquaculture*, 531, 735806.

- Iqbal, M., Younis, M., & Younus, I. (2018). Stress-induced hyperglycemia, its impact on immune system and modulation mechanisms. IntechOpen.
- Janeway, C., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. J. (2001). *Immunobiology: the immune system in health and disease* (Vol. 2, p. 154). New York: Garland Pub
- Karsenty, G., & Oury, F. (2014). The central regulation of bone mass, the first link between bone remodeling and energy metabolism. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 99(12), 4333-4345.
- Kouhounde, S., et al. (2022). Immunological effects of bioactive peptides in aquaculture: A review. *Aquaculture Immunology*, 48, 102348.
- Langlois, M., et al. (2022). The role of bioactive peptides in aquaculture: A comprehensive review. *Aquaculture Reviews*, 24(2), 471-488.
- Lehrer, R. I., et al. (2003). Antimicrobial peptides in aquaculture: A review. *Aquaculture*, 208(3-4), 191-204.
- Li, M., et al. (2022). Resistance mechanisms against bioactive peptides in aquaculture bacteria: A comprehensive review. *Aquaculture Resistance*, 28(4), 901-916.
- Li, P., Gatlin III, D. M., & Ye, X. (2007). Dietary menhaden oil alters leukocyte and erythrocyte fatty acid composition and leukocyte function in Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*). *Aquaculture*, 263(1-4), 192-200.
- Ma, S., et al. (2020). Bioactive peptides as alternatives to conventional antimicrobials in aquaculture: A systematic review. *Aquaculture*, 518, 734862.
- Marr, A. K., et al. (2006). Antimicrobial peptides in aquatic environments: A review. *Aquatic Microbial Ecology*, 44(3), 249-260.
- Martins, M. L., Mouriño, J. L. P., Onaka, E. M., Nomura, D. T., & Nomura, A. M. A. (2016). Bacterioses e viroses de peixes de água doce no Brasil: uma revisão. *Bol. Inst. Pesca*, 42(3), 546-554.
- Mckenzie, H. A., & White Jr, F. H. (1991). Lysozyme and α -lactalbumin: structure, function, and interrelationships. *Advances in protein chemistry*, 41, 173-315. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60198-9](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60198-9)
- Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, 449(7164), 819-826. |doi:10.1038/nature06246
- Muthukumar, S., et al. (2021). Environmental implications of bioactive peptides in aquaculture: A review. *Aquaculture Environment*, 32(2), 345-359.
- Nedaei, S., Noori, A., Valipour, A., Khanipour, A. A., & Hoseinifar, S. H. (2019). Effects of dietary galactooligosaccharide enriched commercial prebiotic on growth

- performance, innate immune response, stress resistance, intestinal microbiota and digestive enzyme activity in Narrow clawed crayfish (*Astacus leptodactylus* Eschscholtz, 1823). *Aquaculture*, 499, 80-89. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.076>
- Olsen, R. E., Sundell, K., Mayhew, T. M., & Myklebust, R. (2016). The influence of stress on fish health and welfare in aquaculture. In J. F. Craig (Ed.), *Aquaculture nutrition: gut health, probiotics and prebiotics* (pp. 212-231). John Wiley & Sons.
- Pan, J., et al. (2017). Antioxidant and anti-inflammatory effects of bioactive peptides in aquaculture: Mechanisms and applications. *Aquaculture Health and Nutrition*, 21(4), 901-916.
- Pedersen, K. B., Brøns, C., & Rungby, J. (2019). The endocrine role of C-peptide. *Current diabetes reviews*, 15(4), 290-298.
- Peng, Y., Yao, H., Chang, Y., Zhang, Y., & Yu, D. (2020). Effects of dietary chitosan on growth performance, digestive enzyme activity, and intestinal morphology of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*♀ × *Oreochromis aureus*♂). *Aquaculture Reports*, 18, 100549.
- Pihlanto-Leppälä, A. (2017). Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides. *Trends in Food Science & Technology*, 69, 84-92.
- Piovesana, S., et al. (2019). Application of bioactive peptides in aquaculture: Current status and future prospects. *Aquaculture Asia Pacific*, 15(3), 43-57.
- Plaza-Díaz, J., Álvarez-Mercado, A. I., Ruiz-Marín, C. M., Reina-Pérez, I., Pérez-Alonso, A. J., & Sánchez-Andujar, M. B. (2020). A review of the health benefits of cherries. *Nutrients*, 12(1), 198.
- Qin, C., Liu, W., & Wan, X. (2020). Identification and characterization of a novel antimicrobial peptide from fish of *Siniperca chuatsi*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 521(1), 74-80.
- Raja, S. W. A., & Jithendran, K. P. (2015). Management of bacterial diseases in aquaculture. *Aquaculture International*, 23(3), 749-763.
- Radwan, S. S., et al. (2023). Streptococcal diseases in aquaculture: A global overview. *Aquaculture Diseases Review*, 25(1), 34-49.
- Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K., & Lambris, J. D. (2010). Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nature immunology*, 11(9), 785-797.

- Salhoff, C. R., et al. (2019). Bioactive peptides: Potential applications in aquaculture. *Aquaculture Perspectives of South Africa*, 21(2), 215-230.
- Sandoval, D. A., Obici, S., Seeley, R. J. (2020). Targeting the CNS to treat type 2 diabetes. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20, 463-483.
- Sapugahawatte, D. N., et al. (2022). Streptococcus agalactiae outbreaks in aquaculture: Causes and management strategies. *Aquaculture Management*, 12(2), 183-197.
- Sahu, S., Das, B. K., & Mishra, B. K. (2015). Effect of dietary beta-glucan on growth, non-specific immune response, and disease resistance in *Labeo rohita* fingerlings. *Fish & Shellfish Immunology*, 45(2), 436-442.
- Sharma, K., Sahu, B. D., Sharma, N., Minz, S., & Singh, D. (2019). Mechanisms of action of flavonoids as anti-inflammatory agents: a review. *Inflammopharmacology*, 27(3), 663-675.
- Srivastava, P. K., & Pandey, A. K. (2015). Role of immunostimulants in immune responses of fish and shellfish. *Biochem Cell Arch*, 15(1), 47-73.
- Soto, E., Evans, J. J., & Klesius, P. H. (2018). Evaluation of Streptococcus iniae killed bacterin and oral Streptococcus iniae vaccine on immune response, immune gene expression and protection in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 484, 164-171.
- Steckbeck, J. D., et al. (2014). Antimicrobial peptides in aquaculture: Mechanisms of action and applications. *Reviews in Aquaculture*, 6(3), 240-258.
- Sun, Y., Feng, R., Li, Y., & Guo, Z. (2020). Protective effect of resveratrol on hepatic injury in peritonitis mice and its mechanism. *Clinical and Experimental Hepatology*, 36(9), 1891-1897.
- Tu, W., et al. (2022). Bioactive peptides as immunomodulators in aquaculture: A systematic review. *Aquaculture Immunomodulation*, 37(1), 234-249.
- Villegas, E. N. C., Conceição, L. E. C., & Martins, C. I. M. (2012). A new look on fish immune system in health and disease. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 41(suppl 1), 53-62.
- Wang, G., Li, X., & Wang, Z. (2020). Bioactive peptides derived from soybean protein and their health benefits: A review. *Food Chemistry*, 338, 127954.
- Wu, H. C., Chen, H. M., & Shiau, C. Y. (2015). Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Research International*, 76, 1-13.

- Yang, S., et al. (2022). Bioactive peptides: Applications in aquaculture and their role in sustainable development. *Aquaculture Sustainability*, 52(2), 387-401.
- Yang, Y., et al. (2020). Bioactive peptides for aquaculture: A comprehensive review. *Aquaculture Reviews*, 23(4), 889-906.
- Yamashita, M., Aoyama, M., Oshima, S., Mori, H., & Koga, Y. (2020). Effect of dietary lecithin on growth performance, fatty acid composition and leukocyte respiratory burst activity in juvenile yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Aquaculture*, 518, 734801.
- Zaccone, G., et al. (2022). Role of bioactive peptides in enhancing animal health in aquaculture: A review. *Aquaculture Health*, 44(3), 672-687.
- Zhang, H., Zhou, C., & Zhang, H. (2016). Transcriptome analysis of peripheral blood mononuclear cells in immune response to *Streptococcus agalactiae*. *Current Microbiology*, 73(1), 42-48.
- Zhang, Y., Tao, X., & Yin, L. (2018). In vitro and in vivo inhibitory effects of a *Leonurus sibiricus* extract on influenza virus-induced cytokine storms. *Journal of Ethnopharmacology*, 220, 15-22.
- Zhou, K., & Regenstein, J. M. (2006). Effects of extraction temperature on functional properties of Pacific whiting surimi. *Journal of Food Science*, 71(2), C78-C82.
- Zhou, Z., et al. (2023). Alternatives to conventional antimicrobials in aquaculture: A comprehensive review. *Aquaculture*, 543, 736934.
- Zhu, J., et al. (2022). Mechanisms of action of bioactive peptides against bacterial pathogens in aquaculture: A review. *Aquaculture Mechanisms*, 14(3), 467-482.

