

**DESENVOLVIMENTO DE CANDIDATOS VACINAIS PARA IMUNIZAÇÃO VIA ORAL E
VIA BANHO DE IMERSÃO CONTRA INFECÇÕES POR *Aeromonas hydrophila* E *Streptococcus agalactiae* EM TILÁPIAS-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*)**

ANGELO GABRIEL VIDAL DOS SANTOS

Foz do Iguaçu, Estado do Paraná

2024

**DESENVOLVIMENTO DE CANDIDATOS VACINAIS PARA IMUNIZAÇÃO VIA ORAL E
VIA BANHO DE IMERSÃO CONTRA INFECÇÕES POR *Aeromonas hydrophila* E *Streptococcus agalactiae* EM TILÁPIAS-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*)**

ANGELO GABRIEL VIDAL DOS SANTOS

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador(a): Prof. Dr. Kelvinson Fernandes Viana

Coorientador(a): MSc. Açucena Veleh Rivas

Foz do Iguaçu, Estado do Paraná

2024

ANGELO GABRIEL VIDAL DOS SANTOS

DESENVOLVIMENTO DE CANDIDATOS VACINAIS PARA IMUNIZAÇÃO VIA ORAL E VIA BANHO DE IMERSÃO CONTRA INFECÇÕES POR *Aeromonas hydrophila* E *Streptococcus agalactiae* EM TILÁPIAS-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*)

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Kelvinson Fernandes Viana
Orientador
UNILA

Dr. Weber Beringui Feitosa
Examinador
UNILA

Dr. Raphael Pires Bolzan
Examinador
IFES

Foz do Iguaçu, Estado do Paraná, 28 de agosto de 2024.

Catálogo elaborado pelo Setor de Tratamento da Informação
Catálogo de Publicação na Fonte. UNILA - BIBLIOTECA LATINO-AMERICANA - CENTRAL

S237d

Santos, Angelo Gabriel Vidal dos.

Desenvolvimento de candidatos vacinais para imunização via oral e via banho de imersão contra infecções por *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae* em tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) / Angelo Gabriel Vidal dos Santos. - Foz do Iguaçu, 2024.

51 fls.: il.

Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, Programa de Pós-Graduação em Biociências.

Orientador: Kelvinson Fernandes Viana.

Coorientador: Açucena Veleh Rivas.

1. Tilápia (Peixe). 2. Imunização. 3. Vacinação de animais. I. Viana, Kelvinson Fernandes. II. Rivas, Açucena Veleh. III. Título.

CDU 615.371

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha família, em especial a minha mãe e meus avós, pelo apoio durante toda a minha trajetória e sempre me incentivando a ser melhor e correr atrás dos meus sonhos.

Ao Dr. Kelvinson, pela oportunidade de trabalhar no seu grupo de pesquisa e pelo conhecimento transmitido e orientação que me proporcionaram crescimento.

À Açucena por aceitar ser minha coorientadora, seus ensinamentos, paciência e amizade foram importantes para minha trajetória acadêmica.

À minha amiga e colega de experimentos Adrieli, companheira nas atividades em campo e laboratório.

Ao Estevam e toda equipe da Alquimia Pescados pelo apoio na execução dos experimentos em campo e troca de conhecimento, a parceria com vocês tornou esse projeto possível.

Aos meus amigos e colegas de laboratório pelas conversas e convivência durante os anos na UNILA.

Agradecimento ao Programa de Pós-Graduação em Biociências.

O presente trabalho conta com o apoio da Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Código de Financiamento 001, bolsa DS (Programa Demanda Social).

“Somente, onde há vida, há também vontade: mas não vontade de vida, e sim - assim te ensino – vontade de potência! Muito, para o vivente, é estimado mais alto do que o próprio viver; mas na própria estimativa fala - a vontade de potência!”

NIETZSCHE, 1974, p. 246.

SANTOS, Angelo Gabriel Vidal dos. 2024. **Desenvolvimento de candidatos vacinais para imunização via oral e via banho de imersão contra infecções por *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae* em Tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*).**

Orientadores: VIANA, Kelvinson Fernandes (orientador); RIVAS, Açucena Veleh (coorientador). 51 f.. Dissertação (Mestrado) - PPG-BC (Programa de Pós-Graduação em Biociências), UNILA (Universidade Federal da Integração Latino-Americana), Foz do Iguaçu.

RESUMO

A expansão da aquicultura em escala comercial requer o desenvolvimento de novas tecnologias para aumentar a produção e mitigar surtos de doenças. Entre os patógenos bacterianos predominantes que afetam a tilápia estão *Aeromonas* spp. e *Streptococcus* spp., frequentemente ocorrendo coinfeção. O uso de antibióticos para tratar infecções bacterianas apresenta significativos riscos ambientais e de saúde pública. Em resposta, a vacinação surgiu como uma medida profilática, demonstrando notável eficácia na redução das taxas de mortalidade e melhoria do desempenho animal. Embora a administração intraperitoneal (i.p.) seja a rota primária, sua natureza trabalhosa apresenta desafios. Consequentemente, metodologias alternativas, como a imunização oral e banhos de imersão, têm sido exploradas para simplificar a administração e reduzir os custos de mão de obra. Este estudo teve como objetivo formular candidatos a vacina para o controle de infecções por *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae* em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), administradas oralmente por incorporação na ração e banhos de imersão. A vacina foi desenvolvida usando antígenos bacterianos isolados de linhagens de tilápia cultivadas e inativadas com formalina. Em ensaios de campo, os peixes foram divididos em dois grupos vacinados: grupo vacinado com ração + reforço de ração (OR+OR), grupo de banho de imersão + reforço de ração (BI+OR), e um grupo controle, e alojados em tanques de malha. Ensaios imunológicos revelaram que ambos os grupos BI+OR e OR+OR produziram anticorpos contra os antígenos, com o grupo BI+OR demonstrando uma resposta imune mais consistente ao longo do estudo. A eficácia das vacinas BI+OR e OR+OR foi de 55,99% e 44,23%, respectivamente. Esses resultados destacam a viabilidade dessas metodologias como técnicas promissoras para a imunização em larga escala de peixes na aquicultura.

Palavras-chave: *Oreochromis niloticus*; imunização; vacina oral; vacina de imersão; teste em campo.

SANTOS, Angelo Gabriel Vidal dos. 2024. ***Development of vaccine candidates for oral and immersion bath immunization against Aeromonas hydrophila and Streptococcus agalactiae infections in Nile Tilapia (Oreochromis niloticus)***. Advisors: VIANA, Kelvinson Fernandes (advisor); RIVAS, Açucena Veleh (co-advisor). 51 s.. Master's thesis (Master's degree) - PPG-BC (Graduate Program in Biosciences), UNILA (Federal University of Latin American Integration), Foz do Iguaçu.

ABSTRACT

*The expansion of commercial-scale aquaculture necessitates the development of modern technologies to enhance production and mitigate disease outbreaks. Among the predominant bacterial pathogens impacting tilapia are *Aeromonas* spp. and *Streptococcus* spp., often co-occurring. The usage of antibiotics to treat bacterial infections poses significant environmental and public health risks. In response, vaccination has emerged as a prophylactic measure, demonstrating notable efficacy in reducing mortality rates and improving animal performance. Although intraperitoneal (i.p.) administration is the primary route, its labor-intensive nature presents challenges. Consequently, alternative methodologies such as oral immunization and immersion baths have been explored to streamline administration and reduce labor costs. This study aimed to formulate vaccine candidates for controlling *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus agalactiae* infections in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), administered orally via incorporation into feed and immersion baths. These vaccines were developed using bacterial antigens isolated from cultivated tilapia strains and inactivated with formalin. In field trials, the fish were divided into two vaccinated groups: feed-vaccinated group + feed booster (FF), immersion bath group + feed booster (IF), and a control group, and housed in mesh tanks. Immunological demonstrated that both IF and FF groups produced antibodies against the antigens, with the IF group demonstrating a more consistent immune response throughout the study. The effectiveness of the IF and FF vaccines was 55.99% and 44.23%, respectively. These findings underscore the feasibility of these methodologies as promising techniques for large-scale fish immunization in aquaculture.*

Keywords: *Oreochromis niloticus; immunization; oral vaccine; immersion vaccine; field testing.*

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição dos tecidos linfoides associados à mucosa.....	17
Figura 2. Delineamento experimental mostrando as aplicações das doses dos imunizantes, os repiques e as coletas de sangue dos animais	24
Figura 3. Aplicação do imunizante via banho de imersão	25
Figura 4. A aplicação do imunizante via oral.....	26
Figura 5. Ensaio de imunoaglutinação com soros de animais dos grupos vacinados e controle.....	30

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Primers utilizados nos ensaios moleculares LAMP para detecção de <i>A. hydrophila</i> e <i>S. agalactiae</i>	27
Tabela 2. Imunizantes via imersão + reforço e ração + reforço desenvolvidos contra <i>A. hydrophila</i> e <i>S. agalactiae</i> reduziram a taxa de mortalidade dos grupos vacinados e foram eficazes contra estas infecções	34

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. O Brasil figura na quarta colocação na produção global de tilápia, ficando atrás da China, Indonésia e Egito	13
Gráfico 2. Principais estados produtores de tilápia, o Paraná se destaca na produção nacional da tilápia	14
Gráfico 3. Avaliação dos anticorpos inibidores de crescimento bacteriano	31
Gráfico 4. Acompanhamento da evolução das massas dos animais dos grupos vacinados e controle após a dose de reforço	32
Gráfico 5. Comparação da taxa de mortalidade dos grupos vacinados e do grupo controle 30 dias, 60 dias, 90 dias e 123 dias após a dose reforço	33

SUMÁRIO

RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE TABELAS	IX
ÍNDICE DE GRÁFICOS	X
1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Referencial teórico	13
1.1.1 A tilapicultura no Brasil e no mundo.....	13
1.1.2 Doenças bacterianas na tilapicultura	14
1.1.3 Sistema imunológico de peixe	16
1.1.4 Metodologias de vacinação	19
1.2 Justificativa	21
1.3 Hipótese.....	21
2 OBJETIVOS	22
2.1 Geral	22
2.2 Específicos	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Produção dos antígenos e formulação do imunizante	23
3.2 Protocolo de imunização e delineamento experimental.....	23
3.2.1 Dose inicial de imunização por banho de imersão e oral via ração	24
3.2.2 Reforço oral via ração.....	25
3.3 Diagnóstico molecular das bacterioses.....	26
3.4 Título de aglutinação.....	28
3.5 Ensaio antimicrobiano.....	28
3.6 Análise estatística.....	29
4 RESULTADOS	30
4.1 Título de aglutinação.....	30
4.2 Ensaio antimicrobiano.....	31
4.3 Mortalidade e biometria	32
5 DISCUSSÃO.....	35
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	39
7 REFERÊNCIAS	40

1 INTRODUÇÃO

A tilapicultura se destaca como uma das principais atividades econômicas na aquicultura mundial, contribuindo significativamente para o fornecimento de proteína de alta qualidade. As tilápias são o segundo grupo de peixes mais produzidos globalmente, destacando-se por sua adaptabilidade e resistência, o que propiciou sua disseminação em mais de 120 países (FAO, 2022). No Brasil, essa atividade tem experimentado um crescimento exponencial nas últimas décadas, tornando o país o quarto maior produtor mundial, com o estado do Paraná liderando a produção (PeixesBR, 2024). Contudo, esse crescimento traz à tona desafios significativos relacionados à sanidade dos animais, sendo as infecções bacterianas uma das principais ameaças ao desenvolvimento sustentável da tilapicultura.

Patógenos como *Streptococcus agalactiae*, *Aeromonas spp.* e *Flavobacterium columnare* são frequentemente associados a surtos em ambientes de alta densidade de cultivo, resultando em altas taxas de mortalidade e perdas econômicas consideráveis (Delphino *et al.*, 2019; Pretto-Giordano *et al.*, 2010). Nesse cenário, a busca por soluções preventivas, incluindo vacinas, e o entendimento dos mecanismos imunológicos dos peixes teleósteis são essenciais para garantir a saúde dos animais e a viabilidade econômica da atividade.

Embora a imunização intraperitoneal com antígenos inativados tenha se mostrado eficaz no controle de infecções bacterianas, sua aplicação enfrenta limitações, especialmente para pequenos e médios produtores. A necessidade de mão de obra qualificada e infraestrutura específica torna essa técnica onerosa, aumentando os custos operacionais e logísticos. Além disso, imunizar grandes populações em sistemas de cultivo intensivo apresenta desafios adicionais, como o risco de estresse durante o manuseio e a dificuldade em garantir a eficácia da vacinação.

