

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP**

**Vacina e peixes resistentes à *Streptococcus
agalactiae* sorotipo Ib realmente garantem
maior sobrevida da tilápia-do-Nilo?**

**Bruno Luis Miani Verri
Biólogo**

Jaboticabal, São Paulo

2022

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS JABOTICABAL**

Vacina e peixes resistentes à *Streptococcus agalactiae* sorotipo Ib realmente garantem maior sobrevida da tilápia-do-Nilo?

Bruno Luis Miani Verri

Orientadora: Dra. Fabiana Pilarski

Dissertação 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 Mestre em Aquicultura.

Jaboticabal, São Paulo

2022

Verri, Bruno
V559v Vacina e peixes resistentes à *Streptococcus agalactiae* sorotipo Ib realmente garantem maior sobrevivência da tilápia-do-Nilo? / Bruno Verri. – Jaboticabal, 2022
vi, 49 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2022

Orientadora: Fabiana Pilarski

Banca examinadora: Vito Antonio Mastrochirico, Suzana Kotzent

Bibliografia

1. Estreptococose. 2. Genética. 3. Imunidade. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3:636.082



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Centro de Aquicultura da Unesp - CAUNESP



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Vacina e peixes resistentes à *Streptococcus agalactiae* sororipo lb garantem maior sobrevivência durante a produção de tilápia-do-Nilo?

AUTOR: BRUNO LUIS MIANI VERRI

ORIENTADORA: FABIANA PILARSKI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em AQUICULTURA, pela Comissão Examinadora:

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

Pós-Doutorando VITO ANTONIO MASTROCHIRICO FILHO (Participação Virtual)
IB/Unesp, Bauru-SP

Dra. SUZANA KOTZENT (Participação Virtual)
Universidade Nilton Lins, Manaus-AM

Jaboticabal, 19 de abril de 2022

Sumário

CAPITULO 1.....	3
RESUMO.....	3
ABSTRACT	4
1. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1. Piscicultura no Brasil	5
2.2. <i>Streptococcus agalactiae</i>	6
2.3. Sistema imune	7
2.4. Vacinação de peixes	8
8. REFERÊNCIAS.....	10
CAPÍTULO II.....	20
RESUMO.....	21
ABSTRACT	22
1. INTRODUÇÃO	23
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
2.1. Peixes e desenho experimental	24
2.2. Preparo da bactéria e Determinação da dose letal – DL75%.....	25
2.3. Análise hematológicas	26
2.4. Análise do sistema imunológico inato	27
2.4.1. Atividade respiratória dos leucócitos.....	27
2.4.2. Atividade da lisozima.....	27
2.4.3. Atividade hemolítica da via alternativa do sistema complemento (HA-AP50)	28
2.5. Resistência à infecção por <i>Streptococcus agalactiae</i>	28
2.6. Análise estatística.....	28
3. RESULTADOS	28
3.1. Variáveis Hematológicas.....	28
3.2. Análise do sistema imunológico inato	30
3.3. Sobrevivência dos peixes após o desafio bacteriano	31
4. DISCUSSÃO	33
5. CONCLUSÃO.....	36
6. AGRADECIMENTOS	36
7. REFERÊNCIAS.....	36

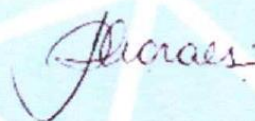
CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Efeito da vacina contra *Streptococcus agalactiae* sorotipo IB e da seleção genética nos parâmetros hematológicos da tilápia-do-Nilo**", protocolo nº 1171/21, sob a responsabilidade da Profª Drª Fabiana Pilarski, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 13 de maio de 2021.

Vigência do Projeto	15/06/2021 a 10/07/2021
Espécie / Linhagem	Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)
Nº de animais	330
Peso / Idade	100g
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	CAUNESP

Jaboticabal, 13 de maio de 2021.



Profa. Dra. Paola Castro Moraes
Vice- Coordenadora – CEUA

AGRADECIMENTOS

À minha família, pela estrutura que me proporcionou durante a vida e por me mostrar a importância de pensar no futuro.

À minha orientadora, Profa. Dra. Fabiana Pilarski, pelos ensinamentos compartilhados e pela confiança, permitindo fazer parte desta equipe.

Ao Prof. Dr. Diogo Hashimoto que abriu a porta do seu laboratório para que pudesse realizar meu experimento e a toda a equipe do LaGeAC que colaborou com o trabalho.

Ao Rubens R. Oliveira, Evandro B. Moro, Inácio M. Assane, Suzana Kotzent e Raphael Barbeta de Jesus pela ajuda e pela amizade nestes últimos dois anos.

Ao Allan e Áurea pelas análises realizadas no laboratório de fisiologia de peixes.

Ao Caunesp, seus professores e funcionários pela estrutura, dedicação e conhecimento que me foi passado.

APOIO FINANCEIRO

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

CAPITULO I

(Revisão Bibliografica)

RESUMO

A piscicultura se desenvolveu consideravelmente nos últimos 50 anos, com aumento médio anual na produção mundial de 5,3%. Dentre as espécies produzidas, a tilápia-do-Nilo e as carpas se destacam como as espécies mais produzidas mundialmente, representando 51,8% da produção. Todavia, com a intensificação da produção, as doenças de origem bacteriana se tornaram um entrave, dentre elas, a estreptococose, causada pelo *Streptococcus agalactiae* tem seu lugar de destaque, provocando perdas de até 90% do plantel quando a água atinge temperatura superior a 28° C. Sinais clínicos como exoftalmia, opacidade e hemorragia ocular, natação errática e ascite podem ser observados nos peixes acometidos pela doença. Comumente nas pisciculturas o tratamento desta doença é realizado através do uso de antimicrobianos. Atualmente, algumas formas alternativas vem sendo incentivadas mundialmente para reduzir a utilização destes fármacos, entre elas a vacinação e o melhoramento genético de famílias focado na resistência às doenças. A utilização de programas de melhoramento genético afim de maximizar características de interesse econômico como resistência as doenças juntamente com a vacinação são ferramentas promissoras para diminuir perdas decorrentes de doenças nas pisciculturas e reduzir gastos com o uso de antimicrobianos. Assim, este estudo combinou essas duas ferramentas de interesse na aquicultura mundial para entender se a vacina contribui para o aumento da sobrevivência de famílias de tilápia-do-Nilo resistentes ao *Streptococcus agalactiae*. Os resultados obtidos foram promissores, demonstrando que a vacinação incrementa o sistema imunológico das famílias resistentes e propicia maior sobrevivência após desafio bacteriano.

Palavras-chave: estreptococose, genética, imunidade, piscicultura, resistência.

ABSTRACT

Fish farming has developed considerably in the last 50 years, with an average annual increase in world production of 5.3%. Among the species farmed, Nile tilapia and carp are the most species farmed worldwide, representing 51.8% of production. However, with the aquaculture intensification, bacterial diseases such as streptococcosis has caused losses of up to 90% of the production when the water reaches a temperature above 28° C. Clinical signs such as exophthalmia, ocular opacity, hemorrhage, erratic swimming and ascites can be observed in fish affected by the disease. Commonly in fish farms, the treatment of this disease is by antibiotic therapy. Currently, some alternative ways have been encouraged worldwide to reduce the use of these drugs, including vaccination and genetic improvement of fish families focused on disease resistance. The use of genetic improvement programs in order to maximize characteristics of economic interest such as disease resistance in combination with vaccination are promising mechanisms to reduce losses by diseases in fish farms and reduce the use of antimicrobials. Thus, this study combined these two tools of interest in aquaculture to investigate whether the vaccine contributes to increasing the survival of Nile tilapia families resistant to *Streptococcus agalactiae*. Finally, the results obtained were promising, demonstrating that vaccination increases the immune response of vaccinated and disease-resistance families and also provides greater survival after bacterial challenge.

Keyword: streptococcosis, genetic, immunity, fish farming, resistance.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Piscicultura no Brasil

A aquicultura atualmente é a atividade com maior crescimento dentro do setor de produção de alimentos de origem animal (FAO, 2020), sendo a sanidade aquícola e a genética fatores importantes para este crescimento. (GUDDING & VAN MUISWINKEL, 2013; OSMOND & COLOMBO, 2019).

Desde o ano de 2000 a piscicultura apresentou um crescimento médio na produção mundial de pescado de 5,3%, e o consumo per capita subiu de 9,9 kg em 1961 para 20,5 kg em 2018. Este aumento considerável no consumo pode estar relacionado ao aumento populacional, melhor renda, busca por alimentos mais saudáveis e a melhoria na distribuição destes produtos devido expansão da produção (FAO, 2020).

O Brasil é um país com potencial para produção de organismos aquáticos, devido sua disponibilidade hídrica para construção de açudes e uso de tanques redes, clima tropical na maior parte de seu território e ocorrência natural de espécies de interesse produtivo. Produzindo 802,930 toneladas de peixe, acumulando um crescimento de 45% desde 2014 (Peixe BR, 2021).

Dentre as principais espécies de interesse, a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) se destaca, sendo a espécie mais produzida no Brasil e a terceira mais produzida no mundo. Este peixe é de grande interesse comercial devido ausência de espinhos intramusculares, manejo simplificado, precocidade, fácil reprodução, baixo custo de produção e rusticidade. Podendo ser produzida em sistemas extensivos e intensivos, em temperaturas entre 24°C a 28 °C. (FIGUEIREDO & VALENTE, 2008; VICENTE et al. 2014; LEIRA et al. 2016; FAO,2020).

Apesar das diversas qualidades desta espécie, a tilápia, assim como todas as outras espécies criadas em sistemas de produção intensivo, está susceptível à doenças. Problemas causados por parasitas, vírus, fungos e bactérias são relatados em peixes submetidos a altas densidades de estocagem (LUQUE, 2004; DINIZ & HONORATO, 2012; SADHU et al. 2014; LIMA-JUNIOR et al. 2021), temperatura inadequada para a espécie (IWASHITA & MACIEL, 2013) e alimentação inapropriada (SADO & ALMEIDA BICUDO, 2012; SHIMADA et al. 2014).

1.2. *Streptococcus agalactiae*

Dentre as principais doenças relacionadas à tilápia-do-Nilo se encontram as bacterioses causadas por patógenos como *Aeromonas hydrophila* (HASSAN et al. 2020), *Francisella orientalis* (Fno) e *Streptococcus agalactiae* (SOTO et al. 2016; DELPHINO et al. 2019).

A estreptococose é uma doença septicêmica causada pela bactéria Gram-positiva *S. agalactiae* que afeta peixes de água doce e marinhos. Este patógeno está associado a altas taxas de morbidade e mortalidade em pisciculturas de todo o mundo (ZHANG, 2020). Surtos desta doença apresentaram um efeito devastador no desenvolvimento da tilapicultura na China, resultando em perdas de 0,4 bilhões de dólares no país em 2011 e atingindo uma perda mundial anual de mais 250 milhões de dólares no mesmo ano (AMAL & ZAMRI-SAAD, 2011; CHEN et al. 2012b).

Os principais sinais clínicos nos peixes acometidos pela bactéria são escurecimento do tegumento, anorexia, letargia, natação errática, curvatura do corpo, exoftalmia, opacidade uni ou bilateral da córnea, hemorragia intraocular, hemorragia no opérculo e base das nadadeiras, ulceração na epiderme e morte. As lesões internas são caracterizadas por ascite, congestão branquial, hepatomegalia e esplenomegalia acompanhadas de congestão e encefalomalácia (ZHANG et al. 2018; PIAMSOMBOON et al. 2020; ZHANG, 2020).

