

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE AQUICULTURA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA**

**Septicemia hemorrágica em surubim híbrido  
(*Pseudoplatystoma corruscans* macho X *P. fasciatum* fêmea)  
causada por *Aeromonas hydrophila***

Dissertação apresentada como requisito a obtenção do título de mestre em Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Mauricio Laterça Martins, Dr.  
Co-orientador: Walter Quadros Seiffert, Dr.

Bruno Corrêa da Silva

Florianópolis  
2010

S586s Silva, Bruno Corrêa da

Septicemia hemorrágica em surubim híbrido (*Pseudoplatystoma coruscans* macho X *P. fasciatum* fêmea) causada por *Aeromonas hydrophila* [dissertação] / Bruno Correa da Silva ; orientador, Maurício Laterça Martins. - Florianópolis, SC : 2010.  
62 p.: il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. Surubim (Peixe). 3. *Pseudoplatystoma fasciatum*. 4. *Aeromonas hydrophila*. 5. Imunologia. I. Martins, Maurício Laterça. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. III. Título.

CDU 639.3

**Septicemia hemorrágica em surubim híbrido  
(*Pseudoplatystoma coruscans* macho X *P. fasciatum* fêmea)  
causada por *Aeromonas hydrophila***

Por

BRUNO CORRÊA DA SILVA

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

**MESTRE EM AQÜICULTURA**

e aprovada em sua forma final pelo Programa de  
Pós-Graduação em Aqüicultura.

Banca Examinadora:

---

Dr. Walter Quadros Seiffert – *Coorientador*

---

Dr. Evoy Zaniboni Filho

---

Dr. Rodrigo Yudi Fujimoto



Ao eterno amigo  
Leonardo Matsunaga (*in memoriam*)



## **AGRADECIMENTOS**

Aos orientadores e amigos Mauricio Laterça Martins e Walter Quadros Seiffert pela orientação e apoio em todo o projeto, assim como em minha vida acadêmica;

Aos amigos, Adolfo Jatobá, Felipe do Nascimento Vieira e José Luiz Mourinho pelos ensinamentos, conselhos, correções e paciência durante a realização do projeto;

Aos companheiros de laboratório e amigos Gabriel, Gabi, Robert, Mari, Kati e Nohra;

A todos os funcionários e professores do Departamento de Aquicultura pela prestatividade;

Ao Carlito, pela paciência e prestatividade na secretaria da PGAQI;

Ao MPA, FAPESC, CNPq por parte do apoio financeiro concedido para a realização dos estudos;

Ao Thiago Tetsuo e a empresa Mar & Terra que acreditaram na proposta do trabalho;

Aos meus primos, grande amigos, pelo companheirismo e por contar com eles nas horas tristes e felizes desta caminhada;

Ao meu pai, Evilásio José da Silva, pelo incentivo nos estudos que sempre me passou através de toda minha vida e pelo amor e carinho a mim destinados,

A minha mãe, Bernadete Corrêa da Silva, por todo apoio, amor e compreensão em todos os momentos difíceis da minha vida acadêmica e pessoal,

Ao meu irmão, Eduardo Corrêa da Silva, por me espelhar como exemplo de dedicação e perseverança profissional,

A minha namorada, Gabriela Scholante Delabary, por todo apoio, amor, carinho e paciência nos melhores e piores momentos desta caminhada,

Enfim, a todos que ajudaram de alguma forma na realização deste trabalho.



## RESUMO

O cultivo intensivo de surubim híbrido no Brasil é responsável pelo aparecimento de enfermidades e consequentemente perdas durante o cultivo, porém, pouco se sabe sobre o agente causador. O objetivo deste estudo foi isolar e caracterizar o agente patogênico causador de mortalidades em cultivo de surubins, e comprovar por meio de desafio experimental a sua virulência. Foram coletados dez peixes em fazenda do estado de Mato Grosso do Sul (Brasil), e isoladas 14 cepas de bactérias hemolíticas do rim (8) e do cérebro (6), caracterizadas como *Aeromonas hydrophila hydrophila*. Esta cepa foi utilizada no desafio experimental onde 144 surubins, com  $98,1 \pm 23,6$  g, foram desafiados com 1 mL de salina e  $2 \times 10^2$ ,  $10^4$ ,  $10^6$  e  $10^8$  UFC de *A. hydrophila*·mL<sup>-1</sup>. Os peixes desafiados com maior concentração de bactérias apresentaram maior prevalência dos sintomas externos e internos e mortalidade de  $50 \pm 12,5\%$  após 96 h. Verificou-se que o aumento na concentração de *A. hydrophila* usada no desafio resultou em diminuição no percentual de hematócrito e do número de eritrócitos, linfócitos e eosinófilos, bem como aumento no número de monócitos, neutrófilos, títulos de aglutinação e atividade antimicrobiana do soro. Conclui-se que *A. hydrophila hydrophila* foi responsável por sintomas característicos de septicemia hemorrágica bacteriana (BHS), além de alterações hematológicas e imunológicas que resultaram em mortalidade do peixe.

**Palavras-chave:** *Pseudoplatystoma* sp., aeromoniose, infecção, hematologia, imunologia.

## ABSTRACT

### HEMORRHAGIC SEPTICEMIA IN HYBRID SURUBIM (*Pseudoplatystoma corruscans* x *P. fasciatum*) CAUSED BY *Aeromonas hydrophila*

Intensive culture of the hybrid surubim in Brazil is responsible for the occurrence of diseases and consequently great economic losses during the rearing. However, the causative agent is few known. The objective of this study was to isolate and characterize the pathogenic agent responsible for the mortalities in cultured surubim, and to demonstrate its virulence. Ten fish from a fishfarm located in the State of Mato Grosso do Sul (Brazil), 14 haemolytic bacteria were isolated from kidney (8) and brain (6) and characterized as *Aeromonas hydrophila hydrophila*. This strain was used in the experimental trial where the fish with  $98.1 \pm 23.6$  g, were challenged with 1mL of saline,  $2 \times 10^2$ ,  $10^4$ ,  $10^6$  and  $10^8$  CFU *A. hydrophila*·mL<sup>-1</sup>. Fish challenged with the higher concentration of bacteria showed increased external and internal symptoms and a mortality rate of  $50 \pm 12.5\%$  after 96 h. As a result of an increase in the *A. hydrophila* concentration used in challenge a decrease in the haematocrit percentage and the number of red blood cells, lymphocytes, and eosinophils, as well as an increase in the number of monocytes, neutrophils, agglutination titers, and antimicrobial activity in the serum were observed. It was concluded that *A. hydrophila hydrophila* was responsible for characteristic symptoms of bacterial hemorrhagic septicemia (BHS) beyond an important haematological and immunological alterations, which led in fish mortality.

**Keywords:** *Pseudoplatystoma* sp., aeromoniosis, infection, hematology, immunology.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Figura esquemática do cruzamento do pintado (*P. corruscans*) com o cachara (*P. fasciatum*), obtendo o surubim híbrido. Fonte: Crepaldi et al. 2006..... 18
- Figura 2** – Figura esquemática do postulado de Henle-Koch. Adaptado de Evans 1976..... 20
- Figura 3** - Chave de identificação para *Aeromonas*, Aerokey II. Adaptado de Carnahan, Behram e Joseph (1991). ..... 24
- Figura 4** - Células sanguíneas de peixes teleósteos. A - Eritrócito, B - Trombócito, C - Linfócito, D - Monócito, E - Neutrófilo, F - LG-PAS, G – Eosinófilo, H – Basófilo. Adaptado de Satake, Padua e Ishikawa (2009). ..... 26
- Figura 5** - Representação das células responsáveis pelos sistemas imune inato e adaptativo. Adaptado de Abbas e Litchman (2003)..... 29
- Figura 6** – Sintomatologia de surubins híbridos sobreviventes ao desafio com *Aeromonas hydrophila hydrophila*. A – Despigmentação da epiderme, B – Ulceração dorsal, C – Ulceração ventral, D – Inchaço abdominal e inflamação no ânus, E – Palidez das brânquias, F – Erosão de nadadeira, G - Hipertrofia do rim, H – Hemorragia no fígado, I – Pontos brancos na vesícula, J – Pontos hemorrágicos no coração, L – Pontos hemorrágicos no cérebro, M – Inflamação intestinal. .... 43
- Figura 7** - Análise de regressão do título de aglutinação, atividade antimicrobiana do soro, contagem total de eritrócito e porcentagem de hematócrito de surubins híbridos desafiados com diferentes concentrações de *Aeromonas hydrophila hydrophila*. ..... 44
- Figura 8** - Análise de regressão da porcentagem de linfócitos, monócitos, neutrófilos e eosinófilos de surubins híbridos desafiados com diferentes concentrações de *Aeromonas hydrophila hydrophila*..... 45