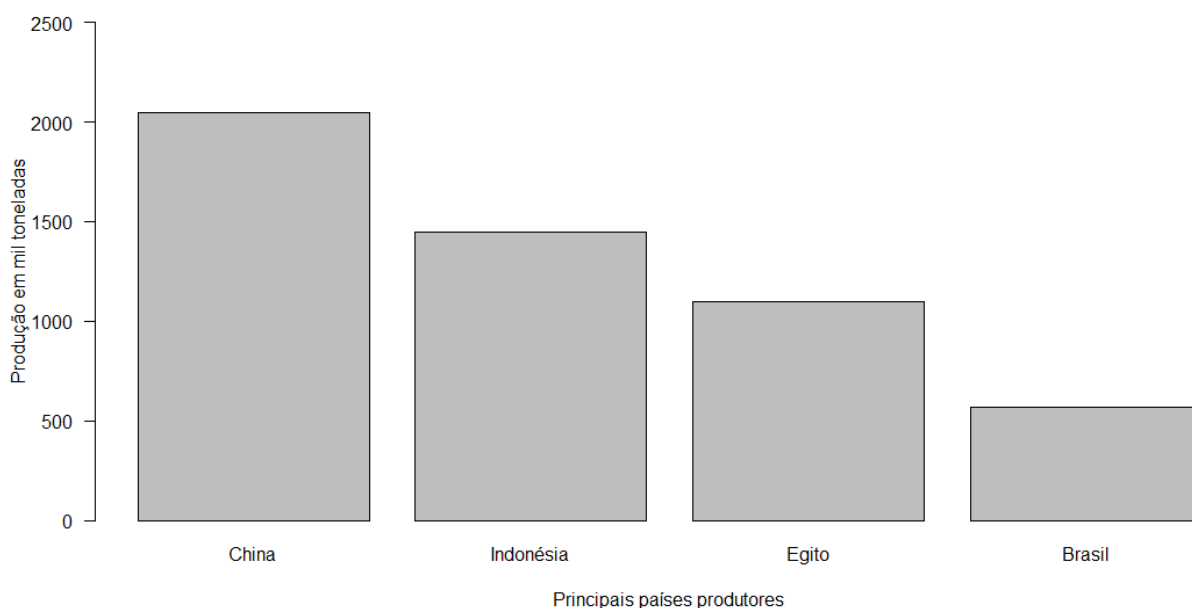
Diante desse contexto, há uma urgente necessidade de desenvolver metodologias acessíveis e menos invasivas para a imunização de peixes. Estratégias como vacinas administradas via oral ou por imersão surgem como alternativas promissoras, reduzindo o estresse dos peixes e possibilitando uma adoção mais ampla por parte dos produtores. Assim, a inovação em estratégias de vacinação é crucial para promover a sustentabilidade da aquicultura e garantir a proteção das espécies contra doenças infecciosas, assegurando a continuidade e a rentabilidade da tilapicultura.

1.1 Referencial teórico

1.1.1 A tilapicultura no Brasil e no mundo

A piscicultura tem papel fundamental no fornecimento de alimento para a população mundial. Em 2020, a produção global de peixes atingiu cerca de 57,5 milhões de toneladas, movimentando um mercado de 146,1 bilhões de dólares (FAO, 2022). A tilápia é o segundo peixe mais cultivado no mundo, ficando atrás apenas das carpas, estando presente em mais de 120 países (FAO, 2022). As espécies do gênero *Oreochromis* spp., tem sua origem na região entre a África e o Oriente Médio, e se destacam pela sua resistência e adaptabilidade (Dunz; Schliewen, 2013). A introdução no Brasil se deu entre a década de 1970 e 1980, em açudes e reservatórios de hidroelétricas na região sudeste e nordeste do país (Kubitza, 2003).

Gráfico 1. O Brasil figura na quarta colocação na produção global de tilápia, ficando atrás da China, Indonésia e Egito



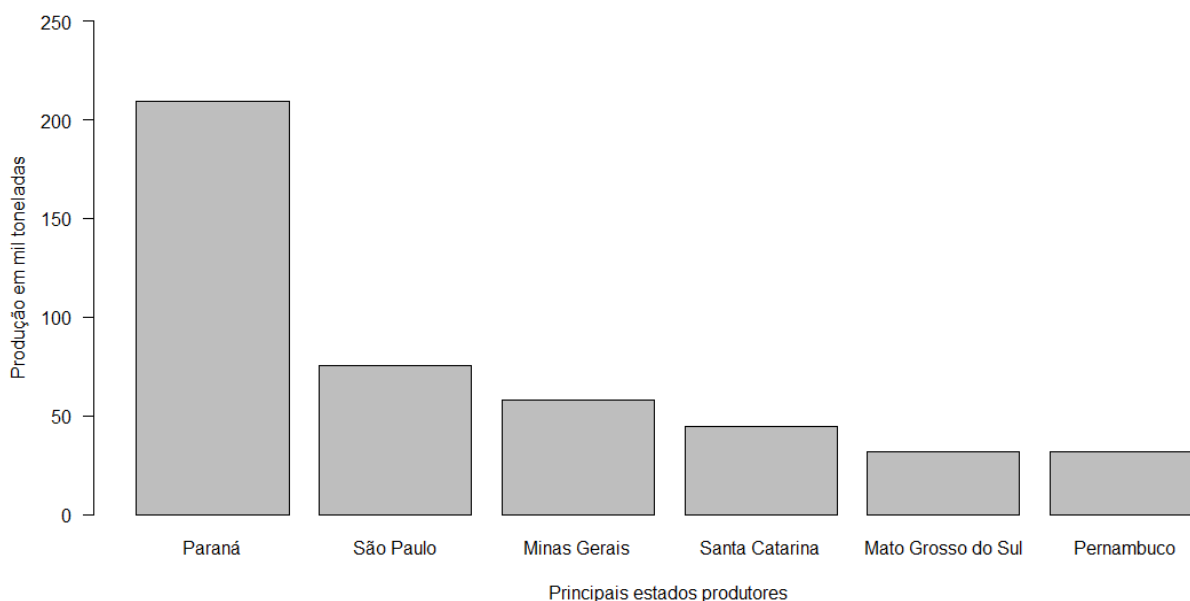
Fonte: Adaptados de PeixesBR, 2024.

A partir dos anos 2000, o processo de modernização da tilapicultura impulsionou o crescimento da produção e possibilitou o Brasil a se tornar um dos maiores produtores. Os programas de melhoramento genético e da sanidade, e pelo aperfeiçoamento e industrialização da cadeia de produção catalisaram a expansão da atividade (Schulter; Vieira Filho, 2018). Atualmente, a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) é a principal espécie da piscicultura brasileira. Em 2023, a produção de tilápia no país foi superior a 579

mil toneladas, sendo o 4º maior produtor mundial da espécie, um salto na produção de 103% nos últimos 10 anos (Gráfico 1) (PeixesBR, 2024).

A distribuição da produção nacional se concentra nos estados da região Centro-Sul, sendo liderada pelo estado do Paraná (209.500 t), seguido por São Paulo (75.700 t), Minas Gerais (58.200 t), Santa Catarina (44.600 t) e Mato Grosso do Sul e Pernambuco (32.200 t) (PeixesBR, 2024) (Gráfico 2).

Gráfico 2. Principais estados produtores de tilápia, o Paraná se destaca na produção nacional da tilápia



Fonte: Adaptados de PeixesBR, 2024.

1.1.2 Doenças bacterianas na tilapicultura

Uma das consequências da industrialização da piscicultura é o surgimento recorrente de surtos de infecções bacterianas. Na tilapicultura, as principais bactérias que acometem os peixes são as *Aeromonas* spp., *Edwardsiella* spp., *Flavobacterium columnare*, *Francisella* spp. e *Streptococcus* spp. (Delphino *et al.*, 2019). Estes patógenos são comuns em ambientes aquáticos e atuam de forma oportunista, muitas vezes co-infectando o mesmo animal (Assis *et al.*, 2017; Erfanmanesh *et al.*, 2019; Okon *et al.*, 2023). A alteração da qualidade da água, a alta densidade dos cultivos e alimentação deficiente de nutrientes são fatores de risco de surtos dessas doenças.

A *S. agalactiae*, gram positiva e catalase e oxidase negativas, é caracterizada em dez sorotipos (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII), baseados na classificação da composição dos polissacarídeos capsulares (Al-Halbi, 1994). Os sintomas mais recorrentes nos animais

infectados são danos nas nadadeiras, manchas hemorrágicas, perda de escama, exoftalmia e formação de cataratas nos olhos, além de danos em órgãos internos como fígado, rins e cérebro (Amal; Zamri-Saad, 2011). Este patógeno pode gerar altas taxas de mortalidade e surtos, com perdas de até 80% dos animais (Pretto-Giordano *et al.*, 2010).

As bactérias *Aeromonas* spp. são responsáveis pela doença conhecida como "septicemia por *Aeromonas* móveis" e são caracterizadas como não esporulantes, flageladas, catalase e oxidase positiva e gram-negativas (Ali *et al.*, 2016). Estas bactérias são a causa comum de doenças não apenas em peixes de água quente, como *Ictalurus punctatus*, *Oreochromis* spp. (Amin *et al.*, 1985) e *Plecoglossus altivelis* (Miyazaki; Jo, 1985), mas também entre peixes de água fria e vertebrados superiores (Janda; Abbott, 1998). A infecção por essa bactéria provoca lesões externas visíveis, como úlceras, erosões ou hemorragias na pele, nadadeiras e brânquias, inflamação nos tecidos, como a peritonite e comportamento anormal, como natação descoordenada, letargia, perda de apetite e dificuldade respiratória, acúmulo de líquido na cavidade abdominal, danos nos órgãos, principalmente rins e fígado (Alyahya *et al.*, 2018; Jhingran; Das, 1990).

As infecções podem acometer os animais ao longo do processo de produção e trazem prejuízos econômicos com a perda da qualidade da carne e aumento da mortalidade dos animais (Bondad-Reantaso *et al.*, 2005). O controle e a prevenção de infecções em peixes envolvem a implementação de boas práticas de manejo, a manutenção de condições sanitárias adequadas, nutrição adequada e a implementação de estratégias preventivas, como a vacinação e uso de métodos diagnósticos eficientes (Mugimba *et al.*, 2021; Padrós *et al.*, 2022).

Os antibióticos também podem ser utilizados como medida de controle e prevenção. Fármacos como Florfenicol e Oxitetraciclina têm sido aplicados via incorporação em ração ou diretamente no sistema de cultivo. No entanto, o emprego desses compostos está associado a questões ambientais e de saúde pública (RIGOS, 2005). A emergência de bactérias que resistem a múltiplos desses medicamentos pode acarretar dificuldades no controle das enfermidades nos animais de criação, bem como problemas relacionados a agentes patogênicos em seres humanos devido à extensa exposição a essas substâncias no meio ambiente (Osman *et al.*, 2017; Miranda; Tello; Keen., 2013; Huddleston, 2014).

1.1.3 Sistema imunológico de peixe

Os peixes teleósteos, classe de peixes ósseos caracterizada por possuir esqueleto ósseo e escamas, apresentam um sistema imunológico celular complexo e altamente adaptativo, com características únicas que refletem sua evolução e ambiente aquático (Bowden, 2008). O sistema imune nestes peixes é caracterizado pela presença de células especializadas fagocíticas, como macrófagos e células granulocíticas, células apresentadoras de antígenos e uma diversidade de células T e B, juntamente com moléculas como as proteínas do sistema complemento e imunoglobulinas, similar ao que é encontrado em mamíferos (Dixon; Stet, 2001; Mashoof, Criscitiello, 2016).

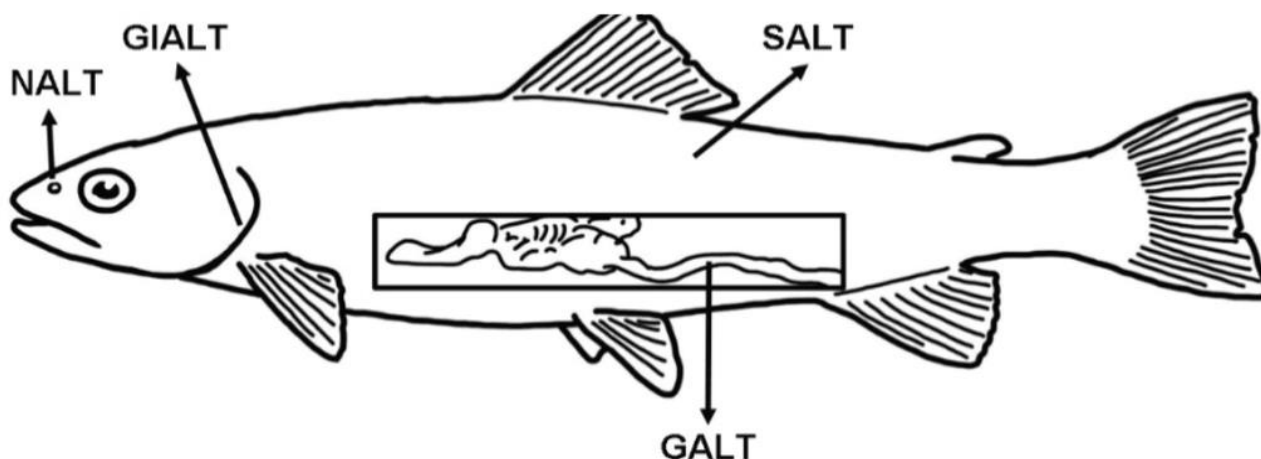
É interessante notar que, apesar das diferenças em relação aos mamíferos, os peixes teleósteos possuem um sistema imunológico adaptado às suas necessidades. Estes animais, apesar da ausência de centros germinativos (CGs) ou linfoides secundárias análogas, possuem estruturas linfoides organizadas que desempenham funções semelhantes aos CGs onde ocorre a expansão clonal de células B específicas para antígenos (Shibasaki *et al.*, 2023).