Os estreptococos apresentam fatores de virulência, como a capacidade de invasão do epitélio e endotélio, aderência às superfícies epiteliais e citocinas prejudiciais aos tecidos (NIZET, 2002). Estudos indicam que o epitélio gastrointestinal é porta de entrada regular para este microrganismo, e que posteriormente migra para órgãos como baço, olhos e encéfalo por via hematogênica (IREGUI et al. 2015).

Fatores como temperatura da água, alta densidade de estocagem, manejo produtivo, dose infectante e a estirpe de *S. agalactiae*, estão relacionados a severidade da doença em tilápias (ZAMRI-SAAD et al. 2014; TAVARES et al. 2018). *S. agalactiae* apresenta sorotipos que estimulam a produção de diferentes anticorpos, e possuem características fenotípicas distintas, sendo uma delas sua estrutura externa (cápsula). A cápsula é o principal componente que o sistema imunológico dos peixes reconhece como

alvo para a produção de anticorpos. Há dez diferentes sorotipos de *S. agalactiae* (I ao IX, sendo o I dividido em Ia e Ib). Cinco deles se encontram associados a doenças em peixes (Ia, Ib, II, III e IX). Nas tilapiculturas brasileiras, surtos causados pelos sorotipos Ia, Ib e III têm sido descritos (LEAL & FIGUEIREDO, 2018), sendo o sorotipo Ib o mais prevalente no Brasil, com alta ocorrência nas regiões Sul e Sudeste (Estado de SP e PR), enquanto que o sorotipo III possui alta incidência na região Nordeste (BARONY et al. 2017; CHIDEROLI et al. 2017). A estreptococose nos peixes ocorre nos meses em que a temperatura da água encontra-se acima de 28° C (WONGSATHEIN, 2012). A principal via de transmissão ocorre de forma horizontal através do contato com o alimento, equipamentos e/ou peixes contaminados, ou por via oral-fecal devido à contaminação do sistema por meio da excreção das bactérias nas fezes dos animais contaminados (NGUYEN et al. 2002; AMAL & ZAMRI-SAAD, 2011).

O tratamento das bacterioses na aquicultura é comumente realizado com o uso de antimicrobianos, muitas vezes de forma errônea e sem critério acarretando efeitos adversos como seleção de cepas resistentes, degradação do meio ambiente e consequências à saúde pública, com o acúmulo de resíduos no pescado (GASTALHO et al. 2014; LEIRA et al. 2016; SANTOS, 2019; SILVA, 2020). Atualmente, formas alternativas para substituição dos antimicrobianos na piscicultura vêm sendo encorajadas, como por exemplo o uso de fitoterápicos (SCHALCH et al. 2015; VALLADÃO et al. 2019), probióticos (ALLAMEH et al. 2017; YI et al. 2018; KOTZENT et al. 2021), vacinação e a seleção de genótipos resistentes à determinada doença (CHENG et al. 2010; LONGHI et al. 2012; ARIEDE et al. 2020; ZENG et al. 2021).

1.3. Sistema imune

Alguns fatores podem influenciar a resposta imune dos peixes, como temperatura, qualidade da água, alimentação, estresse e a genética do indivíduo, podendo ocasionar variações em sua imunidade inata e específica (URBINATI & CARNEIRO, 2004; MASTROCHIRICO-FILHO et al., 2019). Apesar dos peixes viverem em contato direto com agentes infecciosos (parasitas, vírus, fungos e bactérias) em seu ambiente, os quais podem causar doenças e a morte do hospedeiro (NASCIMENTO et al. 2021), as respostas imunológicas foram desenvolvidas pelos peixes para reconhecer e combater os patógenos ou outras

moléculas estranhas (antígenos) de forma eficaz (SAURABH & SAHOO, 2008; PANDAY et al. 2015).

O sistema imunológico dos teleósteos é dividido em sistema inato (não específico) e adaptativo (específico), estas duas linhas de defesa atuam conjuntamente, sendo mediadas por uma variedade de células e fatores humorais para destruir invasores ou desencadear processos de defesa (ELLIS, 1999; URIBE et al. 2011; URBINATI et al. 2014).

O sistema inato é a primeira linha de defesa dos peixes, constituída por barreiras físicas (pele e muco), química (lisozimas séricas e sistema complemento) e células fagocíticas (leucócitos e macrófagos), sendo estes, fatores cruciais para a resistência às doenças (CARDOSO et al. 2015).

As respostas adaptativas são comumente retardatárias, mas essenciais para a imunidade, pois é caracterizada pela memória imunológica dependente de antígenos que desencadeiam reações resultantes do aumento de anticorpos específicos promovendo proteção e memória contra determinado agente invasor, tornando-se o fator chave para o sucesso da vacinação (SECOMBES & WANG, 2012; TAKAHASHI et al. 2013).

A lisozima por exemplo, é uma enzima importante na defesa contra microrganismos invasores. Produzida pelos leucócitos durante infecções é responsável pela lise da parede celular do patógeno e estimula a fagocitose de bactérias Gram-positivas (DAS et al. 2013).

O sistema complemento é responsável pelo reconhecimento de patógenos e promove uma resposta efetiva contra uma infecção através da opsonização e quimiotaxia de leucócitos (NAKAO et al. 2011; TONG & LI, 2020). Sua ativação pode ocorrer por três vias principais: clássica, alternativa e da lectina (DUNKELBERGER & SONG, 2010). A via clássica é ativada pelo complexo antígeno-anticorpo, dependente de anticorpo. A via alternativa que é a mais rápida e mais comum nos peixes é ativada pela identificação da superfície patogênica e pelo complexo antígeno-anticorpo. Já a via da lectina é ativada pela ligação de carboidratos a superfície bacteriana (VALLEJOS-VIDAL et al. 2016).

1.4. Vacinação de peixes

Devido à expansão da produção de tilápia no Brasil, estratégias para a prevenção de doenças têm sido adotadas nas pisciculturas. A imunoprofilaxia,

através do estímulo do sistema imune adaptativo dos peixes com agentes vivos ou inativos tem crescido a cada ano no setor aquícola, considerada uma forma eficaz e ecologicamente segura de proteger os peixes do *Streptococcus agalactiae* (ADAMS, 2019).

A utilização de vacinas contra bactérias têm demonstrado bons resultados tanto do ponto de vista científico quanto da produção, uma vez que bons programas de imunização diminuem o surto de doenças e reduzem a utilização de antimicrobianos (GUDDING & VAN MUISWINKEL, 2013).

A vacinação pela via intraperitoneal em peixes tem sido considerada um método seguro e eficaz quando comparado a outras vias de administração (oral e imersão) (BØGWALD & DALMO, 2019).

No Brasil, até o momento, há apenas uma vacina comercial disponível, a vacina contra *S. agalactiae* sorotipo Ib para tilápia (AQUAVAC® STREP SA, MSD Saúde Animal). Ela é administrada intraperitonealmente na dose de 0,05 mL/peixe, em animais de pelo menos 15 gramas. Porém, esta via apresenta algumas desvantagens como estresse para os animais, alto custo do produto, falta de mão-de-obra qualificada, tempo requerido para administração da vacina e para desenvolvimento da imunidade, além de um repertório limitado de proteção contra diferentes sorotipos e cepas deste patógeno (NAKANISHI & OTOTAKE, 1997; CHIDEROLI et al. 2017).

1.5. Seleção genética de peixes

Programas de melhoramento genético realizados em animais e plantas, têm sido a base do desenvolvimento agropecuário. Afim de maximizar a produção de organismos aquáticos de interesse econômico, a aplicação dessa tecnologia vem se desenvolvendo e a utilização de indivíduos geneticamente selecionados demonstra ser promissora (ARIEDE et al. 2018; MASTROCHIRICO-FILHO et al. 2020).

A aplicação dessa tecnologia em peixes avança rapidamente quando comparada aos mamíferos, e isso ocorre devido à grande diversidade genética e desovas abundantes e múltiplas dos teleósteos (FJALESTAD et al. 1993; CONNON et al. 2018). O uso desta importante ferramenta tem aumentado significativamente o desempenho e a resistência dos animais, considerando a

produtividade e sobrevivência por unidade de área de indivíduos mantidos nas mesmas condições (PONZONI, 2006; WONMONGKOL et al. 2018).

Variações genéticas significativas para a resistência a patógenos tem sido observada, permitindo assim o desenvolvimento de unidades populacionais geneticamente resistentes por meio do melhoramento seletivo (WIEGERTJES et al. 1996; EVENHUIS et al. 2015; GONEN et al. 2015; HICKEY, 2017; WONMONGKOL et al. 2018). Alguns autores têm observado tais variações genéticas em tilápias, demonstrando a viabilidade em obter ganho genético em relação as principais infecções bacterianas que acometem a tilapicultura (LAFRENTZ et al. 2016; SHOEMAKER et al. 2017; WONMONGKOL et al. 2018; SUKHAVACHANA et al. 2019).

No Brasil, ainda há poucos estudos avaliando a viabilidade da produção de tilápias resistentes à bactérias, principalmente para cepas decorrentes de pisciculturas brasileiras, o que demonstra a necessidade de investimentos em estudos genéticos quantitativos para validar se há variância genética suficiente para as características de resistência desejadas (ARIEDE et al. 2018; MASTROCHIRICO-FILHO et al. 2019; MASTROCHIRICO-FILHO et al. 2020).

Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a sobrevivência de tilápias-do-Nilo em processo de formação base de núcleo de melhoramento genético do CAUNESP, vacinadas contra *S. agalactiae* e desafiadas com a mesma bactéria.

2. REFERÊNCIAS

Allameh, S. K.; Noaman, V.; Nahavandi, R. Effects of probiotic bacteria on fish performance. *Advanced Techniques in Clinical Microbiology*, v. 1, n. 2, p. 11, 2017.

Amal, M. N. A.; Zamri-Saad, M. Streptococcosis in Tilapia (*Oreochromis niloticus*): A Review. *Pertanika Journal of Tropical Agriculture Science*, v. 34, p. 195-206, 2011.

Ariede, R. B.; Freitas, M. V.; Hata, M. E., Mastrochirico-Filho, V. A.; Pilarski, F., Batlouni, S. R.; Hashimoto, D. T. Microsatellites associated with growth

performance and analysis of resistance to *Aeromonas hydrophila* in tambaqui *Colossoma macropomum*. *Frontiers in genetics*, 9, 3. 2018.

Ariede, R. B.; Freitas, M. V.; Agudelo, J. F.; Borges, C. H.; Lira, L. V.; Yoshida, G. M.; Hashimoto, D. T. Genetic (co) variation between resistance to *Aeromonas hydrophila* and growth in tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Aquaculture*, 523, 735225. 2020.

Barony, G. M.; Tavares, G. C.; Pereira, F. L.; Carvalho, A. F.; Dorella, F. A.; Leal, C. A.; Figueiredo, H. C. Large-scale genomic analyses reveal the population structure and evolutionary trends of *Streptococcus agalactiae* strains in Brazilian fish farms. *Scientific reports*, 7(1), 1-10. 2017.

Børgwald, J.; Dalmo, R. A. Review on immersion vaccines for fish: An update 2019. *Microorganisms*, 7(12), 627. 2019.

Cardoso, F.; Bruno, C. E. M.; Ramos, C. C.; Conrado, A. L.; Tabata, Y. A., Ferrão, J. S. P.; Kfoury, J. R. Expressão da enzima indoleamina-2, 3-dioxigenase em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 35, 863-870. 2015.

Chen, M.; Li L.P.; Wang, R.; Liang, W.W. ; Liang, W.; Huang, Y.; Li, J.; Lei, A.; Huang, W. and Gan, X. Screening vaccine candidate strains against *Streptococcus agalactiae* of tilapia based on PFGE genotype. *Vaccine* 30: 6088–6092. 2012b.