**CAPITULO 3 – PATHOGENICITY OF *LACTOCOCCUS GARVIEAE* FOR NILE
TILAPIA AND THERAPEUTIC EFFICACY OF BIOACTIVE PEPTIDE
AGAINST THE PATHOGEN**

PATHOGENICITY OF LACTOCOCCUS GARVIEAE FOR NILE TILAPIA AND THERAPEUTIC EFFICACY OF BIOACTIVE PEPTIDE AGAINST THE PATHOGEN

Daiane Vaneci-Silva^a, André do Vale Oliveira^a, Elielma Lima de Sousa^c, Fernando Cardoso Gomes^a, Daniel de Abreu Reis Ferreira ^c, Inácio Mateus Assane^{a,b}, Fabiana Pilarski^{a,c}

^a Post-graduate program in Aquaculture, Laboratory of Microbiology and Parasitology of Aquatic Organisms, São Paulo State University (UNESP), Aquaculture Center of Unesp (CAUNESP), Jaboticabal, São Paulo, Brazil, 14.884-900

^b Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Zambeze (UniZambeze), Ulónguê, Tete, Mozambique 0713-02

^c Graduate Program in Agricultural and Livestock Microbiology, São Paulo State University (UNESP), School of Agricultural and Veterinarian Sciences, Jaboticabal, São Paulo, Brazil, 14884-900

*Corresponding author at Laboratory of Microbiology and Parasitology of Aquatic Organisms, São Paulo State University (UNESP), Aquaculture Center of Unesp, Jaboticabal, São Paulo, 14884-900, Brazil email: fabiana.pilarski@unesp.br

ABSTRACT

Lactococcus garvieae is an emerging bacterium that can cause infection in several aquatic species. Responsible for lactococcosis in fish, it has been reported in recent years as a cause of mortality in aquaculture. Due to the indiscriminate use of antimicrobials, and to promote viable alternatives for their replacement, bioactive peptides with antimicrobial properties can be explored as tools against bacterial infections. Thus, this work identified the pathogen of a mortality outbreak in Nile tilapia produced in cages as *Lactococcus garvieae* and performed Koch's postulate with the strain to understand its pathogenicity in Nile tilapia. He also tested the therapeutic efficacy of a commercial bioactive peptide and florfenicol (FFC) in the treatment of fish experimentally infected with *L. garvieae*. The bacteria were isolated from Nile tilapia with clinical signs of bacteriosis, such as external and internal hemorrhage, ocular opacity, anorexia and ascites, and inoculated at a dose of 3.6×10^7 CFU/mL in healthy Nile tilapia. Fish inoculated with the bacteria showed generalized hemorrhage, ascites and melanosis. Histopathological analyzes showed severe lesions in the liver, spleen, kidney, intestine, and heart. Thus, the strain was considered highly virulent for Nile tilapia. In an attempt to find an adequate treatment for lactococcosis, healthy tilapia were divided into six experimental groups G1: intraperitoneally inoculated with *L. garvieae* and treated with 15mg/kg of peptide by

gavage; G2: intraperitoneally inoculated with *L. garvieae* and treated with 15mg/kg of florfenicol by gavage; G3: inoculated intraperitoneally with the bacteria and treated with intraperitoneal injection of the peptide (15mg/kg); G4: inoculated intraperitoneally with the bacteria and not medicated; G5: PBS by gavage and G6: inoculated intraperitoneally with PBS. After 30 days of treatment, the survival percentage of all groups was G1: 36.85%, G2: 16.79%, G3: 26.44%, G4: 6.7%. Groups G1, G2 and G3 had significantly higher survival when compared to G4. In the analysis of persistence of bacteria, it was not isolated only in groups G1 and G3. Thus, the results of this study proved the effectiveness of the bioactive peptide in the control and persistence of *Lactococcus garvieae* in Nile tilapia.

Key words: Bacteria, Lactococcosis, Treatment, Peptide, Survival, Fish

1. Introduction

Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is the most important species in Brazilian's aquaculture, representing over 62.3% (551.8 tons) of the country's production, and making Brazil the 4th largest producer of farmed Nile tilapia in the world (IBGE, 2021; FAO, 2022; Peixe BR, 2023). With this increase production, Nile tilapia aquaculture is severely affected by bacterial disease outbreaks, that cause high mortality rates and economic impacts (Tavares-Dias and Martins, 2017). One of the most damaging bacterial diseases in Brazilian fish production is the lactococcosis disease, caused by *Lactococcus garvieae* that affects Nile tilapia and Brazilian catfish (nome científico – *Randia quenel*??) (Sebastião et al., 2015; Egger et al., 2023).

Lactococcus garvieae, belonging to the Streptococcaceae family, is a Gram-positive bacterium classified within the group of lactic acid bacteria (LAB). It causes lactococcosis, a hemorrhagic septicemia often fatal in aquatic organisms when the water temperature exceeds 15°C. This non-motile, non-sporulating bacterium is catalase-negative and can be of either non-agglutinating (KG-) or agglutinating (KG+) serotype. Widely distributed in various environments, it exhibits versatility in infecting a broad range of animals, including freshwater and marine fish such as olive flounder (*Paralichthys olivaceus*), spotted catfish (*Pseudoplatystoma corruscans*), mullet (*Mugil cephalus*), greater amberjack (*Seriola quinqueradiata*), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), and Nile tilapia (Vela et al., 2000; Kobayashi et al., 2004; Vendrell et al., 2006; Soltani et al., 2008; Evans et al., 2009; Didinen et al., 2014; Byadgi et al., 2016; Shiry et al., 2019).

Considered an opportunistic pathogen in animals, *L. garvieae* causes disease when the immune system is immunosuppressed, or other underlying health issues such as exacerbated stress, improper breeding practices, and certain co-infections are present, increasing animals' susceptibility to *L. garvieae* infections (Chang et al., 2002; Evans et al., 2009; Khbayashi et al., 2017).

In fish, the bacterium induces a hyperacute systemic infection with nonspecific clinical signs, including erratic swimming, skin lesions, melanosis, lethargy, exophthalmia, anal prolapse, swollen abdomen, and hemorrhagic septicemia (Meyburgh et al., 2017; Abdelfatah & Mahboub, 2018; Bwalya et al., 2020, 2021). Infected fish may exhibit behavioral changes such as reduced swimming and loss of appetite (Abu-Elala et al., 2020). Mortality rates can vary, but severe outbreaks can result in significant economic losses for fish farmers and aquaculturists (Soltani et al., 2021). The bacterium is also considered as a potential foodborne zoonotic agent with clinical significance for humans (Chan et al., 2011).

The transmission of *L. garvieae* in fish occurs horizontally, involving direct contact between infected and susceptible fish, ingestion of contaminated water or feed, and the presence of feces in the system. Stress factors, such as poor water quality, high population density in a tank, and transportation, can increase fish susceptibility to *L. garvieae* infection (Ooyama et al., 2002; Abu-Elala et al., 2020).

The control of bacterial diseases involves the use of antimicrobials, with only a few approved for aquaculture use against lactococcosis (Morris and Cerceo, 2020). In Brazil, only two antimicrobials (Florfenicol and Oxytetracycline) are licensed for aquaculture use, and none are authorized for *L. garvieae* control (Sindan, 2022), leading to indiscriminate and non-judicious use of these drugs, contributing to bacterial resistance to the limited approved medications (Assane et al., 2019). There are 25 vaccines (Assefa and Abunna, 2018) approved for use to prevent diseases in aquaculture around the world but none to prevent lactococcosis.

Given this context, the adoption of preventive measures and alternatives to antimicrobials are encouraged by both the industry and researchers. Among these alternatives are beta-glucans, nucleotides, probiotics, prebiotics, vaccines, glucans, chitosans, seaweeds, echinacea, interferons, adjuvants, and bioactive peptides (Prabu et al., 2016; Zorriehzahra et al., 2016; Liu et al., 2018; Soliman et al., 2019; Ching et al., 2021; Baco et al., 2022; Cunha and Pintado, 2022; Irshath et al., 2023; Linh et al., 2023; Wangkahart et al., 2023).

Bioactive peptides are chains composed of amino acids with low molecular weight, which can be released by enzymatic hydrolysis of proteins. The use of these compounds is a promising strategy to prevent diseases outbreaks and reduce the antimicrobials use in aquaculture because they play a crucial role in strengthening the animal's immune system and eradicating harmful bacteria, offering a potentially safer and more sustainable approach compared to traditional antimicrobials (Ting et al., 2018; de Sousa et al., 2021; Bhat et al., 2022).

Thus, in this study, we identified and characterized *L. garvieae*, responsible for causing mortality outbreaks in Nile tilapia in commercial fish farming. We also evaluated its pathogenicity for this species and, for the first time in fish, assessed the therapeutic efficacy of a commercial bioactive peptide against the bacterium.

2. Materials and Methods

2.1. Ethics Committee

The study was conducted following the recommendations of the National Council for Animal Experimentation Control (CONCEA) and approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of the Faculty of Agricultural and Veterinary Sciences of São Paulo State University (Unesp, protocol number 9470/22).

2.2. Fish Sample

Juveniles of Nile tilapia ($n = 10$, average weight 200 ± 50 g) were randomly captured from five 48 m^3 ($4 \times 4 \times 3$) floating cages with a stocking density equivalent to 850 kg, located in the state of Bahia, Brazil (São Francisco River) during a disease outbreak in July and August of 2022 (winter season). Behavioral assessment of the fish showed erratic swimming and clinical signs characteristic of the disease. Thus, the fish were transported to the Microbiology and Parasitology Laboratory of Aquatic Organisms at the Aquaculture Center of São Paulo State University "Júlio de Mesquita Filho" (CAUNESP) for microbiological analysis.

2.3. Microbiological Analysis

For isolation and identification of the bacterium, samples from the kidneys, brain, and liver of diseased fish were aseptically collected and cultured on Lactobacilli MRS Agar (Neogen®, Brazil), incubated at 37°C for 48 hours, and pure colonies stored at -80°C in MRS broth with the addition of 25% glycerol for further studies. Bacterial isolates (five strains: N1487, N1483, N4355, Ao105, and o1141) underwent Gram staining following the methodology described by Leber et al., (2016).

2.4. Polymerase Chain Reaction (PCR)

To identify the bacterium, a highly conserved partial sequence of the 16S rRNA gene was amplified and sequenced using primers (27F, 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' and 1492R, 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT3'-) described by Sebastião et al. (2015). The amplified PCR products were analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis stained with 1 µL of fluorescent dye for dsDNA (Nancy 520®, Sigma Aldrich). Gels were visualized under UV light using a ChemiDoc MP imaging system (BioRad). Nucleotide sequencing was performed on an ABI 3730 XL DNA analyzer (Applied Biosystems, USA) (Assane et al., 2021) with the described primers. Sequence analyses were conducted using Sequencher (Gene Codes Corporation) and BioEdit (Hall, 1999). Gene sequences were identified using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) with $\geq 98\%$ identity as the criterion for identification. Sequences were deposited in the United States National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank database.

