

Lesões cerebrais e perfil hematoimunológico em *Oreochromis niloticus* após ingestão de ração infectada com *Streptococcus agalactiae*

*Brain injuries and haemato-immunological profile in *Oreochromis niloticus* after ingestion of feed infected with *Streptococcus agalactiae**

Marco Shizuo Owatari¹; Maurício Laterça Martins²; José Luiz Pedreira Mouriño³

Resumo: O objetivo do estudo foi avaliar o tecido cerebral e o sangue de tilápia-do-nylo após ingestão de ração contaminada por *Streptococcus agalactiae*. 90 peixes foram alocados em seis unidades experimentais, sendo quatro tratamentos e duas unidades controle, totalizando 15 animais por tanque. Os peixes receberam o inóculo bacteriano via ração infectada, com um volume de 100 $\mu\text{L g ração}^{-1}$ [10^9 UFC], enquanto os peixes do grupo controle receberam a mesma ração, sem o inóculo bacteriano. Foram realizadas duas coletas de amostras biológicas. A primeira coleta ocorreu no sétimo dia pós-infecção e a segunda coleta no décimo quarto dia pós-infecção. Amostras de tecido do cérebro e alíquotas de sangue foram coletadas de 24 peixes por tratamento para análises histológicas e hematoimunológicas. As análises histológicas do presente estudo revelaram que no tecido cerebral a intensidade das lesões não se altera entre o sétimo e o décimo quarto dia. Na hematoimunologia, houve alterações significativas entre o sétimo e o décimo quarto dia na CHCM, no hematócrito, no número de trombócitos e neutrófilos, bem como na quantidade de lisozima.

Palavras-chave: Bacteriose; Tilápia; Infecção; Estreptococose.

Abstract: The aim of the study was to evaluate the brain tissue and blood of Nile tilapia after ingestion of feed contaminated by *Streptococcus agalactiae*. 90 fish were allocated in six experimental units, four treatments and two control units, totalling 15 animals per tank. The fish received the bacterial inoculum via infected feed, with a volume of 100 $\mu\text{L g feed}^{-1}$ [10^9 CFU], while the fish in the control group received the same feed, without the bacterial inoculum. Two collections of biological samples were performed. The first collection on the seventh post-infection day and the second collection on the fourteenth post-infection day. Brain tissue samples and blood aliquots were collected from 24 fish per treatment for histological and hemato-immunological analyses. The histological analyses of the present study revealed that in the brain tissue the intensity of the lesions does not change between the seventh and fourteenth days. In hemato-immunology, there were significant changes between the seventh and fourteenth day in CHCM, in haematocrit, in the number of thrombocytes and neutrophils, as well as in the amount of lysozyme.

Keywords: Bacteriosis; Tilapia; Infection; Streptococcosis

<http://dx.doi.org/10.5935/1981-2965.20220020>

Recebido em 22.11.2022 Aceito em 30.12.2022

*Corresponding author. E-mail address owatarimarco@hotmail.com

^a AQUOS – Aquatic Organisms Health Laboratory, Aquaculture Department, Federal University of Santa Catarina (CCA, UFSC), Rodovia Admar Gonzaga 1346, 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil.

Introdução

O cérebro dos peixes teleósteos possui muitas semelhanças com o cérebro humano em sua composição básica, porém, é diferente em forma e complexidade (ROBERTS, 2012). A tilápia-do-nilo tem contribuído para o desenvolvimento da oferta mundial de alimentos desde os tempos remotos do antigo Egito e continua sendo uma importante espécie cultivada em água doce. É considerado um peixe muito resistente a doenças bacterianas quando comparado às demais espécies de peixes. No entanto, a tilápia é suscetível às doenças bacterianas. As infecções por *Streptococcus agalactiae* tornaram-se um grande problema no cultivo, causando sérios prejuízos econômicos (AMAL & ZAMRI-SAAD, 2011; TAVARES-DIAS & MARTINS, 2017).

Streptococcus agalactiae é um dos patógenos mais importantes na aquicultura em todo o mundo (PRIDGEON & KLESIUS, 2012). Portanto, ações para o controle e mitigação da estreptococose têm sido constantemente estudadas em todo o mundo (YANONG & FRANCIS-FLOYD, 2002; SUN et al., 2016; SOTO et al., 2016; ZHANG et al., 2018). Além

disso, o *S. agalactiae* é um importante patógeno com potencial zoonótico, ou seja, pode afetar tanto os humanos quanto os animais aquáticos (SUANYUK et al., 2008), ameaçando a segurança e a saúde dos trabalhadores da pesca, indústria processadora e eventuais consumidores de peixes contaminados (SUN et al., 2016).

Os micro-organismos patogênicos podem causar doenças e geralmente infectam o hospedeiro através da boca, poros urogenitais ou através de lesões que rompem a barreira cutânea (ROBERTS, 2012). Assim, a presente pesquisa teve como objetivo avaliar e divulgar os consequentes danos aos tecidos cerebrais e alterações hematoimunológicas em tilápia-do-nilo após a ingestão de ração contaminada com *S. agalactiae*.