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Prevalência de sintomas externos e internos dos surubins híbridos sobreviventes ao desafio com diferentes concentrações de <i>Aeromonas hydrophila hydrophila</i> . ....	42
--	----

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	7
RESUMO .....	9
ABSTRACT.....	10
LISTA DE FIGURAS .....	11
LISTA DE TABELAS .....	12
CAPÍTULO 1 .....	15
INTRODUÇÃO .....	16
Cultivo de surubim.....	16
Bacterioses em peixes .....	18
<i>Aeromonas hydrophila</i> .....	21
Hematologia e imunologia de peixes teleósteos.....	25
CAPÍTULO 2.....	33
SEPTICEMIA HEMORRÁGICA EM SURUBIM HÍBRIDO ( <i>Pseudoplatystoma</i> sp.) CAUSADA POR <i>Aeromonas</i> <i>hydrophila</i> .....	33
RESUMO .....	34
ABSTRACT.....	35
INTRODUÇÃO .....	36
MATERIAL E MÉTODOS .....	37
Isolamento de patógenos .....	37
Caracterização bioquímica e molecular .....	37
Desafio experimental.....	38
Mortalidade, sintomatologia e re-isolamento da bactéria.....	39
Análises hematológicas e imunológicas.....	39
Análises estatísticas.....	40
RESULTADOS.....	41
Identificação bioquímica e molecular .....	41

Qualidade da água, mortalidade e sintomatologia .....	41
Análises hematológicas e imunológicas.....	43
DISCUSSÃO .....	45
CONCLUSÃO .....	48
AGRADECIMENTOS .....	48
REFERÊNCIAS.....	48
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	53
REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO.....	55

## CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO:  
SEPTICEMIA HEMORRÁGICA EM SURUBIM HÍBRIDO  
(*Pseudoplatystoma corruscans* x *P. fasciatum*) CAUSADA POR  
*Aeromonas hydrophila*

## INTRODUÇÃO

### **Cultivo de surubim**

Os peixes da família Pimelodidae, a qual os surubins pertencem, são os bagres mais apreciados no mercado sul americano. Dentre esta família, três espécies possuem características comerciais importantes: *Pseudoplatystoma fasciatum*, *P. tigrinum*, que ocorrem ao longo da bacia Amazônica e na Amazônia boliviana, enquanto o *P. corruscans* é distribuído na Bacia do Rio São Francisco e Rio da Prata (vide revisão de NUNEZ et al., 2008).

Os surubins são vulneráveis ao grande esforço da pesca, e constantemente ameaçados pelas alterações das características ambientais (MELLO et al., 2009). As barreiras das hidrelétricas alteram os percursos dos rios, impedindo a transposição dos peixes à cabeceira para a reprodução, comprometendo a perpetuação da espécie (ZANARDI; BOQUEMBUZO; KOBERSTEIN, 2008). Como consequência, o uso múltiplo dos rios (assoreamento, ausência de manejo racional do solo e desmatamento) ocasiona mudanças nas populações de peixes, reduzindo os estoques naturais (MIRANDA; RIBEIRO, 1997). No período de 1987 a 1990 o *P. corruscans* foi uma das nove espécies mais capturadas no reservatório Itaipu pela pesca profissional (AGOSTINHO; JULIO JR., 1999). Miranda e Ribeiro (1997) já constatavam no Brasil que esta espécie de água doce possui a maior importância econômica e maior demanda, não apenas pelos consumidores como também pelos aquicultores em potencial.

Os cultivos das espécies nativas no Brasil têm condições de crescer mais do que os cultivos de espécies exóticas, como tilápia e carpa (BEUX; ZANIBONI-FILHO, 2007). O gênero *Pseudoplatystoma*, dentre as espécies nativas, apresentou grande potencial de cultivo e importância econômica no país, por possuir excelente qualidade de carne e ser apreciado pela pouca presença de espinhos intramusculares, apresentam alto preço de mercado, sendo bastante procurados pelos exportadores de pescados. Em condições de cultivo podem chegar a dois quilos em um ano (ROUBACH et al., 2003; CAMPOS, 2004; ZANIBONI-FILHO, 2004).

O cultivo de surubim iniciou no Brasil em 1997, sendo cultivado em quase todas as regiões brasileiras, principalmente no Centro-Oeste, possuindo diferentes fins: pesca esportiva, principalmente na região sul e sudeste; cultivado para o abate e beneficiamento; e mais recentemente fins ornamentais (CAMPOS, 2004; ZANIBONI-FILHO, 2004).

Em 2007 a produção aquícola de espécies de bagres sul-americanos em águas continentais alcançou cerca de 670 toneladas, movimentando cerca de US\$ 1.467.000 (FAO, 2008). Porém, os dados estatísticos de cultivos não são confiáveis e estima-se que estes valores sejam ainda maiores, haja vista a informalidade da piscicultura continental brasileira (CAMPOS, 2004).

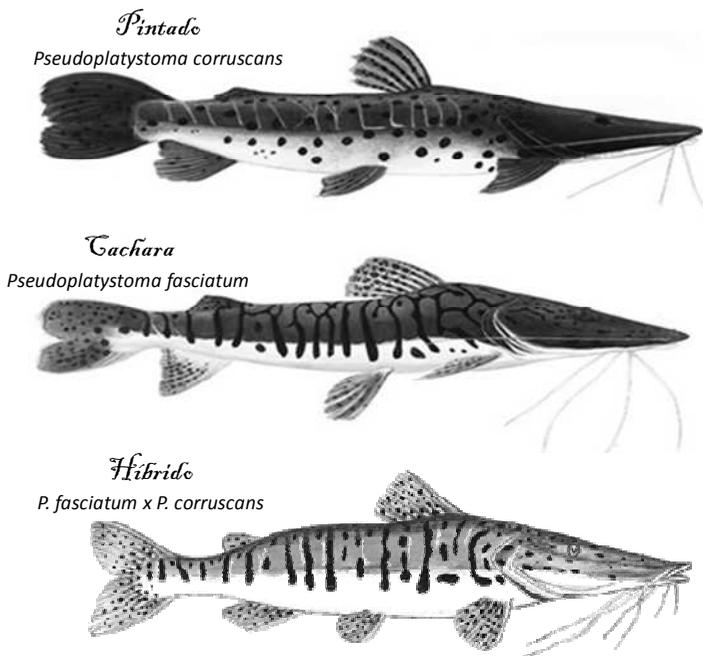
Apesar do crescente aumento no cultivo, criação em cativeiro de surubim é dificultada pelo fato de apresentar hábito alimentar carnívoro; alta exigência em qualidade da água, principalmente quanto a disponibilidade de oxigênio dissolvido; ocorrência de canibalismo e susceptibilidade ao estresse, levando a altos índices de mortalidade durante o cultivo, principalmente durante as larviculturas (FUJIMOTO; CARNEIRO, 2001; ANDRADE et al., 2004).

O cultivo destas espécies exige desenvolvimento de tecnologias para produção em pequena e larga escala (BEUX; ZANIBONI-FILHO, 2007). Alguns estudos já foram publicados com pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) e cachara (*P. fasciatum*) referindo-se à biologia e ecologia (BRITO; BAZOLLI, 2003; GODINHO et al., 2007), reprodução (LEONARDO et al., 2004; LEONARDO et al., 2006), larvicultura (BEUX; ZANIBONI-FILHO, 2007; NUNEZ et al., 2008), nutrição (MARTINO et al., 2005; CAMPOS; MARTINO; TRUGO, 2006; ARSLAN, 2008), estresse fisiológico (GIANQUITO; VOLPATO, 2005; FAGUNDES; URBINATI, 2008), parasitologia (REGO, 2002; CAMPOS et al., 2008; CORREA; BRASIL-SATO, 2008), imunologia e hematologia (BEELEN et al., 1998; BEELEN et al., 2004) e bacteriologia do peixe processado (RALL; PEDROSO; HEIDTMANN, 1998; SOUZA et al., 2008).

A linhagem de surubim usualmente comercializada é o híbrido entre *P. corruscans* e *P. fasciatum* (Figura 1). Tal escolha se deve à partir da premissa de que os híbridos teriam um maior desenvolvimento e maior adaptação ao cativeiro, quando comparados aos peixes de linhagem pura. Dados obtidos por Crepaldi et al. (2003, apud CREPALDI et al. 2006) em um ensaio de 84 dias comparando as linhagens pura e híbrida confirmaram que os peixes híbridos apresentaram maior crescimento, corroborando a afirmação de produtores e fornecedores de alevinos. Devido, em parte, à expressão da heterose advinda de tais cruzamentos (CREPALDI et al. 2006).