Embora o desenvolvimento do timo e das células T em peixes teleósteos seja um processo conservado, ainda há muito a ser compreendido sobre os mecanismos exatos e a organização das células T nessas espécies (Partula *et al.*, 1995; Boudinot *et al.*, 2002). Uma grande variedade de marcadores clássicos de células T, citocinas específicas de células T e fatores de transcrição, têm sido identificados em diversas espécies até o momento, indicando que o sistema de células T dos peixes compartilha muitas características com mamíferos (Mulder *et al.*, 2007; Díaz-Rosales *et al.*, 2009; Hong *et al.*, 2013; Mitra *et al.*, 2010). No entanto, questões importantes permanecem em aberto, como a compartimentalização geográfica das populações de células T, a diversidade genômica dos genes dos receptores de células T e seu papel na especificidade da resposta imune, e o impacto das células T na imunidade mucosa e na homeostase (Munang'andu *et al.*, 2015).

As barreiras físicas e químicas presentes na pele e as mucosas servem como primeira linha de defesa, impedindo a entrada de microrganismos patogênicos do ambiente aquático. As superfícies mucosas dos peixes estão em contato contínuo com comensais, patógenos oportunistas e obrigatórios, e, portanto, a imunidade na superfície mucosa é considerada desempenhar um papel importante na proteção dos peixes contra patógenos. As MALTs, tecidos linfoides associados à mucosa, possuem papel importante nos peixes na detecção e sinalização da presença de organismos invasores (Figura 1) (Munang'andu *et al.*, 2015). Estes possuem um repertório de células apresentadoras de antígenos, células T CD4⁺ e CD8⁺ e células B, secreções mucosas, imunoglobulinas e enzimas possuem

propriedades antimicrobianas que ajudam a combater infecções (Yu *et al.*, 2020; Salinas, 2015).

Figura 1. Distribuição dos tecidos linfóides associados à mucosa



Legenda: (MALT: *mucosa-associated lymphoid tissues*) presentes em peixes teleósteos: (GALT: *gut-associated lymphoid tissue*; SALT: *skin-associated lymphoid tissue*; GIALT: *gill-associated lymphoid tissue*; NALT: *nasopharynx-associated lymphoid tissue*).

Fonte: dos autores, 2024.

O intestino parece ter um papel crucial no sistema imunológico, tanto em termos de desenvolvimento de células imunes quanto na possibilidade de ser considerado um órgão linfóide primário (Peaudecerf, Rocha, 2011). Em carpas e robalos, o timo e o intestino são os primeiros órgãos onde as células T são encontradas durante o desenvolvimento de seus sistemas imunológicos, esses órgãos desempenham um papel crucial no desenvolvimento inicial e maturação do sistema imunológico nessas espécies de peixes (Rombout *et al.*, 2005). Além disso, os teleósteos podem desenvolver inflamação intestinal, especialmente em resposta ao transporte de antígenos no segundo segmento intestinal, onde células epiteliais, linfócito intestinais e eosinófilos/basófilos desempenham um papel crucial (Rombout *et al.*, 2011).

A estrutura básica da Ig consiste em duas cadeias pesadas (H) idênticas e duas cadeias leves (L) idênticas. Ambas as cadeias pesadas e leve contêm um domínio variável N-terminal (VH ou VL) e um ou mais domínios constantes C-terminal que formam a região constante (CH ou CL), todos os domínios adotando a dobra característica da superfamília de Igs (Danilova *et al.*, 2005).

Em mamíferos, os segmentos de genes que codificam as cadeias pesadas e leves de imunoglobulina estão tipicamente organizados em um arranjo translócon. Nestes, os segmentos de genes V estão localizados a montante dos grupos de segmentos de genes

D, J e constantes (C) (Chothia *et al.*, 1992). Em contraste, peixes cartilaginosos organizam os segmentos gênicos de imunoglobulina em pequenos aglomerados contendo segmentos V, D, J e C. Já os peixes teleósteos apresentam uma posição intermediária, possuindo um locus de cadeia pesada semelhante ao arranjo translócon de mamíferos, mas com múltiplos segmentos gênicos de cadeia leve organizados em um agrupamento (Conrath *et al.*, 2003).

As imunoglobulinas (Igs) desempenham um papel fundamental na resposta imune inata e adaptativa. Embora sua estrutura e função possam variar entre as diferentes espécies, as principais classes de imunoglobulinas identificadas em peixes teleósteos são a IgM, IgT e a IgD (Bilal *et al.*, 2021). Esta classe de Ig é encontrada predominantemente como uma forma livre pentâmera, mas também ligada a células imunes na forma monomérica. Ao contrário dos mamíferos, os peixes teleósteos não possuem IgG e IgA, em vez disso, a IgM desempenha um papel multifuncional semelhante, incluindo a neutralização de patógenos, ativação do sistema complemento e a opsonização de antígenos (Boshra *et al.*, 2004). Além disso, IgM também atua na aglutinação para o processo de fagocitose e remoção de patógenos e citotoxicidade celular (Ye *et al.*, 2013).

Evidências reforçam a hipótese que em peixes teleósteos há separação de isotipos de imunoglobulinas em áreas mucosas (IgT) e sistêmicas (IgM) em resposta ao desafio patogênico (Zhang *et al.*, 2010). Estudos mostram que o subconjunto de células B IgT⁺ da truta arco-íris compreende 16 - 27% de todas as células B nos principais órgãos linfóides sistêmicos, sendo a porcentagem restante de células B IgM. Em adição, Zhang e colaboradores (2011) mostram que existem um maior número de células B IgT⁺ e anticorpos IgT, comparado a células B IgM⁺ e anticorpos IgM, em animais infectados anteriormente por parasitas intestinais.

A proporção de células B em suspensões celulares isoladas do intestino é geralmente relatada como baixa e variável entre as espécies de teleósteos estudadas (Salinas *et al.*, 2011). Em várias espécies, as células IgM⁺ foram encontradas principalmente na lâmina própria (LP) do intestino, com ocorrência menor no epitélio (Ballesteros *et al.*, 2013). Estudos em trutas arco-íris revelaram a presença tanto de células IgM⁺ quanto de células IgT⁺ na LP e, em menor grau, no epitélio intestinal (ZHANG *et al.*, 2010). Esses estudos enfatizam a distribuição das células B no intestino dos peixes teleósteos e seu potencial relevância na resposta imune local.

A presença e função da IgD em peixes teleósteos ainda não são completamente compreendidas. Esta é encontrada em menor quantidade em comparação com a IgM no plasma dos animais (Chen *et al.*, 2009). A concentração de células plasmáticas secretoras

de IgD em trutas são comuns nas brânquias, nos rins e no baço e raras no sangue periférico (Ramirez-Gomez *et al.*, 2012). Tem se investigado que as células plasmáticas secretoras de IgD são especializadas para funcionar em certos tecidos para fornecer uma barreira à infecção. Estes anticorpos podem atuar junto a microbiota comensal em tecidos mucosos, incluindo a mucosa do trato digestivo e mucosa branquial, auxiliando na homeostase (Yu *et al.*, 2016; KONG *et al.*, 2019).

Na ontogenia das células B, observa-se que inicialmente surgem no rim, seguidas pelo baço e, por fim, no tecido linfóide associado ao intestino (MALT) (Rombout *et al.*, 2005). A expressão de Ig de superfície precede a expressão de Ig citoplasmática, podendo variar conforme os métodos de detecção (ZAPATA *et al.*, 2006). Os estudos sobre o desenvolvimento das células B e plasmáticas em teleósteos têm se concentrado principalmente na presença e secreção de IgM, deixando lacunas significativas no entendimento da ontogenia e distribuição das células que expressam IgD ou IgT nos tecidos, bem como na dinâmica populacional dos peixes ósseos.

1.1.4 Metodologias de vacinação

Atualmente, a maioria das vacinas aquáticas comerciais são feitas através da inativação de agentes patogênicos por meio de métodos químicos e físicos. Essas vacinas tendem a ser mais estáveis, o que facilita seu armazenamento por períodos mais longos e em condições menos rigorosas de refrigeração, simplificando assim sua distribuição (Ma *et al.*, 2019). Outro aspecto positivo é a menor probabilidade de mutação dos patógenos inativados para formas mais virulentas, o que pode ser uma preocupação em vacinas vivas (Munang'andu; Paul; Evensen, 2016). No entanto, as formulações inativadas têm limitações, como exigências rigorosas de inativação, curta duração da imunidade, necessidade de altas doses de antígenos e aplicação de doses de reforço (Du *et al.*, 2022).

Experimentos promissores têm sido registrados em diversas espécies de peixes de valor econômico com a aplicação dessas vacinas vivas atenuadas (Nawi *et al.*, 2012; Evans *et al.*, 2004). O emprego de vacinas vivas atenuadas na aquicultura traz várias vantagens, tais como simplificação do procedimento de imunização, diminuição dos custos de produção, administração rápida, doses reduzidas para imunização e prolongamento da proteção imunológica. Além disso, tais vacinas têm vida útil limitada, estabilidade térmica reduzida, exigem condições específicas de transporte e armazenamento, e há o risco de surgimento de mutações (Munang'andu; Paul; Evensen, 2016).

As vacinas de subunidade preservam apenas os elementos imunogênicos essenciais e descartam os elementos patogênicos irrelevantes ou prejudiciais que desencadeiam a imunidade protetora. Deste modo, as vacinas de subunidade mantêm apenas os componentes imunogênicos eficazes, resultando em melhorias significativas e estáveis nos efeitos imunológicos, maior confiabilidade e menos reações adversas no organismo. Contudo, frequentemente requerem o uso de adjuvantes para produção de uma resposta imune protetora.

As vacinas injetáveis têm dominado o mercado devido a melhor eficácia na prevenção de infecções. Podendo ser injetadas via intraperitoneal, intramuscular e subcutânea. No entanto, a técnica possui desvantagens, devido a laboriosidade e necessidade de mão de obra qualificada. Métodos alternativos propostos, como a aplicação via oral e banho de imersão, se mostram mais viáveis ao produtor devido à redução de custos e facilidade da técnica, no entanto, ainda possuem desafios a serem superados (Bogwald; Dalmo, 2019; Munang'andu; Paul; Evensen, 2016).

Estas vacinas aplicadas via mucosa estimulam primariamente a resposta das brônquias, do intestino e da pele do animal, através de células especializadas e estruturas presentes nesses tecidos. Os MALTs (tecidos linfóides associados à mucosa) e GALTs (tecidos linfóides associados ao intestino) são estruturas das mucosas ricas em células imunes, similares às placas de Peyer e tonsilas encontradas em mamíferos (Munang'andu *et al.*, 2015). As células B e as imunoglobulinas nos MALTs e GALTs desempenham papéis importantes na imunidade da mucosa local (Yu *et al.*, 2020).

O método de aplicação via banho de imersão ocorre pela imersão do animal, durante breve período, em uma solução com os antígenos. Estudos mostram que a aplicação de vacinas pela metodologia de imersão estimula a proliferação de células B IgT⁺ positivas em órgãos sistêmicos e aumento de IgT total no soro (Hoare *et al.*, 2017). A técnica ainda enfrenta desafios relacionados à formulação precisa dos antígenos, à capacidade de manter a estabilidade desses compostos na água, à eficácia da absorção pelos peixes e à garantia de uma resposta imunológica satisfatória para proteção contra patógenos (Mutoloki; Munang'andu; Evensen, 2015; Mondal; Thomas, 2022).

Na aplicação via oral, os animais ingerem os antígenos e o principal alvo da estimulação são as estruturas do intestino dos animais. Esta formulação tem sido avaliada para uso em peixes desde a década de 1940 (Duff, 1942). No entanto, existem no mercado poucos imunizantes. Estudos buscam reduzir a degradação estomacal com o

desenvolvimento de formulações e métodos de entrega de antígenos (Mutoloki; Munang'andu; Evensen, 2015). Diversos autores exploraram a utilização de vacinas orais encapsuladas em microesferas ou partículas como forma de superar esse desafio (Priya e Kappalli, 2022). Além disso, o uso de adjuvantes para auxiliar a ativação de resposta imunológica pode ser um caminho para melhorar a eficiência destas formulações (Firdaus-Nawi *et al.*, 2012).