Material e Métodos

2.1 Delineamento experimental

Todos os procedimentos de manipulação e eutanásia dos peixes foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFSC 9594280417) utilizando eugenol (75 mg L⁻¹) para anestesia. Um total de 90 alevinos de tilápia-do-nilo com peso médio de 45 g foram distribuídos em 6

unidades experimentais de 90 L cada, com 15 peixes por tanque. As unidades experimentais foram dispostas em uma estufa iluminada com fotoperíodo natural. Foi utilizada ração comercial (40% proteína bruta) capaz de atender às exigências nutricionais dos alevinos. Os peixes foram alimentados quatro vezes ao dia durante o período de aclimação. Os parâmetros da água foram mantidos em: temperatura $28,12 \pm 1,41^\circ\text{C}$; pH $7,18 \pm 0,22$; amônia total $0,25 \pm 0,50 \text{ mg L}^{-1}$; nitrito $0,10 \pm 0,10 \text{ mg L}^{-1}$; alcalinidade $33,15 \pm 10,25 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ e oxigênio dissolvido $6,50 \pm 0,55 \text{ mg L}^{-1}$ em condições de conforto para tilápia (POPMA & LOVSHIN 1996).

2.2 Infecção experimental com ração contaminada

A alimentação foi embebida com inóculo bacteriano vertido diretamente nos pellets em um recipiente plástico e foi realizada com dosagem de $100 \mu\text{L g feed}^{-1}$ [10^9 UFC] previamente definido em DL_{50} . Os peixes foram alimentados apenas uma vez com a ração contendo o patógeno, na frequência de quatro vezes ao dia, de acordo com o manejo alimentar proposto. A ração foi oferecida cuidadosamente para que todos os peixes tivessem a oportunidade de capturar as partículas da ração. O inóculo bacteriano foi inserido na ração dez minutos antes do manejo alimentar. O controle

negativo foi composto em duplicata, e os animais alimentados com ração embebida em solução salina tamponada com fosfato (PBS). A temperatura da água nos tanques foi gradualmente aumentada para 31°C com aquecedores termostáticos. Durante o desafio experimental os peixes foram constantemente monitorados entre zero e 336 h pós-infecção. Os sinais clínicos foram observados e descritos, e as mortalidades contadas ao longo do período.

2.3 Análise histológica

Para avaliação histológica, foram coletados fragmentos de tecido do cérebro de 24 peixes do grupo infectado; 12 peixes no sétimo e 12 peixes no décimo quarto dia após a infecção, bem como o grupo controle, a fim de estabelecer uma amostra de peixes saudáveis. As amostras foram fixadas em formalina tamponada 10%, lavadas e desidratadas em série crescente de álcool etílico, clarificadas em xilol e embebidas em parafina a 60°C para serem fatiadas em cortes de $4\mu\text{m}$ (micrótomo PAT-54 MR10) e coradas com hematoxilina-eosina (H & E). Posteriormente, as lâminas foram preparadas em meio Entellan® e analisadas pelo microscópio de contraste de interferência de fase Axio Imager A.2 (DIC) com o software Zen Pro (Zeiss, Gottingen, Alemanha).

Para todos os órgãos, foram atribuídos valores para alteração histológica, de acordo com o grau de intensidade; 0 (ausência de alteração), 1 (alteração leve, correspondendo a < 25% da área do tecido), 2 (alteração moderada, 25% a 50% da área do tecido) e 3 (alteração grave, > 50% da área do tecido), de acordo com o método descrito por Schwaiger et al. (1997) e Brum et al. (2018).

2.4 Análise hematoimunológica

Para a análise hematológica, foi coletado sangue de 24 peixes do tratamento; 12 peixes no sétimo e 12 peixes no décimo quarto dia após a infecção, bem como o grupo controle para estabelecer uma amostra de peixes saudáveis. A coleta de sangue foi realizada por punção do vaso caudal com seringas de insulina revestidas com solução anticoagulante HEMSTB (EDTA K2 15 gL⁻¹) para contagem total de eritrócitos e contagens diferenciais da série branca de acordo com os protocolos de Ranzani-Paiva et al. (2013), Ishikawa et al. (2008) e Ranzani-Paiva et al. (2013). A concentração de hemoglobina foi analisada pelo método da cianometahemoglobina descrito por Collier (1944). O volume corpuscular médio (MCV) e a concentração média de hemoglobina corpuscular (MCHC)

também foram calculados (Wintrobe, 1934).