2.5. Scanning Electron Microscopy (SEM)

For SEM analysis, isolated bacterial colonies (taken from Petri dishes after microbiological growth in MRS culture medium) underwent fixation in 2.5% glutaraldehyde immersion in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.4. Subsequently, the colonies were dehydrated in increasing ethanol concentrations of 30%, 50%, and 70% for 15 minutes each and refrigerated for 24 hours. Dehydration continued with 80%, 90%, and 100% ethanol for 3 cycles of 15 minutes each, followed by drying with liquid CO₂

in an EMS 850 critical point dryer (Electron Microscopy Sciences, USA), coated with a gold layer (Au, 50 nm) using a Denton Vacuum Desk II sputter coater, and observed through a ZEISS EVO 10 scanning electron microscope (ZEISS, Germany). The material was photographed at a working distance of 8.0 mm.

2.6. Bacterial Pathogenicity

To reproduce the clinical signs observed in fish farming, Koch's postulates were applied by inoculating the bacterium (strain Ao105) into healthy Nile tilapia (200 ± 50 g) and reisolating the bacterium from deceased fish to confirm death by *L. garvieae*.

2.6.1. Inoculum preparation for bacterial challenge

A colony of *L. garvieae* (strain A0105) was inoculated into MRS broth and incubated in a microbiological oven at 35°C for 48 hours. Subsequently, the broth was washed twice with phosphate-buffered saline (PBS, pH = 7.4) by centrifugation ($3000 \times g$, 4°C for 10 min), and the bacterial suspension was adjusted to different concentrations (OD₆₂₅), confirmed by plate count method.

2.6.2. Experimental infection with *Lactococcus garvieae* (Koch's Postulates)

One hundred and eighty healthy Nile tilapia (200 ± 50 g), were obtained from a commercial fish farm in São Paulo state, acclimatized under laboratory conditions for 15 days, and then distributed into 18 tanks (500L) with constant aeration in an flow-through system. The animals were divided into six experimental groups with three repetitions each: G1: intraperitoneal inoculation with *L. garvieae* at a dose of 2.4×10^4 CFU/mL; G2: intraperitoneal inoculation with *L. garvieae* at a dose of 3.4×10^5 CFU/mL; G3: intraperitoneal inoculation with *L. garvieae* at a dose of 1.3×10^6 CFU/mL; G4: intraperitoneal inoculation with *L. garvieae* at a dose of 3.9×10^6 CFU/mL; G5: intraperitoneal inoculation with *L. garvieae* at a dose of 3.6×10^7 CFU/mL; G6: intraperitoneal inoculation with PBS (control group). The animals were evaluated daily for clinical signs of lactococcosis, behavioral changes, and daily mortality until mortality

ceased in all treatments. During the acclimatization and experimentation periods, the animals were fed twice a day with 28% crude protein commercial fish feed (Comigo®) at a rate of 3% of body weight. The water parameters were measured every 3 days using a U-52G probe (Horiba® Japan). All parameters were kept within the recommended range for Nile tilapia (dissolved oxygen: 7.6 ± 0.2 mg/L; temperature: 28 ± 1.5 °C; pH: 7.4 ± 0.1 and electrical conductivity: 179 ± 2.1 µS/L).

2.6.3. Histopathological Analysis

Samples of liver, kidney, spleen, brain, heart, and intestine from freshly deceased fish after bacterial challenge were collected and fixed in 10% buffered formalin for 48 hours. Subsequently, the samples were dehydrated in a series of 100% ethanol for impregnation and fixation. Histological sections (5 µm) were stained with hematoxylin-eosin (H&E) and examined under an optical microscope (Nikon Eclipse E200®) with an attached camera (Moticam 2300®).

2.7. Therapeutic efficacy of the bioactive peptide against *L. garvieae*

After conducting Koch's postulates, a new experiment was designed to evaluate the therapeutic efficacy of the bioactive peptide. For this purpose, healthy Nile tilapia specimens (n=180) obtained from a commercial fish farm in São Paulo state, previously diagnosed as healthy (parasitological, microbiological, and viral analysis), were transported to the Microbiology and Parasitology Laboratory of Aquatic Organisms at CAUNESP. They were acclimatized for 15 days. After the acclimatization period, fish (64.6 ± 33.4 g) were divided into six experimental groups, each with three repetitions: G1: intraperitoneal injection of *L. garvieae* (1.3×10^6) and gavage administration (15mg/kg) of the bioactive peptide; G2: intraperitoneal injection of *L. garvieae* and gavage administration (15mg/kg) of Florfenicol (FFC); G3: intraperitoneal injection of *L. garvieae* and single intraperitoneal injection of the bioactive peptide (15mg/kg); G4: intraperitoneal injection of *L. garvieae* and no medication; G5: PBS (pH 7.4) administered by gavage; and G6: intraperitoneal injection of PBS (pH 7.4). All fish were anaesthetized in benzocaine solution (100 mg/mL) before inoculation of bacterial. The

animals were assessed daily for clinical signs of lactococcosis, behavioral changes, and mortality for 30 consecutive days. After 30 days of observation, the surviving fish from all experimental groups were euthanized (benzocaine overdose) for re-isolation of the bacteria and analysis of bacterial prevalence. The internal organs (kidney, liver and brain) of dead fish were aseptically taken and streaked directly on Lactobacilli MRS Agar (Neogen®, Brazil), incubated at 37°C for 48 hours for the bacterial and pure colonies were identified by morphological, biochemical and molecular tests.

2.8. Statistical Analysis

The data were analyzed for normality and homogeneity. Subsequently, analysis of variance (ANOVA) was performed, followed by post hoc tests of multiple comparisons using Holm-Sidak or Bonferroni, with a significance level of 0.05. Cumulative mortality and percentage of survival date were analyzed by the Kaplan-Meier survival analysis (Log-Rank test) and p-values 0.05 or less considered statistically significant.

3. Results

3.1. Bacterial isolation and identification: Microbiological analysis, PCR, and scanning electron microscopy (SEM)

The analyzed fish from the commercial Nile tilapia farm exhibited external (Figure 1 A) and internal hemorrhage, ocular opacity (Figure 1 C), anorexia, and ascites, resulting in the death of over 1000 fish in three days. After culturing the organs on culture medium, the growth of pure colonies was obtained, characterized by small, flat, rounded colonies with a cream-grayish color (Figure 1 B and Figure 2 A). Gram staining revealed the presence of Gram-positive diplococci (Figure 2 B and C).

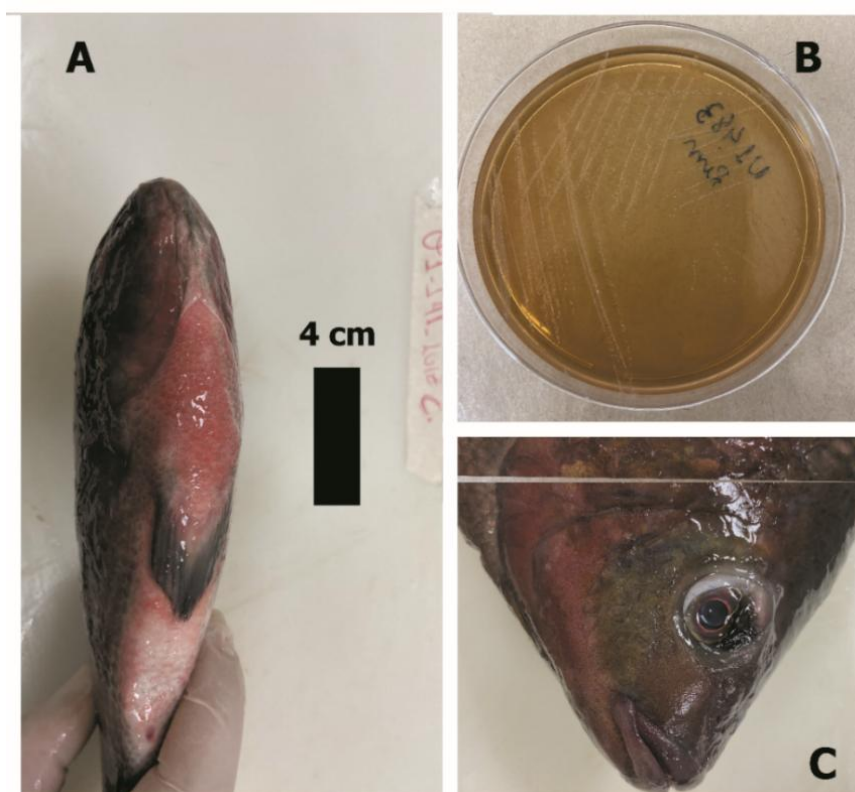


Figure 1. Nile tilapia with generalized hemorrhage (A); Petri dish with colonies characteristic of *L. garvieae* (B); tilapia with hemorrhagic spots on the head and ocular opacity (C).

The five bacterial strains (Ao105, N1487, N1483, N4355, and O1141), isolated from the kidney and brain of Nile tilapia, showed genetic similarity with values $\geq 98.00\%$ to the bacterium *Lactococcus garvieae* (*L. garvieae*) deposited in GenBank. Scanning Electron Microscopy (SEM) revealed cells in the form of ovoid cocci, diplococci with a cream-grayish coloration. Based on phenotypic and genotypic characteristics, as well as partial sequences of the 16S rRNA genes, the strains were deposited in the NCBI GenBank database, identified by the following accession numbers: OQ325240 (Ao105), OQ325237 (N1487), OQ325238 (N1483), OQ325239 (N4355), and OQ325241 (Ao1141).