Cheng, S.; Hu Y. H.; Jiao X. D.; & Sun L. Identification and immunoprotective analysis of a *Streptococcus iniae* subunit vaccine candidate. *Vaccine*, 28(14), 2636-2641. 2010.

Chideroli, R. T.; Amoroso N.; Mainardi R. M.; Suphoronski, S. A.; de Padua; S. B.; Alfieri A. F. & Pereira, U. P. Emergence of a new multidrug-resistant and highly virulent serotype of *Streptococcus agalactiae* in fish farms from Brazil. *Aquaculture*, 479, 45-51. 2017.

Connon, R. E.; Jeffries, K. M.; Komoroske, L. M.; Todgham, A. E.; Fanguie, N. A. The utility of transcriptomics in fish conservation. *Journal of Experimental Biology*, 221(2), jeb148833. 2018.

Das, R.; Raman R.P.; Saha H.; Singh R. Effect of *Ocimum sanctum* Linn. (Tulsi) extract on the immunity and survival of *Labeo rohita* (Hamilton) infected with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Research* 46(5): 1111-1126.12264. 2013.

Delphino, M. K.; Leal, C. A.; Gardner, I. A.; Assis, G. B.; Roriz, G. D.; Ferreira, F.; Gonçalves, V. S. Seasonal dynamics of bacterial pathogens of Nile tilapia farmed in a Brazilian reservoir. *Aquaculture*, 498, 100-108. 2019.

Diniz, N. M.; Honorato, C. A. Algumas alternativas para diminuir os efeitos do estresse em peixes de cultivo-revisão. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*, v. 15, n. 2, 2012.

Dunkelberger, J.; Song W.C. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Research* 20: 34-50. 2010.

Ellis A. E. Immunity to bacteria in fish. *Fish and Shellfish Immunology*, v.9, p.291-308, 1999.

Evenhuis, J. P.; Leeds, T. D.; Marancik, D. P.; LaPatra, S. E.; Wiens, G. D. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) resistance to columnaris disease is heritable and favorably correlated with bacterial cold water disease resistance. *Journal of animal science*, 93(4), 1546-1554. 2015.

FAO. The state of world fisheries and aquaculture: sustainability in action. Rome (Italy): FAO. p. 1–206. 2020.

Figueiredo, C. A. J.; Valente A. S. J. Cultivo de tilápia no Brasil: origens e cenário atual. No. 1349-2016-107133. 2008.

Fjalestad, K. T.; Gjedrem, T.; Gjerde, B. Genetic improvement of disease resistance in fish: an overview. In *Genetics in Aquaculture* (pp. 65-74). Elsevier; 1993.

Gastalho, S.; Silva, G.; Ramos, F. Uso de antibióticos em aquacultura e resistência bacteriana: Impacto em saúde pública. *Acta Farmacêutica Portuguesa*, 3(1), 29-45. 2014.

Gonen, S.; Baranski, M.; Thorland, I.; Norris, A.; Grove, H.; Arnesen, P.; Houston, R. D. Mapping and validation of a major QTL affecting resistance to pancreas disease (*salmonid alphavirus*) in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Heredity*, 115(5), 405-414; 2015.

Gudding, R. & Van Muiswinkel W. B. A history of fish vaccination: science-based disease prevention in aquaculture. *Fish & shellfish immunology*, 35(6), 1683-1688. 2013.

Hassan, S.; Abdel-Rahman, M.; Mansour, E. S.; Monir, W. Prevalence and Antibiotic Susceptibility of Bacterial Pathogens Implicating the Mortality of Cultured Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Egyptian Journal for Aquaculture*, 10(1), 23-43. 2020.

Hickey, J. M.; Chiurugwi, T.; Mackay, I.; Powell, W.; Eggen, A.; Kilian, A.; Atlin, G. Genomic prediction unifies animal and plant breeding programs to form platforms for biological discovery. *Nature genetics*, 49(9), 1297, 2017.

Iregui, C. A.; Comas, J.; Vasquez, G. M.; Verjan, N. Experimental early pathogenesis of *Streptococcus agalactiae* infection in red tilapia *Oreochromis* spp. *Journal of fish diseases*, v. 39, n. 2, p. 205-215, 2015.

Iwashita, M. K. P.; Maciel, P. O. Princípios básicos de sanidade de peixes. *Piscicultura de água doce: multiplicando conhecimento*, Brasília, Distrito Federal, Brasil. ed, v. 7, p. 215-269, 2013.

LaFrentz, B. R.; Lozano, C. A.; Shoemaker, C. A.; García, J. C.; Xu, D. H.; Løvoll, M.; Rye, M. Controlled challenge experiment demonstrates substantial additive genetic variation in resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to *Streptococcus iniae*. *Aquaculture*, 458, 134-139. 2016.

Leal, C. A. G. & Figueiredo, H. C. P. Estreptococose clínica em tilápia: passado e presente. *Panorama da Aqüicultura*, 2018.

Leira, M. H.; de Assis Lago A.; Botelho H. A.; Melo, C. C. V.; Mendonça F. G.; do Nascimento A. F.; de Freitas, R. T. F. Principais infecções bacterianas na criação de peixes de água doce do Brasil—Uma revisão. *Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública*, 3(1), 44-59. 2016.

Leira, M. H.; da Cunha, L. T.; Braz, M. S.; Melo, C. C. V.; Botelho, H. A.; Reghim, L. S. Qualidade da água e seu uso em pisciculturas. *Pubvet*, 11, 11-17. 2016.

Lima-Junior, D. P.; Bellay, S.; Hoeinghaus, D. J.; Bini, L. M.; Lima, L. B.; Yotoko, K.; Agostinho, A. A. Host diversity, phylogenetic relationships and local environmental factors drive infection patterns of a non-native parasite in tropical floodplain fish assemblages. *Hydrobiologia*, 848(5), 1041-1057. 2021.

Longhi, E.; Pretto-Giordano L. G.; Müller E. E. Avaliação da eficácia de vacina autóctone de *Streptococcus agalactiae* inativado aplicada por banho de imersão em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Semina: Ciências Agrárias*, 33(2), 3191-3200. 2012.

Luque, J. L. Biologia, epidemiologia e controle de parasitos de peixes. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 13, n. Supl 1, p. 161-165, 2004.

Mastrochirico-Filho, V. A.; Ariede R. B.; Freitas M. V.; Lira L. V.; Agudelo J. F.; Pilarski F.; Hashimoto, D. T. Genetic parameters for resistance to *Aeromonas hydrophila* in the Neotropical fish pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Aquaculture*, 513, 734442. 2019.

Mastrochirico-Filho, V. A.; Borges, C. H.; Freitas, M. V.; Ariede, R. B.; Pilarski, F.; Utsunomia, R.; Hashimoto, D. T. Development of a SNP linkage map and genome-wide association study for resistance to *Aeromonas hydrophila* in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). BMC genomics, 21(1), 1-13. 2020.

Nascimento, I. R. M. A.; Souza, A. C. F.; Silva, L. R.; Bezerra, C. A. M.; Sousa, R. R.; de Abreu, A. S.; Cantanhede, S. P. D. Patógenos em peixes de ambientes naturais e de cultivo no Estado do Maranhão: Uma visão geral e perspectivas para pesquisa. Research, Society and Development, 10(7), e15910716284-e15910716284. 2021.

Nakanishi, T. & Ototake, M. Antigen uptake and immune responses after immersion vaccination. In:GUDDING R. et al. Fish Vaccinology, p.59-68, 1997.

Nakao, M.; Tsujikura M.; Ichiki S.; VO T.K.; Somamoto, T. The complement system in teleost fish: progress of post-homolog-hunting researches. Developmental and comparative immunology. 35, 1296-1308. 2011.

Nguyen, H.T.; KANAI, K.; Yoshikoshi K. Ecological investigation of *Streptococcus iniae* in cultured Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) using selective isolation procedures. Aquaculture. 205: 7-17. 2002.

Nizet, V. Streptococcal β -hemolysins: genetics and role in disease pathogenesis. Trends in microbiology, v. 10, n. 12, p. 575-580, 2002.

Panday A, Sahoo M. K., Osorio D., Batra S. NADPH Oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies. Cellular & Molecular Immunology 12: 5-23. 2015.

Osmond, A. T. Y. & Colombo, S. M. The future of genetic engineering to provide essential dietary nutrients and improve growth performance in aquaculture: Advantages and challenges. Journal of the World Aquaculture Society, v. 50, n. 3, p. 490-509, 2019.

Peixe Br. Associação Brasileira de Piscicultura. Anuário da Piscicultura. 2021.

Piamsomboon, P.; Thanasaksiri, K.; Murakami, A.; Fukuda, K.; Takano, R., Jantrakajorn, S.; Wongtavatchai, J. Streptococcosis in freshwater farmed seabass *Lates calcarifer* and its virulence in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 523, 735189. 2020.

Ponzoni, R. W. Genetic improvement effective dissemination: Keys to prosperous and sustainable aquaculture industries. In: Ponzoni R. W.; Acosta B. O.; Ponniah A. G. Development of aquatic animal genetic improvement and dissemination programs. Malaysia. Worldfish Center, p.1-6. 2006.

Sado, R. Y. & de Almeida Bicudo, A. J. Prevenção de doenças em peixes tem nutrição como fator determinante. *Visão Agrícola*, n. 11, p. 80-82, 2012.

Sadhu, N.; Sharma S. K.; Joseph S.; Dube P.; Philipose K. Chronic stress due to high stocking density in open sea cage farming induces variation in biochemical and immunological functions in Asian seabass (*Lates calcarifer*, Bloch). *Fish physiology and biochemistry*. V. 40(4), p. 1105-1113, 2014.

Santos, L. A contribuição da aquacultura para a emergência, disseminação e transferência de resistência bacteriana aos antibióticos: origem, potenciadores e soluções. *Acta Farmacêutica Portuguesa*, 8(1), 69-80. 2019.

Saurabh S. & Sahoo P. K. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture Research* 39(3): 223-239. 2008.

Schalch, S. H. C.; França F. M.; Da Silv S. M. P. Capítulo 12 Fitoterápicos na Piscicultura: Revisão Comentada. *Aquicultura no Brasil*, p. 237. 2015.

Secombes, C. J.; Wang T. The innate and adaptive immune system of fish. In: *Infectious disease in aquaculture*. Woodhead Publishing, p.3-68. 2012.

Shimada, M. ; Claudiano G. ; Engracia Filho J. R.; Yunis J.; Moraes J.R. E.; Moreira R.; Moraes F. R. Hepatic steatosis in cage-reared young cobia, *Rachycentron canadum* (Linnaeus, 1766). Brazil. Journal of Veterinary Science & Medical Diagnosis. V. 3 (2), 2014.

Kotzent, S.; Gallani, S. U.; Valladão, G. M. R.; Alves, L. D. O.; Pilarski, F. Probiotic potential of autochthonous bacteria from tambaqui *Colossoma macropomum*. Aquaculture Research, 52(5), 2266-2275. 2021.

Shoemaker, C. A.; Lozano, C. A.; LaFrentz, B. R.; García, J. C.; Soto, E.; Xu, D. H.; Rye, M. Additive genetic variation in resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to *Streptococcus iniae* and *S. agalactiae* capsular type Ib: Is genetic resistance correlated?. Aquaculture, 468, 193-198. 2017.

Silva, D.V. Monitoramento da resistência à antimicrobianos na aquicultura: Isolamento e infecção experimental de tilapia do nilo com *klebsiella pneumoniae*. 2020.