1.2 Justificativa

As vacinas têm se mostrado uma alternativa ambientalmente e economicamente viáveis para o controle e prevenção de doenças na piscicultura. No entanto, o principal método de aplicação, via i.p., possui desvantagens, relacionadas a laboriosidade, necessidade de mão de obra qualificada e custos elevados, que dificultam o seu uso no país. Deste modo, surge a necessidade de metodologias que facilitem a aplicação dos imunizantes pelos produtores. Embora imunizantes para a aplicação via oral e via banho de imersão já sejam utilizados em outras espécies de peixes, há poucos produtos voltados para a tilapicultura. Este trabalho se propõe a desenvolver imunizantes para aplicação via oral e via banho de imersão em tilápias-do-Nilo e comparar a resposta imune, o impacto no crescimento e na mortalidade dos animais ao longo do processo de produção.

1.3 Hipótese

As mucosas são estruturas com a presença de grande número de células imunes de diferentes tipos. Estes animais possuem estruturas especializadas nas brânquias, intestinos e na pele que interagem com os microrganismos presentes, tornando-se uma via para estimulação de resposta de proteção a patógenos. Assim, os protocolos de imunização que utilizam via oral e via banho de imersão têm o potencial de estimular o sistema imune e proteger os animais.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- avaliar candidatos vacinais para imunização via oral e via banho de imersão contra infecção por *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae* em Tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*).

2.2 Específicos

- desenvolver candidatos vacinais bivalentes para aplicação via oral e via banho de imersão em tilápias.
- administrar os imunizantes em tilápias criadas em tanques-rede no reservatório de Itaipu, de Foz do Iguaçu/PR.
- comparar a resposta imune humoral gerada pelas vacinas de via oral e via banho de imersão.
- comparar a resposta imune e a capacidade de proteção ao longo do processo de produção; e
- avaliar o impacto dos imunizantes no crescimento dos animais e na conversão alimentar aparente.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Produção dos antígenos e formulação do imunizante

Foram utilizadas linhagens de bactérias isoladas na região e identificadas previamente. A cepa de *S. agalactiae* foi caracterizada como pertencente ao sorotipo III. A produção dos antígenos foi realizada seguindo protocolo desenvolvido e testado sua segurança e eficácia previamente pelo nosso grupo de pesquisa (RIVAS *et al.*, 2023). As bactérias foram cultivadas em meio líquido de extrato de levedura por 12h em estufa a 32°C. O processo de inativação dos microrganismos foi realizado com o uso de formalina a 5%, posteriormente lavados 4X com solução salina (PBS 1X).

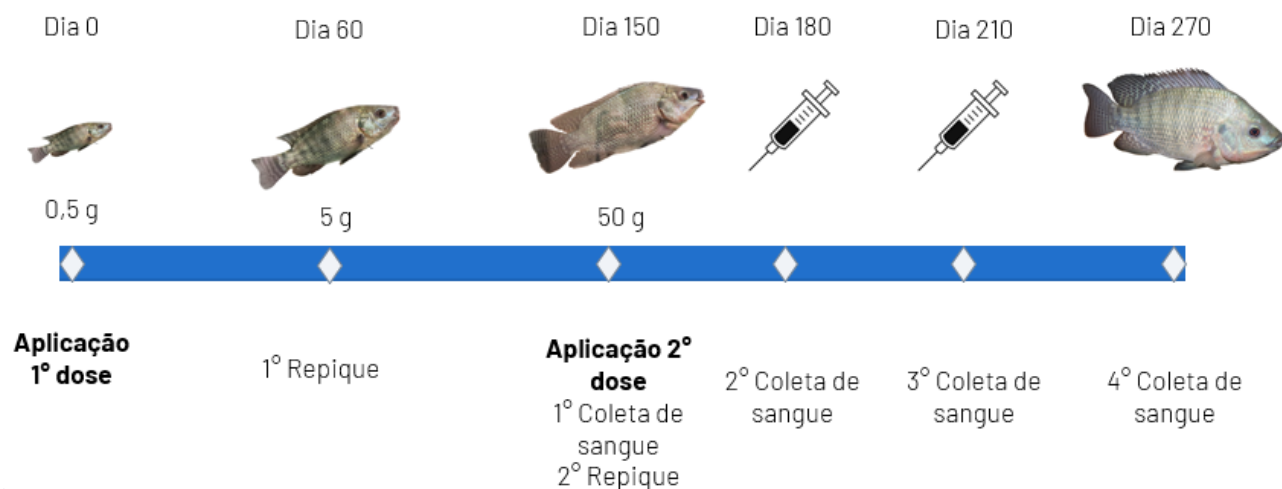
A formulação do imunizante de administração via banho de imersão foi realizada com a diluição do antígeno em PBS 1X. Para o protocolo de vacinação via ração, foi formulado o imunizante a partir de uma emulsão 70/30 do antígeno e óleo de coco. Os antígenos foram diluídos em PBS 1X. A emulsão foi incorporada em uma mistura de milho, farelo de soja e proteína animal e hidratada para a peletização. Os pellets foram secados por 12h a 30°C.

3.2 Protocolo de imunização e delineamento experimental

Este trabalho avaliou dois protocolos de imunização para tilápias, o primeiro com uma dose inicial por banho de imersão + reforço oral via ração (BI+OR) e o segundo oral via ração + reforço oral via ração (OR+OR). O estudo foi realizado no lago de Itaipu na cidade de Foz do Iguaçu. Todos os procedimentos realizados na presente pesquisa foram aprovados pelo CEUA (Comitê de Ética em Pesquisa com Animais) da UNILA, protocolo nº. 2018/01.

Ao longo do estudo foi realizado o acompanhamento da evolução da biomassa dos animais 30 dias, 60 dias e 120 dias após a dose de reforço. As biometrias foram realizadas com a coleta e pesagem de 50 animais por tanque para avaliar a média de massa dos animais. Enquanto para a avaliação dos parâmetros imunológicos foram coletados sangue dos animais 30, 60, 120 dias após a vacinação da dose de reforço (Figura 2).

Figura 2. Delineamento experimental mostrando as aplicações das doses dos imunizantes, os repiques e as coletas de sangue dos animais



Nota explicativa: Inicialmente os animais receberam a primeira dose dos imunizantes com animais com 0,5 g. Os animais foram classificados e repicados com 5g e 50g de acordo com sua biomassa. Foram realizadas coletas de sangue após a segunda dose para avaliação dos resultados da vacinação nos tempos 150 dias, 180 dias, 210 dias e 270 dias.

Fonte: dos autores, 2024.

3.2.1 Dose inicial de imunização por banho de imersão e oral via ração

A primeira dose foi realizada com animais com 0,5 g de massa, os animais foram previamente depurados por 24 h. Os animais do grupo controle não receberam tratamento. A imunização dos animais utilizando a metodologia de banho de imersão foi realizada com os animais distribuídos em pacotes de 6L, cada pacote continha 2000 animais (Figura 3). Os animais foram incubados por 1 h em solução com concentração de antígenos de 1×10^8 células/mL e posteriormente, distribuídos em tanques-redes com 6000 animais cada tanque.

Para a aplicação via oral, os animais receberam o imunizante no alimento na concentração de 1×10^8 células/grama. A quantidade de ração/dia foi calculada em 10% da biomassa por tanque e o imunizante foi distribuído 3 vezes ao longo de um dia. As tilápias estavam distribuídas em tanques-redes com 6000 animais cada tanque. Os animais do grupo controle receberam ração livre de imunizante.

Após 60 dias da aplicação do imunizante, foi realizado o repique dos grupos vacinados e do controle. O protocolo buscou garantir a homogeneidade dos tanques e controlar a densidade. Os animais com massa em torno de 5g foram alocados em tanques de 6 M³ com 2000 peixes cada.

Figura 3. Aplicação do imunizante via banho de imersão



Nota explicativa: Foi realizada a injeção da solução contendo o antígeno em sacos contendo os animais e inflados com oxigênio.

Fonte: dos autores, 2024.

3.2.2 Reforço oral via ração

Ao completar em torno de 50 g, os animais foram repicados e distribuídos em tanques com dimensões de 10 M³. Os tanques receberam cerca de 1000 peixes, sendo 3 tanques vacinados via imersão, 3 tanques via ração e 2 tanques controle. Este processo garantiu que os grupos tivessem animais de massa homogênea. Após sete dias, foi realizada a aplicação da dose de reforço com o uso de imunizante via oral, os animais foram previamente depurados por 24 h e receberam o imunizante impregnado no alimento na concentração de 1×10^8 células/grama (Figura 4). A quantidade de ração dia foi calculada

em 5% da biomassa por tanque e o imunizante foi distribuído 3 vezes ao longo de um dia. Os animais do grupo controle receberam ração livre de imunizante.

Figura 4. A aplicação do imunizante via oral



Nota explicativa: a imunização foi feita com a ração contendo o antígeno em sua formulação. A avaliação em campo da vacina foi realizada no lago de Itaipu em Foz do Iguaçu em parceria com a empresa Alquimia Pescados.

Fonte: dos autores, 2024.

3.3 Diagnóstico molecular das bacterioses

Foram coletados os órgãos (fígado, cérebro e olhos) dos animais sintomáticos para as estreptococoses e/ou septicemia por *Aeromonas* móveis e semeados em agar sangue

e cultivados a 30°C por 24h. Os microrganismos isolados foram primariamente triados por coloração de gram e teste de catalase. As cepas foram preservadas em glicerol 50% e armazenadas em freezer -80°C.

Para a extração do material genômico, as bactérias isoladas foram cultivadas por 12 h em meio extrato de levedura (Kasvi, São José dos Pinhais, Brasil) e submetidas ao protocolo conforme instruções do fabricante (Viogene Biotek, New Taipei City, Taiwan). O material obtido foi armazenado em freezer -80°C.

As análises de *S. agalactiae* foram realizadas em um mix com volume total de 25 µL contendo 1,6 µM de FIP e BIP, 0,2 µM F3 e B3 e 0,4 µM LF e LB, 1X tampão de reação Thermopol (20 mM Tris-HCl pH 8.8, 0,1 M KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄) (Cellco, São Carlos, SP, Brasil), 0,8 M de betaína (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 6 mM MgSO₄, 2 mM dNTPs mix (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 8 U Bst DNA polimerase (Cellco, São Carlos, SP, Brasil) e 100 ng de DNA. As reações foram incubadas em temperatura de 60°C por 60 minutos e posteriormente paradas a 90°C por 2 minutos.

Para *A. hydrophila* o mix da reação teve um volume total de 25 µL contendo 1,6 µM de FIP e BIP, 0,2 µM F3 e B3 e 0,4 µM LF e LB, 1X tampão de reação Thermopol (20 mM Tris-HCl pH 8.8, 0,1 M KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄) (Cellco, São Carlos, SP, Brasil), 1,6 M de betaína (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 6 mM MgSO₄, 2 mM dNTPs mix (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 8 U Bst DNA polimerase (Cellco, São Carlos, SP, Brasil) e 100 ng de DNA. As reações foram incubadas em temperatura de 63°C por 60 minutos e posteriormente parada a 90°C por 2 minutos.

Os primers utilizados específicos para detecção de *A. hydrophila* e *S. agalactiae* são apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Primers utilizados nos ensaios moleculares LAMP para detecção de *A. hydrophila* e *S. agalactiae*

Bactérias	Primers	Referências
<i>A. hydrophila</i>	F3 ATATGATGCGCTTGAGCC	SUEBSING, R. <i>et al.</i> 2013
	B3 ACCACCGTTATTGATGACTG	
	FIP	
	GAGCAGCATTTGCATTAGCAACATATTTTGATGCTGAGACA	
	BIP	
	ACATCCTGAAATTGGAGAAGACTTTTTCTGACGAATATCT	
	TCTGGAAT	
	LF TGCATGGTGCTTATCATGATGT	

LB AGGCGCTCTTAGCTGATGT

F3 CCGAAGGTGTTCCACTTCC

B3 ATAACGGCAATCAGACCTTC

FIP

GCTGCGGAATGTTGTTGGTGTGTTTGGTGTGGAAGTAGCGA

S. agalactiae TG

BIP

ACCTGGTGGGCTTCCGTATTTGCCTTCTTGCTGTAGTCC

LF CCTGATAGGCGTCGTTCC

LB CCGTACTCTGAACTCCTACATG

ZHOU, Q.

et al, 2020

Fonte: dos autores, 2024.

3.4 Título de aglutinação

O método foi realizado conforme Sahoo e colaboradores (2004). O teste foi realizado com o antígeno de ambas as bactérias, *S. agalactiae* e *A. hydrophila*, separadamente. Foram adicionados 20 µL do antígeno da bactéria ($1,0 \times 10^9$ células/mL) e 20 µL dos soros de peixes do grupo controle e do grupo vacinado nas diluições 1:10, 1:100 e 1:1.000. Os soros foram diluídos em solução PBS 1X.