O crescimento e a intensificação da produção de peixes envolvem estresse, resultando no aparecimento de doenças e gerando consequentemente mortalidades (VANDENBERG, 2004). Campos (2004) já citava surtos de doenças no inverno no cultivo de surubim,

possivelmente causados por bacterioses, levando a sintomas como hemorragia no intestino e ânus, lesões externas e vermelhidão na base das nadadeiras, podendo causar mortalidades de até 80% da produção. Doenças em *Pseudoplatystoma corruscans* causam importantes perdas nos cultivos (GIANQUITO; VOLPATO, 2007), porém nenhum estudo foi encontrado até o presente momento relacionando as mortalidades em fazendas de surubim com bacterioses.



**Figura 1** - Figura esquemática do cruzamento do pintado (*P. corruscans*) com o cachara (*P. fasciatum*), obtendo o surubim híbrido. Fonte: Crepaldi et al. 2006

### **Bacterioses em peixes**

No Brasil, em 2006, a produção aquícola atingiu a marca de 289.648 toneladas, movimentando um capital próximo a \$600 milhões de dólares (FAO, 2008). Porém, a intensificação do cultivo somada às más práticas de manejo causam perdas durante os cultivos associadas às infecções de diversas origens, como bacteriana, viral, protozoária e muitas vezes mais de um destes agentes agindo em conjunto

(PAVANELLI; EIRAS; TAKEMOTO, 1998; AUSTIN; AUSTIN, 2007).

Um estudo em fazendas de Bangladesh revelou que aproximadamente 15% de toda a produção de peixes continentais é perdida devido a doenças, chegando a uma perda econômica de aproximadamente \$350,00 dólares por hectare por ano (FARUK et al., 2004), tendo como maior causa as doenças de origem bacteriana (AUSTIN; AUSTIN, 2007).

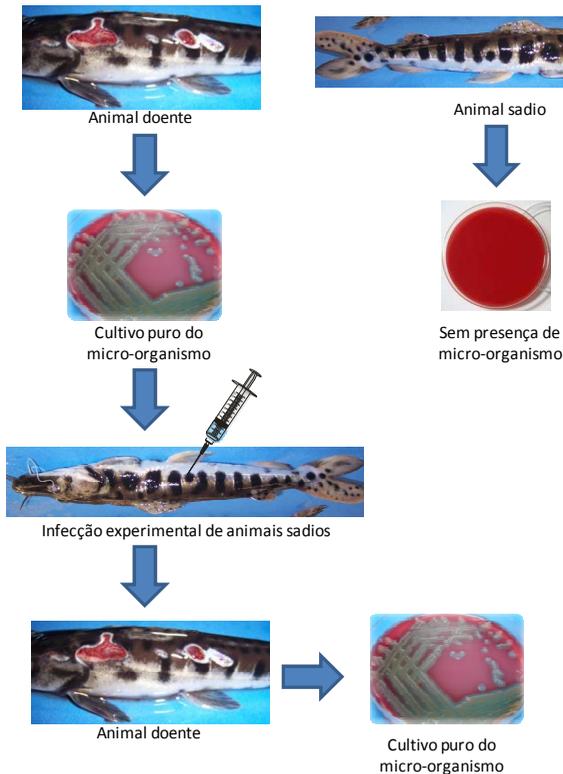
As bacterioses em pisciculturas são doenças que podem avançar rapidamente, causando mortalidades elevadas e desaparecendo em curto prazo de tempo. Ou podem desenvolver-se mais lentamente, com menos gravidade, mas persistir por períodos longos. A exemplo disto, no cultivo de tilápias algumas doenças causadas por bactérias Gram-negativas podem levar a perdas de 5% em casos mais brandos, ou a 100% em casos mais agudos (CONROY, 2001).

Os gêneros que se destacam entre as bactérias isoladas em surtos de mortalidade, são: *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Flavobacterium*, *Edwardsiella*, *Streptococcus* e *Enterococcus*. Para realização de diagnósticos devem ser realizados exames bacteriológicos. Estas análises devem ser feitas em espécimes moribundos ou que evidenciem os sintomas típicos da doença. Estas bactérias podem ser encontradas nos órgãos internos como rim, fígado, intestino, coração, cérebro e baço, sendo indicada a colheita destes em infecções crônicas (PAVANELLI; EIRAS; TAKEMOTO, 1998; AUSTIN; AUSTIN, 2007).

É importante frisar que a maior parte das bactérias que causam as doenças são organismos que fazem parte da comunidade bacteriana presente na água, sendo encontradas na superfície da epiderme, nas brânquias e também na microbiota intestinal (CAHILL, 1990). Apesar disso, apenas em determinadas condições há o favorecimento da invasão e proliferação destas nos peixes, estando correlacionado com a diminuição da capacidade do sistema imunitário dos hospedeiros. Resumidamente, a doença é geralmente resultado da relação entre o hospedeiro, o agente causador e estressores externos, i.e. ambientais (PAVANELLI; EIRAS; TAKEMOTO, 1998).

As bactérias estão associadas à fenômenos patogênicos, divididos em três aspectos: resposta septicêmica, necrose do tegumento e músculo, e resposta crônica proliferativa. Dependendo da natureza do organismo e das circunstâncias da infecção, geralmente, apenas uma destas respostas se destacam em uma infecção bacteriana (PAVANELLI; EIRAS; TAKEMOTO, 1998).

Os principais sinais internos de bacterioses são: anemia, septicemia, hipertrofia do baço, víceras hemorrágicas e ruptura de vasos internos. Já a sintomatologia externa começa com diminuição ou nenhuma alimentação seguida do escurecimento da pele, natação errática, letargia, curvatura do corpo, exoftalmia, opacidade da córnea, hemorragia no opérculo e base das nadadeiras, ulceração da epiderme e por último a morte. A principal via de transmissão destas doenças acontece de forma horizontal, feita pelo contato com peixes ou alimentos contaminados (PAVANELLI; EIRAS; TAKEMOTO, 1998; LIM; WEBSTER, 2006; AUSTIN; AUSTIN, 2007), no caso do pintado e do cachara essa transmissão pode ser ainda mais intensificada pelo canibalismo existente nestas espécies (ANDRADE et al., 2004).



**Figura 2** – Figura esquemática do postulado de Henle-Koch. Adaptado de Evans 1976.

Diversos estudos que identificam e comprovam a patogenicidade de bactérias isoladas de peixes doentes são feitos com o objetivo de estudar a sobrevivência, sintomatologia alterações hematológicas e imunológicas causadas por estas bacterioses nos cultivos de goldfish, *Carassius auratus* (SHAO; LIU; XIANG, 2004), carpa rohu, *Labeo rohita* (DAS MAHAPATRA et al., 2008; SAHU et al., 2008), tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (MARTINS et al., 2008a, 2008b) paulistinha, *Danio rerio* (RODRIGUEZ; NOVOA; FIGUERA, 2008) salmão do atlântico, *Salmo salar* (ROMALDE et al., 2008), olho de boi, *Seriola dumerili* (HAGIWARA et al., 2009), catfish, *Ictalurus punctatus* (GRIFFIN; MITCHELL, 2007), jundiá, *Rhamdia quelen* (BARCELLOS et al., 2008).

O isolamento de bactérias de peixes doentes, obviamente é tomado como prova de uma infecção, porém não deve esquecer-se do Postulado de Henle-Koch (Figura 2) (AUSTIN; AUSTIN, 2007). O postulado foi inicialmente formulado por Jakob Henle em 1840, posteriormente foi adaptado e publicado por Robert Koch em 1882. O postulado traz as seguintes condições para que um agente seja relacionado a uma doença: a presença do agente deve ser sempre comprovada em todos os indivíduos que sofram da doença em questão e, a partir daí, isolada em cultura pura. Uma vez isolado, o agente deve ser capaz de reproduzir os sintomas da doença em questão, após a sua inoculação em animais experimentais, sendo que, o mesmo agente deve ser isolado novamente dos animais experimentalmente infectados (EVANS, 1976).

### ***Aeromonas hydrophila***

Desde o seu reconhecimento como agente causador de septicemia hemorrágica bacteriana (BHS, do inglês *Bacterial Hemorrhagic Septicemia*), as aeromonas móveis foram consideradas patógenos que afetam grande variedade de espécies de peixes continentais, incluindo ornamentais, e ocasionalmente, peixes marinhos. Também já foram encontrados em anfíbios, répteis e bovinos. Estes agentes etiológicos estão distribuídos geograficamente no mundo todo. A BHS causa ruptura de pequenos vasos sanguíneos, implicando na presença de lesões superficiais pequenas, que levam à descamação e despigmentação da epiderme, hemorragias nas brânquias e hiperventilação, úlceras e abscessos externos, exoftalmia, hemorragia na nadadeira, distensão abdominal. Internamente pode haver acumulação de líquido ascítico, anemia e danos aos órgãos, geralmente nos rins e fígado (PAVANELLI; EIRAS; TAKEMOTO, 1998; WOO; BRUNO, 2003; DUNG et al., 2008).