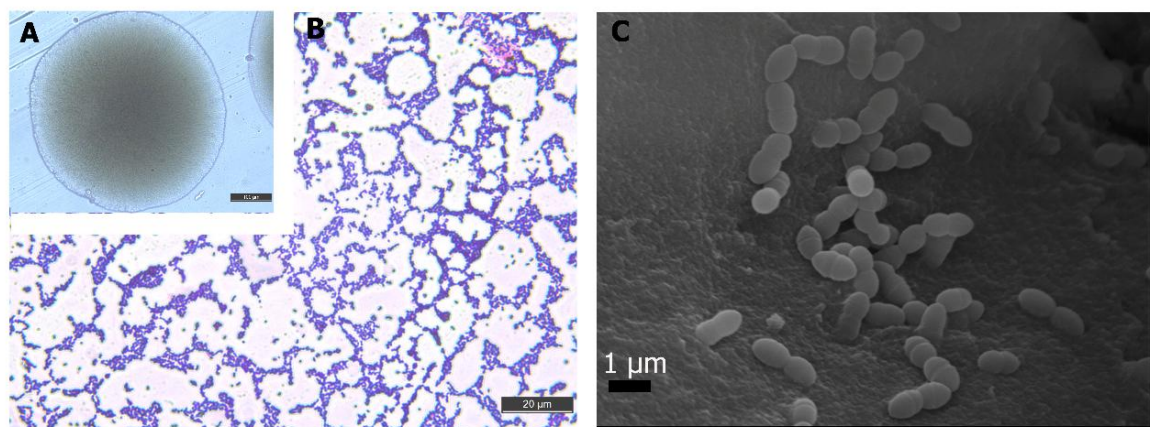


Figure 2. Morphological characteristics of *L. garvieae* after microbiological isolation. Individual flat colony rounded and cream-grayish coloration (A); Gram staining under an optical microscope (B); individual bacterial cells in MRS medium, under Scanning Electron Microscopy (SEM) (C).

3.2. Pathogenicity

Tilapia inoculated with PBS (G6) (control group) did not show any clinical signs of disease or behavioral changes during the experimental period. The other experimental groups (G1 to G5), challenged with *L. garvieae*, presented clinical signs like those of fish from the fish farm 48 hours after bacterial inoculation. The observed clinical signs included anorexia, lethargy, and melanosis.

The first mortalities were recorded 48 hours after bacterial challenge in G5, along with the initial clinical signs of the disease. At 72 hours' post-challenge, the first deaths occurred in fish from groups G1, G2, G3, and G4, which had stopped feeding. On the 8th day after the challenge, groups G1 and G2 resumed feeding, and clinical signs gradually regressed. Clinical signs of lactococcosis began to regress in G3 only on the 9th day post-challenge, and mortality ceased on the 10th day. Groups G4 and G5, despite being inoculated with a higher dose of the bacterium and having the highest number of deaths, also ceased mortality on the 9th day, similar to G3.

From the 10th day onward, all animals, regardless of mild or severe clinical signs, were feeding normally, and no mortality was recorded until the 30th day of the experimental period. Throughout the experimental period, moribund and freshly dead animals exhibited clinical signs like those observed in the first 48 hours, such as erratic swimming, unilateral and bilateral exophthalmia, external and internal hemorrhage,

abdominal swelling, and anal prolapse. These animals underwent microbiological analysis, and *L. garvieae* was reisolated, confirming death due to the bacterium (Figure 3).

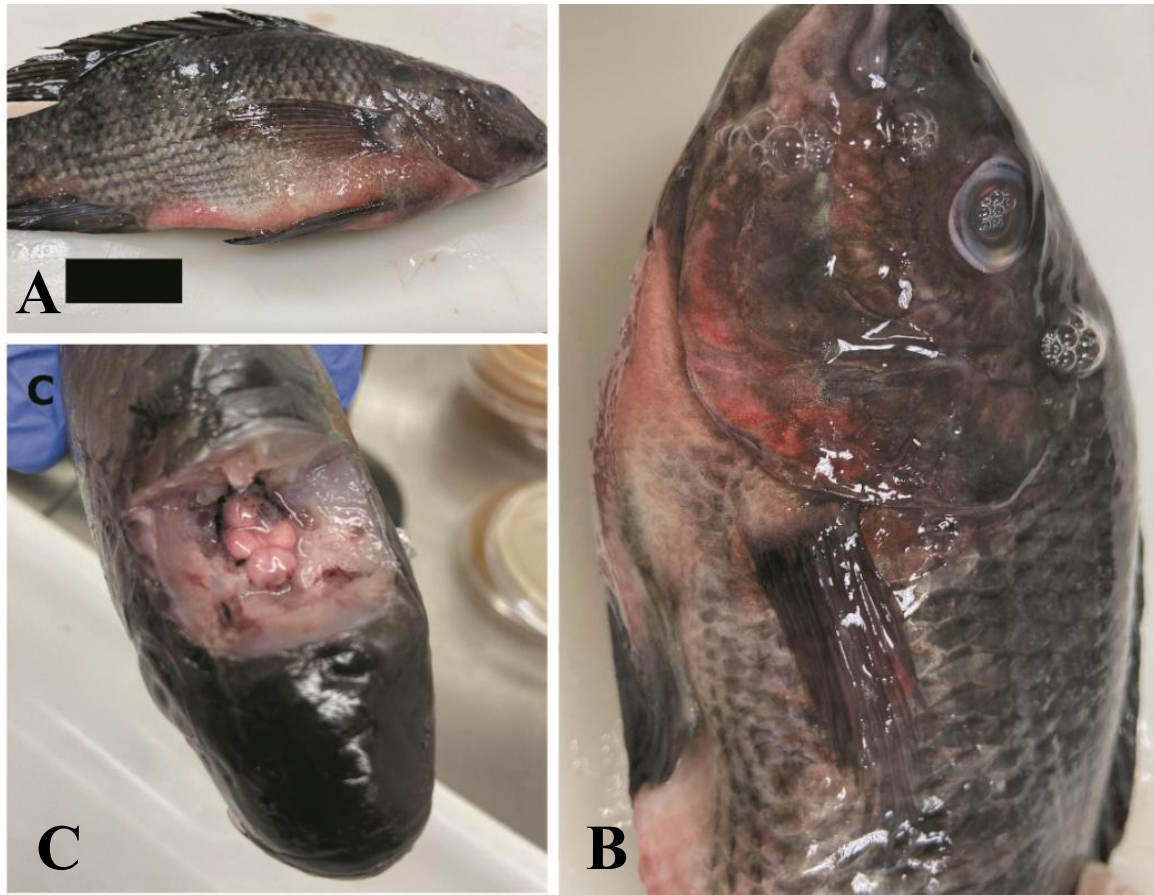


Figure 3. Nile tilapia experimentally infected with a lethal dose (LD50) of *L. garvieae* (OQ325240) demonstrating clinical signs such as abdominal and opercular hemorrhage (A), ocular opacity (A, B), and exposed brain for microbiological analysis for bacterial reisolation (C).

The LD50% was established at 1.3×10^6 CFU/mL, and the LD80, LD60, LD40, and LD30 were 3.6×10^7 , 3.9×10^6 , 3.4×10^5 , and 2.1×10^4 , respectively (Figure 4).

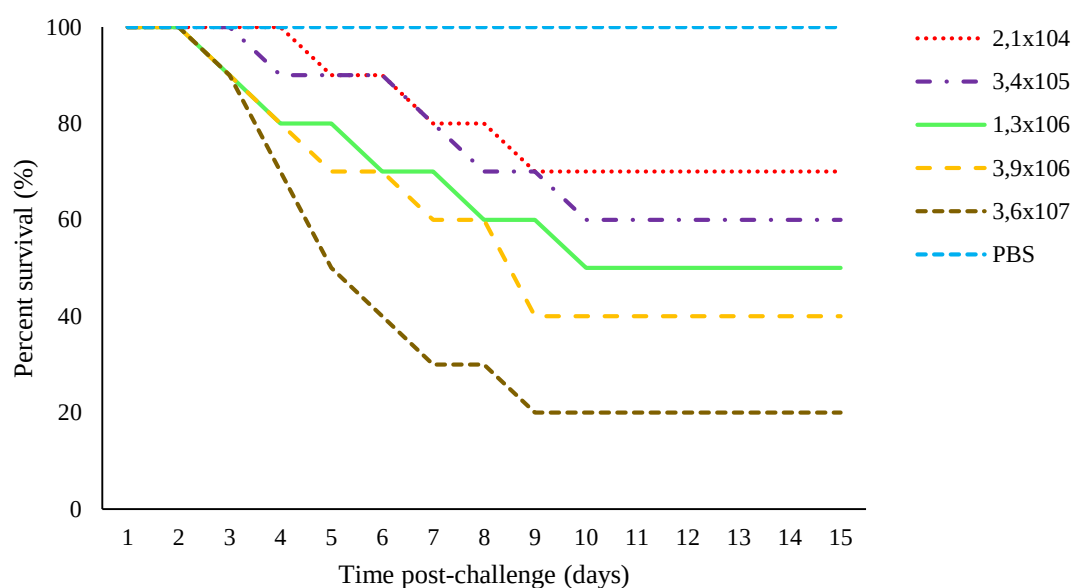


Figure 4. Cumulative mortality of Nile tilapia intraperitoneally inoculated with different doses of *L. garvieae*. Deaths ceased in all experimental groups 10 days after the infection.

3.3. Histopathological Analysis

Histopathological analyses demonstrated that the bacterium causes severe lesions in the liver, spleen, kidney, intestine, and heart of the Nile tilapia infected with lethal dose of *L. garvieae*. In the liver, diffuse glycogen degeneration, moderate to severe, affecting the entire organ, was observed. The spleen showed a normal ratio of red and white pulp, with a moderate presence of melanomacrophage centers. In the kidneys, there was a discreet presence of melanomacrophage centers, as well as a discreet presence of inflammatory infiltrate in the cardiac chambers. The intestines presented moderate edema, fusion, and loss of epithelium in the intestinal villi (Figure 5).