3.5 Ensaio antimicrobiano

O ensaio foi realizado conforme Liu e colaboradores (2017). Ambas as bactérias foram cultivadas em meio líquido a 32 °C por 12 h, lavadas em PBS e diluídas a 1×10^4 CFU/mL. O soro dos animais dos grupos controle e vacinados foram misturados com o mesmo volume (30 µL) de suspensão de bactéria em tubos. Como controle, foi utilizado meio líquido extrato de levedura no lugar do soro dos animais. Os tubos foram incubados à 32 °C por 2 h, após esse período foram plaqueados em ágar sangue e armazenadas em estufa à 32°C. O número de colônias foi avaliado após 24 h e a atividade antibacteriana seguindo a equação:

Atividade antibacteriana (%) = $\frac{\text{número de colônias nas amostras tratado}}{\text{números de colônias nas amostras controle}}$.

3.6 Análise estatística

Os dados gerados no projeto serão tratados e analisados utilizando ferramentas estatísticas. Para verificar a significância estatística entre os grupos vacinados (imersão e ração) e controle, foi utilizado o teste de Qui-quadrado ($p < 0,05$). O cálculo do Risco Relativo (RR) (IC= 95%) foi realizado para avaliar a força de associação entre a exposição à vacina e seu efeito protetor. Para comparar o crescimento dos animais vacinados (imersão e ração) e controle, foi aplicado o teste de t ($p < 0,05$). Para a eficácia vacinal (EV) foi utilizada a fórmula:

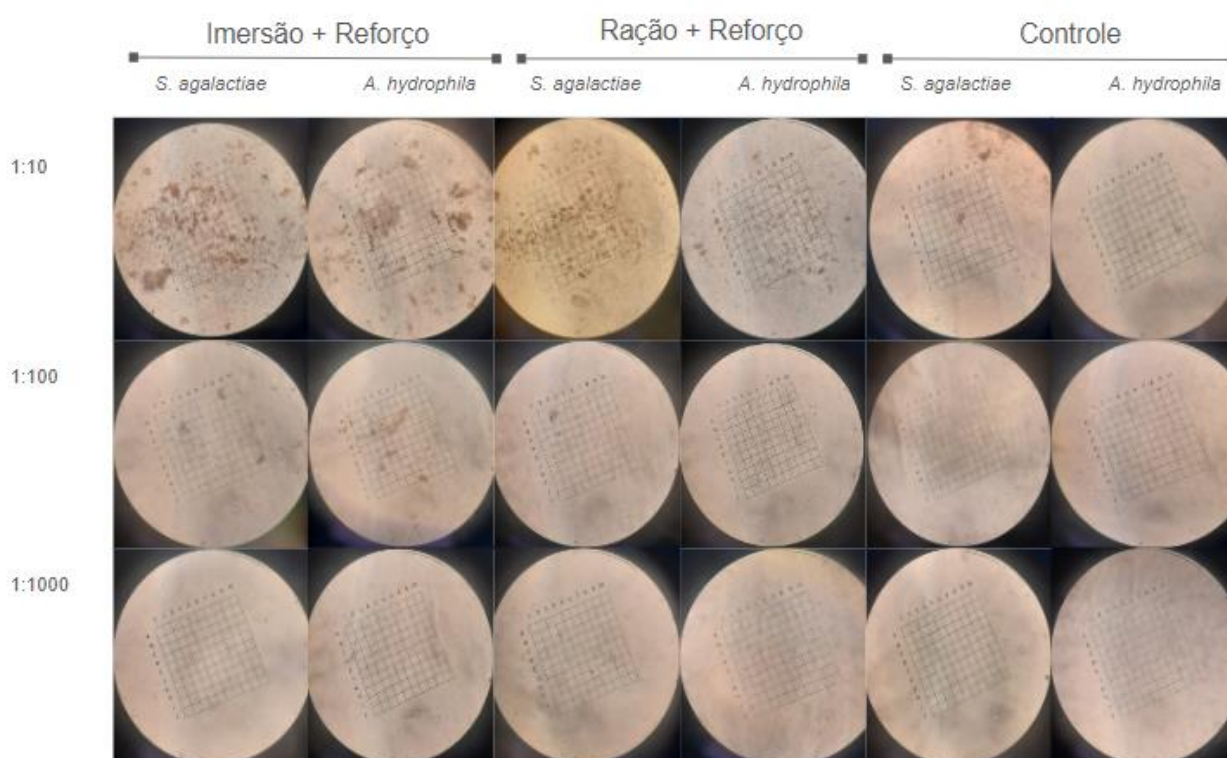
$$EV = (1 - \text{Odds ratio}) \times 100$$

4 RESULTADOS

4.1 Título de aglutinação

O estudo avaliou o título de anticorpos aglutinantes para ambas as bactérias dos grupos controle, imersão + reforço e ração + reforço após 30 dias a dose reforço (Figura 5). O grupo que recebeu a primeira dose via imersão teve maior presença de corpos de aglutinação do que o grupo que recebeu primeira dose via ração e o grupo controle. Em adição, podemos notar que apenas o grupo vacinado via imersão teve aglutinação na diluição 1:100 e nenhum dos grupos teve aglutinação na diluição 1:1000. Deste modo, podemos notar que os protocolos vacinais adotados nos estudos são capazes de gerar anticorpos aglutinantes, mas em baixas quantidades.

Figura 5. Ensaio de imunoaglutinação com soros de animais dos grupos vacinados e controle



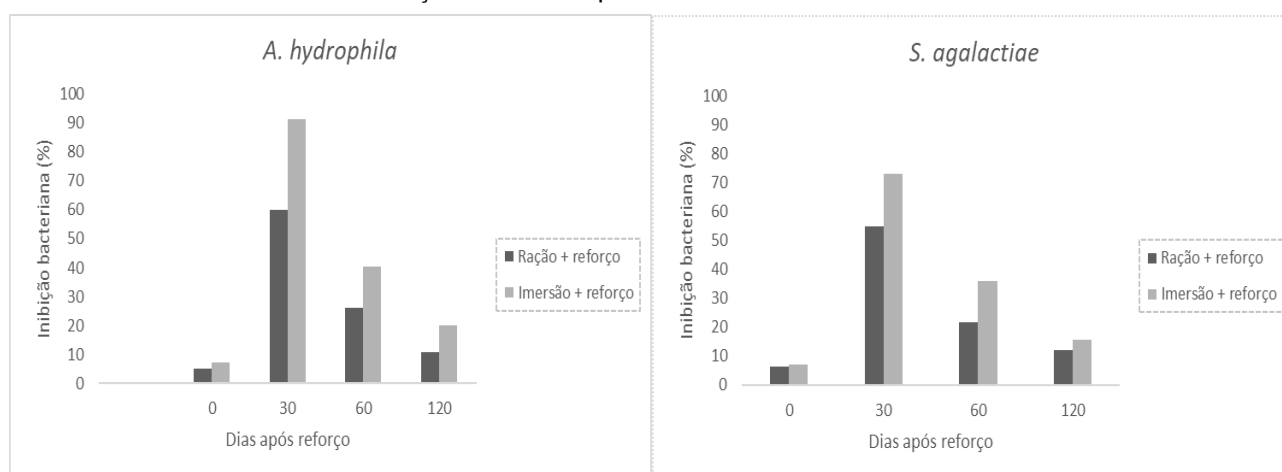
Nota explicativa: os soros incubados com antígenos bacterianos de *S. agalactiae* e *A. hydrophila* mostrando a presença de corpos aglutinados na diluição 1:10. Não houve formação de corpos de aglutinação no grupo controle em nenhuma diluição.

Fonte: dos autores, 2024.

4.2 Ensaio antimicrobiano

Os dados no gráfico 3 revelam a porcentagem de inibição do crescimento em dois grupos (grupo ração e grupo imersão) ao longo de 120 dias. Antes da aplicação da dose reforço (Dia 0), todos os grupos mostraram uma baixa inibição bacteriana. Entretanto, após 30 dias da aplicação da segunda dose do imunizante, os grupos experimentaram uma capacidade de inibição significativa, mostrando o impacto da dose reforço para geração da resposta imune das vacinas testadas. Ao longo dos 120 dias, o grupo vacinado via imersão manteve uma melhor capacidade de inibição bacteriana do que o grupo que recebeu duas doses via oral. Além disso, é possível notar uma tendência de redução da resposta à presença de anticorpos inibidores ao longo do período de observação de 120 dias. Assim, podemos concluir que os protocolos vacinais desenvolvidos neste trabalho são eficientes em ativar uma resposta imunológica de inibição de *A. hydrophila* e *S. agalactiae*, no entanto, reduzem significativamente após 120 dias da aplicação da dose reforço.

Gráfico 3. Avaliação dos anticorpos inibidores de crescimento bacteriano



Nota explicativa: O soro dos animais vacinados coletado antes da dose de reforço e 30 dias, 60 dias, 90 dias e 120 dias após a dose de reforço foi avaliado, a porcentagem de inibição bacteriana foi calculada comparando o crescimento bacteriano dos grupos vacinados com o grupo controle. Os animais vacinados apresentaram maior inibição 30 dias após a vacinação, reduzindo gradativamente a atividade antibacteriana. O grupo imersão + reforço obteve melhores resultados.

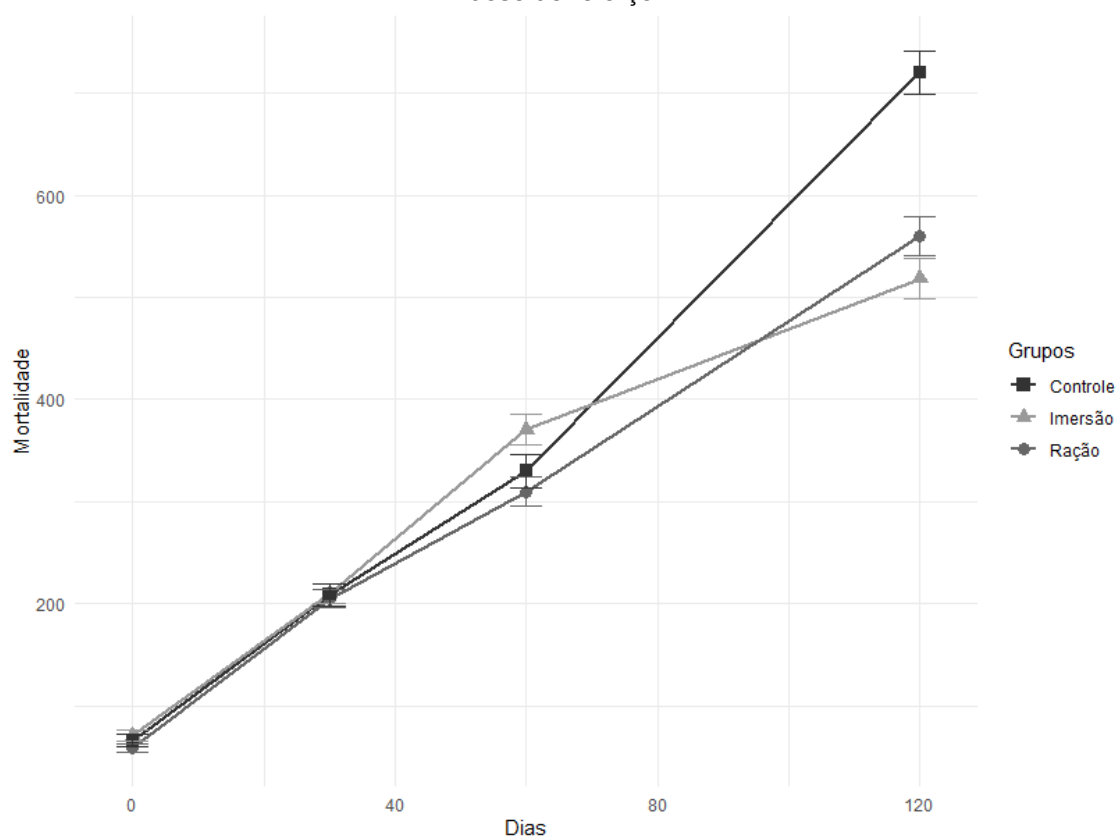
Fonte: dos autores, 2024.

4.3 Mortalidade e biometria

Os animais coletados com sinais clínicos para as estreptococoses e septicemia por *Aeromonas* móveis submetidos ao diagnóstico molecular pela técnica de LAMP se mostraram positivos aos patógenos, sendo possível visualizar casos de coinfeção.

Ao analisar a evolução do peso médio dos animais podemos notar um melhor desempenho do grupo imersão comparado com os demais nos tempos 0, 30 e 60 dias. No entanto, na última biometria podemos visualizar um melhor desempenho dos animais do grupo controle. Com relação ao grupo vacinado via ração, um desempenho melhor é visto apenas na última biometria. Podemos concluir que os tratamentos utilizados não tiveram efeito significativo neste parâmetro. O melhor desempenho dos animais do grupo controle pode ter sido gerado pela redução da densidade nos tanques gerado pela maior mortalidade deste grupo (Gráfico 4).