As análises imunológicas foram realizadas com alíquotas de sangue coletadas com seringa sem anticoagulantes, dos mesmos peixes descritos anteriormente. O sangue foi centrifugado a 1400g por 10 min para retirada do soro e armazenado a -20 °C para análise imunológica de proteína total (LabTest®), concentração de imunoglobulina total (AMAR et al., 2000) e título de atividade aglutinante (SILVA et al., 2009). Para verificar a atividade antimicrobiana sérica, um inóculo de *S. agalactiae* foi cultivado em meio de cultura caldo BHI (HiMedia, Índia) a 32 °C por 24 h, preparado na concentração de 0,5 na escala de *McFarland* e diluído em meio caldo pobre (PB) 100.000 vezes. A diluição seriada do soro em meio PB foi realizada na proporção de 1:2 até o 12º poço. Para controle positivo e branco, a solução salina foi diluída em PB da mesma forma que o soro. Por fim, 20µL da suspensão bacteriana foram adicionados a cada poço da amostra de soro diluída e do controle positivo. A microplaca contendo *S. agalactiae* foi incubada a 32 °C por 24 h. O crescimento dos microrganismos foi determinado visualmente pela observação da formação de um botão no fundo do poço.

2.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o software Statistica 13.0 (Statsoft Inc., EUA). As médias foram comparadas pelo teste de Levene para verificar a homocedasticidade e, em seguida, o teste de Shapiro-Wilk foi usado para avaliar a normalidade dos dados. Os dados sem homogeneidade foram transformados em $\log_{10}(x + 1)$. Em seguida, os dados foram submetidos à análise de variância unifatorial e as médias separadas pelo teste de Tukey.

Os dados imunológicos foram submetidos à análise de variância bifatorial quando verificadas diferenças significativas, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey.

Resultados

A análise histológica revelou a evolução da septicemia no órgão. No cérebro, observou-se estabilidade nas lesões, ou seja, a intensidade manteve-se estatisticamente igual entre o sétimo e o décimo quarto dia (Tabela 1).

Tabela 1: Avaliação histológica no tecido cerebral de tilápia-do-nylo após ingestão de ração infectada com *Streptococcus agalactiae*. Fragmentos de tecido do cérebro de 24 peixes foram analisados no sétimo e décimo quarto dia. Para todos os órgãos foram atribuídos valores de alteração histológica de acordo com o grau de intensidade; 0 (ausência de alteração). 1 (alteração leve, correspondendo a < 25% da área tecidual). 2 (alteração moderada, 25-50% da área do tecido) e 3 (alteração grave, > 50% da área do tecido), conforme método descrito por Schwaiger et al. (1997). (*) indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Alterações	7° dia	14° dia	Controle	P (value)
Degeneração e necrose	2,00±0,19	1,70±0,21	1,33±0,33	0,2477
Redução de células granulares	0,00	0,00	0,00	
Perda de neurópilo	0,00	0,00	0,00	
Edema intracelular*	1,60±0,16 ^{ab}	2,38±0,26 ^a	1,33±0,33 ^b	0,0294
Vacuolização	1,87±0,35	1,50±0,22	1,00±0,00	0,1663
Perda corpúsculo de Nissl*	2,15±0,29 ^a	1,33±0,15 ^a	0,33±0,33 ^b	0,0027
Encefalite*	1,87±0,35 ^a	1,70±0,30 ^a	0,00 ^b	0,0188
Meningite*	2,12±0,29 ^a	1,88±0,39 ^{ab}	0,00 ^b	0,0291
Granuloma	0,00	0,00	0,00	
Degeneração/necrose neural	1,87±0,22	1,40±0,16	1,00±0,00	0,0575
Gliososis	2,00±0,27	1,70±0,21	2,00±0,57	0,6793

O edema intracelular, embora mais intenso no décimo quarto dia, não foi significativamente diferente ($p > 0,05$) do sétimo dia. Porém, diferente ($p < 0,05$) do grupo controle.

Da mesma forma, a meningite foi numericamente mais intensa no sétimo dia, mas sem diferença estatística ($p > 0,05$) a partir do décimo quarto dia (Figura 1 e 2).

Figura 1: Alterações histológicas no tecido cerebral de tilápia-do-nilo (peso médio de 45 g) no sétimo dia após ingestão de ração infectada com *S. agalactiae*. Em a, b, c, d, e (infectados); f (grupo controle). a: Degeneração e necrose de neurônios no tectum do mesencéfalo (seta preta). b: grave degeneração e necrose (círculo preto), vacuolização citoplasmática (seta preta), meningite e encefalite com infiltrados de células mononucleares (ponta de seta preta). c: vacuolização citoplasmática (ponta de seta preta), degeneração e necrose severas (seta preta), gliose severa (quadrado preto). d: Meningite e encefalite com infiltrados de células mononucleares (seta preta), congestão severa e áreas hemorrágicas (círculo preto). e: degeneração e necrose grave (seta vermelha), perda do corpo de Nissl (seta preta), degeneração e necrose de neurônios no tectum do mesencéfalo (ponta de seta preta), gliose grave (quadrado preto). f: meningite leve (seta preta). Coloração H&E. *Gliose = tecido cicatricial no cérebro.