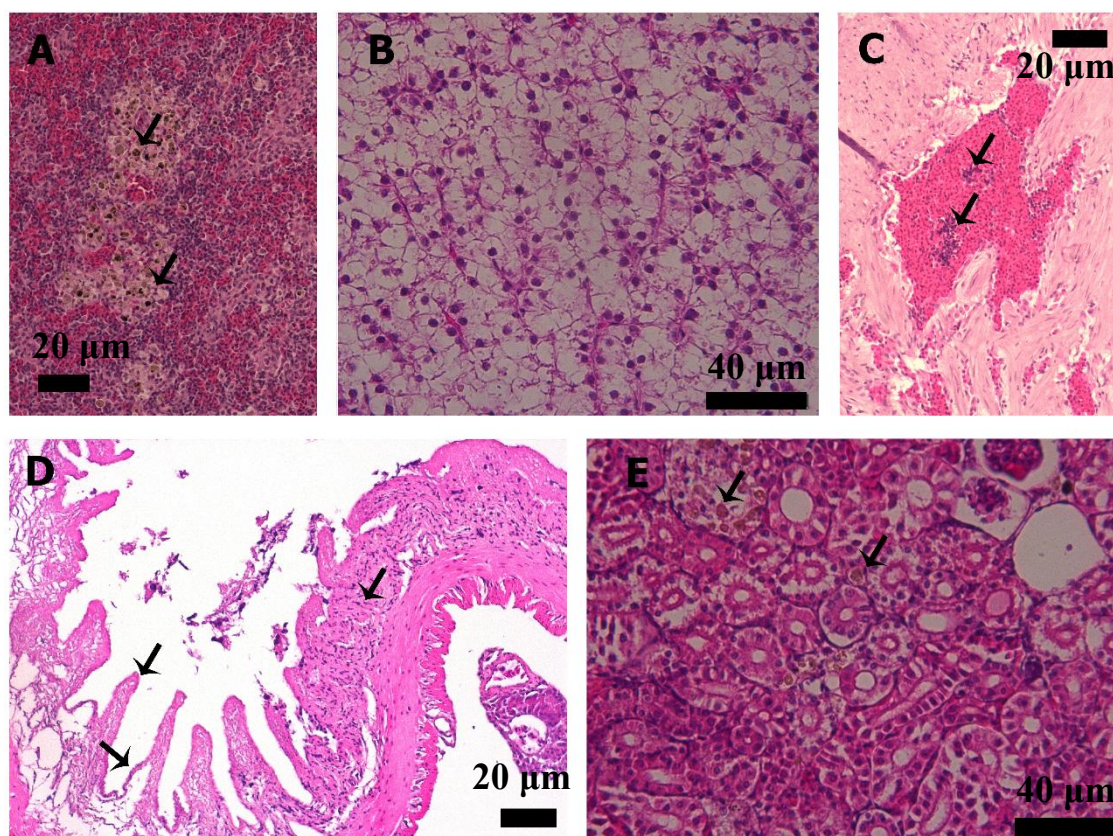


Figure 5. Histopathological alterations observed in Nile tilapia juveniles experimentally infected with 1.3×10^6 CFU/mL of *L. garvieae*. Melanomacrophage centers in the spleen (A), diffuse glycogen degeneration, moderate to severe, in the liver (B); discrete presence of inflammatory infiltrate in cardiac chambers (C); presence of moderate edema, fusion, and loss of epithelium in intestinal villi (D); discrete presence of melanomacrophage centers in the kidney (E). Hematoxylin and eosin (HE) staining. All alterations are indicated by arrows.

3.4. Therapeutic efficacy of the bioactive peptide against lactococcosis

Tilapia from groups 5 and 6, or control groups (PBS), did not show clinical signs of lactococcosis and did not present mortality during the 30 days of observation. Group 4 (intraperitoneal injection of *L. garvieae* and untreated) recorded the first mortalities 48 hours after bacterial inoculation, and these occurred until the 16th day; after that, no mortality was recorded (Figure 6). After 48 hours of bacterial infection, clinical signs consistent with those caused by *L. garvieae* were observed in groups 1, 2, and 3, such as lethargy, erratic swimming, gill pallor, melanosis, exophthalmia, hemorrhage, and ascites (Figure 7).

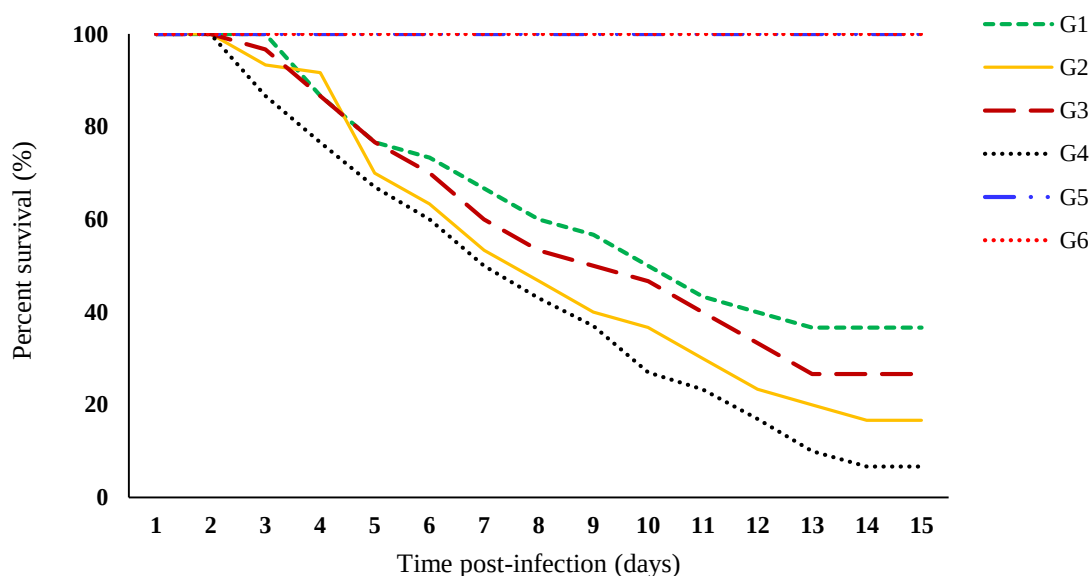


Figure 6. Survival curves of Nile tilapia juveniles experimentally infected with 1.3×10^6 CFU/mL of *L. garvieae* (G1, G2, and G3) and treated with bioactive peptide and FFC (15mg/kg) by gavage and intraperitoneally; (G4) inoculated with the pathogen and untreated, and control groups (G5 and G6) inoculated by gavage and intraperitoneally with PBS.

All experimental groups showed high mortality rates (G1 – 63.5%, G2 – 83.21%, G3 – 73.56%, G4 – 93.3%). The low percentage of animal survival did not reveal a significant difference between the groups. However, group G1, which received (15mg/kg) of the bioactive peptide by gavage, ceased mortality on the 12th day after bacterial challenge, while group (G4), which received 15mg/kg of florfenicol by gavage, only ceased mortality on the 14th day after the challenge. Regarding the reisolation of bacteria from the organs of surviving animals, this was only possible in groups 2 and 4, as the groups treated with the peptide did not present bacteria in their organs.

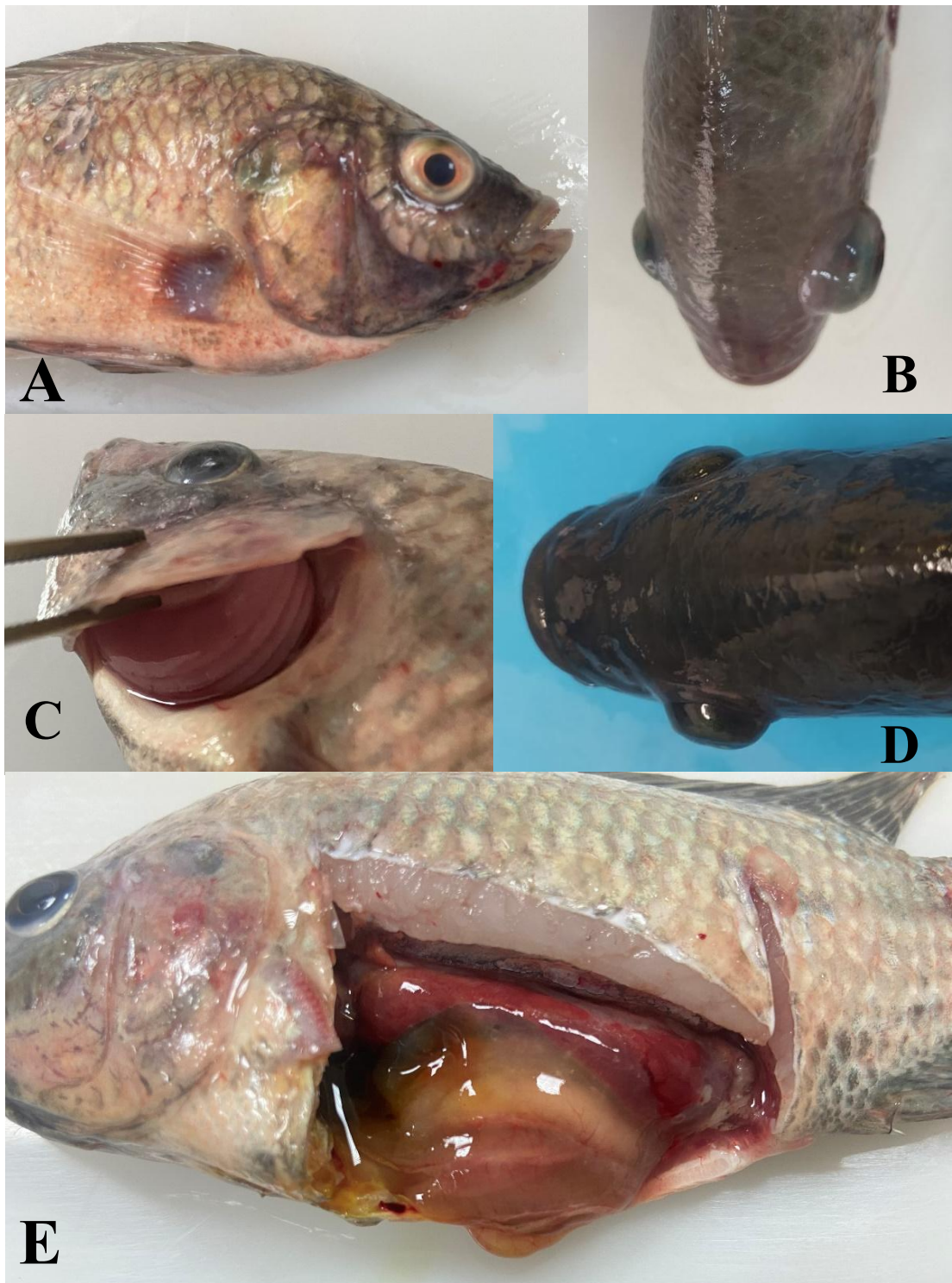


Figure 7. Nile tilapia after bacterial infection and treated with bioactive peptide and FFC. Presence of generalized hemorrhage on the body surface (A); Unilateral exophthalmos (B); Gill paleness (C); Unilateral exophthalmos and melanosis (D); Hemorrhagic spots on the body, accumulation of fluid in the coelomic cavity, and friable organs (E).