As espécies mais comuns de *Aeromonas* móveis são: *A. caviae*, *A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. veronii*, *A. trota*, *A. schubertii* e *A. jandaei* (PENDERS; STOBBERINGH, 2008), no entanto as três primeiras são mais frequentemente isoladas de peixes doentes. Contudo, algumas dúvidas são expressas sobre o papel destas bactérias como patógenos de peixes. Enquanto alguns pesquisadores acreditam que as *Aeromonas* móveis podem ser meramente secundárias, invadindo hospedeiros já comprometidos, outros grupos têm insistido que estas bactérias atuam como um patógeno primário (AUSTIN; AUSTIN, 2007). Wakabayashi et al. (1981) e Holliman (1993) reconhecem que dentre as aeromonas móveis as mais virulentas são as cepas de *A. hydrophila*, sendo considerada também uma zoonose, podendo causar diarreia e septicemias em humanos (DEODHAR; SARASWATHI; VARUDKAR, 1991).

*A. hydrophila* está presente naturalmente no ecossistema aquático e faz parte da microbiota natural dos organismos aquáticos (PAVANELLI; EIRAS; TAKEMOTO, 1998). Esta cepa já foi isolada de diversos surtos de mortalidade em cultivos de salmonídeos (*Salmo trutta*, *Oncorhynchus mykiss*, *O. tshawytscha*), carpas (*Cyprinus carpio* e *Labeo rohita*), enguias (*Anguilla japonica* e *A. rostrata*), kinguio (*Carassius auratus*), tilapia (*Tilapia nilotica*), paulistinha (*Danio rerio*), colisa (*Colisa lalia*) e inclusive bagres como catfish americano (*Ictalurus punctatus*), peixe gato (*Clarias batrachus*) e jundiá (*Rhamdia quelen*) (REHULKA, 2002; WOO; BRUNO, 2003; SAHOO et al., 2004; MASTAN; RAO, 2007; BARCELLOS et al., 2008; HOSSAIN, 2008, RODRIGUEZ; NOVOA; FIGUERA., 2008).

Sua transmissão ocorre horizontalmente, podendo ser pelas fezes e lesões externas na epiderme. Estas bactérias se multiplicam no intestino, causando hemorragias nas mucosas, onde metabólitos tóxicos são absorvidos pelo intestino induzindo a uma intoxicação, ocorrendo hemorragia na derme das nadadeiras e na mucosa do estômago (WOO; BRUNO, 2003).

Este agente têm a habilidade de aderir-se a células do hospedeiro como, por exemplo; eritrócitos, proteínas dos tecidos, o colágeno, proteínas séricas e glicoproteínas; por meio da ação de adesinas excretada por ele, facilitando assim a invasão no hospedeiro (vide revisão de AUSTIN; AUSTIN; 2007).

Toxinas como, as hemolisinas, proteases, enterotoxinas, endotoxinas, hemaglutininas e colinesterases produzidas por *A. hydrophila*, são estudadas por diversos autores por serem as causadoras das septicemias hemorrágicas e, conseqüentemente das mortalidades em

peixes (CAHILL, 1990; MAJUNDAR et al., 2006). Já as hemolisinas são proteínas citolíticas extracelulares que agem formando poros na membrana celular de eritrócitos por inserção na camada bilipídica, comprometendo a seletividade de filtração (HOWARD; BUCKLEY, 1985). Allan e Stevenson (1981) observaram alta correlação entre a quantidade de hemolisina produzida por *Aeromonas hydrophila* e sua patogenicidade para peixes.

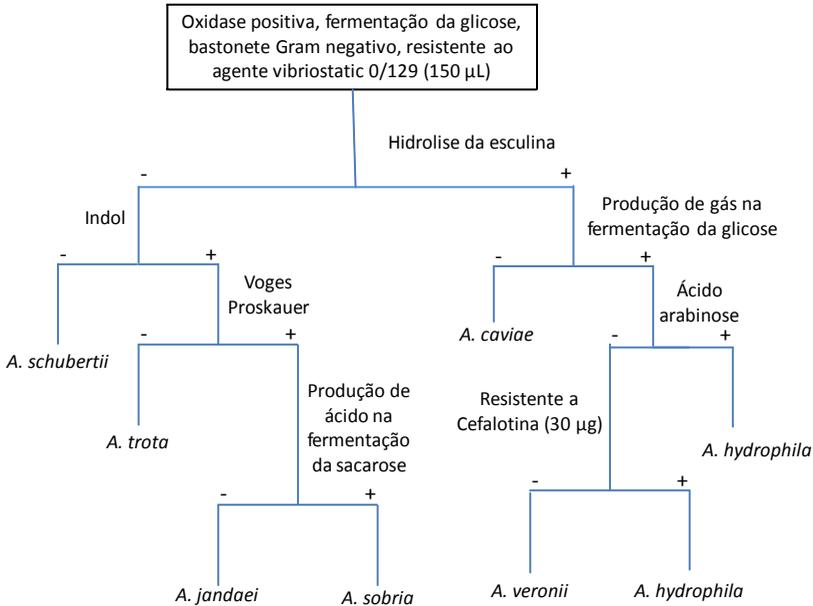
As enterotoxinas são produtos extracelulares que podem agir sobre o epitélio intestinal e causam inflamação. As hemaglutininas são componentes da camada superficial bacteriana que permite a sua ligação aos grupos receptores dos eritrócitos (CAHILL, 1990). As proteases podem contribuir para a patogenicidade e causar danos diretos nos tecidos ou aumentar a capacidade de invasão (SAKAI, 1985). Estas toxinas também podem estar envolvidas, na proteção do patógeno contra os efeitos soro-bactericidas dos hospedeiros, no fornecimento dos nutrientes para o crescimento após a destruição dos tecidos do hospedeiro, e pelo reforço da capacidade de invasão, e na ativação de hemolisina (vide revisão de AUSTIN; AUSTIN, 2007).

Estudos também revelam que diferentes temperaturas alteram a estrutura da membrana de *A. hydrophila*, alterando a virulência da bactéria. Em estudo com kinguio (*Carassius auratus*) infectados com *A. hydrophila* cultivada em meio de cultura por 24 h nas temperaturas de 10, 17, 25 e 32°C, os peixes infectados com as cepas crescidas a 17 e 25°C apresentaram maiores mortalidades e menores taxas fagocíticas dos macrófagos (RAHMAN; SUZUKI; KAWAI, 2001).

As aeromonioses ocorrem geralmente após uma queda da temperatura ou depois de uma manipulação ou transporte, ou seja, sempre quando há um fator que favorece a queda do sistema imunológico dos peixes (LIM; WEBSTER, 2006). Resumindo, os surtos de infecções por *Aeromonas* spp. estão associados às alterações nas condições ambientais e/ou fatores estressantes no cultivo (PAVANELLI; EIRAS; TAKEMOTO, 1998).

Diversos estudos têm relatado a mortalidade de peixes injetados com *A. hydrophila* em diferentes concentrações de bactérias. Ardo et al. (2008) observaram que a mortalidade em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) injetada com  $5 \times 10^7$  UFC·mL<sup>-1</sup>, foi de aproximadamente 85% após 72 horas, enquanto Bailone et al. (2010) verificaram mortalidade de 79,9% em tilápia do Nilo desafiada com  $1 \times 10^8$  UFC·mL<sup>-1</sup> em 96 horas. Em jundiá (*Rhamdia quelen*) inoculado com  $3,5 \times 10^8$  UFC·mL<sup>-1</sup> a mortalidade foi de 100% em 24 horas (BOIJINK; BRANDÃO, 2001), em pacu (*Piaractus mesopotamicus*) a DL<sub>50</sub> foi de  $6 \times 10^6$  UFC·mL<sup>-1</sup>

(GARCIA et al., 2007), em carpa rohu (*Cyprinus carpio*) injetada com  $5 \times 10^6$  UFC·mL<sup>-1</sup> a mortalidade foi de 23 a 65%, segundo os autores, tal variação neste caso se deve a alteração brusca de 2 a 3°C entre os tanques analisados (DAS MAHAPATRA et al., 2008).



**Figura 3** - Chave de identificação para *Aeromonas*, Aerokey II. Adaptado de Carnahan, Behram e Joseph (1991).

Para isolamento e confirmação do diagnóstico de *Aeromonas* é aconselhável o isolamento de pelo menos de 4 a 6 peixes (NOGA, 2000). Normalmente, em um meio não seletivo, como Agar triptona de soja (TSA, do inglês *Tryptic Soy Agar*). As colônias de *Aeromona* spp. são redondas com cor creme, tamanho de 2-3mm de diâmetro, desenvolvendo-se dentro de 48 horas a 25°C (AUSTIN; AUSTIN, 2007). Para identificação pelo perfil bioquímico pode-se utilizar o kit API 20E (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France), e na diferenciação das aeromonas móveis utiliza-se a chave de Aerokey II (Figura 3) (CARNAHAN; BEHRAM; JOSEPH, 1991).