Soto, E.; Zayas, M.; Tobar, J.; Illanes, O.; Yount, S.; Francis, S.; Dennis, M. M. Laboratory-controlled Challenges of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) with *Streptococcus agalactiae*: Comparisons between Immersion, Oral, Intracoelomic and Intramuscular Routes of Infection. Journal of Comparative Pathology, v. 155, n. 4, p. 339-345, 2016.

Sukhavachana, S.; Poompuang S.; Onming S.; Luengnaruemitchai, A. Heritability estimates and selection response for resistance to *Streptococcus agalactiae* in red tilapia *Oreochromis spp.* Aquaculture, 502, 384-390. 2019.

Tavares, G. C.; Carvalho, A. F.; Pereira, F. L.; Rezende, C. P.; Azevedo, V. A.; Leal, C. A.; Figueiredo, H. C. Transcriptome and proteome of fish-pathogenic *Streptococcus agalactiae* are modulated by temperature. Frontiers in microbiology, 2639.2018.

Takahashi, J. D. B.; Takahashi L. S.; Urbinati, E. C. Título de anticorpos hemaglutinantes de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, como indicador de imunidade adquirida. *Ars Vet.*, 126-131. 2013.

Tong, C. & Li M. Transcriptomic signature of rapidly evolving immune genes in a highland fish. *Fish & Shellfish Immunology* 97: 587-592. 2020.

Urbinati, E. C. & Carneiro P. C. F.. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura intensiva. Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropicas intensiva. TecArt, São Paulo, p. 171-194, 2004.

Urbinati, E.C.; Zanuzzo F.S.; Biller-Takahashi J.D. Estresse e sistema imune em peixes. In: Baldisserotto, B.; Cyrino, J.E.P.; Urbinati, E.C (Ed.). *Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce*. Jaboticabal: FUNEP, Cap. 5, 87-105, 2014.

Uribe C.; Folch H.; Enriquez R.; Moran G. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Vet Med Czech*; 56(10): 486-503. 2011.

Valladão, G. M. R.; Gallani S. U.; Kotzent S.; Assane, I. M.; Pilarski F. Effects of dietary thyme essential oil on hemato-immunological indices, intestinal morphology, and microbiota of Nile tilapia. *Aquaculture International*, 27(2), 399-411. 2019.

Vallejos-Vidal, E.; Reyes-López F.; Teles M.; MacKenzie S. The response of fish to immunostimulant diets. *Fish & Shellfish Immunology* 56: 34-69.06.028. 2016.

Vicente, I. S. T; Elias, F.; Fonseca-Alves, C. E. Perspectivas da produção de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil. *Revista de Ciências Agrárias*, v. 37, n. 4, p. 392-398, 2014.

Wiegertjes, G. F.; Stet, R. M.; Parmentier, H. K.; Van Muiswinkel, W. B. Immunogenetics of disease resistance in fish: a comparative approach. *Developmental & Comparative Immunology*, 20(6), 365-381; 1996.

Wongsathein, D. Factors affecting experimental *Streptococcus agalactiae* infection in tilapia, *Oreochromis niloticus*. Dissertation, Institute of Aquaculture, University of Stirling. 2012.

Wonmongkol, P.; Sukhavachana, S.; Ampolsak, K.; Srisapoome, P.; Suwanasopee, T.; Poompuang, S. Genetic parameters for resistance against *Flavobacterium columnare* in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). *Journal of fish diseases*, 41(2), 321-328. 2018.

Yi, Y.; Zhang, Z.; Zhao, F.; Liu, H.; Yu, L.; Zha, J.; Wang, G. Probiotic potential of *Bacillus velezensis* JW: antimicrobial activity against fish pathogenic bacteria and immune enhancement effects on *Carassius auratus*. *Fish & shellfish immunology*, 78, 322-330. 2018.

Zamri-Saad, M.; Amal, M. N. A.; Siti-Zahrah, A.; Zulkafli, A. R. Control and prevention of streptococcosis in cultured tilapia in Malaysia: a review. *Pertanika J. Trop. Agricult. Sci.* 37, 389–410. 2014.

Zhang, Z.; Lan, J.; Li, Y.; Hu, M.; Yu, A.; Zhang, J.; Wei, S. The pathogenic and antimicrobial characteristics of an emerging *Streptococcus agalactiae* serotype IX in Tilapia. *Microbial pathogenesis*, 122, 39-45. 2018.

Zhang, Z. Research Advances on Tilapia Streptococcosis. *Pathogens*, 10(5), 558. 2020.

Zeng, R.; Pan, W.; Lin, Y.; He, J.; Luo, Z.; Li, Z.; Guo, C. Development of a gene-deleted live attenuated candidate vaccine against fish virus (ISKNV) with low pathogenicity and high protection. *Iscience*, 24(7), 102750. 2021.

CAPÍTULO II

(Manuscrito I)

Vacinação e seleção de peixes resistentes à *Streptococcus agalactiae* sorotipo Ib realmente garantem maior sobrevivência da tilápia-do-Nilo?

Bruno Luis Miani Verri ^a, Rubens Ricardo de Oliveira ^a, Evandro Bilha Moro ^a,
Inácio Mateus Assane ^a, Raphael Barbetta de Jesus ^a, Diogo Teruo Hashimoto ^a,
Fabiana Pilarski ^a

^a Centro de Aquicultura da Unesp, UNESP - Univ Estadual Paulista. Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castelane, 14.884-900, Jaboticabal, SP, Brasil.

*autor correspondente: Fabiana Pilarski

Endereço de e-mail: fabiana.pilarski@unesp.br

Endereço atual: Centro de Aquicultura da Unesp, UNESP - Univ Estadual Paulista. Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castelane, 14.884-900, Jaboticabal, SP, Brasil.

RESUMO

Streptococcus agalactiae é uma bactéria responsável por surtos de doença nas tilapiculturas de todo o mundo, sendo uma das principais causas de perdas econômicas para os piscicultores neotropicais. Uma forma segura de prevenir surtos de mortalidade pela estreptococose é através da vacinação. Todavia, na tentativa de controlar a doença e evitar a disseminação para todo o plantel os produtores utilizam antimicrobianos, os quais, se usados de forma errônea e sem critérios causam resistência bacteriana, poluição ambiental e acúmulo de resíduos na carne do pescado. Assim, este estudo avaliou as respostas hematológica, imunológica e a sobrevivência de tilápias-do-Nilo em processo de formação de núcleo base de melhoramento genético para resistência ao *S. agalactiae* e vacinadas contra a *S. agalactiae* sorotipo Ib, após desafio realizado com cepa viva da bactéria. Para o desafio bacteriano, os peixes foram distribuídos aleatoriamente em três grupos, compostos por famílias resistentes à bactéria e famílias resistentes e vacinadas e um grupo controle (não vacinado). Antes e 15 dias após a vacinação, 15 peixes de cada família foram amostrados para colheita de sangue e realização das análises acima descritas e em seguida desafiados com cepa homóloga e virulenta de *S. agalactiae*. Os resultados demonstraram que os parâmetros hematológicos e imunológicos não foram alterados significativamente pela vacinação ou resistência, todavia, as análises realizadas demonstraram principalmente o incremento do sistema imunológico da maioria das famílias resistentes e vacinadas. Com relação a sobrevivência, a maioria das famílias vacinadas obtiveram maior porcentagem de sobrevivência que os peixes inoculados com PBS. Desta forma, podemos concluir que a vacinação, juntamente com a seleção genética de famílias resistentes ao *S. agalactiae* sorotipo Ib foram capazes de estimular o sistema imunológico da tilápia-do-Nilo naturalmente resistentes a bactéria e proporcionar maior sobrevivência após desafio bacteriano.

Palavras-chave: genética, bactéria, *Oreochromis niloticus*, vacinação, resistência.

ABSTRACT

Streptococcus agalactiae is a bacterium responsible for disease outbreaks in tilapia farms worldwide, and causes economic losses for fish farmers. A safe way to prevent outbreaks of mortality by streptococcosis is through vaccination, however, in an attempt to control the disease and prevent its spread to the entire farm, producers use antimicrobials, which, if used incorrectly and without criteria, cause bacterial resistance, environmental pollution and accumulation of residues in fish meat. Thus, this study assessed the hematological, biochemical, immunological responses and survival of Nile tilapia with resistant to *S. agalactiae* serotype 1b and vaccinated against this pathogen after challenge with a live strain of the bacterium. The fish were randomly assigned to three experimental groups, divided into bacteria-resistant families; bacteria-resistant and vaccinated families and a control group (unvaccinated). Before and 15 days after vaccination, 15 fish from each family were sampled for blood collection, the analyzes as previously described were performed, and then challenged with an homologous and virulent strain of *S. agalactiae*. The results showed that the hematological, biochemical and immunological parameters were not significantly altered by vaccination or resistant family, however, the analyzes mainly showed an increase in the immune response in vaccinated families. Regarding survival, vaccinated families had a higher percentage of survival than fish inoculated with PBS. Thus, we can conclude that vaccination in combination with genetic selection of families resistant to *S. agalactiae* serotype 1b, were able to stimulate the immune response of Nile tilapia naturally resistant to the bacteria and provide greater survival after bacterial challenge.

Keyword: genetics, bacteria, *Oreochromis niloticus*, vaccination, resistance.

1. INTRODUÇÃO

A produção mundial de pescado atingiu o patamar de 54,3 milhões de toneladas em 2018 (FAO, 2020). Deste montante, 43% é representado pela piscicultura, a qual, atualmente está em ascensão e é responsável por fornecer parte do suprimento de peixes para o consumo. Contudo, pisciculturas de grande porte são relativamente novas comparada aos outros empreendimentos agropecuários no Brasil e tem o desafio de aumentar a produtividade e rentabilidade, reduzindo o impacto sobre o meio ambiente (CHOPIN et al. 2012; CASTELLANI & BARRELLA, 2018).

No Brasil, a piscicultura foi o setor de produção de proteína animal com maior crescimento percentual em 2014, chegando a média de 8% anual. Sendo a tilápia-do-Nilo a principal espécie produzida no país e a terceira mais produzida no mundo, devido sua rusticidade, rápido crescimento, rendimento alto e boa qualidade do filé (FAO, 2020).

Em sistemas intensivo, alterações na qualidade da água devido às altas densidades, além de práticas de manejo excessivas que induzem o estresse nos animais ocorrem continuamente, com consequências negativas para o seu sistema imunológico, fazendo com que os animais fiquem mais susceptíveis a enfermidades (URBINATI & CARNEIRO, 2004; BRANDÃO et al. 2006),

Na piscicultura, as doenças de origem bacteriana são responsáveis por elevadas perdas econômicas devido à alta taxa de mortalidades, morbidade, má qualidade do produto final e custos associados ao seu tratamento (LANDOLT, 1989; BELEM-COSTA et al. 2021).

Dentre as bactérias de maior importância para a tilapicultura mundial encontra-se o *Streptococcus agalactiae*, cocos Gram-positivos que provocam surtos infecciosos quando a temperatura da água encontra-se acima de 28° C e que causam taxas de mortalidade de até 90% dos peixes em todas as fases de desenvolvimento (ABUSELIANA et al. 2010; ZAMRISAAD et al. 2010; CHIDEROLI et al. 2017).

Para o controle desta doença, são utilizados antimicrobianos, que além de apresentarem alto custo (MORAES & MARTINS, 2004; GASTALHO et al. 2014), muitas vezes são usados de forma indiscriminada ocasionando baixa eficácia a longo prazo e seleção de microrganismos resistentes, além da

possibilidade de transferência dos genes de resistência entre bactérias nunca expostas a esses produtos (BAQUERO et al. 2008). Desta forma, alternativas preventivas e sustentáveis são encorajadas.