4. Discussion

The bacterium *Lactococcus garvieae* is considered an emerging pathogen in global aquaculture, responsible for hemorrhagic septicemia often fatal in tilapia and other fish species (Evans et al., 2009; Itsaro et al., 2012; Tsai et al., 2012; Baba et al., 2017; Abdelfatah & Mahboub, 2018; Bwalya et al., 2021; Egger et al., 2023;) and also a problem for humans, as it is zoonotic (Rao et al., 2022).

This study isolated and characterized a virulent strain of this bacterium responsible for massive death in Nile tilapia in a commercial fish farm. We confirmed the pathogenicity of the bacterium for Nile tilapia after performing the Koch's postulate, showing that the fish exhibited generalized hemorrhage and severe changes in major organs, like those observed in fish from the fish farm. The bacterium is often misdiagnosed due to the similarity of clinical signs with *Streptococcus agalactiae* (Vendrell et al., 2006).

Therefore, the correct identification of a pathogen and the study of its pathogenicity are fundamental for the implementation of control and eradication measures. Often, the correct diagnosis is neglected, and to contain the spread of the pathogen throughout the system, antimicrobials are used incorrectly, not respecting good veterinary practices, which can cause serious problems for both the production chain and the environment, including humans (Assane et al., 2019; Bilen et al., 2019; Pilarski et al., 2017; Raida et al., 2011).

The main way to prevent bacterial diseases in aquaculture is through vaccination; however, there is no commercial vaccine available for lactococcosis. Thus, research on new products with immunostimulant and bactericidal potential is crucial for the sustainability of aquaculture and to mitigate the impact of this disease. Peptides with potential antimicrobial activity are considered promising in disease prevention due to their antimicrobial and immunomodulatory activity and reduced likelihood of causing bacterial resistance (Barroso et al., 2021). Some recent studies have demonstrated the efficacy of certain peptides against pathogens in aquaculture. The use of hepcidin in striped bass (*Centropomus striata*) infected with *Vibrio anguillarum* made the animal more resistant to the pathogen and contributed to the reduction of mortality (Álvarez et al., 2016). Another study using hepcidin (hamp 1 and 2) demonstrated that hamp2 substantially reduced mortality and bacterial load of *Photobacterium damsela* spp. piscicida in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*), presenting itself as a viable

alternative to the use of antimicrobials (Barroso et al., 2021). The antimicrobial peptide LL-37 (human cathelicidin) after demonstrating bactericidal activity against *Streptococcus agalactiae* in vitro was selected for in vivo testing to treat streptococcosis in Nile tilapia infected with the bacteria. The results of the in vivo test showed that despite the bactericidal activity in vitro, the peptide was unable to control the disease in tilapia (de Sousa et al., 2021). In our study, we tested the efficacy of a bioactive peptide derived from plants in Nile tilapia infected with *Lactococcus garvieae*, and the results were promising. The fish treated with the peptide showed the lowest mortality rate, similar to the fish treated with florfenicol, and at the end of the experiment, the groups treated with the peptide showed no bacterial persistence. This result is crucial for aquaculture, as it proves that the peptide has a bactericidal effect and is safe. The chances of a peptide developing bacterial resistance are very small, unlike an antimicrobial.

The histopathological findings presented in this study elucidate the impact of *L. garvieae* infection on the internal organs of Nile tilapia. The observed lesions in the liver, spleen, kidney, intestine, and heart underscore the systemic nature of the infection and its ability to affect multiple organ systems (Brum et al., 2018).

In this study, the normal ratio of red and white pulp in the spleen, coupled with a moderate presence of melanomacrophage centers, indicates a relatively balanced immune response. The findings bear resemblance to specimens of surubim (*Pseudoplatystoma spp.*) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*) experimentally infected with *L. garvieae* (Rodrigues et al., 2020 & Akayli et al., 2022). Melanomacrophage centers are known to play a role in antigen processing and immune regulation, and their presence suggests an active immune response to the infection in the spleen (Sayed et al., 2022 & Zapata et al., 2022), highlighting the action of the innate fish immune system against the pathogen.

In the liver, the identification of diffuse glycogen degeneration, ranging from moderate to severe and affecting the entire organ, is attention-grabbing. This suggests a significant metabolic disruption in hepatocytes, possibly induced by the bacterium (Tilg et al., 2021). Understanding the mechanisms behind this glycogen degeneration could provide insights into the pathogenicity of *L. garvieae* in the liver, aligning with the findings by Shain et al., (2022), where histopathological changes evaluated in experimentally infected rainbow trout are less aggressive compared to free-living fish but do not diverge from clinical signs reported by various authors (Rodrigues et al., 2020; Abu-Elala et al., 2020; Akayli et al., 2022). It is noteworthy that the degree of injury may

vary depending on the virulence of the bacterial strain causing lesions in the host (Didinen et al., 2014).

The discreet presence of melanomacrophage centers in the kidneys and inflammatory infiltrate in the cardiac chambers suggests that the pathogen may have tropism for these organs (Reddacliff & Whittington et al., 1996). Analyses conducted by (Abu-Elala et al., 2020 & Akayli et al., 2022) revealed diffuse necrotic phenomena and hemorrhagic occurrences in the myocardial cells of the cardiac organ. Simultaneously, enterocyte cells covering the cardiac region exhibited necrotic alterations as a consequence of these pathological processes (Akayli et al., 2022).

The observed moderate edema, fusion, and loss of epithelium in the intestinal villi highlight the impact of the infection on the gastrointestinal tract. These changes may contribute to the overall morbidity of the infected tilapia, affecting nutrient absorption and overall intestinal health (Su et al., 2017 & Brum et al., 2018).

Another relevant point in our study was that fish treated with the bioactive peptide exhibited clinical signs characteristic of lactococcosis and started to die later than the groups not treated with the peptide. When comparing the onset of clinical signs and the initiation of deaths between fish treated with the peptide and those treated with florfenicol, we can observe that both treatments were effective. However, the fish treated with peptide had deaths concluded two days earlier, and the clinical signs of lactococcosis were less pronounced in this group than in those treated with the antimicrobial, clearly demonstrating the efficacy of the peptide as an antimicrobial.

This is since antimicrobial peptides (AMPs) have a broad-spectrum antimicrobial action that acts simultaneously at various sites, drastically reducing the chances of the pathogen undergoing mutations and colonizing the entire organism. AMPs also act on bacterial structures, particularly membranes, through nonspecific mechanisms, greatly reducing the likelihood of developing bacterial resistance (Bhat et al., 2022; Chaturvedi et al., 2020; Kim, 2014; León Madrazo & Segura Campos, 2020; Seo et al., 2013).

In conclusion, the oral dose of 15 mg/kg of the bioactive peptide is effective in reducing deaths caused by *Lactococcus garvieae* in Nile tilapia and is effective against the persistence of this bacterium in fish. This suggests that the administration of the bioactive peptide is an important tool for treating lactococcosis in Nile tilapia, making aquaculture more sustainable, and contributing to the reduction in the use of antimicrobials and bacterial resistance.

5. Bibliographic Reference

- Abdelfatah, E.N., Mahboub, H.H.H., 2018. Studies on the effect of *Lactococcus garvieae* of dairy origin on both cheese and Nile tilapia (*O. niloticus*). *Int. J. Vet. Sci. Med.* 6, 201–207. <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2018.11.002>
- Abu-Elala, N.M., Abd-Elsalam, R.M., Younis, N.A., 2020. Streptococcosis, Lactococcosis and Enterococcosis are potential threats facing cultured Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) production. *Aquac. Res.* 51, 4183–4195. <https://doi.org/10.1111/are.14760>
- Akaylı, T., Ürkü, Ç., Göken, S.Z., 2022. Pathological aspects of experimental infection of *Lactococcus garvieae* in European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L.): Clinical, hematological, and histopathological parameters. *Aquat. Res.* 5, 219–229. <https://doi.org/10.3153/ar22021>
- Álvarez, C.A., Acosta, F., Montero, D., Guzmán, F., Torres, E., Vega, B., Mercado, L., 2016. Synthetic hepcidin from fish: Uptake and protection against *Vibrio anguillarum* in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish Shellfish Immunol.* 55, 662–670. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.06.035>
- Anwar, Z., Galor, A., Albini, T.A., Miller, D., Perez, V., Davis, J.L., 2013. The diagnostic utility of anterior chamber paracentesis with polymerase chain reaction in anterior uveitis. *Am. J. Ophthalmol.* 155, 781–786. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2012.12.008>
- Assane, I.M., de Sousa, E.L., Valladão, G.M.R., Tamashiro, G.D., Criscoulo-Urbini, E., Hashimoto, D.T., Pilarski, F., 2021. Phenotypic and genotypic characterization of *Aeromonas jandaei* involved in mass mortalities of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) in Brazil. *Aquaculture* 541. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736848>
- Assane, I.M., Gozi, K.S., Valladão, G.M.R., Pilarski, F., 2019. Combination of antimicrobials as an approach to reduce their application in aquaculture: Emphasis on the use of thiamphenicol/florfenicol against *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture* 507, 238–245. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.04.021>
- Assefa, A., Abunna, F., 2018. Maintenance of Fish Health in Aquaculture: Review of Epidemiological Approaches for Prevention and Control of Infectious Disease of Fish. *Vet. Med. Int.* 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/5432497>
- Baba, E., Acar, Ü., Yılmaz, S., Öntaş, C., Kesbiç, O.S., 2017. Pre-challenge and post-challenge haemato-immunological changes in *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) fed argan oil against *Lactococcus garvieae*. *Aquac. Res.* 48, 4563–4572. <https://doi.org/10.1111/are.13282>
- Baco, N., Oslan, S.N.H., Shapawi, R., Mohhtar, R.A.M., Noordin, W.N.M., Huda, N., 2022. Antibacterial activity of functional bioactive peptides derived from fish protein hydrolysate. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* 967. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/967/1/012019>
- Barroso, C., Carvalho, P., Nunes, M., Gonçalves, J.F.M., Rodrigues, P.N.S., Neves, J. V., 2021. The Era of Antimicrobial Peptides: Use of Hepcidins to Prevent or Treat Bacterial Infections and Iron Disorders. *Front. Immunol.* 12, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.754437>