Para identificação molecular de bactérias geralmente utiliza-se o sequenciamento direto do gene 16S rRNA, que é aceito como marcador estável e específico de bactérias. No entanto, alguns autores sugerem que microheterogeneidades (divergência nas sequências de

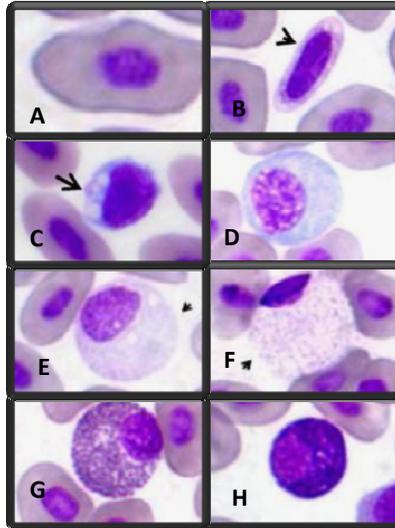
nucleotídeos), encontrado em algumas cepas de *Aeromonas* spp. pode alterar a inferir a filogênia do gene 16S rRNA (WOO; BRUNO, 2003). No entanto, Alperi et al. (2008) caracterizaram 999 cepas de *Aeromonas* usando o gene 16S, mostrando que este gene é considerado uma ferramenta útil para a identificação de espécies de *Aeromonas*. Isto porque mais de 91% dos isolados analisados pode ser identificada com a não utilização do sequenciamento genético por *rpoD*, pois não apresentaram as microheterogeneidades. Neste estudo, dentre as cepas que mais apresentaram as microheterogeneidades (cerca de 8% das cepas testadas) foram: *A. caviae*, *A. veronii* e *A. media*.

### **Hematologia e imunologia de peixes teleósteos**

O estudo da composição e da função dos componentes do sangue de peixes teleósteos é de fundamental importância na avaliação das condições fisiológicas, bioquímicas e patológicas dos peixes (TAVARES-DIAS, 2003). Os peixes teleósteos são animais que possuem sistema de defesa inato e adaptativo, ou seja, com memória imunológica, possuindo no sangue células, como: eritrócitos ou hemácias ou células vermelhas, leucócitos ou células brancas, e trombócitos (Figura 4). Porém, o estudo destas células em peixes é bastante diferenciado dos demais animais, como os mamíferos, pois a maturação de eritrócitos e leucócitos ocorre normalmente na corrente sanguínea, tornando a interpretação do hemograma diferenciada (SATAKE; PADUA; ISHIKAWA, 2009).

#### *Células vermelhas*

Os eritrócitos são as células mais numerosas do sangue, que contêm a hemoglobina como pigmento respiratório, que tem por função transportar o oxigênio (O<sub>2</sub>) e parte do gás carbônico (CO<sub>2</sub>) no sangue. A forma do eritrócito e sua extrema plasticidade favorecem sua circulação nos capilares e, assim, qualquer modificação na forma acarretará perturbação circulatória e favorecerá sua destruição. É importante destacar que qualquer deficiência no eritrócito poderá ser traduzida por uma falta de O<sub>2</sub> nos tecidos. As alterações em sua estrutura estão altamente relacionadas à resposta dos organismos frente a processos anemiantes (RANZANI-PAIVA; SILVA-SOUZA, 2004; SATAKE; PADUA; ISHIKAWA, 2009). Segundo Clauss, Dove e Arnold (2008) doenças em peixes causam anomalias em eritrócitos e conseqüentemente anemias, sendo *Aeromonas* spp. a causa mais comum de anemia hemolítica em peixes.



**Figura 4** - Células sanguíneas de peixes teleostes. A - Eritrócito, B - Trombócito, C - Linfócito, D - Monócito, E - Neutrófilo, F - LG-PAS, G - Eosinófilo, H - Basófilo. Adaptado de Satake, Padua e Ishikawa (2009).

#### *Trombócitos*

Em contraste com as plaquetas de mamíferos que são células anucleadas, os trombócitos de peixes são células completas (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004). Os trombócitos podem possuir formas variadas nos peixes: elípticos, arredondados, ovais, fusiformes; com núcleo grande que acompanha o formato da célula (RANZANI-PAIVA; SILVA-SOUZA, 2004). Além do seu papel de hemostasia, os trombócitos têm relevante participação no mecanismo de defesa orgânica, demonstrado pela sua presença nos processos de coagulação e inflamação, além de alguns autores sugerirem possível atividade fagocitária nos processos de infecção (TAVARES-DIAS, 2003; MARTINS et al., 2004). Tilápia do Nilo desafiada com *A. hydrophila* apresentaram aumento no número de trombócitos circulantes comprovando sua atuação na defesa do organismo (BAILONE et al., 2010).

#### *Células brancas*

Os leucócitos são células de defesa encontradas no sangue de peixes teleostes, e estão subdivididos em dois grupos: os não granulares (linfócitos e monócitos), e os leucócitos granulares

(neutrófilos, eosinófilos, basófilos e leucócitos granulares PAS positivo), e participam das respostas imunológicas de diferentes formas (FERNANDEZ; DE BLAS; RUIZ, 2002).

#### *Leucócitos não granulares*

Os linfócitos são leucócitos mais comuns e mais variados em teleósteos e elasmobrânquios saudáveis. Estas células são responsáveis pela resposta imune adaptativa humoral e celular, promovendo a produção de anticorpos, aumento da capacidade citotóxica, atuando no processo de memória imunológica e promovendo a liberação de fatores reguladores da função imune, como as linfocinas (YOSHINAGA et al., 1994). Os linfócitos se distinguem em dois grupos de populações chamados linfócitos B e T. Os linfócitos B se diferenciam em plasmócitos (linfócitos B ativados) e células de memória, participando da resposta imune humoral. Enquanto os linfócitos T diferencia-se em linfócitos T auxiliares, que reconhecem antígenos específicos ligados à marcadores e liberam mensageiros químicos que estimulam a atividade de células como os fagócitos; e linfócitos T citotóxicos, que reconhecem e destroem células infectadas.

Os linfócitos B e os diferentes linfócitos T, quando ativos, migram para o local de infecção ou para o timo e segregam substâncias tóxicas que matam as células anormais (TIZARD, 2002; SWAIN; SAHOO; AYYAPPAN, 2006). Segundo Clauss, Dove e Arnold (2008) a linfopenia (diminuição do número de linfócitos no sangue) sugere condição de imunossupressão, observada por exemplo, em uma infecção aguda. Já a linfocitose (aumento do número de linfócitos no sangue) em peixes pode sugerir estímulo imune, causado no início de uma infecção crônica ou após o uso de imunoestimulantes e vacinas. Linfocitose foi observada por Bailone et al. (2010) e por Silva et al. (2009) em tilápia do Nilo vacinada intraperitonealmente com antígeno polivalente.

Os monócitos são provavelmente as células sanguíneas mais importantes da resposta imune, não sendo importantes apenas pela produção de citocinas, mas também são as células primárias na apresentação dos antígenos em teleósteos. Estão envolvidas na fagocitose e na destruição de patógenos, que fazem o papel de interligar o sistema imune não específico ao específico, sendo isolado do sangue, órgão linfóide (rim) ou da cavidade peritoneal (VALLEJO; MILLER; CLEM, 1992; SHOEMAKER; KLESIUS; PLUMB, 1997). Dentre as principais características destacam-se a capacidade de ingerir material estranho ao organismo, inerte e antigênico, assim como restos celulares da resposta inflamatória e de outros processos degenerativos, além de

secretarem radicais livres de oxigênio e nitrogênio e destruir diferentes tipos de patógenos (ELLIS, 1999). Em processos de infecções bacterianas, normalmente ocorre a monocitose (aumento do número de monócitos) no sangue dos peixes teleósteos (CLAUSS; DOVE; ARNOLD, 2008).

#### *Leucócitos granulares*

Os neutrófilos são as células mais comuns entre as granulares e as primeiras envolvidas nos estágios iniciais de inflamação nos peixes (MANNING, 1994). Estas células possuem a capacidade de fagocitar e, no transcorrer da resposta imune, onde a maioria possui o material ingerido no seu fagossomo (FERNANDEZ; DE BLAS; RUIZ, 2002). Outra função importante descrita é a atividade microbicida desencadeada durante o processo denominado “explosão respiratória”, que consiste na conversão do oxigênio molecular em compostos e metabólitos derivados do oxigênio, como radicais livres do oxigênio (PLYZYCZ et al., 1989). Em situações de estresse, a quantidade dessas células pode aumentar significativamente em 24 horas. Porém, em situações de infecções bacterianas são observados neutrofilia (aumento do número de neutrófilos) no sangue (CLAUSS; DOVE; ARNOLD, 2008).