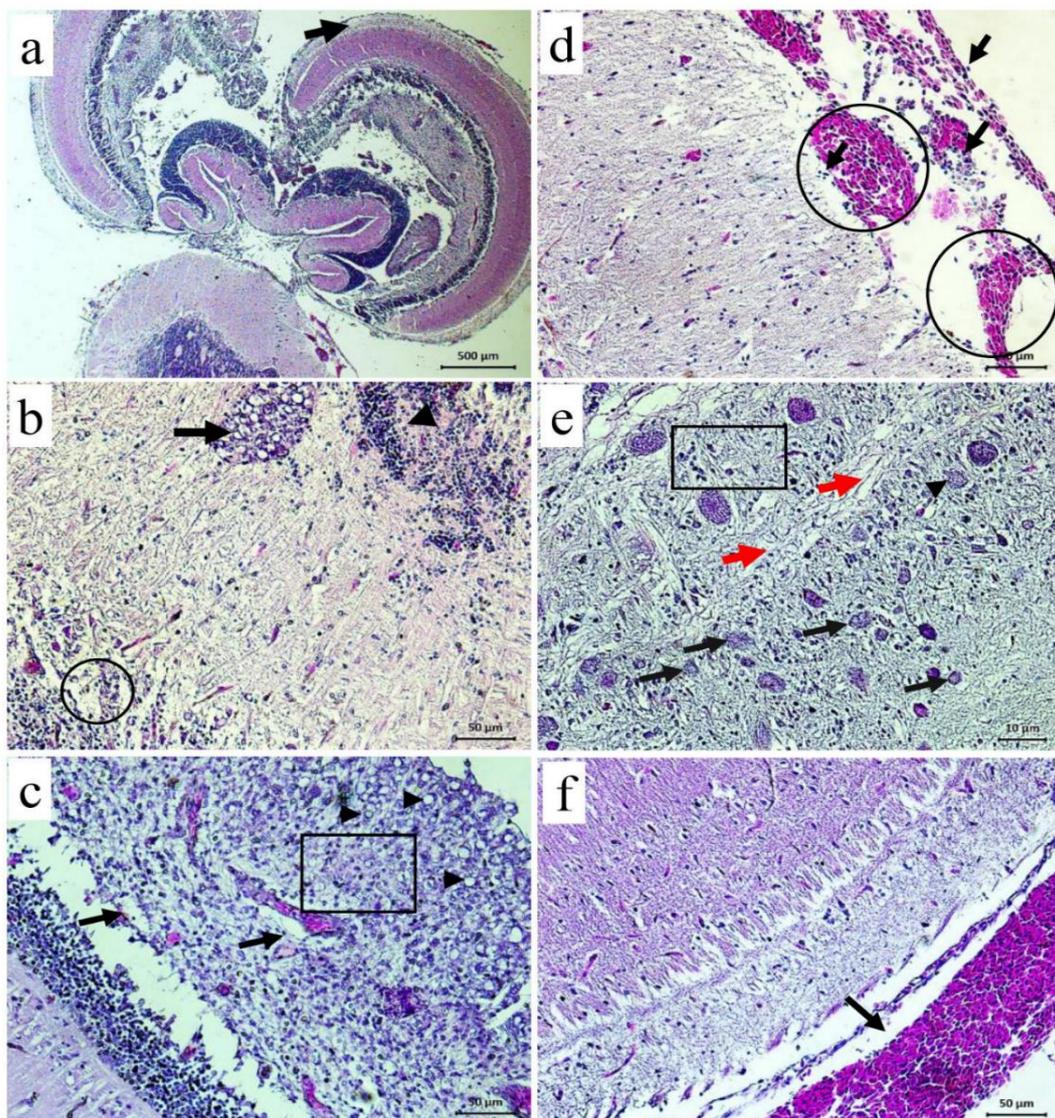
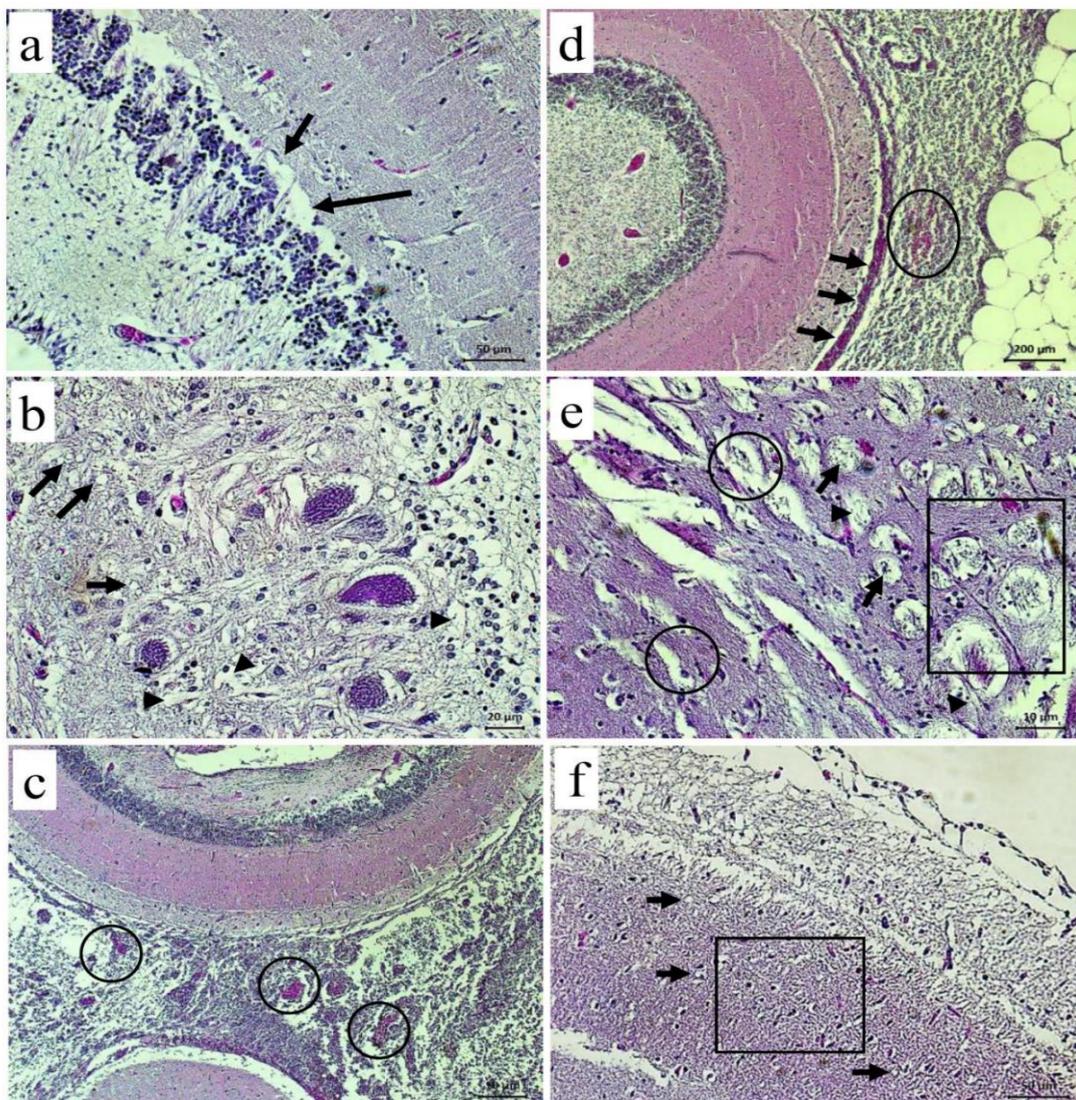