- Bhat, R.A.H., Khangembam, V.C., Thakuria, D., Pant, V., Tandel, R.S., Tripathi, G., Sarma, D., 2022. Antimicrobial activity of an artificially designed peptide against fish pathogens. *Microbiol. Res.* 260, 127039. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127039>
- Bilen, S., Kenanoglu, O.N., Terzi, E., Ozdemir, R.C., Sonmez, A.Y., 2019. Effects of tetra (*Cotinus coggygria*) and common mallow (*Malva sylvestris*) plant extracts on growth performance and immune response in Gilthead Sea bream (*Sparus aurata*) and European Sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 512, 734251. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734251>
- Brum, A., Cardoso, L., Chagas, E.C., Chaves, F.C.M., Mouriño, J.L.P., Martins, M.L., 2018. Histological changes in Nile tilapia fed essential oils of clove basil and ginger after challenge with *Streptococcus agalactiae*. *Aquaculture* 490, 98–107. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.02.040>
- Bwalya, P., Hang'ombe, B.M., Evensen, Ø., Mutoloki, S., 2021. *Lactococcus garvieae* isolated from Lake Kariba (Zambia) has low invasive potential in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J. Fish Dis.* 44, 721–727. <https://doi.org/10.1111/jfd.13339>
- Bwalya, P., Hang'Ombe, B.M., Gamil, A.A., Munang'Andu, H.M., Evensen, Ø., Mutoloki, S., 2020. A whole-cell *Lactococcus garvieae* autovaccine protects Nile tilapia against infection. *PLoS One* 15, 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230739>
- Byadgi, O., Chen, Y.C., Barnes, A.C., Tsai, M.A., Wang, P.C., Chen, S.C., 2016. Transcriptome analysis of grey mullet (*Mugil cephalus*) after challenge with *Lactococcus garvieae*. *Fish Shellfish Immunol.* 58, 593–603. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.10.006>
- Chan, J.F.W., Woo, P.C.Y., Teng, J.L.L., Lau, S.K.P., Leung, S.S.M., Tam, F.C.C., Yuen, K.Y., 2011. Primary infective spondylodiscitis caused by *Lactococcus garvieae* and a review of human *L. garvieae* infections. *Infection* 39, 259–264. <https://doi.org/10.1007/s15010-011-0094-8>
- Chang, P.H., Lin, C.W., Lee, Y.C., 2002. *Lactococcus garvieae* infection of cultured rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, in Taiwan and associated biophysical characteristics and histopathology. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 22, 319–327.
- Chaturvedi, P., Bhat, R.A.H., Pande, A., 2020. Antimicrobial peptides of fish: innocuous alternatives to antibiotics. *Rev. Aquac.* 12, 85–106. <https://doi.org/10.1111/raq.12306>
- Ching, J.J., Shuib, A.S., Abdul Majid, N., Mohd Taufek, N., 2021. Immunomodulatory activity of β -glucans in fish: Relationship between β -glucan administration parameters and immune response induced. *Aquac. Res.* 52, 1824–1845. <https://doi.org/10.1111/are.15086>
- Cunha, S.A., Pintado, M.E., 2022. Bioactive peptides derived from marine sources: Biological and functional properties. *Trends Food Sci. Technol.* 119, 348–370. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.08.017>
- de Sousa, E.L., Assane, I.M., Santos-Filho, N.A., Cilli, E.M., de Jesus, R.B., Pilarski, F., 2021. Haematological, biochemical and immunological biomarkers, antibacterial activity, and survival in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* after treatment using

- antimicrobial peptide LL-37 against *Streptococcus agalactiae*. *Aquaculture* 533. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736181>
- Didinen, B.I., Yardimci, B., Onuk, E.E., Metin, S., Yildirim, P., 2014. Naturally lactococcus garvieae infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792): New histopathological observations, phenotypic and molecular identification. *Rev. Med. Vet. (Toulouse)*. 165, 12–19.
- Egger, R.C., Rosa, J.C.C., Resende, L.F.L., de Pádua, S.B., de Oliveira Barbosa, F., Zerbini, M.T., Tavares, G.C., Figueiredo, H.C.P., 2023. Emerging fish pathogens *Lactococcus petauri* and *L. garvieae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) farmed in Brazil. *Aquaculture* 565. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.739093>
- Evans, J.J., Klesius, P.H., Shoemaker, C.A., 2009. First isolation and characterization of *Lactococcus garvieae* from Brazilian Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), and pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* (Spix & Agassiz). *J. Fish Dis.* 32, 943–951. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2009.01075.x>
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user friendly biological sequence. *Nucleic Acids Symp. Ser.*
- FAO-Food and Agriculture Organization. (2022). The state of world fisheries and aquaculture. Roma. <https://www.fao.org/3/cc0461en/online/sofia/2022/world-fisheries-aquaculture.html>
- IBGE- Brazilian Institute of Geography and Statistics. (2021). Monthly Services Survey. <https://sidra.ibge.gov.br/home/pms/brasil>.
- Irshath, A.A., Rajan, A.P., Vimal, S., Prabhakaran, V.S., Ganesan, R., 2023. Bacterial Pathogenesis in Various Fish Diseases: Recent Advances and Specific Challenges in Vaccine Development. *Vaccines* 11, 1–14. <https://doi.org/10.3390/vaccines11020470>
- Itsaro, A., Suanyuk, N., Tantikitti, C., 2012. Multiplex PCR for simultaneous detection of *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus iniae* and *Lactococcus garvieae*: A case of *S. agalactiae* infection in cultured Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and red tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis mossambicus*). *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 34, 495–500.
- Kim, J.M., 2014. Antimicrobial Proteins in Intestine and Inflammatory Bowel Diseases. *Intest. Res.* 12, 20. <https://doi.org/10.5217/ir.2014.12.1.20>
- Kobayashi, T., Kajiwara, M., Wahyuni, M., Hamada-Sato, N., Imada, C., Watanabe, E., 2004. Effect of culture conditions on lactic acid production of *Tetragenococcus* species. *J. Appl. Microbiol.* 96, 1215–1221. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02267.x>
- Leber, A.L., Everhart, K., Balada-Llasat, J.M., Cullison, J., Daly, J., Holt, S., Lephart, P., Salimnia, H., Schreckenberger, P.C., DesJarlais, S., Reed, S.L., Chapin, K.C., LeBlanc, L., Johnson, J.K., Soliven, N.L., Carroll, K.C., Miller, J.A., Bard, J.D., Mestas, J., Bankowski, M., Enomoto, T., Hemmert, A.C., Bourzac, K.M., 2016. Multicenter evaluation of biofire filmarray meningitis/encephalitis panel for detection of bacteria, viruses, and yeast in cerebrospinal fluid specimens. *J. Clin. Microbiol.* 54, 2251–2261. <https://doi.org/10.1128/JCM.00730-16>
- León Madrazo, A., Segura Campos, M.R., 2020. Review of antimicrobial peptides as promoters of food safety: Limitations and possibilities within the food industry. *J.*

- Food Saf. 40, 1–15. <https://doi.org/10.1111/jfs.12854>
- Linh, N.T., Qui, N.H., Tho, N. Van, 2023. The Utilization of β -Glucan in Feed as Growth Promoter for Broilers : A Mini Review 3, 42–44.
- Liu, X., Huang, Z., Jia, S., Zhang, J., Li, K., Luo, Y., 2018. The roles of bacteria in the biochemical changes of chill-stored bighead carp (*Aristichthys nobilis*): Proteins degradation, biogenic amines accumulation, volatiles production, and nucleotides catabolism. Food Chem. 255, 174–181. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.069>
- Meyburgh, C.M., Bragg, R.R., Boucher, C.E., 2017. *Lactococcus garvieae*: An emerging bacterial pathogen of fish. Dis. Aquat. Organ. 123, 67–79. <https://doi.org/10.3354/dao03083>
- Morris, S., Cerceo, E., 2020. Trends, epidemiology, and management of multi-drug resistant gram-negative bacterial infections in the hospitalized setting. Antibiotics 9, 1–20. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040196>
- Ohbayashi, K., Oinaka, D., Hoai, T.D., Yoshida, T., Nishiki, I., 2017. PCR-mediated identification of the newly emerging pathogen *Lactococcus garvieae* serotype II from *Seriola quinqueradiata* and *S. dumerili*. Fish Pathol. 52, 46–49. <https://doi.org/10.3147/jsfp.52.46>
- Ooyama, T., Hirokawa, Y., Minami, T., Yasuda, H., Nakai, T., Endo, M., Ruangpan, L., Yoshida, T., 2002. Cell-surface properties of *Lactococcus garvieae* strains and their immunogenicity in the yellowtail *Seriola quinqueradiata*. Dis. Aquat. Organ. 51, 169–177. <https://doi.org/10.3354/dao051169>
- Peixe, B. R. (2023). Brazilian Fish Farming Yearbook. Brazilian Aquaculture Association: São Paulo, Brazil.
- Pilarski, F., Ferreira de Oliveira, C.A., Darpossolo de Souza, F.P.B., Zanuzzo, F.S., 2017. Different β -glucans improve the growth performance and bacterial resistance in Nile tilapia. Fish Shellfish Immunol. 70, 25–29. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.06.059>
- Prabu, D.L., Sahu, N.P., Pal, A.K., Dasgupta, S., Narendra, A., 2016. Immunomodulation and interferon gamma gene expression in sutchi cat fish, *Pangasianodon hypophthalmus*: Effect of dietary fucoidan rich seaweed extract (FRSE) on pre and post challenge period. Aquac. Res. 47, 199–218. <https://doi.org/10.1111/are.12482>
- Raida, M.K., Nylén, J., Holten-Andersen, L., Buchmann, K., 2011. Association between plasma antibody response and protection in rainbow trout *oncorhynchus mykiss* immersion vaccinated against *yersinia ruckeri*. PLoS One 6, 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018832>
- Rao, S., Pham, T.H., Poudyal, S., Cheng, L.W., Nazareth, S.C., Wang, P.C., Chen, S.C., 2022. First report on genetic characterization, cell-surface properties and pathogenicity of *Lactococcus garvieae*, emerging pathogen isolated from cage-cultured cobia (*Rachycentron canadum*). Transbound. Emerg. Dis. 69, 1197–1211. <https://doi.org/10.1111/tbed.14083>
- Reddacliff, L.A., Whittington, R.J., 1996. Pathology of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss walbaum*) and redfin perch (*Perca fluviatilis* L). J. Comp. Pathol. 115, 103–115.