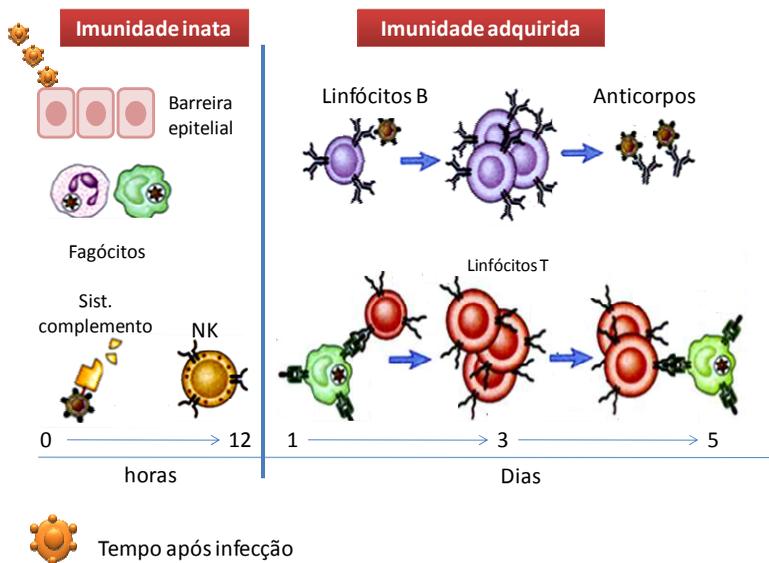
Os eosinófilos e basófilos se encontram distribuídos pelo tecido conjuntivo, especialmente no trato gastrointestinal e nas brânquias. A função dessas células nos peixes não estão totalmente esclarecidas, porém sabe-se que elas intervêm nos processos de inflamação crônica e na defesa celular mediante a degranulação, sendo mais comumente encontradas na corrente sanguínea quando há infestação por parasitos (HINE, 1992; RANZANI-PAIVA; SILVA-SOUZA, 2004).

Os leucócitos granulares PAS-positivos (LG-PAS), anteriormente chamados de células granulocíticas especiais (CGE), são pouco lembrados nos estudos hematológicos em peixes. São observados na sua forma mais imatura no tecido hematopoiético, apresentando formas maduras no sangue periférico, na submucosa intestinal, e em raspados da cavidade peritoneal e brânquias. Estão associadas às células de defesa do sistema imune inato, mas não possuem função fagocítica (RANZANI-PAIVA; SILVA-SOUZA, 2004).

#### *Sistema imunológico inato e adaptativo*

Os processos de defesa não específicos (inato), assim como o específico (adaptativo), podem ser de dois tipos: a imunidade mediada por células e a imunidade humoral (Figura 5). A imunidade celular não

específica envolve o monócito e os leucócitos granulares. Estas células são responsáveis por vários processos da resposta imune não específica (inflamação, fagocitose, fagocitose com células acessórias e citotoxicidade não específica). Já a resposta humoral não específica é composta por uma variedade de substâncias (lisozima, sistema complemento, interferon, proteína C reativa, transferrina e lectina) encontradas no muco, soro e ovos dos peixes, que inibem o crescimento de micro-organismos infecciosos (SECOMBES, 1996; YANO, 1996).



**Figura 5** - Representação das células responsáveis pelos sistemas imune inato e adaptativo. Adaptado de Abbas e Litchman (2003)

A imunidade celular específica está relacionada à capacidade dos linfócitos T reconhecerem alguns antígenos que se ligam a epítopos de certas células. Se uma bactéria for fagocitada pelo macrófago (monócito amadurecido no tecido), os fragmentos resultantes da fagocitose ligam-se a marcadores superficiais desse macrófago que os apresenta aos linfócitos T, estimulando assim a proliferação desta célula (SWAIN; SAHOO; AYYAPPAN, 2006).

Já quando há a ativação do sistema humoral específico, pela entrada de um antígeno no organismo chegando a um órgão linfóide, os linfócitos B dividem-se e formam células que sofrem diferenciação,

originando os plasmócitos (linfócitos B ativados) e células de memória. Os plasmócitos produzem anticorpos específicos a cada antígeno, que se encontram no sangue e migram para os locais da infecção. As células de memória tornam-se inativas, mas prontas a responder rapidamente, caso venha a acontecer um posterior contato com o antígeno (KAATTARI; FIGANELLI, 1996).

Os processos de aglutinação e inibição de patógenos são dois mecanismos importantes na resposta imune de peixes teleósteos, realizados por moléculas presentes no soro sanguíneo. As moléculas responsáveis pela aglutinação são as lectinas e as imunoglobulinas (Ig). As lectinas são proteínas capazes de se ligar a alguns açúcares, principalmente manoses, encontrados na parede de bactérias Gram negativas ou Gram positivas, porém, não possui tanta especificidade quanto as Ig's. Contudo, as moléculas com maior capacidade aglutinante são as Ig, que possuem uma ação mais específica entre os antígenos, sendo produzidas pelos linfócitos B. Silva et al. (2009) e Swain et al. (2007) relataram aumento do título de aglutinação no soro sanguíneo de tilápia do Nilo e carpa indiana (*Labeo rohita*), respectivamente, após vacinarem com antígenos polivalentes.

Na circulação sanguínea de peixes teleósteos é encontrado apenas IgM, possuindo estrutura tetrâmera ou pentâmera, ao contrário dos mamíferos que possuem diversos tipos de Ig (IgA, IgD, IgM, IgG). Tanto as lectinas como as Ig também possuem função de opsonina (molécula que age como facilitadora de ligação no processo de fagocitose) e estão envolvidas na ativação do sistema complemento, cascata proteolítica responsável por clivar organismos invasores (ELLIS, 1999; SWAIN; SAHOO; AYYAPPAN, 2006).

A atividade antimicrobiana do soro sanguíneo dos peixes teleósteos se deve a diversos tipos de proteínas e enzimas. A lisozima é uma enzima importante no combate de infecções tanto para vertebrados como invertebrados, e em peixes teleósteos é produzida por neutrófilos e monócitos, encontrando-se em maior quantidade nos rins. Esta enzima possui ação, principalmente, contra as bactérias Gram-positivas, porém também pode ajudar a inibir Gram-negativas, e ainda pode possuir função de opsonina (MAGNADÓTTIR, 2006; SAURABH; SAHOO, 2008). Há ainda outros tipos de inibidores microbianos presentes no sangue, como a transferrina, a qual instabilizam o ferro disponível, importante nutriente para manutenção das bactérias; peptídeos antimicrobianos, que possuem ação rápida e eficaz, pois atuam diretamente nas membranas dos patógenos provocando sua destabilização; antiproteases, como a  $\alpha$ 2-macroglobulina que inibe a

ação de toxinas proteolíticas produzidas pelas bactérias (ELLIS, 1999; MAGNADÓTTIR, 2006).



## CAPÍTULO 2

### **SEPTICEMIA HEMORRÁGICA EM SURUBIM HÍBRIDO (*Pseudoplatystoma* sp.) CAUSADA POR *Aeromonas hydrophila***

#### ***Aeromonas hydrophila* COMO PATÓGENO DE SURUBIM**

Bruno C. da Silva<sup>1,2,\*</sup>, José Luiz P. Mouriño<sup>1,2</sup>, Felipe N. Vieira<sup>2</sup>,  
Adolfo Jatobá<sup>2</sup>, Walter Q. Seiffert<sup>2</sup>, Mauricio L. Martins<sup>1</sup>

1 Laboratório AQUOS – Sanidade de Organismos Aquáticos,  
Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil.  
Rod. Ademar Gonzaga, 1346, Florianópolis, SC, Brasil. CEP 88040-900. Tel:  
55 48-37219923

2 Laboratório de Camarões Marinhos, Departamento de Aquicultura,  
Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil. Servidão dos Coroas s/n  
(fundos), Barra da Lagoa, Florianópolis, SC, Brazil. CEP: 88061-600. Tel: 55  
48-32313410 FAX: 55 48-32313434

\* E-mail: bcs85@hotmail.com (B.C. Silva)

\*Artigo formatado de acordo com as normas da revista  
“Aquaculture Research” (A2, Fator de impacto: 1,099).