Dentre as formas de prevenção da estreptococose, destaca-se a vacinação, que proporciona a produção de anticorpos e, conseqüentemente, ao possível aumento da proteção dos peixes contra patógenos (MA et al. 2020). Outra alternativa eficaz e ainda pouco utilizada na piscicultura brasileira é a seleção genética de peixes para a resistência às doenças, cujos resultados encontrados têm sido promissores, para várias espécies de peixes, principalmente para a tilápia-do-Nilo, permitindo assim o desenvolvimento de unidades populacionais geneticamente resistentes (WIEGERTJES et al. 1996; EVENHUIS et al. 2015; GONEN et al. 2015; HICKEY, 2017; WONMONGKOL et al. 2018).

Sendo assim, este estudo teve como objetivo avaliar os parâmetros hematológicos, imunológicos e a sobrevivência de tilápia-do-Nilo selecionadas como resistentes ao *Streptococcus agalactiae* sorotipo Ib e vacinadas com vacina comercial contra a mesma bactéria e desafiadas com cepa viva de *S. agalactiae*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos utilizados no estudo estão de acordo com os princípios éticos em pesquisa animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCAV - UNESP - campus de Jaboticabal, sob o protocolo nº 1171/21.

2.1. Peixes e desenho experimental

Foram utilizados um total de 300 tilápias-do-Nilo pertencentes a seis famílias (1(f7-4), 2 (f10-1), 3 (h3-15766),4 (f21-2), 5 (h1-16838) e 6 (f16-4)) pertencentes ao núcleo de melhoramento genético do Caunesp, com peso médio de $55,82 \pm 30,23$ g e comprimento padrão de $11,86 \pm 2,24$ cm. Os peixes foram marcados com microchips (pit-tagged ISSO FDX-B, 134,2 Khz) de acordo com a metodologia de Holm et al. (2007) para identificação da família de cada indivíduo e foram distribuídos aleatoriamente em três caixas experimentais com

capacidade de 1000 litros em sistema de recirculação de água. Todas as caixas receberam peixes de todas as famílias (totalizando 100 animais por caixa). Durante o período de aclimação e experimental, os peixes receberam ração comercial (40% PB e 3.200 kcal/kg⁻¹EB) três vezes ao dia, correspondendo a 3% da biomassa.

Após 15 dias de aclimação, os peixes foram divididos em dois grupos. O primeiro grupo denominado vacinado (n = 100), foi inoculado intraperitonealmente com vacina comercial (AQUAVAC® STREP SA, MSD Saúde Animal) na dose de 0,05 mL por peixe, de acordo com as recomendações do fabricante e o segundo grupo, denominado não vacinado (n = 100) foi inoculado intraperitonealmente na dose de 0,05 mL com solução salina tamponada de fosfato esterilizado (PBS). Foram mantidas 100 tilápias como controle negativo.

A qualidade da água foi monitorada diariamente com sonda multiparâmetros série U-50-HORIBA, a temperatura foi mantida a 30,0 ± 0,5 °C, oxigênio dissolvido 5,0 ± 1,0 mg / L e pH 7,2 ± 1,0 durante todo período experimental.

No início do período de aclimação, foi realizada uma colheita de sangue inicial de 45 peixes por tratamento para análise hematológica. Após 15 dias da inoculação, foi realizada uma nova colheita sanguínea de mais 45 peixes por tratamento, uma vez que este período é o indicado como tendo a maior produção de células de defesa.

Três dias após a colheita do sangue, os animais foram inoculados intraperitonealmente com *S. agalactiae* sorotipo Ib vivo, pertencente à coleção de cepas do Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos do Caunesp, na dose determinada após o ensaio de DL75%, ou seja, da dose capaz de produzir a mortalidade em 75% dos peixes.

2.2. Preparo da bactéria e Determinação da dose letal – DL75%

A cepa de *S. agalactiae* sorotipo Ib utilizada, foi isolada previamente de tilápia-do-Nilo e identificada por meio de sequenciamento parcial do gene 16S rRNA (número de acesso do GenBank KJ561066).

Para o preparo do inóculo, a cepa foi cultivada em meio TSA (Triplic Soy Agar, Sigma-Aldrich, MO, EUA), incubada a 28°C por 24 horas e para

confirmação da pureza foi analisado a morfologia da colônia em placa e coloração de Gram. Após confirmação, uma colônia foi repicada em meio TSB (Triplic Soy Broth, Sigma-Aldrich, MO, EUA) e incubada a 28°C por 24 horas em estufa de crescimento. Após, foi centrifugada a 4°C por 10 minutos a 3.000 × g em centrífuga refrigerada (Eppendorf 5804 R) e lavada duas vezes com PBS sob as mesmas condições. Após as lavagens, as concentrações foram ajustadas através da densidade óptica em espectrofotômetro (625 nm). A dose foi estabelecida através da realização da DL75% (em que os peixes foram testados com diferentes doses quanto sua resistência até atingir a mortalidade de 75% dos indivíduos). Os animais foram divididos de forma aleatória em cinco caixas experimentais de 1000 litros, com densidade de 40 peixes em cada. Os animais de cada caixa foram anestesiados em solução alcoólica de benzocaína (100 mg/L) e inoculados intraperitonealmente com concentrações crescentes de *S. agalactiae* (1 x 10⁵, 1 x 10⁶, 1 x 10⁷, 1 x 10⁸ UFC/mL) e uma caixa foi utilizada como controle, em que os peixes foram injetados com PBS. A dose estabelecida foi de 1 x 10⁵.

Durante o período do desafio, os peixes foram inoculados com 1mL/100g de peso vivo e avaliados quanto ao comportamento, sinais clínicos e mortalidade diária durante 15 dias após a inoculação da bactéria. Os peixes recém-mortos de cada grupo, foram lavados e desinfetados com álcool 70% e necropsiados em cabine de segurança. Foram coletados rim e cérebro e estriados em placas de BHI (Brain Heary Infusion, Sigma-Aldrich, MO, EUA) e levados para estufa a 28°C por 24 horas. A confirmação do crescimento bacteriano foi realizada através de morfologia da colônia em placa e coloração de Gram.

2.3 Análise hematológicas

Nas coletas basal e 15 dias após a inoculação, 45 peixes por tratamento foram anestesiados em solução alcoólica de benzocaína (100 mg/L) e o sangue colhido por punção do vaso caudal. Uma gota foi destinada à confecção de lâminas de esfregaço sanguíneo e uma alíquota (0,3 mL) foi heparinizada na concentração 100 UI mL⁻¹ (20 µL) e destinada à realização do hemograma e da atividade respiratória dos leucócitos. O restante do sangue foi mantido em temperatura ambiente por três horas para coagulação, e após centrifugação (4°C

por 10 min a 2000 x g), o soro foi coletado e armazenado em ultrafreezer -80 °C até a sua utilização.

O hematócrito foi realizado seguindo a metodologia do microhematócrito (GOLDENFARB et al. 1971). Para a determinação dos parâmetros eritrocitários, a contagem do número de eritrócitos foi realizada em câmara Neubauer, utilizando-se solução formol-citrato (RANZANI-PAIVA et al. 2013). A determinação da quantidade de hemoglobina presente no sangue foi determinada através do método da cianometahemoglobina (COLLIER, 1944).

As extensões sanguíneas foram coradas com MGGW (May-Grünwald-Gyemsa-Writh) para posterior contagem total e diferencial de trombócitos e leucócitos (ISHIKAWA et al 2008). As equações hematimétricas foram calculadas de acordo com Wintrobe (1934) para a determinação do volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).

2.4. Análise do sistema imunológico inato

2.4.1. Atividade respiratória dos leucócitos

A análise da atividade respiratória dos leucócitos foi realizada seguindo metodologia descrita por Biller-Takahashi (2013). Em microtubos contendo 50 µL de nitroazul de tetrazolium (NBT) foi adicionado 50 µL de sangue. As amostras foram incubadas por 30 min no escuro em temperatura ambiente e 50 µL desta solução foi adicionada à 1 mL de N,N-dimetilformamida agitada e centrifugada, a leitura realizada em espectrofotômetro (540 nm absorvância).

2.4.2. Atividade da lisozima

A concentração da lisozima foi determinada segundo metodologia proposta por Ellis (1990), modificada por Abreu (2009) e Zanuzzo et al. (2017). Resumidamente, soluções padrão de lisozima de clara de ovo (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP; # L6876) e amostras de soro foram colocadas em uma placa de 96 poços em triplicata com suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil; # M3770). Após a mistura, a absorvância foi medida a 450 nm ao longo de 10 min, utilizando um leitor de microplacas (Modelo Multiskan Ascent, Thermo Fisher Scientific Inc., Madison, WI, EUA) à

temperatura ambiente. A taxa de redução da absorvância para cada amostra foi então comparada com a obtida na curva padrão ($\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$).

2.4.3. Atividade hemolítica da via alternativa do sistema complemento (HA-AP50)

A atividade do sistema complemento (via alternativa) foi medida de acordo com Zanuzzo et al. (2015) com modificações. Inicialmente, sangue de coelho foi coletado e as hemácias (RaRBCs) foram lavadas e isoladas. Para otimizar o ensaio, foi utilizado diluição de 200 μL de tampão para 400 μL de hemácias sendo feitas misturando um pool de alíquotas de todas as amostras de soro (120 μL) com tampão TEA-EGTA- Mg^{2+} (trietanolamina etilenoglicol tetra-acico; 8 mM, com 2 mM de Mg^{2+} e 0,1% de gelatina, pH 7,4) e a suspensão de RaRBC. Em seguida foi medido a absorvância a 700 nm utilizando espectrofotômetro (Modelo Genesys 10S, Thermo Scientific Inc., Madison, WI, EUA).

2.5. Resistência à infecção por *Streptococcus agalactiae*

A resistência dos peixes inoculados com a bactéria viva na concentração 1×10^5 UFC/mL foi avaliada através da sobrevivência dos animais durante 15 dias. Após a inoculação da bactéria, os peixes foram observados a cada duas horas para análise dos sinais clínicos e alterações comportamentais (exoftalmia, opacidade ocular, melanose, isolamento do grupo, perda de apetite, natação errática, ascite e curvatura do corpo). Apenas animais que demonstravam sinais clínicos de estreptococose foram considerados susceptíveis à bactéria. Os animais recém-mortos foram retirados para análise microbiológica.