Gráfico 4. Acompanhamento da evolução das massas dos animais dos grupos vacinados e controle após a dose de reforço



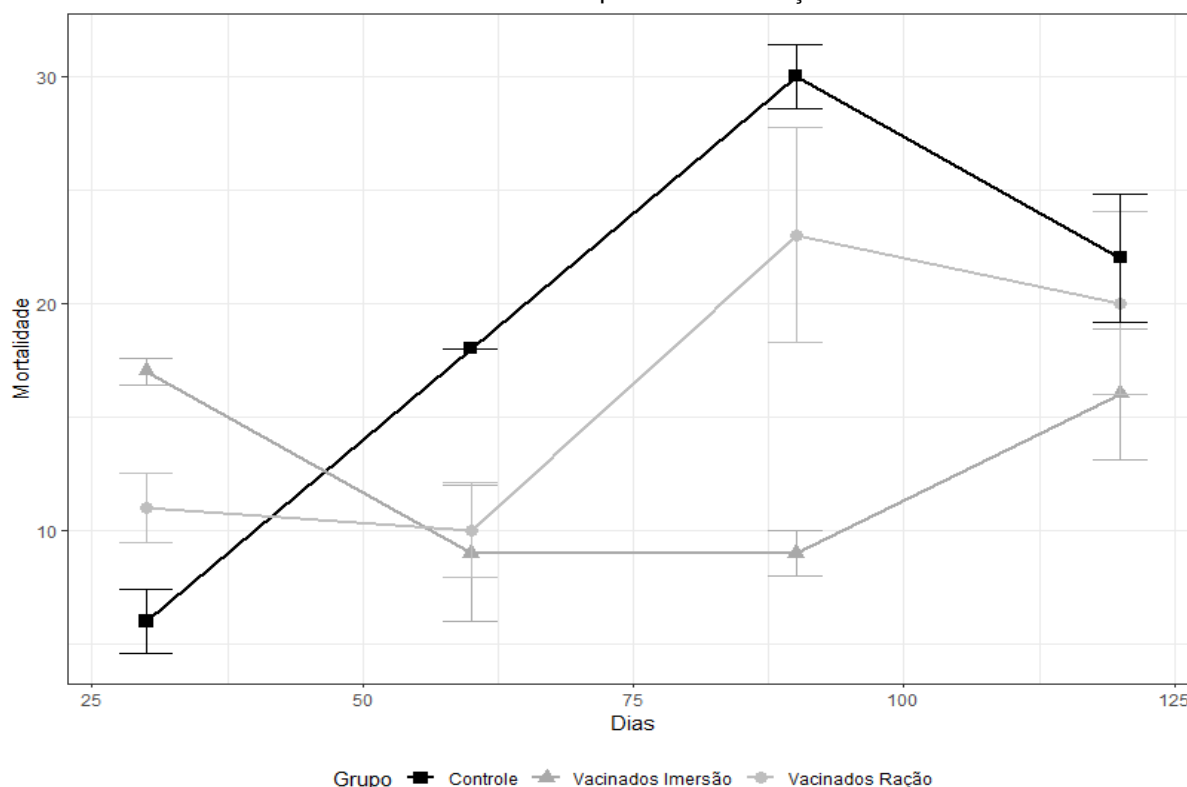
Nota explicativa: o grupo vacinado via imersão teve melhores resultados nos primeiros 60 dias do período avaliado. Enquanto o grupo controle ganhou mais biomassa no período final do estudo superando os grupos vacinados.

Fonte: dos autores, 2024.

Acerca da mortalidade (Gráfico 5), os grupos vacinados e o controle apresentaram resultados similares nos 30 primeiros dias, após esse período houve um aumento da mortalidade no controle e no grupo ração + reforço. Os resultados mostram que o grupo imersão + reforço apresentou taxas mais baixas em comparação com os outros grupos nos intervalos de 60, 90 e 120 dias. Além disso, quando comparamos a mortalidade dos

tratamentos com o controle, ambos os grupos vacinados ração + reforço ($p=0,0005$) e imersão + reforço ($p=0,0001$) apresentaram diferença estatística significativa (Tabela 2), indicando uma que os protocolos foram capazes de reduzir a mortalidade dos animais. No entanto, a comparação entre os tratamentos de ração + reforço e imersão + reforço não mostra diferença estatística significativa (0,2209). Pode-se notar também que no tempo 120 dias da dose de reforço a taxa de mortalidade dos grupos vacinados e controle mostram similares, corroborando os dados imunológicos, isto pode significar que os protocolos de vacinação avaliados tendem a perder eficácia após esse período.

Gráfico 5. Comparação da taxa de mortalidade dos grupos vacinados e do grupo controle 30 dias, 60 dias, 90 dias e 120 dias após a dose reforço



Nota explicativa: os grupos vacinados via oral e via imersão tiveram menor taxa de mortalidade comparada com o grupo controle. O grupo controle teve crescimento na taxa de mortalidade nos primeiros 90 dias após a dose de reforço, enquanto o grupo vacinado via imersão teve uma redução da mortalidade neste período. No entanto, nos últimos 30 dias de monitoramento a taxa de mortalidade dos grupos foi similar.

Fonte: dos autores, 2024.

Acerca da eficácia dos protocolos de vacinação via imersão + reforço (BI+OR) e via ração + reforço (OR+OR) desenvolvidos neste trabalho, tivemos resultado de 55,99% e 44,23%, respectivamente, mostrando que estas metodologias são eficazes no controle das bacterioses geradas por *A. hydrophila* e *S. agalactiae*. Os dados de mortalidade da tabela 2 evidenciam os indicadores de eficácia dos imunizantes.

Tabela 2. Mortalidade e eficácia dos imunizantes via imersão + reforço e ração + reforço desenvolvidos contra *A. hydrophila* e *S. agalactiae*.

Tratamento	Mortes/Total	Risco relativo	EV (%)
BI+OR	51/3000 (1,7%)	0,45	55,99%
OR+OR	64/3000 (2,1%)	0.56	44,23%
Controle	76/2000 (3,8%)	-	-

Fonte: dos autores, 2024.

5 DISCUSSÃO

O segmento da aquicultura brasileira tem visto um crescente aumento de sua produtividade nos últimos anos, se destacando entre os principais produtores mundiais de tilápias. Somado a esse cenário, temos os desafios gerados pelas mudanças climáticas que tendem a acelerar o surgimento de patógenos emergentes, impondo riscos à produção piscícola. Para ampliar a atividade, são necessárias políticas para melhoramento na gestão e a introdução de inovações tecnológicas, visando alcançar um desenvolvimento sustentável em toda cadeia produtiva.

Atualmente a principal forma de imunização de peixes tem sido a injeção intraperitoneal de antígenos inativados (Du *et al.*, 2022). No entanto, tal via tende a ser mais laboriosa e exige alto custo para aplicação, o que dificulta o acesso dos pequenos e médios produtores a esta tecnologia. A aplicação de vacinação em organismos aquáticos pode ser cara, especialmente ao considerar a necessidade de equipamentos e instalações especializadas. Além disso, a logística de vacinar peixes em ambientes de água aberta pode ser complexa e demorada, tornando difícil garantir que todos os indivíduos recebam imunização adequada. Deste modo, o desenvolvimento de metodologias acessíveis, seguras e eficientes para a prevenção e combate a infecções é essencial para a atividade.

As formas de imunização via mucosa apresentam resultados significativos na geração de imunidade e redução da mortalidade. Schulz e colaboradores (2020) compararam a imunização contra *A. salmonicida* utilizando antígenos inativados via oral, via imersão e via injeção, e concluíram que as três formulações podem ser eficazes em reduzir a mortalidade. Apesar da menor eficiência das vacinas por via mucosa comparada à via i.p., estas são interessantes para estratégias de aplicação em animais adultos. Além disso, o uso de formas menos laboriosas e estressantes aos animais podem aumentar a lucratividade na piscicultura devido ao seu baixo custo.

Nesse contexto, a presente pesquisa propõe a integração das vias de banho de imersão e oral para otimizar a prevenção de doenças em peixes, buscando também reduzir os custos associados à imunização. Neste trabalho, desenvolvemos duas estratégias para a vacinação de tilápias contra *A. hydrophila* e *S. agalactiae*. A primeira com uma dose inicial por banho de imersão + reforço oral via ração (BI+OR) e a segunda oral via ração + reforço oral via ração (OR+OR). A avaliação dos imunizantes foi conduzida em condições de campo sem a infecção experimental dos animais, utilizando um cenário de produção com infecção natural. Com o apoio da técnica molecular de LAMP foi possível detectar a presença dos

patógenos ao longo do período avaliado. Ambos os protocolos se mostram seguros para os animais e foram capazes de gerar resposta imunológica contra os patógenos presentes na formulação e reduzir a mortalidade dos animais tratados. Os imunizantes aplicados BI+OR e OR+OR obtiveram uma eficácia de 55,99% e 44,23%, respectivamente. No entanto, os imunizantes não foram eficientes em melhorar o ganho de biomassa dos animais. Estes resultados se diferem da imunização via i.p. para *A. hydrophila* e *S. agalactiae*, a qual mostrou um ganho de biomassa de 22% no grupo vacinado em relação ao controle (Rivas *et al.*, 2023).

Estudo com uso de antígenos de *S. iniae* e *A. hydrophila* incorporados na ração conseguiu ativar resposta celular e humoral e aumentar a sobrevivência em peixes vacinados, deste modo, demonstra que vacinas baseadas em ração podem ser uma técnica promissora para a imunização eficaz e em larga escala de peixes na indústria da aquicultura (Monir *et al.* 2020). Resultados similares na redução da mortalidade foram encontrados por Ali e colaboradores (2023) utilizando antígenos inativados de *S. agalactiae* e *A. hydrophila* incorporados no pellet de ração, RPS 80% e 90% respectivamente. Estes trabalhos também evidenciam a estimulação do sistema imune no trato digestivo, mucosas da pele e no sangue da tilápia. A administração desses antígenos de patógenos específicos via ração desencadeiou resposta imune celular e humoral, resultando em aumentos significativos na sobrevivência dos peixes vacinados.

As vias de imunogenicidade em vacinas orais ainda são pouco conhecidas. Estudos mostram que existe a formação local e sistêmica de resposta aos antígenos apresentados no sistema digestivo. No entanto, estes imunizantes têm como desafio a passagem pelas condições ácidas do trato digestivo, o qual leva a degradação dos antígenos. A compartimentalização da resposta imune em peixes tem sido discutida, anticorpos específicos foram detectáveis em títulos mais elevados no extrato intestinal de peixes imunizados por via oral do que nos soros, enquanto na imunização parenteral resultou em títulos de anticorpos elevados e persistentes no soro, mas não nas secreções intestinais e cutâneas (Mutoloki; Munang'andu; Evensen, 2015).

Quando olhamos a resposta imune gerada pelas metodologias desenvolvidas neste trabalho, vemos que estas estimularam a produção de anticorpos no soro dos animais contra os antígenos presentes nas vacinas. A produção teve o seu pico em 30 dias após a segunda dose, mas não foram persistem ao longo do período avaliado. A vacinação aplicada via oral explora a forte presença do sistema imune no trato digestivo. Ismail e colaboradores (2017) avaliaram o uso de dose única e duas doses de vacinas com os

antígenos incorporados na ração, no entanto, apenas o imunizante de duas doses gerou resposta humoral por até 16 semanas e ambos aumentaram a taxa de sobrevivência dos animais, RPS igual a 65,3 % e 75,1%, respectivamente.

Sobre a resposta imune, as formas vacinais avaliadas neste trabalho foram capazes de gerar resposta imune humoral aglutinante e neutralizante contra *S. agalactiae* e *A. hydrophila*. A vacinação via imersão se mostrou melhor na indução de resposta imune e no aumento da sobrevivência em comparação a via oral. No entanto, a presença de anticorpos reduziu significativamente após um mês da dose de reforço, similar ao relatado em outros trabalhos. Tu e colaboradores (2010) analisaram antígenos bactérias inativadas em imunizantes via oral e mostraram um decréscimo no título de anticorpos após 5 semanas da imunização. O uso do imunizante via banho de imersão em duas doses ou em combinação com outras vias de imunização parece ser eficaz em ampliar o tempo de proteção do imunizante (Chettri *et al.*, 2013).

As abordagens da incorporação de antígenos na ração e aplicação de imunizante via banho demonstram ser capaz de estimular o sistema imunológico em várias áreas, incluindo o trato digestivo, mucosas da pele e circulação sanguínea dos peixes, gerando respostas duradouras em alguns casos. Contudo, as pesquisas também ressaltam a importância da dosagem e do esquema de vacinação, como evidenciado pela necessidade de múltiplas doses para alcançar uma resposta imune mais prolongada e efetiva em alguns estudos (Munang'andu; Evensen, 2018).