Figura 2: Alterações histológicas no tecido cerebral da tilápia-do-nylo (peso médio de 45 g) no décimo quarto dia após ingestão de ração infectada com *S. agalactiae*. Em a, b, c, d, e (infectados); f (grupo controle). a: Degeneração e necrose leve/média no toro longitudinal, teto do mesencéfalo e toro semicircular (seta preta). b: Vacuolização citoplasmática fraca/média (seta preta), degeneração e necrose no teto do mesencéfalo (ponta de seta preta). c: congestão intensa e áreas de sangramento (círculo preto). d: meningite leve/moderada com infiltrados eosinofílicos (seta preta), congestão grave e áreas hemorrágicas (círculo preto). e: degeneração fraca/média e necrose no toro longitudinal e toro semicircular (círculo preto), edema intracelular fraco/médio no teto do mesencéfalo (quadrado preto), perda generalizada do corpo de Nissl (seta preta) e degeneração e necrose moderadas de neurônios na medula espinhal (seta preta). f: vacuolização citoplasmática fraca/média (seta preta) e gliose fraca/média (quadrado preto). Coloração H&E.



Na análise hematoimunológica, encontramos um perfil de hemopatia

generalizada, caracterizada por alterações no sangue. Foi observada

redução significativa na quantidade de hemoglobina no sangue dos peixes infectados, bem como leucopenia e monocitose em ambos os tempos de amostragem quando comparados aos

peixes do grupo controle. MCHC, hematócrito, trombócitos, neutrófilos e lisozima foram significativamente diferentes entre o sétimo e o décimo quartos dias (Tabela 2).