## RESUMO

O cultivo intensivo de surubim híbrido no Brasil é responsável pelo aparecimento de enfermidades e conseqüentemente grandes perdas econômicas durante o cultivo, porém, pouco se sabe sobre o agente causador. O objetivo deste estudo foi isolar e caracterizar o agente patogênico causador de mortalidades em cultivo de surubins, e comprovar por meio de desafio experimental a sua virulência. Foram coletados dez peixes em fazenda do estado de Mato Grosso do Sul (Brasil), e isoladas 14 cepas de bactérias hemolíticas do rim (8) e do cérebro (6), caracterizadas como *Aeromonas hydrophila hydrophila*. Esta cepa foi utilizada no desafio experimental onde 144 surubins, com  $98,1 \pm 23,6$  g, foram desafiados com 1mL de salina e  $2 \times 10^2$ ,  $10^4$ ,  $10^6$  e  $10^8$  UFC de *A. hydrophila*·mL<sup>-1</sup>. Os peixes desafiados com maior concentração de bactérias apresentaram maior prevalência dos sintomas externos e internos e mortalidade de  $50 \pm 12,5\%$  após 96 h. Verificou-se que o aumento na concentração de *A. hydrophila* usada no desafio resultou em diminuição no percentual de hematócrito e do número de eritrócitos, linfócitos e eosinófilos, bem como aumento no número de monócitos, neutrófilos, títulos de aglutinação e atividade antimicrobiana do soro. Conclui-se que *A. hydrophila hydrophila* foi responsável por sintomas característicos de septicemia hemorrágica bacteriana (BHS), além de alterações hematológicas e imunológicas que resultaram em mortalidade do peixe.

**Palavras-chave:** *Pseudoplatystoma* sp., aeromoniose, infecção, hematologia, imunologia.

## ABSTRACT

Intensive culture of the hybrid surubim in Brazil is responsible for the occurrence of diseases and consequently great economic losses during the rearing. However, the causative agent is few known. The objective of this study was to isolate and characterize the pathogenic agent responsible for the mortalities in cultured surubim, and to demonstrate its virulence. Ten fish from a fishfarm located in the State of Mato Grosso do Sul (Brazil), 14 haemolytic bacteria were isolated from kidney (8) and brain (6) and characterized as *Aeromonas hydrophila hydrophila*. This strain was used in the experimental trial where the fish with  $98.1 \pm 23.6$  g, were challenged with 1mL of saline,  $2 \times 10^2$ ,  $10^4$ ,  $10^6$  and  $10^8$  CFU *A. hydrophila*·mL<sup>-1</sup>. Fish challenged with the higher concentration of bacteria showed increased external and internal symptoms and a mortality rate of  $50 \pm 12.5\%$  after 96 h. As a result of an increase in the *A. hydrophila* concentration used in challenge a decrease in the haematocrit percentage and the number of red blood cells, lymphocytes, and eosinophils, as well as an increase in the number of monocytes, neutrophils, agglutination titers, and antimicrobial activity in the serum. It was concluded that *A. hydrophila hydrophila* was responsible for characteristic symptoms of bacterial hemorrhagic septicemia (BHS) beyond an important haematological and immunological alterations, which led in fish mortality.

**Keywords:** *Pseudoplatystoma* sp., aeromoniosis, infection, hematology, immunology.

## INTRODUÇÃO

O surubim híbrido, resultado do cruzamento entre o pintado (*Pseudoplatystoma corruscans* Spix, Agassiz 1829) e cachara (*P. fasciatum* Linnaeus 1766), é cultivado no Brasil e compreende os maiores bagres de água doce da América do Sul, possuindo alto valor comercial (Godinho, Kynard & Godinho 2007). Entretanto, o crescimento e a intensificação da produção envolvem estresse e acúmulo excessivo de nutrientes no ambiente de cultivo. Consequentemente, as bactérias oportunistas que fazem parte da microbiota da água e do trato digestório de peixes intensificam seu potencial patogênico quando as condições do ambiente e do animal estiverem alteradas, resultando no surto de doenças e gerando mortalidades (Woo & Bruno 2003).

Mortalidades causadas por bactérias são a maior causa de perdas econômicas na piscicultura, sendo encontradas nos órgãos internos, como o rim, fígado, intestino, coração, cérebro, baço. Doenças em *Pseudoplatystoma* sp. causam importantes perdas nos cultivos (Gianquito & Volpato 2005), porém quase nenhum estudo tem sido feito para identificação do agente patogênico. Apesar disto, surtos de doenças em fazendas de surubim no inverno, causam sintomas como hemorragia no intestino e ânus, lesões externas e vermelhidão na base das nadadeiras, sendo responsáveis por mortalidades de até 80% da produção (Campos 2004).

Desde o seu reconhecimento como agente causador de septicemia hemorrágica bacteriana (BHS, do inglês *Bacterial hemorrhagic septicemia*), as aeromonas móveis foram consideradas patógenos que afetam grande variedade de espécies de peixes continentais (Woo & Bruno 2003). Holliman (1993) reconhece que entre as aeromonas móveis as mais virulentas são as cepas de *Aeromonas hydrophila*, sendo considerada também como zoonose, pois causa diarreia e septicemia em humanos (Deodhar, Saraswathi & Varudkar 1991).

Estudos hematológicos de peixes teleosteos são fundamentais para avaliação das condições fisiológica, bioquímica e patológica dos peixes (Tavares-Dias & Moraes 2004). As doenças bacterianas causam alterações hematológicas importantes em peixes, ocasionando alterações imunológicas (Clauss, Dove & Arnold 2008). A inoculação de *A. hydrophila* resultou no aumento nos números totais de leucócitos e trombócitos em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Bailone, Martins, Mouriño, Vieira, Pedrotti, Nunes & Silva 2010) e na redução do número de linfócitos em pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (Garcia, Pilarski, Onaka, Moraes & Martins 2007), enquanto que em carpa

comum (*Cyprinus carpio*) desafiada com LPS de *A. hydrophila* foi observado aumento do número de monócitos e neutrófilos (Selvaraj, Sampath & Sekar 2004).

O objetivo deste estudo foi isolar e caracterizar o agente patogênico causador de mortalidades em cultivo de surubins, e comprovar por meio de desafio experimental sua virulência analisando a taxa de mortalidade, sintomatologia e parâmetros hemato-imunológicos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Isolamento de patógenos**

Durante surto de mortalidade no ano de 2009 em fazendas do estado de Mato Grosso do Sul, região Centro-Oeste do Brasil, foram coletados 10 surubins enfermos (*Pseudoplatystoma corruscans* macho x *P. fasciatum* fêmea), entre 100 a 500 g, para isolamento de bactérias patogênicas. As mortalidades nas fazendas da região neste ano chegaram a 20 toneladas, causando um prejuízo de aproximadamente R\$260.000,00 (dados extraoficiais). Geralmente estas mortalidades eram vistas após algum manejo nos peixes quando a temperatura da água estava abaixo de 18°C. Os peixes apresentavam anemia, hemorragia no ânus, anorexia, natação errática, letargia, hemorragia na base das nadadeiras e ulcerações na epiderme. Foram extirpados rim e cérebro, macerados em gral de porcelana estéril na proporção de 1g de amostra para 1mL de solução salina estéril a 0,65%. O macerado foi diluído em série (1:10) e semeado em placas de petri contendo Agar triptona de soja (TSA, *Tryptone Soya Agar*) com 5% de sangue de carneiro, e incubadas a 26°C. Depois de averiguado o crescimento de colônias hemolíticas foi realizado as purificações por esgotamento.

### **Caracterização bioquímica e molecular**

Para caracterização fenotípica foram analisados o perfil bioquímico utilizando kit de identificação API 20E (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France), e realizadas as análises de hidrólise da esculina e produção de gás na fermentação da glicose, para diferenciação entre as *Aeromonas hydrophila*, *A. sobria* e *A. caviae*, segundo a chave de identificação Aerokey II (Carnahan, Behram & Joseph 2001).

A identificação molecular foi realizada pela Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) por meio de amplificação do gene do RNAr 16S, por PCR. Os fragmentos de DNAr amplificados foram purificados e submetidos diretamente ao sequenciamento em sequenciador automático MegaBACE 1000 (GE Healthcare). Os

primers utilizados para o sequenciamento foram p10f, 765f, 782r e p1100r. Suas sequências parciais obtidas com diferentes primers foram montadas em um *cotig* (sequência única combinando os diferentes fragmentos obtidos), o qual foi comparado com as sequências de organismos representadas no Genbank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) e do RDP (<http://rdp.cme.msu.edu>). Foram então selecionadas sequências de organismos relacionados ao organismo desconhecido para realização das análises filogenéticas.

### **Desafio experimental**

A cepa selecionada foi esgotada em placa de Petri contendo meio de cultura TSA. Em seguida uma colônia da bactéria foi inoculada em meio de cultura caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) e incubada a 28°C por 18 h. Após o crescimento, a cultura foi diluída em série (1:10) até a diluição  $10^{-8}$ , sendo semeadas em TSA para contagem total de unidades formadoras de colônia (UFC) do inóculo. Este foi diluído serialmente em BHI (1:2) em triplicata nas microplacas de 96 poços até o 12° poço, e a absorbância medida em leitor de microplaca no comprimento de onda de 630nm, para confecção da curva de crescimento (Concentração bacteriana x Absorbância).