A imunização via banho de imersão é interessante para uso em animais em estágio de alevino, possibilitando a aplicação em massa. O uso de formulação polivalente via BI demonstrou fornecer proteção significativa, RPS 84%, contra uma cepa heteróloga de *F. psychrophilum* quando administrada a alevinos de truta arco-íris ($4,7 \pm 1,0$ g) por imersão (Hoare *et al.*, 2017). Skov e colaboradores (2018) também mostraram que a imunização por imersão em animais de menos de 10g com antígenos inativados pode gerar uma taxa de sobrevivência de 100% em animais desafiados experimentalmente. No entanto, resultados menos promissores foram observados ao comparar o uso de uma dose de vacinação com antígenos inativados via injeção intraperitoneal (i.p.) e via banho de imersão (BI) contra *S. agalactiae*, obtendo resultados inferiores com o imunizante por imersão (Evans *et al.*, 2004).

A ampliação das tecnologias utilizadas na imunização de peixes traz um cenário promissor para a aquicultura (Munang'andu; Paul; Evensen, 2016; Du *et al.*, 2022). Apesar disso, poucos são os artigos que avaliam as formulações desenvolvidas em teste de campo

submetendo a condições reais de produção, se limitando aos testes laboratoriais. Rivas e colaboradores (2023) mostram diferentes resultados de um imunizante bivalente para *S. agalactiae* e *A. hydrophila* avaliado em laboratório e em campo, onde utilizando isolados regionais, houve na fase em campo uma redução da eficácia vista na fase laboratorial.

Além disso, as variações genéticas dentro da mesma espécie de bactérias e a presença de diferentes sorotipos de *S. agalactiae* no ambiente de produção também têm devem ser destacados na eficácia dos imunizantes. Assim, o uso de cepas locais e a produção de formulações contendo dois ou mais sorotipos de *S. agalactiae* tendem a ter resultados melhores na fase de campo (Kannika *et al.*, 2022).

Apesar dos avanços na compreensão da resposta imune dos peixes teleósteos, a diversidade nas respostas imunológicas interespecies constitui um desafio substancial na concepção de vacinas eficazes para a imunização de populações de peixes. A variação no sistema imunológico entre as diferentes espécies de peixes, consequentemente, uma vacina que demonstra eficácia em uma determinada espécie pode não induzir uma proteção similar em outra, devido a estas disparidades (Munang'andu; Evensen, 2018). Deste modo, compreender a função e a especificidade da resposta imune em tilápias é fundamental para o desenvolvimento de estratégias de manejo da saúde desses peixes, incluindo a criação de vacinas específicas para proteger contra patógenos e doenças.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A proposta de integrar as vias de banho de imersão e oral para otimizar a prevenção de doenças em peixes se mostra uma estratégia inovadora e promissora. É fundamental continuar a pesquisa nesse campo, considerando a diversidade de patógenos, características específicas das espécies e o desenvolvimento de novas formulações e adjuvantes para maximizar os benefícios e superar as limitações dessas estratégias de vacinação. Apesar de alguns trabalhos indicarem variações nos resultados, a combinação dessas abordagens pode representar um avanço significativo na busca por métodos eficientes e economicamente viáveis de imunização em larga escala na aquicultura. Nossos resultados obtidos corroboram a viabilidade destas metodologias como técnicas promissoras para a imunização em larga escala de peixes na aquicultura, representando um avanço significativo na busca por métodos mais acessíveis, eficazes e práticos para proteger a saúde e a produção desses animais.

7 REFERÊNCIAS

AL-HARBI, Ahmed H.. *First isolation of Streptococcus spp. from hybrid tilapia (Oreochromis niloticus × O. aureus) in Saudi Arabia*. **Aquaculture**, v. 128, n. 3-4, p. 195-201, 1994. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)90308-5](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)90308-5)>.

ALI, S.; AKHTER, S.; MUHAMMAD, A.; KHAN, I.; KHAN, W. A.; IQBAL, M. N.; ALI, Q.. *Identification, characterization and antibiotic sensitivity of Aeromonas hydrophila, a causative agent of epizootic ulcerative syndrome in wild and farmed fish from Potohar, Pakistan*. **Pakistan J. Zool**, v. 48, n. 03, p. 899-901, 2016. Disponível em: <[https://www.zsp.com.pk/pdf48/899-901%20\(39\)%20PJZ-2220-15%2024-11-15%20PROOFREAD%20CORRECTED.pdf](https://www.zsp.com.pk/pdf48/899-901%20(39)%20PJZ-2220-15%2024-11-15%20PROOFREAD%20CORRECTED.pdf)>.

ALI, N. S.; SAAD, M. Z.; AZMAI, M. N. A.; SALLEH, A.; ZULPERI, Z. M.; MANCHANAYAKE, T.; ZAHALUDIN, M. A. D.; BASRI, L.; MOHAMAD, A.; MD YASIN, I. S.. *Immunogenicity and efficacy of a feed-based bivalent vaccine against Streptococcosis and motile Aeromonad septicemia in red hybrid tilapia (Oreochromis spp.)*. **Animals**, v. 13, p. 1346, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ani13081346>>.

ALYAHYA, S. A.; AMEEN, F.; AL-NIAEEM, K. S.; AL-SA'ADI, B. A.; HADI, S.; MOSTAFA, A. A.. *Histopathological studies of experimental Aeromonas hydrophila infection in blue tilapia, Oreochromis aureus*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 25, n. 01, p. 182-185, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.10.019>>.

AMAL, M. N. A.; ZAMRI-SAAD, M.. *Streptococcosis in tilapia (Oreochromis niloticus): a review*. **Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science**, v. 34, n. 02, p. 195-206, 2011. Disponível em: <<https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.1067.7701&rep=rep1&type=pdf>>.

AMIN, N. E. D.; ABDALLAH, I. S.; ELALLAWY, T.; AHMED, S. M.. *Motile Aeromonas septicemia among Tilapia nilotica (Sarotherodon niloticus) in Upper Egypt*. **Fish Pathol.**, v. 20, p. 93-97, 1985. Disponível em: <<https://doi.org/10.3147/jsfp.20.93>>.

ASSIS, G. B.; TAVARES, G. C.; PEREIRA, F. L.; FIGUEIREDO, H. C.; LEAL, C. A.. *Natural coinfection by Streptococcus agalactiae and Francisella noatunensis subsp. orientalis in farmed Nile tilapia (Oreochromis niloticus L.)*. **Journal of Fish Diseases**, v. 40, n. 01, p. 51-63, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/jfd.12493>>.

BALLESTEROS, N. A.; CASTRO, R.; ABOS, B.; RODRÍGUEZ SAINT-JEAN, S. S.; PÉREZ-PRIETO, S. I.; TAFALLA, C.. *The pyloric caeca area is a major site for IgM(+) and IgT(+) B cell recruitment in response to oral vaccination in rainbow trout*. **PloS one**, v. 08, n. 06, p. e66118, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066118>>.

BILAL, S., ETAYO, A., HORDVIK, I.. *Immunoglobulins in teleosts*. **Immunogenetics**, v. 73, p. 65-77, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00251-020-01195-1>>.

BØGWALD, J.; DALMO, R. A.. *Review on immersion vaccines for fish: an update 2019*. **Microorganisms**, v. 07, n. 12, p. 627, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/microorganisms7120627>>.

BONDAD-REANTASO, M. G.; SUBASINGHE, R. P.; ARTHUR, J. R.; OGAWA, K.; CHINABUT, S.; ADLARD, R.; TAN, Z.; SHARIFF, M.. *Disease and health management in Asian aquaculture*. **Veterinary parasitology**, v. 132, n. 03-04, p. 249-272, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.07.005>>.

BOSHRA, H.; GELMAN, A. E.; SUNYER, J.. *Structural and functional characterization of complement C4 and C1s-like molecules in teleost fish: insights into the evolution of classical and alternative pathways*. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 01, p. 349-359, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.1.349>>.

BOUDINOT, P.; BOUBEKEUR, S.; BENMANSOUR, A.. *Primary structure and complementarity-determining region (CDR) 3 spectratyping of rainbow trout TCR β transcripts identify ten V β families with V β 6 displaying unusual CDR2 and differently spliced forms*. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 11, p. 6244-6252, 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.11.6244>>.

BOWDEN T. J.. *Modulation of the immune system of fish by their environment. **Fish Shellfish Immunol.***, v. 25, n. 04, p. 373-383, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.03.017>>.

CHEN, K., XU, W. *et al.*. *Immunoglobulin D enhances immune surveillance by activating antimicrobial, proinflammatory and B cell-stimulating programs in basophils. **Nature immunology***, v. 10, n. 08, p. 889-898, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/ni.1748>>.

CHETTRI, J. K.; DESHMUKH, S.; HOLTEN-ANDERSEN, L.; JAFAR, R. M.; DALSGAARD, I.; BUCHMANN, K.. *Comparative evaluation of administration methods for a vaccine protecting rainbow trout against Yersinia ruckeri O1 biotype 2 infections. **Veterinary immunology and immunopathology***, v. 154, n. 01-02, p. 42-47, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2013.04.001>>.

CHOTHIA, C. *et al.*. *Structural repertoire of the human VH segments. **Journal of Molecular Biology***, v. 227, n. 03, p. 799-817, 1992. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0022-2836\(92\)90224-8](https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)90224-8)>.

CONRATH, K. E.; WERNERY, U.; MUYLDERMANS, S.; NGUYEN, V. K.. *Emergence and evolution of functional heavy-chain antibodies in Camelidae. **Developmental & Comparative Immunology***, v. 27, n. 02, p. 87-103, 2003. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(02\)00071-X](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(02)00071-X)>.

DANILOVA, N., BUSSMANN, J., JEKOSCH, K., STEINER, L. A.. *The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin Z. **Nature Immunology***, v. 06, n. 03, p. 295-302, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/ni1166>>.

DELPHINO, M K *et al.*. *Seasonal dynamics of bacterial pathogens of Nile tilapia farmed in a Brazilian reservoir. **Aquaculture***, v. 498, p. 100-108, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.023>>.

DÍAZ-ROSALES, P. et al.. *Rainbow trout interleukin 2: cloning, expression and bioactivity analysis*. ***Fish & Shellfish Immunology***, v. 27, n. 03, p. 414-422, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.06.008>>.

DIXON, B.; STET, R.. *The relationship between major histocompatibility receptors and innate immunity in teleost fish*. ***Developmental & Comparative Immunology***, v. 25, n. 08-09, p. 683-699, 2001. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(01\)00030-1](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(01)00030-1)>.

DU, Y.; HU, X.; MIAO, L.; CHEN, J.. *Current status and development prospects of aquatic vaccines*. ***Frontiers in immunology***, v. 13, p. 1040336, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1040336>>.

DUFF, D. C. B.. *The oral immunization of trout against *Bacterium salmonicida**. ***The Journal of Immunology***, v. 44, n. 01, p. 87-94, 1942. Disponível em: <<https://doi.org/10.4049/jimmunol.44.1.87>>.

DUNZ, A. R.; SCHLIEWEN, U. K.. *Molecular phylogeny and revised classification of the haplotilapiine cichlid fishes formerly referred to as “Tilapia”*. ***Molecular Phylogenetics and Evolution***, v. 68, n. 01, p. 64-80, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2013.03.015>>.

ERFANMANESH, A.; BEIKZADEH, B.; MOHSENI, F. A.; NIKAEIN, D.; MOHAJERFAR, T.. *Ulcerative dermatitis in barramundi due to coinfection with *Streptococcus iniae* and *Shewanella algae**. ***Diseases of Aquatic Organisms***, v. 134, n. 02, p. 89-97, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.3354/dao03363>>.

EVANS J. J.; KLESIOUS P. H.; SHOEMAKER C. A.. *Efficacy of *Streptococcus agalactiae* (group B) vaccine in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by intraperitoneal and bath immersion administration*. ***Vaccine***, v. 22, p. 3769-3773, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.03.012>>.

FAO. ***The state of world fisheries and aquaculture 2022: towards blue transformation***. Rome: FAO, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.4060/cc0461en>>.

FIRDAUS-NAWI, M.; YUSOFF, S. M.; YUSOF, H.; ABDULLAH, S. Z.; ZAMRI-SAAD, M.. *Efficacy of feed-based adjuvant vaccine against Streptococcus agalactiae in Oreochromis spp. in Malaysia. Aquaculture Research*, v. 45, n. 01, p. 87-96, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2012.03207.x>>.

GILLESPIE, B. E.; OLIVER, S. P.. *Simultaneous detection of mastitis pathogens, Staphylococcus aureus, Streptococcus uberis, and Streptococcus agalactiae by multiplex real-time polymerase chain reaction. Journal of Dairy Science*, v. 88, n. 10, p. 3510-3518, 2005. Disponível em: <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)73036-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)73036-8)>.

HOARE, R.; NGO, T. P. H.; BARTIE, K. L.; ADAMS, A.. *Efficacy of a polyvalent immersion vaccine against Flavobacterium psychrophilum and evaluation of immune response to vaccination in rainbow trout fry (Oncorhynchus mykiss L.). Veterinary Research*, v. 48, n. 01, p. 01-13, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13567-017-0448-z>>.

HUDDLESTON, J. R.. *Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: potential spread of antibiotic resistance genes. Infection and Drug Resistance*, v. 07, p. 167, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.2147/idr.s48820>>.