Tabela 2: Parâmetros hematoimunológicos (média \pm desvio padrão) de juvenis de tilápia-do-nilo (peso médio 45 g) no sétimo e décimo quarto dia após a ingestão de ração infectada com *Streptococcus agalactiae*. VCM = volume corpuscular médio. CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média. MIC = concentração inibitória mínima; MBC = concentração bactericida mínima. (*) indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Hemograma	7º dia	14º dia	Controle	P (value)
Hemoglobina (g dL ⁻¹) *	8,31 \pm 0,69 ^b	7,78 \pm 0,43 ^b	13,50 \pm 0,50 ^a	0,0002
VCM (fL)	171,96 \pm 6,95	158,19 \pm 30,74	157,57 \pm 35,67	0,8952
CHCM (g dL ⁻¹) *	33,47 \pm 3,12 ^b	50,17 \pm 5,15 ^a	50,91 \pm 6,98 ^a	0,0221
Hematócrito (%) *	25,83 \pm 1,50 ^a	17,33 \pm 1,54 ^b	27,33 \pm 2,96 ^a	0,0009
Eritrócito ($\times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$)	1,51 \pm 0,08	1,30 \pm 0,13	1,57 \pm 0,16	0,3312
Trombócito ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) *	38,38 \pm 8,82 ^b	69,92 \pm 11,05 ^a	49,00 \pm 8,22 ^b	0,0416
Leucócito ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) *	31,86 \pm 6,70 ^b	19,91 \pm 3,34 ^b	55,65 \pm 13,25 ^a	0,0192
Neutrófilo ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) *	9,56 \pm 3,28 ^a	2,38 \pm 1,43 ^b	2,04 \pm 0,62 ^b	0,0437
Linfócito ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	53,19 \pm 8,12	50,31 \pm 5,90	73,08 \pm 6,96	0,3442
Monócito ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) *	15,72 \pm 4,65 ^a	14,33 \pm 2,50 ^a	3,55 \pm 1,05 ^b	0,0469
Proteína sérica total (mg mL ⁻¹)	41,07 \pm 2,96	37,70 \pm 3,16	36,90 \pm 1,05	0,6252
Imunoglobulinas (mg mL ⁻¹)	26,52 \pm 2,30	23,70 \pm 1,96	22,98 \pm 1,54	0,4365
Lisozima ($\mu\text{g mL}^{-1}$) *	2,22 \pm 0,92 ^a	0,97 \pm 0,38 ^b	3,72 \pm 0,50 ^a	0,0462
Título de aglutinação ($\log_2(x + 1)$)	4,58 \pm 0,41	5,08 \pm 0,29	5,58 \pm 0,00	0,1622
MIC (%)	3,83 \pm 0,25	3,58 \pm 0,00	3,58 \pm 0,00	0,4633
MBC (%)	2,83 \pm 0,48	3,58 \pm 0,00	3,25 \pm 0,33	0,3192

Discussão

Surtos de mortalidade por *Streptococcus agalactiae* continuam a causar perdas econômicas significativas na tilapicultura mundial (ZHANG et al., 2018). Lesões histopatológicas em tecidos de órgãos de peixes são constantemente descritas por pesquisadores, pois, são capazes de informar a natureza, gravidade, extensão, evolução e intensidade das

lesões, além de sugerir ou mesmo confirmar, a causa da afecção (SCHWAIGER et al., 1997; RIBEIRO et al., 2011; AGAMY, 2012; TATTIYAPONG et al., 2017; JESUS et al., 2021).

As exotoxinas secretadas por *S. agalactiae* podem danificar células sanguíneas ou tecidos de órgãos, interferindo diretamente nas respostas imunes, causando danos fisiológicos ao

hospedeiro (ZHANG et al., 2018; PALANG et al., 2020). A lise das células eucarióticas é a função primária dessas toxinas durante a doença bacteriana. Sabe-se que bactérias, como as do gênero *Streptococcus*, podem colonizar o intestino utilizando uma estratégia característica de bactérias patogênicas, denominada injectossoma, na qual transferem proteínas efetoras aos enterócitos presentes no revestimento intestinal. Essas proteínas permitem a adesão e colonização do patógeno nos enterócitos (TWETEN & CAPARON, 2005; PAL et al., 2019). Uma vez que tais exotoxinas entram em contato com o trato digestivo dos animais, promovem a proliferação do patógeno por todo o organismo do hospedeiro, promovendo uma resposta inflamatória sistêmica, comprometendo órgãos importantes, como o cérebro.

O diagnóstico hematoimunológico do sétimo dia revelou que os peixes infectados apresentaram uma resposta inata aguda contra o patógeno, comprovada pela redução significativa de leucócitos, que atuam diretamente na defesa do organismo (RANZANI-PAIVA et al., 2013; FAZIO, 2019), bem como, na quantidade de hemoglobina, indicando uma redução nos níveis de oxigênio nos órgãos dos animais.

Concomitantemente, foi observado aumento significativo das linhagens de neutrófilos e monócitos, o que pode ser explicado pela necessidade de promover o equilíbrio do organismo por meio de uma resposta coordenada para eliminar o patógeno, migrando para os focos inflamatórios, e assim, atuando nos processos de fagocitose. Além disso, os monócitos possuem vocação citotóxica inespecífica, desencadeando um aumento da atividade fagocítica de antígenos bacterianos, induzida pela liberação de fatores ativadores de macrófagos por meio da inoculação de patógenos mortos ou seus produtos (THRALL, 2007; ROBERTS, 2012; FAZIO, 2019).