2.6. Análise estatística

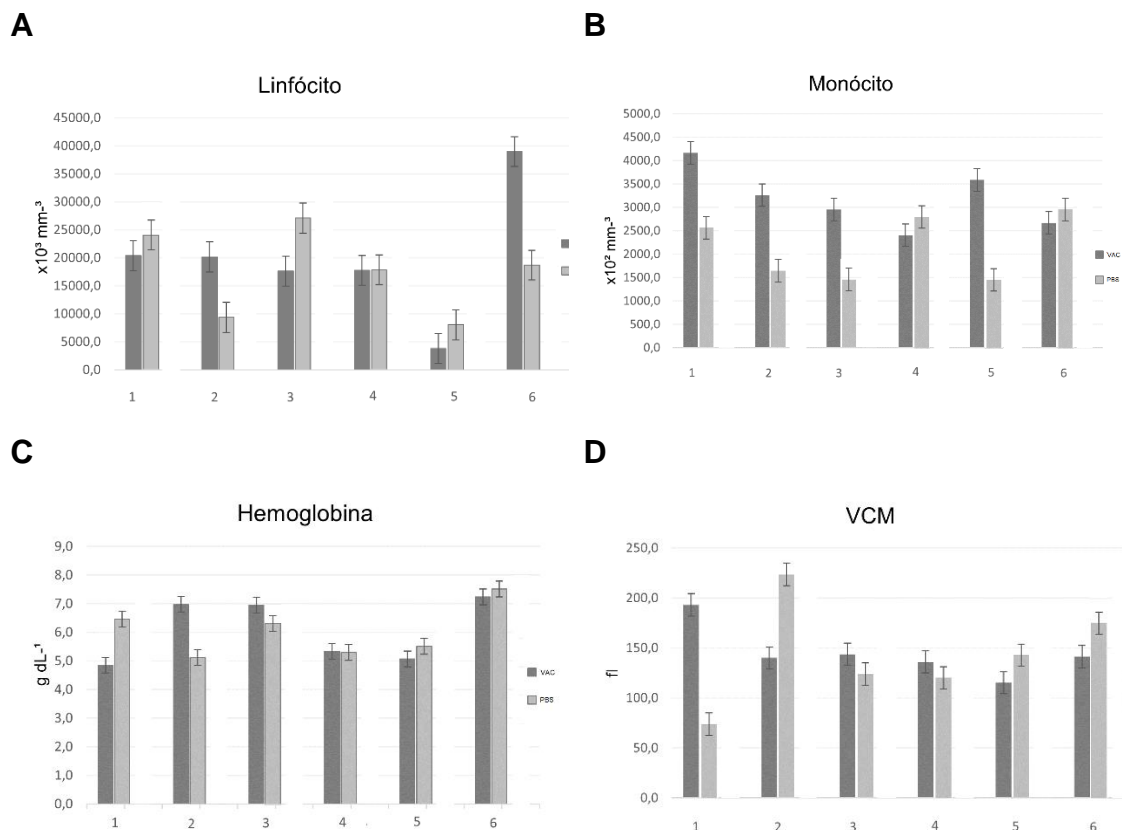
Para análise das famílias, o teste utilizado foi o Tukey-HSD, para vacina o Student-T e para a interação família x vacina o teste de Tukey-HSD. Os dados foram analisados no programa JMP Software (versão 14.0, SAS Institute).

3. RESULTADOS

3.1. Variáveis Hematológicas

Com relação às variáveis hematológicas, que são de grande importância para a compreensão da saúde dos animais e do status do seu sistema

imunológico, o número de eritrócitos, leucócitos (linfócitos e monócitos), hemoglobina, o volume corpuscular médio, a hemoglobina corpuscular média e a concentração de hemoglobina corpuscular média não foram diferentes ($P>0,05$) entre famílias na primeira coleta (tempo 0). Na segunda coleta (15 dias após a vacinação), a HCM foi influenciada ($P<0,05$) pela genética. A HCM foi menor nos peixes das famílias 5 e 6. Já a vacinação não influenciou essa variável. Um importante fator a ser ressaltado é que o número de linfócitos mesmo sem demonstrar diferença significativa entre as famílias ou tratamentos (vacina ou não), foi superior nas famílias 2 e 6 vacinadas (19.741) e inferior nas famílias inoculadas com PBS (15.666). O mesmo pode ser observado para o número de monócitos nas famílias 1, 2, 3 e 5, que foi superior nos peixes vacinados (3.175) e inferior nos peixes não vacinados (1.881) (Figura 1).



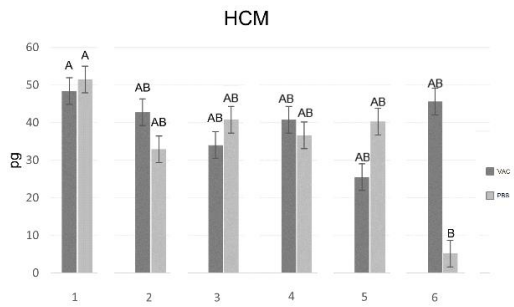
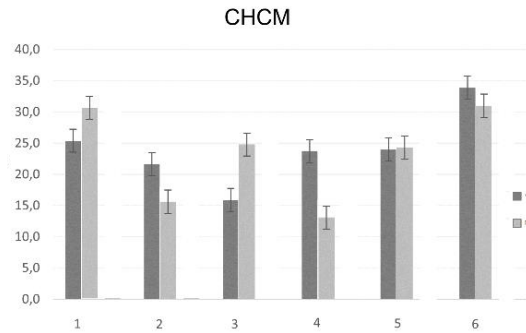
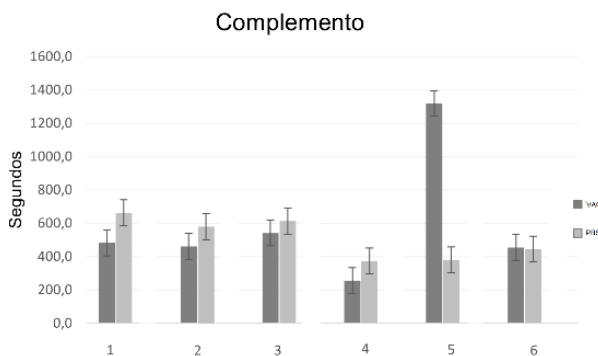
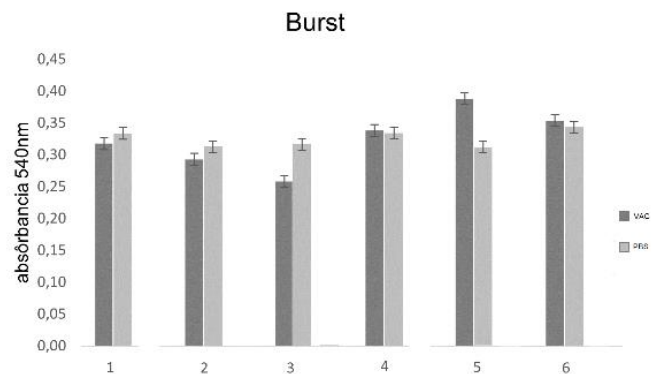
E**F**

Figura 1- Variáveis hematológicas em tilápias inoculadas com PBS ou vacinadas.. Famílias que não receberam a vacina são descritas como “PBS”: 1PBS; 2 PBS;3 PBS; 4 PBS; 5 PBS; 6 PBS. Famílias vacinadas são descritas como “Vac”: 1 Vac; 2 Vac; 3 Vac; 4 Vac; 5 Vac; 6 Vac.

3.2. Análise do sistema imunológico inato

Os indicadores da imunidade inata ou celular (burst oxidativo, atividade da lisozima e do complemento) não foram influenciados ($P>0,05$) pela genética ou pela vacinação nos dois tempo de coleta. Todavia, pode-se observar que após 15 dias de vacinação, a atividade da lisozima nas famílias 1, 3, 4 e 6 foram maiores nos peixes vacinado (8,20). A atividade do sistema complemento foi maior nos peixes vacinados das famílias 1, 2, 3, 4 e 6 (complemento 507,2) e menor nas famílias inoculadas com PBS (complemento 553) (Figura 2).

A**B**

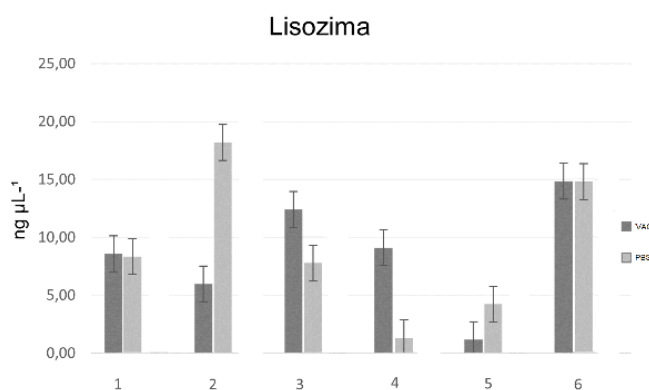
C

Figura 2- Análise da imunidade inata em tilápias inoculadas com PBS ou vacinadas. Famílias que não receberam a vacina são descritas como “PBS”: 1PBS; 2 PBS;3 PBS; 4 PBS; 5 PBS; 6 PBS. Famílias vacinadas são descritas como “Vac”: 1 Vac; 2 Vac; 3 Vac; 4 Vac; 5 Vac; 6 Vac.

3.3. Sobrevivência dos peixes após o desafio bacteriano

Os sinais clínicos de estreptococose (melanose, letargia, exoftalmia e opacidade ocular) foram observados 24 horas após a inoculação do *Streptococcus agalactiae*, tanto nos peixes vacinados quanto nos inoculados com PBS, que evoluíram para uma natação errática e posterior morte. O cérebro e o rim dos peixes recém-mortos foram coletados para realização de análise microbiológica e molecular, que confirmaram a morte por infecção de *S. agalactiae*.

As primeiras mortalidades foram observadas 24 horas após a inoculação do patógeno e a última mortalidade no 15º dia. O platô de mortalidade foi atingido três dias após a inoculação da bactéria. Dos 73 peixes desafiados com *S. agalactiae* Ib, 67 morreram durante o desafio, correspondendo a uma mortalidade cumulativa total de 91,78%.

A sobrevivência das diferentes famílias, vacinadas ou inoculadas com PBS não apresentou diferença significativa ($P > 0,05$), todavia, as famílias 1, 2, 3 e 4 vacinadas tiveram maior sobrevivência que os peixes inoculados com PBS. A maior porcentagem de sobrevivência foi observada nos peixes da família 4 (33%) e a menor sobrevivência nos peixes da família 2 e 6 inoculados com PBS (Figura 3).

Todos os peixes mortos durante o desafio apresentaram sinais característicos de estreptococose: exoftalmia, opacidade ocular, escurecimento da pele e natação errática (Figura 4).

Survival Analysis

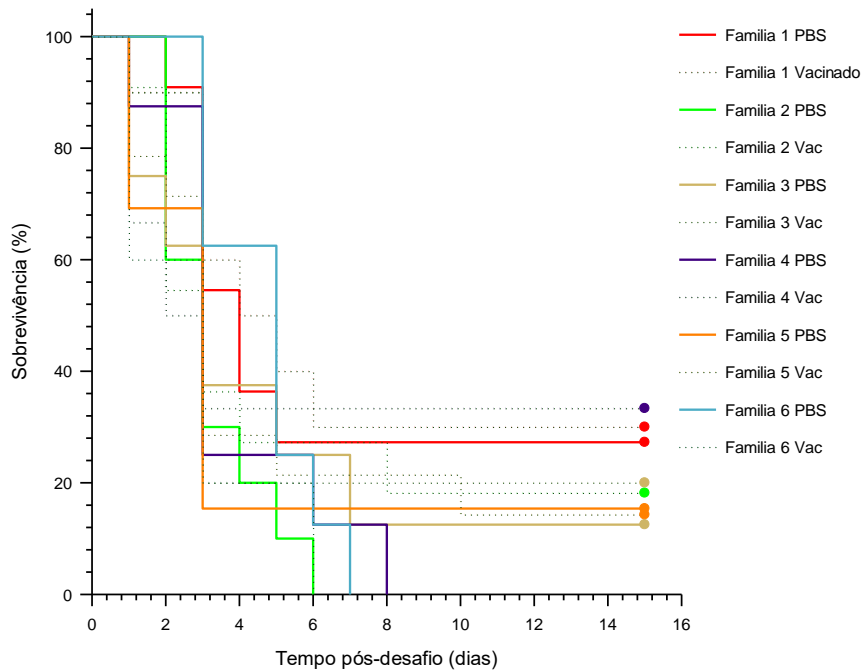


Figura 3- Sobrevivência de *Oreochromis niloticus* desafiadas com *Streptococcus agalactiae* após 15 dias de imunização com vacina comercial. Famílias que não receberam a vacina são descritas como “PBS”: 1PBS; 2 PBS; 3 PBS; 4 PBS; 5 PBS; 6 PBS. Famílias vacinadas são descritas como “Vac”: 1 Vac; 2 Vac; 3 Vac; 4 Vac; 5 Vac; 6 Vac.