[https://doi.org/10.1016/S0021-9975\(96\)80033-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9975(96)80033-8)

- Rodrigues, R.A., do Nascimento Silva, A.L., Siqueira, M.S., Pilarski, F., Leal, C.R.B., Kuibida, K.V., de Campos, C.M., Fernandes, C.E., 2020. Hematological, biochemical, and histopathological responses in sorubim *Pseudoplatystoma* spp. experimentally infected with *Lactococcus garvieae*. *Aquac. Int.* 28, 1907–1923. <https://doi.org/10.1007/s10499-020-00566-5>
- Sayed, R.K.A., Zacccone, G., Capillo, G., Albano, M., Mokhtar, D.M., 2022. Structural and Functional Aspects of the Spleen in Molly Fish *Poecilia sphenops* (Valenciennes, 1846): Synergistic Interactions of Stem Cells, Neurons, and Immune Cells. *Biology (Basel)*. 11. <https://doi.org/10.3390/biology11050779>
- Sebastião, F. de A., Lemos, E.G.M., Pilarski, F., 2015. Validation of absolute quantitative real-time PCR for the diagnosis of *Streptococcus agalactiae* in fish. *J. Microbiol. Methods* 119, 168–175. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.10.021>
- Seo, A.N., Lee, H.J., Kim, E.J., Kim, H.J., Jang, M.H., Lee, H.E., Kim, Y.J., Kim, J.H., Park, S.Y., 2013. Tumour-infiltrating CD8⁺ lymphocytes as an independent predictive factor for pathological complete response to primary systemic therapy in breast cancer. *Br. J. Cancer* 109, 2705–2713. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.634>
- Shahin, K., Veek, T., Heckman, T.I., Littman, E., Mukkatira, K., Adkison, M., Welch, T.J., Imai, D.M., Pastenkos, G., Camus, A., Soto, E., 2022. Isolation and characterization of *Lactococcus garvieae* from rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*, from California, USA. *Transbound. Emerg. Dis.* 69, 2326–2343. <https://doi.org/10.1111/tbed.14250>
- Shiry, N., Shomali, T., Soltanian, S., Akhlaghi, M., 2019. Comparative single-dose pharmacokinetics of orally administered florfenicol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792) at health and experimental infection with *Streptococcus iniae* or *Lactococcus garvieae*. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 42, 214–221. <https://doi.org/10.1111/jvp.12736>
- SINDAN. (2022). Veterinary Products Compendium. Retrieved from 508 <http://www.cpv.com.br/cpv/>
- Soliman, W.S., Shaapan, R.M., Mohamed, L.A., Gayed, S.S.R., 2019. Recent biocontrol measures for fish bacterial diseases, in particular to probiotics, bio-encapsulated vaccines, and phage therapy. *Open Vet. J.* 9, 190–195. <https://doi.org/10.4314/ovj.v9i3.2>
- Soltani, M., Nikbakht, G., Mousavi, H.A.E., Ahmadzadeh, N., 2008. Epizootic outbreaks of lactococcosis caused by *Lactococcus garvieae* in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 28, 207–212.
- Soltani, S., Couture, F., Boutin, Y., Ben Said, L., Cashman-Kadri, S., Subirade, M., Biron, E., Fliss, I., 2021. In vitro investigation of gastrointestinal stability and toxicity of 3-hydroxypropionaldehyde (reuterin) produced by *Lactobacillus reuteri*. *Toxicol. Reports* 8, 740–746. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2021.03.025>
- Su, Y., Feng, J., Liu, C., Li, W., Xie, Y., Li, A., 2017. Dynamic bacterial colonization and microscopic lesions in multiple organs of tilapia infected with low and high pathogenic *Streptococcus agalactiae* strains. *Aquaculture* 471, 190–203. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.01.013>

- Tavares-Dias, M., Martins, M.L., 2017. An overall estimation of losses caused by diseases in the Brazilian fish farms. *J. Parasit. Dis.* 41, 913–918. <https://doi.org/10.1007/s12639-017-0938-y>
- Ting, J.P., Tung, F., Antonysamy, S., Wasserman, S., Jones, S.B., Zhang, F.F., Espada, A., Broughton, H., Chalmers, M.J., Woodman, M.E., Bina, H.A., Dodge, J.A., Benach, J., Zhang, A., Groshong, C., Manglicmot, D., Russell, M., Afshar, S., 2018. Utilization of peptide phage display to investigate hotspots on IL-17A and what it means for drug discovery. *PLoS One* 13, 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190850>
- Tilg, H., Adolph, T. E., Dudek, M., & Knolle, P. 2021. Non-alcoholic fatty liver disease: the interplay between metabolism, microbes and immunity. *Nature metabolism*, 3(12), 1596-1607.
- Tsai, M.A., Wang, P.C., Liaw, L.L., Yoshida, T., Chen, S.C., 2012. Comparison of genetic characteristics and pathogenicity of *Lactococcus garvieae* isolated from aquatic animals in Taiwan. *Dis. Aquat. Organ.* 102, 43–51. <https://doi.org/10.3354/dao02516>
- Vela, A.I., Vazquez, J., Gibello, A., Blanco, M.M., Moreno, M.A., Liebana, P., Albendea, C., Alcalá, B., Mendez, A., Dominguez, L., Fernandez-Garayzabal, J.F., 2000. Phenotypic and genetic characterization of *Lactococcus garvieae* isolated in Spain from lactococcosis outbreaks and comparison with isolates of other countries and sources. *J. Clin. Microbiol.* 38, 3791–3795. <https://doi.org/10.1128/jcm.38.10.3791-3795.2000>
- Vendrell, D., Balcázar, J.L., Ruiz-Zarzuela, I., de Blas, I., Gironés, O., Múzquiz, J.L., 2006. *Lactococcus garvieae* in fish: A review. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 29, 177–198. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2006.06.003>
- Wangkahart, E., Thongsrisuk, A., Vialle, R., Pholchamat, S., Sunthamala, P., Phudkliang, J., Srisapoome, P., Wang, T., Secombes, C.J., 2023. Comparative study of the effects of Montanide™ ISA 763A VG and ISA 763B VG adjuvants on the immune response against *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Shellfish Immunol.* 134, 108563. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2023.108563>
- Zapata, A.G., 2022. Lympho-Hematopoietic Microenvironments and Fish Immune System. *Biology (Basel)*. 11, 1–25. <https://doi.org/10.3390/biology11050747>
- Zorriehzahra, M.J., Delshad, S.T., Adel, M., Tiwari, R., Karthik, K., Dhama, K., Lazado, C.C., 2016. Probiotics as beneficial microbes in aquaculture: an update on their multiple modes of action: a review. *Vet. Q.* 36, 228–241. <https://doi.org/10.1080/01652176.2016.1172132>

CAPITULO 4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os efeitos da suplementação dietética com peptídeos bioativos (BP) na saúde e na resposta imunológica da tilápia-do-Nilo fornece informações valiosas sobre aplicações potenciais para a sustentabilidade da aquicultura. O estudo revelou efeitos dose-dependentes da PB em vários parâmetros imunológicos, incluindo atividade respiratória de leucócitos, atividade de lisozima e atividade de complemento. Os resultados sugerem que doses mais baixas de PB podem melhorar a função imunológica, enquanto doses mais altas podem levar à supressão ou a resultados adversos. A diminuição observada nos níveis de glicose no sangue pós-suplementação indica benefícios potenciais para a saúde metabólica e controle do estresse na tilápia.

Além disso, o estudo demonstrou a eficácia do PB na mitigação de infecções bacterianas, particularmente contra *L. garvieae* e *S. agalactiae*, patógenos de expressão significativa na aquicultura. A suplementação de peptídeos não apenas melhorou as taxas de sobrevivência, mas também inibiu efetivamente o crescimento bacteriano e preveniu sua colonização. As análises histopatológicas forneceram informações sobre a natureza sistêmica da infecção pelos patógenos, destacando o impacto em múltiplos sistemas de órgãos e o potencial papel terapêutico da BP na mitigação de alterações patológicas.

É importante ressaltar que o estudo destaca a necessidade de mais pesquisas para elucidar os mecanismos subjacentes e otimizar as estratégias de suplementação para a sustentabilidade da aquicultura. A relação dose-resposta observada neste estudo sugere a importância de considerar a variabilidade individual entre as populações de peixes e as potenciais interações com fatores ambientais.

Dessa maneira, as descobertas contribuem para o crescente corpo de literatura sobre as propriedades imunomoduladoras e antimicrobianas dos peptídeos bioativos na aquicultura. Ao fornecer evidências da sua eficácia no aumento da resposta imunitária e no combate a infecções bacterianas, este estudo apoia o uso potencial do BP como uma alternativa sustentável aos antimicrobianos na produção aquícola, mitigando assim o risco de resistência bacteriana e promovendo a saúde ambiental e humana.