A lisozima é uma enzima altamente potente contra bactérias porque quebra suas paredes celulares. Em peixes, é encontrado em células fagocíticas, soro e muco (ROBERTS, 2012). Em bactérias Gram-positivas, a lisozima promove a lise celular alterando as propriedades das estruturas da superfície celular, quebrando a ligação glicosídica entre o ácido N-acetilmurâmico e a N-acetilglicosamina no peptidoglicano bacteriano, um importante componente da parede celular (SAHOO et al., 2012, GONG, 2014). Como marcador de doença, a atividade de lisozima sérica, que é um

dos mecanismos de defesa mais fundamentais contra infecções, pode ser descrita como um marcador potencial de atividade de monócitos/macrófagos (SAHOO et al., 2012). Essa informação corrobora os achados imunológicos do presente estudo, que revelou uma quantidade estável de lisozima no sétimo dia, porém bastante reduzida no décimo quarto dia, indicando que os animais estavam passando por um processo de imunossupressão, ou seja, o enfraquecimento do sistema imunológico após uma resposta aguda nos primeiros dias após a infecção.

Atualmente, existe um consenso universal sobre a importância da prevenção e controle de patógenos na produção de peixes. Uma das estratégias de controle é conhecer os organismos patogênicos com os quais estamos lidando, os mecanismos de ação, ciclo de vida, metabolismo, respostas a estímulos e sua evolução e assim intervir de forma mais eficiente no controle da doença. A utilização de ração infectada para administrar o patógeno é um modelo experimental que pode ser utilizado, porém os sinais clínicos da estreptococose são tardios, podendo aparecer apenas a partir do quinto dia pós-infecção.

Conclusão

O cérebro da tilápia foi consideravelmente danificado quando os peixes receberam alimentos contaminados com a bactéria *Streptococcus agalactiae*. Além disso, o hemograma pode expressar diferentes condições de acordo com o período de amostragem.

Agradecimentos

Os autores reconhecem o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de pesquisa e apoio financeiro ao J.L.P. Mouriño (CNPq 308292/2014-6) e M.L. Martins (CNPq 446072/2014-1, 306635/2018-6), Departamento de Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina. Este estudo é financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil-Código Financeiro 001.

Declaração de contribuição de autoria de crédito

Marco Shizuo Owatari Conceituação, Redação – rascunho original, execução experimental, Metodologia, Curadoria dos dados, análise histológica, redação final. Maurício Laterça Martins administração, recursos e supervisão do projeto. José

Luiz Pedreira Mouriño concepção, metodologia, administração do projeto, recursos e supervisão.

Declaração de conflito de interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesses no presente manuscrito.

Referências

AGAMY, E. (2012). Histopathological liver alterations in juvenile rabbit fish (*Siganus canaliculatus*) exposed to light Arabian crude oil, dispersed oil and dispersant. *Ecotoxicology and environmental safety*, 75, 171-179. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.09.010>.

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

AMAR, E. C., KIRON, V., SATOH, S., OKAMOTO, N., & WATANABE, T. (2000). Effects of dietary β -carotene on the immune response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fisheries Science*, 66(6), 1068-1075. <https://doi.org/10.1046/j.1444-2906.2000.00170.x>.

BRUM, A., CARDOSO, L., CHAGAS, E. C., CHAVES, F. C. M., MOURIÑO, J. L. P., & MARTINS, M. L. (2018). Histological changes in Nile tilapia fed essential oils of clove basil and ginger after challenge with *Streptococcus agalactiae*. *Aquaculture*, 490, 98-107. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.02.040>.

COLLIER, H. B. (1944). Standardization of blood haemoglobin determinations. *Canadian Medical Association Journal*, 50(6), 550-552.

FAZIO, F. (2019). Fish hematology analysis as an important tool of aquaculture: a review. *Aquaculture*, 500, 237-242.

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.10.030>.

GONG, M. (2014). Efficacy of lysozyme as an alternative to antibiotics for broiler chickens.

ISHIKAWA, N.M., RANZANI-PAIVA, M.J.T., LOMBARDI, J.V. (2008). Metodologia para quantificação de leucócitos totais em peixe, *Oreochromis niloticus*. *Archives of Veterinary Science*, 13, 54-63. <http://hdl.handle.net/11449/70526>.

JESUS, G. F. A., OWATARI, M. S., PEREIRA, S. A., SILVA, B. C., SYRACUSE, N. M., LOPES, G. R., ADDAM, K., CARDOSO, L., MOURIÑO, J. L. P., & MARTINS, M. L. (2021). Effects of sodium butyrate and *Lippia organoides* essential oil blend on growth, intestinal microbiota, histology, and haemato-immunological response of Nile tilapia. *Fish & Shellfish Immunology*, 117, 62-69. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.07.008>.

PAL, R. R., BAIDYA, A. K., MAMOU, G., BHATTACHARYA, S., SOCOL, Y., KOBI, S., KATSOWICH, N., BEN-YEHUDA, S., & ROSENSHINE, I. (2019). Pathogenic *E. coli* extracts nutrients from infected host cells utilizing injectisome components. *Cell*, 177(3), 683-696. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.02.022>.