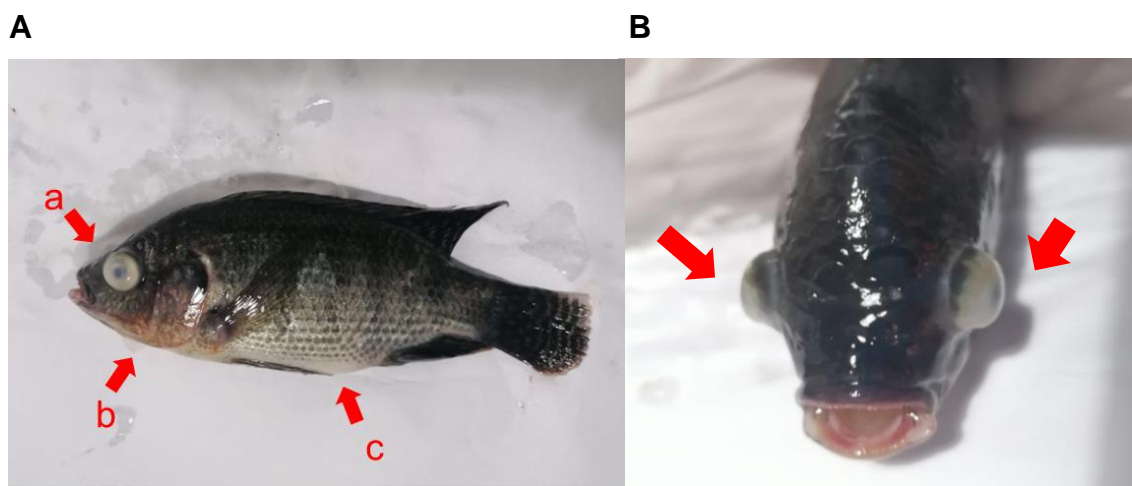


Figura 4- Presença de sinais característicos de estreptococose. A: Opacidade ocular (a); pontos hemorrágicos no opérculo (b); ascite (c). B: exoftalmia bilateral (setas vermelhas).

4. DISCUSSÃO

A vacinação é uma das principais ferramentas disponíveis para prevenir surtos de doenças, além de ser altamente recomendada por ser uma alternativa ao uso de antimicrobianos e disseminação de patógenos na aquicultura (WANGKAGHART et al. 2021; LINH et al. 2022).

Entretanto, no Brasil, atualmente a aquicultura tem disponível somente uma vacina licenciada para tilápia-do-Nilo contra o *Streptococcus agalactiae* sorotipo Ib e no país já foram identificados os sorotipos Ia, Ib, II e III (BARONY et al. 2017). Estudos demonstram que a vacina monovalente é eficaz apenas para um sorotipo da bactéria (CHEN et al. 2012; CHIDEROLI et al. 2017).

Assim, o melhoramento genético da tilápia-do-Nilo, com a resistência dos peixes aos patógenos é uma excelente alternativa, que aliada à vacinação contra um patógeno específico pode promover maior sobrevivência e rentabilidade durante todo o ciclo produtivo desta espécie, que é uma das mais importantes economicamente para a aquicultura mundial e a principal para o Brasil.

No presente estudo, foram testadas famílias de tilápia-do-Nilo pertencente a um núcleo em processo de formação de melhoramento genético para resistência a *S. agalactiae* sorotipo Ib, vacinadas com vacina comercial contra a mesma bactéria e um grupo controle, inoculadas com PBS e foram realizadas coletas para análise hematológica 15 dias após a vacinação. Com relação aos

resultados obtidos nessa combinação, observamos um aumento do número de linfócitos e monócitos nos peixes vacinados da maioria das famílias, que foram expressivos, mesmo sem significância estatística.

Este resultado é promissor, uma vez que os linfócitos são as células presentes em maior quantidade na circulação dos peixes (SCAPIGLIATI et al. 2022) e responsáveis pela resposta imunológica adquirida, além de estarem diretamente envolvidos na produção de anticorpos, no aumento da capacidade citotóxica e nos processos de memória imunológica (produção de Igs), além de promoverem a liberação das linfocinas que são reguladoras da função imune (SCAPIGLIATI et al. 2013; MURPHY, 2014). Desta forma, acreditamos que o maior número de linfócitos observado nos peixes vacinados das famílias 2 e 6 também promoverá maior número de anticorpos nesses animais, uma vez que os linfócitos (B) são responsáveis pela produção e liberação de anticorpos. Resultado semelhante foi observado por Marcusso et al. (2021) em tilápia-do-Nilo vacinadas com antígeno sonicado contra *S. agalactiae*. Assim, como observado por Monir et al. (2020) e Hayat et al. (2021) em tilápias híbridas (*Oreochromis mossambicus* × *O. niloticus*) após imunização contra *Streptococcus iniae*.

Em relação ao número de monócitos, células responsáveis pela atividade fagocitária e citotóxica não-específica (URBINATI et al. 2014), as famílias vacinadas 1, 2, 3 e 5 também apresentaram um número maior dessas células quando comparadas aos outros indivíduos da mesma família inoculados com PBS. Esse aumento pode estar relacionado ao processo inflamatório induzido artificialmente pela vacina, como descrito por Martins et al. (2011), que relataram o aumento no número de monócitos em bagres do canal (*Ictalurus punctatus*) após imunização contra *Ichthyophthirius multifiliis*. Esse aumento também foi descrito por Monir et al. (2020) em tilápias híbridas imunizadas contra *S. iniae*.

Durante a fagocitose, os leucócitos aumentam o consumo de oxigênio, o que pode ser observado pelo aumento da atividade respiratória dos leucócitos. Pesquisadores relataram a diminuição da atividade respiratória dos leucócitos após inoculação de agentes patogênicos (SEPULCRE et al. 2007) e exposição imediata a agentes imunoestimulantes (COOK et al. 2003). Wang et al. (2021) observaram uma diminuição na atividade respiratória dos leucócitos em tilápias após imunização contra *S. agalactiae*, semelhante a este estudo, em que não foi

observada maior atividade respiratória dos leucócitos nos peixes vacinados ou inoculados com PBS.

Analisar a atividade hemolítica da via alternativa do sistema complemento tem sido um indicador da competência imunológica dos peixes e apresenta um papel essencial na detecção de patógenos (BOSHRA et al. 2006). Neste trabalho, observamos maior atividade do sistema complemento nas famílias vacinadas 1, 2, 3, 4 e 6. Esse sistema funciona através de uma cascata de reações enzimáticas, para realizar fagocitose, opsonização, quimiotaxia de leucócitos e inativação de toxinas. Resultados semelhantes foram observados em tilápias-do-Nilo imunizados contra *S. agalactiae* por Ke et al. (2019) e em bragres do canal (*I. punctatus*) imunizados contra *I. multifiliis* por Xu et al.(2019).

A vacinação também estimulou o aumento da concentração de lisozima nas famílias 1, 3, 4 e 6. Esta enzima protege o organismo da invasão bacteriana, através da destruição dos componentes da parede celular das bactérias, causando sua lise (LOPES et al. 2022). Nos peixes vacinados sua concentração foi maior possivelmente pela característica da vacina utilizada, a qual é composta pela bactéria inteira inativada, que pode ter sido responsável pela maior atividade da enzima.

Um dos principais indicadores de eficácia de um produto ou vacina é a sobrevivência dos peixes após um desafio com cepa homóloga ou heteróloga. Com relação a sobrevivência das famílias vacinadas ou inoculadas com PBS e desafiadas com *S. agalactiae* sorotipo Ib, mesmo sem diferenças significativas entre os dois tratamentos (vacina e PBS) foi constatado maior sobrevivência nas famílias vacinadas 1, 2, 3, 4 e 5, em que a família 4 vacinada apresentou maior porcentagem de sobrevivência (33%), seguida da família 1 (30%), demonstrando maior resistência quando comparadas com as outras famílias avaliadas. Este fato, em uma piscicultura é muito importante, pois a sobrevivência de 30% a mais de peixes tem um impacto econômico muito elevado para o piscicultor. O aumento da sobrevivência de tilápias após imunização contra *S. agalactiae* também foi relatado por outros pesquisadores (MA et al. 2020; MO et al. 2020; HAYAT et al. 2021; WANG et al. 2021).

Famílias de tilápias resistentes ao *S. agalactiae* foram descritas em trabalhos realizados nas Filipinas (JOSHI et al. 2021; JOSHI et al. 2020),

Tailândia (SUEBSONG et al. 2019; SUKHAVACHANA et al. 2020) e Estados Unidos (SHOEMAKER et al. 2017)

5. CONCLUSÃO

A vacinação contra *Streptococcus agalactiae* sorotipo Ib foi capaz de estimular o sistema imunológico da tilápia-do-Nilo resistente a bactéria e juntamente com o melhoramento genético, proporcionou maior sobrevivência dos peixes após desafio bacteriano.

6. AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 pela concessão da bolsa de estudos e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) processo nº 2019/23029-0, pelo apoio financeiro ao projeto.

7. REFERÊNCIAS

Abreu, J.S.; Marzocchi-Machado, C.M.; Urbaczek, A.C.; Fonseca, L.M.; Urbinati, E.C. Leukocytes respiratory burst and lysozyme level in pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) Braz. J. Biol. 69 (4), 1133-1139. 2009.

Abuseliana, A.; Hassan, D.; Saleha, A.A.; Siti-Khairani, B.; Milud A. *Streptococcus agalactiae* the etiological agent of mass mortality in farmed red tilapia (*Oreochromis sp.*). J Anim Vet Adv 20:2640–2646. 2010.

Barony, G. M.; Tavares, G. C.; Pereira, F. L.; Carvalho, A. F.; Dorella, F. A.; Leal, C. A.; Figueiredo, H. C. Large-scale genomic analyses reveal the population structure and evolutionary trends of *Streptococcus agalactiae* strains in Brazilian fish farms. Scientific reports, 7(1), 1-10. 2017.

Baquero, F.; Martínez, J. L.; C. R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. Current opinion in biotechnology, v. 19, n. 3, p. 260-265, 2008.

Belem-Costa, A.; Gomes, A. L. S.; Carvalho, E.; Nacif-Marçal, L.; da Silva, T. B. A.; da Silva Soares, J. Protocolos para Diagnóstico de Doenças em Peixes. Editora Appris. 2021.

Biller-Takahashi, J.D.; Takahashi, L.S.; Saita, M.V.; Gimbo, R.Y.; Urbinati, E.C. Leukocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*. Braz. J. Biol. 73, 425-429. 2013.

Boshra, H.; Li, J.; Sunyer, J. O. Recent advances on the complement system of teleost fish. Fish & shellfish immunology, 20(2), 239-262. 2006.

Brandão F.; Gomes L.; Chagas E. Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura. Acta Amazônica. V. 36, p. 349–356, 2006.

Castellani, D.; Barrella, W. Impactos da atividade de piscicultura na Bacia do Rio Ribeira de Iguape, SP–Brasil. Boletim do Instituto de Pesca, 32(2), 161-171. 2018.

Chen, M.; Li, L. P.; Wang, R.; Liang, W. W.; Huang, Y.; Li, J.; Gan, X. PCR detection and PFGE genotype analyses of streptococcal clinical isolates from tilapia in China. Veterinary microbiology, 159(3-4), 526-530. 2012.

Chideroli, R. T.; Amoroso N.; Mainardi R. M.; Suphoronski, S. A.; de Padua; S. B.; Alfieri A. F.; Pereira, U. P. Emergence of a new multidrug-resistant and highly virulent serotype of *Streptococcus agalactiae* in fish farms from Brazil. Aquaculture, 479, 45-51. 2017.