HONG, S.; LI R.; XU, Q.; SECOMBES, C. J.; WANG, T.. *Two types of TNF- α exist in teleost fish: phylogeny, expression, and bioactivity analysis of type-II TNF- α 3 in rainbow trout Oncorhynchus mykiss. J Immunol.*, v. 191, n. 12, p. 5959-5972, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301584>>.

ISMAIL, M. S. et al.. *The effect of feed-based vaccination on tilapia farm endemic for streptococcosis. Fish & Shellfish Immunology*, v. 60, p. 21-24, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.11.040>>.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L.. *Evolution concepts regarding the genus Aeromonas: an expanding panorama of species, disease presentation, and unanswered questions. Clin. Inf. Dis.*, v. 27, p. 332-344, 1998.

JHINGRAN, A. G.; DAS, M. K.. *Epizootic ulcerative syndrome in fishes*. **Bulletin of the Central Inland Capture Fisheries Research Institute**, n. 65, p. 01-14, 1990. Disponível em: <<http://cifri.ernet.in/Bulletins/Bulletin%20No.65.pdf>>.

KANNIKA, K. et al.. *Trial evaluation of protection and immunogenicity of piscine bivalent Streptococcal vaccine: from the lab to the farms*. **Vaccines**, v. 10, n. 10, p. 1625, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/vaccines10101625>>.

KONG, W. G. et al.. *Pharyngeal immunity in early vertebrates provides functional and evolutionary insight into mucosal homeostasis*. **Journal of immunology** (Baltimore, Md.: 1950), v. 203, n. 11, p. 3054-3067, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900863>>.

KUBITZA, F.. A evolução da tilapicultura no Brasil: produção e mercado. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 76, mar./abr. 2003. Disponível em: <<https://panoramadaaquicultura.com.br/a-evolucao-da-tilapicultura-no-brasil/#:~:text=Produ%C3%A7%C3%A3o%20e%20mercado&text=Cerca%20de%201.265.000%20toneladas,de%20peixe%20produzidas%20no%20cultivo>>.

LIU, X. et al.. *Flagellin enhances the immunoprotection of formalin inactivated Edwardsiella tarda vaccine in turbot*. **Vaccine**, v. 35, n. 02, p. 369-374, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.11.031>>.

MA, J.; BRUCE, T. J.; JONES, E. M.; CAIN, K. D.. *A review of fish vaccine development strategies: conventional methods and modern biotechnological approaches*. **Microorganisms**, v. 07, n. 11, p. 569, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/microorganisms7110569>>.

MASHOOF S.; CRISCITIELLO M. F.. *Fish immunoglobulins*. **Biology**, v. 05, n. 45, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/biology5040045>>.

MIRANDA, C. D.; TELLO, A.; KEEN, P. L.. *Mechanisms of antimicrobial resistance in finfish aquaculture environments*. **Frontiers in Microbiology**, v. 04, p. 233, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00233>>.

MITRA, S.; ALNABULSI, A.; SECOMBES, C. J.; BIRD, S.. *Identification and characterization of the transcription factors involved in t-cell development, t-bet, stat6 and foxp3, within the zebrafish, danio rerio*. **The FEBS journal**, v. 277, n. 01, p. 128-147, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07460.x>>.

MIYAZAKI, T.; JO, Y.. *A histopathological study on motile aeromonad disease in ayu*. **Fish Pathol.**, v. 20, p. 55-59 (1985).

MONDAL, H.; THOMAS, J.. *A review on the recent advances and application of vaccines against fish pathogens in aquaculture*. **Aquaculture international: Journal of the European Aquaculture Society**, v. 30, n. 04, p. 1971-2000, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10499-022-00884-w>>.

MONIR, M. S.; et al.. *Haemato-immunological responses and effectiveness of feed-based bivalent vaccine against Streptococcus iniae and Aeromonas hydrophila infections in hybrid red tilapia (Oreochromis mossambicus × O. niloticus)*. **BMC veterinary research**, v. 16, n. 01, p. 226, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12917-020-02443-y>>.

MUGIMBA, K. K.; BYARUGABA, D. K.; MUTOLOKI, S.; EVENSEN, Ø.; MUNANG'ANDU, H. M.. *Challenges and solutions to viral diseases of finfish in marine aquaculture*. **Pathogens** (Basel, Switzerland), v. 10, n. 06, p. 673, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/pathogens10060673>>.

MULDER, I. E.; WADSWORTH, S.; SECOMBES, C. J.. *Cytokine expression in the intestine of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) during infection with Aeromonas salmonicida*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 23, n. 04, p. 747-759, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.02.002>>.

MUNANG'ANDU, H. M.; MUTOLOKI, S.; EVENSEN, Ø.. *A review of the immunological mechanisms following mucosal vaccination of finfish*. **Frontiers in Immunology**, v. 06, p. 427, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00427>>.

MUNANG'ANDU, H.; PAUL, J.; EVENSEN, Ø.. *An overview of vaccination strategies and antigen delivery systems for Streptococcus agalactiae vaccines in Nile tilapia (Oreochromis niloticus)*. **Vaccines**, v. 04, n. 04, p. 48, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/vaccines4040048>>.

MUNANG'ANDU, H. M.; EVENSEN, Ø.. *Correlates of protective immunity for fish vaccines*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 85, p. 132-140, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.03.060>>.

MUTOLOKI, S.; MUNANG'ANDU, H. M.; EVENSEN, Ø.. *Oral vaccination of fish - antigen preparations, uptake, and immune induction*. **Frontiers in Immunology**, v. 6, p. 519, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00519>>.

NAWI, M. F.; MOHD YUSOFF, S.; YUSOF, H.; ABDULLAH, S. Z.; SAAD, M. Z.. *Efficacy of feed-based adjuvant vaccine against Streptococcus agalactiae in Oreochromis spp. in Malaysia*. **Aquacult. Res.**, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2012.03207.x>>.

OKON, E. M.; OKOCHA, R. C.; TAIWO, A. B.; MICHAEL, F. B.; BOLANLE, A. M.. *Dynamics of co-infection in fish: a review of pathogen-host interaction and clinical outcome*. **Fish and Shellfish Immunology Reports**, v. 4, n. 100096, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fsirep.2023.100096>>.

OSMAN, K. M. et al.. *Characterization and susceptibility of streptococci and enterococci isolated from Nile tilapia (Oreochromis niloticus) showing septicemia in aquaculture and wild sites in Egypt*. **BMC veterinary research**, v. 13, n. 01, p. 357, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12917-017-1289-8>>.

PADRÓS, F.; CAGGIANO, M.; TOFFAN, A.; CONSTENLA, M.; ZARZA, C.; CIULLI, S.. *Integrated management strategies for Viral Nervous Necrosis (VNN) disease control in marine fish farming in the Mediterranean*. **Pathogens**, v. 11, n. 03, p. 330, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/pathogens11030330>>.

PARTULA, S.; DE GUERRA, A.; FELLAH, J. S.; CHARLEMAGNE, J.. *Structure and diversity of the T cell antigen receptor beta-chain in a teleost fish*. **Journal of immunology** (Baltimore, Md.: 1950), v. 155, n. 02, p. 699-706, 1995. Disponível em: <<https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.11.6244>>.

PEAUDECERF, L.; ROCHA, B.. *Role of the gut as a primary lymphoid organ*. **Immunology Letters**, v. 140, n. 01-02, p. 01-06, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.imlet.2011.05.009>>.

PEIXEBR. **Anuário brasileiro da piscicultura**: PEIXE BR 2024. São Paulo: Associação Brasileira da Piscicultura, 2024. Disponível em: <<https://www.peixebr.com.br/anuario2024>>.

PRETTO-GIORDANO, L. G. et al.. *Efficacy of an experimentally inactivated Streptococcus agalactiae vaccine in Nile tilapia (Oreochromis niloticus) reared in Brazil*. **Aquaculture Research**, v. 41, n. 10, p. 1539-1544, 2010b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02449.x>>.

PRIYA, T. A.; KAPPALLI, S.. *Modern biotechnological strategies for vaccine development in aquaculture - prospects and challenges*. **Vaccine**, v. 40, n. 41, p. 5873–5881, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2022.08.075>>.

RIGOS, G.; TROISI, G. M.. *Antibacterial agents in Mediterranean finfish farming: a synopsis of drug pharmacokinetics in important euryhaline fish species and possible environmental implications*. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 15, n. 01, p. 53-73, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11160-005-7850-8>>.

RIVAS, A. V. et al.. *Bivalent vaccine against Streptococcus agalactiae and Aeromonas hydrophila in Nile tilapia (Oreochromis niloticus): a laboratory-phase and large-scale study*. **Animals**, v. 13, n. 21, p. 3338, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ani13213338>>.

ROMBOUT, J. H.; HUTTENHUIS, H.; PICCHIETTI, S.; SCAPIGLIATI, G.. *Phylogeny and ontogeny of fish leucocytes*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 19, n. 05, p. 441-455, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.03.007>>.

ROMBOUT, J. H.; ABELLI, L.; PICCHIETTI, S.; SCAPIGLIATI, G.; KIRON, V.. *Teleost intestinal immunology*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 31, n. 05, p. 616-626, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.09.001>>.

SAHOO, P. K.; KUMARI, J.; MISHRA, B. K.. *Non-specific immune responses in juveniles of Indian major carps*. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 21, n. 02, p. 151-155, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2004.00606.x>>.

SALINAS, I.; ZHANG, Y. A.; SUNYER, J. O.. *Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 35, n. 12, p. 1346-1365, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.11.009>>.

SALINAS, I.. *The mucosal immune system of teleost fish*. **Biology**, v. 04, p. 525-539, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/biology4030525>>.

SCHULTER, E. P.; VIEIRA FILHO, J. E. R.. *Desenvolvimento e potencial da tilapicultura no Brasil*. **Revista de Economia e Agronegócio**, v. 16, n. 02, p. 177-201, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.25070/rea.v16i2.554>>.

SCHULZ, P.; TERECH-MAJEWSKA, E.; SIWICKI, A. K.; KAZUŃ, B.; DEMSKA-ZAKĘŚ, K.; ROŻYŃSKI, M.; ZAKĘŚ, Z.. *Effect of different routes of vaccination against Aeromonas salmonicida on rearing indicators and survival after an experimental challenge of pikeperch (Sander lucioperca) in controlled rearing*. **Vaccines**, v. 08, p. 476, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/vaccines8030476>>.

SHIBASAKI, Y. et al.. *Cold-blooded vertebrates evolved organized germinal center-like structures*. **Sci. Immunol.**, v. 08, n. eadf1627, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1126/sciimmunol.adf1627>>.

SKOV, J. et al.. *Effects of soluble immunostimulants on mucosal immune responses in rainbow trout immersion-vaccinated against Yersinia ruckeri*. **Aquaculture**, v. 492, p. 237-246, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.04.011>>.

SUEBSING, R. et al.. *Evaluation of colorimetric loop-mediated isothermal amplification assay for visual detection of Streptococcus agalactiae and Streptococcus iniae in tilapia. Letters in Applied Microbiology*, v. 57, n. 04, p. 317-324, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/lam.12114>>.

TU, F. P.; CHU, W. H.; ZHUANG, X. Y.; LU, C. P.. *Effect of oral immunization with Aeromonas hydrophila ghosts on protection against experimental fish infection. Letters in applied microbiology*, v. 50, n. 01, p. 13-17, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02746.x>>.

YE, J.; KAATTARI, I. M.; MA, C.; KAATTARI, S.. *The teleost humoral immune response. Fish & Shellfish Immunology*, v. 35, n. 06, p. 1719-1728, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.10.015>>.

YU, Y. Y. et al.. *Convergent evolution of mucosal immune responses at the buccal cavity of teleost fish. iScience*, v. 19, p. 821-835, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.08.034>>.

YU, Y.; WANG, Q.; HUANG, Z.; DING, L.; XU, Z.. *Immunoglobulins, mucosal immunity and vaccination in teleost fish. Frontiers in Immunology*, v. 11, p. 2597, 2020. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2020.567941>>.

ZAPATA, A.; DIEZ, B.; CEJALVO, T.; GUTIERREZ-DE FRIAS, C.; CORTES, A.. *Ontogeny of the immune system of fish. Fish Shellfish Immunol.*, v. 20, p. 126-136, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.09.005>>.

ZHANG, Y. A. et al.. *IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity. Nature immunology*, v. 11, n. 09, p. 827-835, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/ni.1913>>.

ZHANG, Y. A.; SALINAS, I.; ORIOL, S. J.. *Recent findings on the structure and function of teleost IgT. Fish & shellfish immunology*, v. 31, n. 05, p. 627-634, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.03.021>>.

ZHOU, Q. J. et al.. *Simultaneous detection of multiple bacterial and viral aquatic pathogens using a fluorogenic loop-mediated isothermal amplification-based dual-sample microfluidic chip*. **Journal of Fish Diseases**, v. 44, n. 04, p. 401-413, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/jfd.13325>>.