PALANG, I., WITHYACHUMNARNKUL, B., SENAPIN, S., SIRIMANAPONG, W., & VANICHVIRIYAKIT, R. (2020). Brain histopathology in red tilapia *Oreochromis* sp. experimentally infected

with *Streptococcus agalactiae* serotype III. Microscopy Research and Technique, 83(8), 877-888. <https://doi.org/10.1002/jemt.23481>.

POPMA, T. J., & LOVSHIN, L. L. (1996). Worldwide prospects for commercial production of tilapia. Alabama: International Center for Aquaculture and Aquatic Environments, 26 p.

PRIDGEON, J. W., & KLESIOUS, P. H. (2012). Major bacterial diseases in aquaculture and their vaccine development. *CABI Reviews*, 7, 1-16. <https://doi.org/10.1079/PAVSNNR20127048>.

RANZANI-PAIVA, M. J. T., DE PÁDUA, S. B., TAVARES-DIAS, M., & EGAMI, M. I. (2013). Métodos para análise hematológica em peixes. Editora da Universidade Estadual de Maringá-EDUEM.

RIBEIRO, H. J., PROCÓPIO, M. S., GOMES, J. M. M., VIEIRA, F. O., RUSSO, R. C., BALZUWEIT, K., CHIARINI-GARCIA, H., CASTRO, A. C. S., RIZZO, C. & CORRÊA, J. D. (2011). Functional dissimilarity of melanomacrophage centres in the liver and spleen from females of the teleost fish *Prochilodus argenteus*. *Cell and Tissue Research*, 346(3), 417-425.

ROBERTS, R. J. (2012). *Fish pathology*. John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1007/s00441-011-1286-3>.

SAHOO, N. R., KUMAR, P., BHUSAN, B., BHATTACHARYA, T. K., DAYAL, S., & SAHOO, M. (2012). Lysozyme in livestock: a guide to selection for disease resistance: a review. *Journal of Animal Science Advances*, 2(4), 347-360.

SCHWAIGER, J., WANKE, R., ADAM, S., PAWERT, M., HONNEN, W., & TRIEBSKORN, R. (1997). The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, 6(1), 75-86. <https://doi.org/10.1023/A:1008212000208>.

SILVA, B. C., MARTINS, M. L., JATOBÁ, A., BUGLIONE NETO, C. C., VIEIRA, F. N., PEREIRA, G. V., JERÔNIMO, G. T., SEIFFERT, W. Q., & MOURIÑO, J. L. P. (2009). Hematological and immunological responses of Nile tilapia after polyvalent vaccine administration by different routes. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 29(11), 874-880. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2009001100002>.

SOTO, E., ZAYAS, M., TOBAR, J., ILLANES, O., YOUNT, S., FRANCIS, S., & DENNIS, M. M. (2016). 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*, 155 (4), 339-345. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2016.09.003>.

SUANYUK, N., KONG, F., KO, D., GILBERT, G.L., SUPAMATTAYA, K., 2008. Occurrence of rare genotypes of *Streptococcus agalactiae* in cultured red tilapia *Oreochromis* sp. and Nile tilapia *O. niloticus* in Thailand—relationship to human isolates? *Aquaculture*, 284 (1–4), 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.07.034>.

- SUN, J., FANG, W., KE, B., HE, D., LIANG, Y., NING, D., TAN, H., PENG, H., WANG, Y., MA, Y., KE, C., & DENG X. (2016). Inapparent *Streptococcus agalactiae* infection in adult/commercial tilapia. Scientific Reports, 6, 26319. <https://doi.org/10.1038/srep26319>.
- TATTIYAPONG, P., DACHAVICHITLEAD, W., & SURACHETPONG, W. (2017). Experimental infection of Tilapia Lake Virus (TiLV) in Nile tilapia THRALL, M. A. (2007). Hematologia e bioquímica clínica veterinária. Editora Roca.
- TWETEN, R. K., & CAPARON, M. (2005). Injectosomes in Gram-Positive Bacteria. Structural Biology of Bacterial Pathogenesis, 223-239. <https://doi.org/10.1128/9781555818395.ch11>.
- YANONG, R. P., & FRANCIS-FLOYD, R. (2002). Streptococcal infections of fish. Florida Cooperative Extension Service. IFAS, University of Florida, pp. 1-5.
- (*Oreochromis niloticus*) and red tilapia (*Oreochromis* spp.). Veterinary Microbiology, 207, 170-177. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.06.014>.
- TAVARES-DIAS, M., & MARTINS, M. L. (2017). An overall estimation of losses caused by diseases in the Brazilian fish farms. Journal of Parasitic Diseases, 41(4), 913-918. <https://doi.org/10.1007/s12639-017-0938-y>.
- ZHANG, Z., LAN, J., LI, Y., HU, M., YU, A., ZHANG, J., & WEI, S. (2018). The pathogenic and antimicrobial characteristics of an emerging *Streptococcus agalactiae* serotype IX in Tilapia. Microbial Pathogenesis, 122, 39-45. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.05.053>.