Chopin, T.; Cooper J. A.; Reid, G.; Cross, S.; Moore, C. Open-water integrated multi-trophic aquaculture: environmental biomitigation and economic diversification of fed aquaculture by extractive aquaculture. Reviews in Aquaculture. V. 4(4), p. 209-220, 2012.

Collier, H. B. Standardization of blood hemoglobin determinations. Canadian Medical Association Journal, 50(6), 550, 1944.

Cook, M. T.; Hayball, P. J.; Hutchinson, W.; Nowak, B. F.; Hayball, J. D. Administration of a commercial immunostimulant preparation, EcoActiva™ as a feed supplement enhances macrophage respiratory burst and the growth rate of snapper (*Pagrus auratus*, Sparidae (Bloch and Schneider)) in winter. *Fish & Shellfish Immunology*, 14(4), 333-345. 2003.

Ellis, A.E. Lysozyme Assays. In: Stolen J. S.; Fletcher, T. C.; Anderson, D. P.; Roberson, B. S.; Muiswinkel, W. B. (eds) *Techniques in fish immunology*. Sos Publications, 101-103. 1990.

Evenhuis, J. P.; Leeds, T. D.; Marancik, D. P.; LaPatra, S. E.; Wiens, G. D. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) resistance to columnaris disease is heritable and favorably correlated with bacterial cold water disease resistance. *Journal of animal science*, 93(4), 1546-1554. 2015.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. *The state of world fisheries and aquaculture. Sustainability in action*. Roma. 244p. 2020.

Gastalho, S.; Silva, G.; Ramos, F. Uso de antibióticos em aquacultura e resistência bacteriana: Impacto em saúde pública. *Acta Farmacêutica Portuguesa*, 3(1), 29-45. 2014.

Goldenfarb, P. B.; Bowyer, F. P.; Hall, E.; Brosious, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. *American Journal of Clinical Pathology*, 56(1), 35-39, 1971.

Gonen, S.; Baranski, M.; Thorland, I.; Norris, A.; Grove, H.; Arnesen, P.; Houston, R. D. Mapping and validation of a major QTL affecting resistance to pancreas disease (*salmonid alphavirus*) in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Heredity*, 115(5), 405-414; 2015.

Hayat, M.; Mohd Yusoff, M. S.; Samad, M. J.; Abdul Razak, I. S.; Md Yasin, I. S.; Thompson, K. D.; Hasni, K. Efficacy of feed-based formalin-killed vaccine of

streptococcus iniae stimulates the gut-associated lymphoid tissues and immune response of red hybrid tilapia. *Vaccines*, 9(1), 51. 2021.

Hickey, J. M.; Chiurugwi, T.; Mackay, I.; Powell, W.; Eggen, A.; Kilian, A.; Atlin, G. Genomic prediction unifies animal and plant breeding programs to form platforms for biological discovery. *Nature genetics*, 49(9), 1297, 2017.

Holm, S.; Brungot, J.; Rønnekleiv, A.; Hoff, L.; Jahr, V.; Kjølnerbakken, K. M. Acoustic passive integrated transponders for fish tagging and identification. *Aquacultural engineering*. V. 36(2), p. 122-126. 2007.

Ishikawa, N. M.; Ranzani-Paiva, M. J. T.; Lombardi, J. V. Metodologia para quantificação de leucócitos totais em peixe *Oreochromis Niloticus*. *Archives of Veterinary Science*, 54-63, 2008.

Joshi, R.; Almeida, D. B.; da Costa, A. R.; Skaarud, A.; de Pádua Pereira, U. Knutsen; T. M.; Alvarez, A. T. Genomic selection for resistance to Francisellosis in commercial Nile tilapia population: genetic and genomic parameters, correlation with growth rate and predictive ability. *Aquaculture*, 537, 736515. 2021.

Joshi, R.; Skaarud, A.; de Vera, M.; Alvarez, A. T.; Ødegård, J. Genomic prediction for commercial traits using univariate and multivariate approaches in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 516, 734641. 2020.

Landolt, M. L. The relationship between diet and the immune response of fish. *Aquaculture*, v. 79, n. 1-4, p. 193-206, 1989.

Ke, X. L.; Zhang, D. F.; Li, Q. Y.; Liu, Z. G.; Gao, F. Y.; Lu, M. X.; Yang, H. Digital gene expression analysis in the liver of ScpB-vaccinated and *Streptococcus agalactiae*-challenged Nile tilapia. *Fish & Shellfish Immunology*, 94, 249-257. 2019.

Linh, N. V.; Sangpo, P.; Senapin, S.; Thapinta, A.; Panphut, W.; St-Hilaire, S.; Dong, H. T. Pre-treatment of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) with ozone

nanobubbles improve efficacy of heat-killed *Streptococcus agalactiae* immersion vaccine. *Fish & Shellfish Immunology*. 2022.

Lopes, L. M. F.; de Mello, M. M. M.; Urbinati, E. C. β -Glucan reduces cortisol plasma levels, enhances innate immune system after *A. hydrophila* inoculation, and has lipolytic effects on the pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Aquaculture*, 546, 737411. 2022.

Ma, Y.; Hao, L.; Liang, Z.; Ma, J.; Ke, H.; Kang, H.; Liu, Z. Characterization of novel antigenic vaccine candidates for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) against *Streptococcus agalactiae* infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 105, 405-414. 2020.

Marcusso, P. F.; da Silva Claudiano, G.; Yunis-Aguinaga, J.; de Almeida Marinho-Neto, F.; Eto, S. F.; Fernandes, D. C.; de Moraes, F. R. Immunogenicity in *Oreochromis niloticus* vaccinated with sonicated antigens against streptococcosis. *Fish & Shellfish Immunology*, 115, 134-141. 2021.

Martins, M. L.; Xu, D. H.; Shoemaker, C. A.; Klesius, P. H. Temperature effects on immune response and hematological parameters of channel catfish *Ictalurus punctatus* vaccinated with live theronts of *Ichthyophthirius multifiliis*. *Fish & shellfish immunology*, 31(6), 774-780. 2011.

Mo, X. B.; Wang, J.; Guo, S.; Li, A. X. Potential of naturally attenuated *Streptococcus agalactiae* as a live vaccine in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 518, 734774. 2020.

Monir, M. S.; Yusoff, S. B. M.; Mohamad, A.; Ngoo, M. S. B. M. H.; Ina-Salwany, M. Y. Haemato-immunological responses and effectiveness of feed-based bivalent vaccine against *Streptococcus iniae* and *Aeromonas hydrophila* infections in hybrid red tilapia (*Oreochromis mossambicus* \times *O. niloticus*). *BMC veterinary research*, 16(1), 1-14. 2020.

Moraes, F. R.; Martins M. L. Condições predisponentes e principais enfermidades de teleósteos em piscicultura intensiva. In: Cyrino, J. E. P.; Urbinati E. C.; Castagnolli, N. Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. São Paulo: TecArt. V. 1. p. 343-383, 2004.

Murphy, K. Imunobiologia de Janeway-8. Artmed Editora. 2014.

Paiva, M. J. T. R.; de Pádua, S. B.; Tavares-Dias, M.; Egami, M. I. Métodos para análise hematológica em peixes. Editora da Universidade Estadual de Maringá-EDUEM. 2013.

Scapigliati, G. Functional aspects of fish lymphocytes. *Developmental & Comparative Immunology*, 41(2), 200-208. 2013.

Scapigliati, G.; Miccoli, A.; Buonocore, F.; Fausto, A. M.; Picchiatti, S. Lymphocytes of Teleosts. In *Principles of Fish Immunology* (pp. 177-201). Springer, Cham. 2022.

Sepulcre, M. P.; Sarropoulou, E.; Kotoulas, G.; Meseguer, J.; Mulero, V. *Vibrio anguillarum* evades the immune response of the bony fish sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*) through the inhibition of leukocyte respiratory burst and down-regulation of apoptotic caspases. *Molecular immunology*, 44(15), 3751-3757. 2007.

Shoemaker, C. A.; Lozano, C. A.; LaFrentz, B. R.; García, J. C.; Soto, E.; Xu, D. H.; Rye, M. Additive genetic variation in resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to *Streptococcus iniae* and *S. agalactiae* capsular type Ib: Is genetic resistance correlated?. *Aquaculture*, 468, 193-198. 2017.

Suebsong, W.; Poompuang, S.; Srisapoome, P.; Koonawootrittriron, S.; Luengnaruemitchai, A.; Johansen, H.; Rye, M. Selection response for *Streptococcus agalactiae* resistance in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Journal of fish diseases*, 42(11), 1553-1562. 2019.

Sukhavachana, S.; Tongyoo, P.; Massault, C.; McMillan, N.; Leungnaruemitchai, A.; Poompuang, S. Genome-wide association study and genomic prediction for resistance against *Streptococcus agalactiae* in hybrid red tilapia (*Oreochromis* spp.). *Aquaculture*, 525, 735297. 2020.

Urbinati, E. C.; Carneiro P. C. F.. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura intensiva. Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropicas intensiva. TecArt, São Paulo, p. 171-194, 2004.

Urbinati, E.C.; Zanuzzo F.S.; Biller-Takahashi J.D. Estresse e sistema imune em peixes. In: Baldisserotto, B.; Cyrino, J.E.P.; Urbinati, E.C (Ed.). *Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce*. Jaboticabal: FUNEP, Cap. 5, 87-105, 2014.

Wang, Q.; Zhang, C.; Xu, L.; Chen, J.; Wang, X. Characterization of *Streptococcus iniae* ghost vaccine and its immunization in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Research*, 52(4), 1359-1368. 2021.

Wangkaghart, E.; Deville, S.; Wang, B.; Srisapoome, P.; Wang, T.; Secombes, C. J. Immune response and protective efficacy of two new adjuvants, Montanide™ ISA 763B VG and Montanide™ GEL02, administered with a *Streptococcus agalactiae* ghost vaccine in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 116, 19-29. 2021.

Wiegertjes, G. F.; Stet, R. M.; Parmentier, H. K.; Van Muiswinkel, W. B. Immunogenetics of disease resistance in fish: a comparative approach. *Developmental & Comparative Immunology*, 20(6), 365-381; 1996.

Wintrobe M.M. Anemia: classification and treatment on the basis of differences in the average volume and hemoglobin content of the red corpuscles. *Arch Intern Med*, 54:256–280. 1934.

Wonmongkol, P.; Sukhavachana, S.; Ampolsak, K.; Srisapoome, P.; Suwanasopee, T.; Poompuang, S. Genetic parameters for resistance against

Flavobacterium columnare in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758).
Journal of fish diseases, 41(2), 321-328. 2018.

Xu, D. H.; Zhang, D.; Shoemaker, C.; Beck, B. Immune response of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) against *Ichthyophthirius multifiliis* post vaccination using DNA vaccines encoding immobilization antigens. Fish & Shellfish Immunology, 94, 308-317. 2019.

Zamri-Saad M; Amal M.N.A; Siti-Zahrah A. Pathological changes in red tilapias (*Oreochromis* spp.) naturally infected by *Streptococcus agalactiae*. Journal of Comparative Pathology 143:227-229. 2010.

Zanuzzo, F.S.; Sabioni, R.E.; Montoya, L.N.F.; Favero, G.; Urbinati, E.C.; Aloe vera enhances the innate immune response of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) after transport stress and combined heat killed *Aeromonas hydrophila* infection. Fish Shellfish Immunol. 65, 198-205. 2017.

Zanuzzo, F. S.; Urbinati, E. C.; Rise, M. L.; Hall, J. R.; Nash, G. W.; Gamperl, A. K. *Aeromonas salmonicida* induced immune gene expression in Aloe vera fed steelhead trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Aquaculture, 435, 1-9. 2015.