Para infecção experimental, o inóculo crescido em BHI por 18h em 28°C, foi centrifugado 30 minutos a 1800 g. O sobrenadante foi descartado e o pelete re-suspendido em solução salina estéril 0,65% na proporção para que a suspensão se mantivesse em  $2 \times 10^8$  UFC·mL<sup>-1</sup> segundo a curva de crescimento feita anteriormente. Posteriormente, a suspensão foi diluída até as concentrações desejadas para desafio experimental.

Para o desafio 144 surubins híbridos (*Pseudoplatystoma corruscans* macho x *P. fasciatum* fêmea), com peso médio de  $98,1 \pm 23,6$ g e comprimento de  $26,9 \pm 1,7$ cm, foram distribuídos em 18 unidades experimentais de 300L, com aeração contínua, filtro biológico e aquecedores com termostatos, mantendo a temperatura em  $26 \pm 0,5$ °C. Após cinco dias de aclimação, as 18 unidades experimentais foram divididas aleatoriamente em seis tratamentos.

Os tratamentos consistiram em peixes não injetados, injetados via intraperitoneal e com 1mL de solução salina estéril, e mais quatro tratamentos com peixes desafiados com 1mL de  $2 \times 10^2$ ,  $10^4$ ,  $10^6$  e  $10^8$  UFC·mL<sup>-1</sup> da bactéria isolada. Cada tratamento contou com três réplicas delineadas completamente ao acaso (Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina, CEUA 23080.021883/2009-91). Diariamente foram mensurados o pH, amônia

total e oxigênio dissolvido da água. Duas vezes ao dia era fornecido a cada unidade, ração comercial com 40% proteína bruta (Douramix<sup>®</sup> - Revolution Alevino), totalizando 3% da biomassa dos peixes.

### **Mortalidade, sintomatologia e re-isolamento da bactéria**

O experimento foi conduzido 10 dias após o desafio. A retirada dos peixes mortos foi feita a cada seis horas. Os sobreviventes foram sacrificados para o diagnóstico microbiológico e sintomatológico. Ao final do experimento foram coletadas amostras do cérebro, rim, coração e fígado de três animais por unidade experimental em *pool* para re-isolamento da bactéria patogênica em meio de cultura TSA. Os tecidos foram processados assim como no isolamento. Após o crescimento em placa e as colônias re-isoladas, estas foram caracterizadas fenotipicamente pelo perfil bioquímico através do kit de identificação API 20E (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France), complementado com as análises de hidrólise da esculina e produção de gás na fermentação da glucose.

### **Análises hematológicas e imunológicas**

Ao término do experimento, três peixes de cada unidade experimental foram amostrados, anestesiados com benzocáina ( $0,1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) e o sangue coletado por punção do vaso caudal em duas seringas de 3 mL (21G), uma contendo anticoagulante EDTA 10% e outra sem anticoagulante. O sangue com anticoagulante foi utilizado para realizar as análises hematológicas. Já o sangue coletado sem anticoagulante ficou em repouso durante 1h a  $25^{\circ}\text{C}$  para coagulação, sendo posteriormente centrifugado a  $1400\text{ g}$  por 10 minutos para obtenção do soro sanguíneo para armazenamento a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o dia das análises de atividade antimicrobiana e título de aglutinação do soro.

O sangue coletado com seringa contendo anticoagulante foi utilizado para confecção de duplicatas de extensões sanguíneas coradas com Giemsa/MayGrunwald para contagem diferencial de leucócitos e contagens totais de trombócitos e leucócitos. Uma alíquota foi utilizada para a determinação do hematócrito (Goldenfarb, Bowyer, Hall & Brosius 1971) e o restante armazenado em frascos de vidro no gelo para quantificar o número total de eritrócitos em hemocitômetro. Os números totais de trombócitos e leucócitos foram obtidos na extensão sanguínea pelo método indireto descrito por Ishikawa, Ranzani-Paiva & Lombardi (2008).

Os títulos de aglutinação foram feitos segundo o método descrito por Silva, Martins, Jatobá, Buglione, Vieira, Pereira, Jerônimo, Seiffert

& Mouriño (2009), para cepa de bactéria utilizada no experimento O teste foi feito com microplaca de 96 poços de fundo U onde o soro diluído na proporção de 1:1 em solução tampão fosfato salino (PBS, 0.04M de Fosfato monobásico, 0.16M de Fosfato dibásico, 0.11M de Cloreto de Sódio, pH 7.2) no 1° poço (50µL de solução PBS:50µL do soro), sendo diluído serialmente em fator 1:2 para os demais poços até o 12°. Depois disso, foram adicionados 50µL da bactéria inativada com 1% de formalina em todos os poços. A microplaca foi incubada a 25°C durante 18 horas em câmara úmida. A aglutinação foi confirmada com a observação de um precipitado no fundo do poço a olho nu. O título aglutinante foi considerado como o recíproco da última diluição que apresentou aglutinação.

A atividade antimicrobiana do soro contra a bactéria utilizada no desafio foi realizada em microplaca de 96 poços com fundo chato, com metodologia utilizada por Silva et al. (2009). O inóculo cultivado em BHI a 30°C por 24 h foi preparado na concentração de 0,5 na escala de Macfarland e diluído em meio de cultura Poor broth (PB) 100.000 vezes. Então, 150µL de PB foram adicionados no 1° poço da linha e 100µL nos demais poços, e 50µL do soro adicionado ao primeiro poço da linha. Posteriormente, foi realizada uma diluição seriada fator 1:2 até o 12° poço. Para controle positivo e branco, solução salina foi diluída em PB, da mesma forma do que para o soro. Finalmente, 20µL da bactéria foram adicionados em cada poço da amostra diluída do soro e do controle positivo. A microplaca foi incubada a 28°C por 12 horas com agitação orbital e o crescimento dos micro-organismos determinado em leitora de microplaca no comprimento de onda de 550nm. A atividade antimicrobiana do soro é recíproca da última diluição que apresentou atividade bactericida ou bacteriostática.

### **Análises estatísticas**

Os efeitos entre as diferentes concentrações de bactérias no desafio nas respostas hematológicas e imunológicas foram avaliados mediante o uso de modelos de regressões. Anteriormente, foi avaliado a homocedastidade dos dados através do teste de Bartlett ( $p < 0,05$ ) e os dados de aglutinação e atividade antimicrobiana do soro foram transformados em  $\log_2(x+1)$ . O ajustamento dos dados ao modelo foi verificado com base na significância ( $p < 0,05$ ) dos coeficientes de regressão pelo teste t, no coeficiente de determinação ( $R^2 = S.Q.Reg./S.Q.Tratamento$ ), na soma de quadrado dos desvios e no fenômeno em estudo.

## RESULTADOS

### Identificação bioquímica e molecular

No total foram isoladas 14 cepas hemolíticas, oito do rim e seis do cérebro, onde todas as cepas isoladas foram identificadas como *Aeromonas hydrophila* (99,7%) com mesmo perfil bioquímico. Por este motivo, foi selecionada apenas uma cepa, isolada do cérebro (CPQBA 228-08 DRM), para ser utilizada na identificação molecular e desafio experimental, exibindo 99% de similaridade com o gene 16S rRNA de *Aeromonas hydrophila hydrophila* contidas nas bases de dados consultadas. A análise filogenética recuperando as amostras da cepa em agrupamento coeso e com valor de *bootstrap* de 82% com a linhagem tipo de *A. hydrophila hydrophila* (ATCC 7966 – X74677 ), confirmou os resultados de busca nas bases de dados.

### Qualidade da água, mortalidade e sintomatologia

Durante o período do desafio experimental o pH se manteve em  $7,5\pm 0,2$ , amônia total  $2,07\pm 1,5$  mg·mL<sup>-1</sup>, amônia tóxica  $0,04\pm 0,03$  mg·mL<sup>-1</sup> e oxigênio dissolvido da água  $6,4\pm 0,4$  mg·L<sup>-1</sup>. As mortalidades foram observadas até 96 horas após o desafio, porém até o nono dia os peixes ainda apresentavam aumento nos sintomas externos, e no décimo dia foram realizadas as coletas. Apenas os peixes desafiados com  $2\times 10^8$  *A. hydrophila*·mL<sup>-1</sup> apresentaram mortalidades ( $50\pm 12,5\%$ ), porém os peixes de todos os tratamentos desafiados apresentaram sintomas, enquanto que os peixes não injetados e injetados com salina não apresentaram sintomas externos nem internos. Nos animais desafiados com as concentrações mais elevadas de *A. hydrophila* foi observado aumento na prevalência dos sintomas externos e internos (Tabela 1).

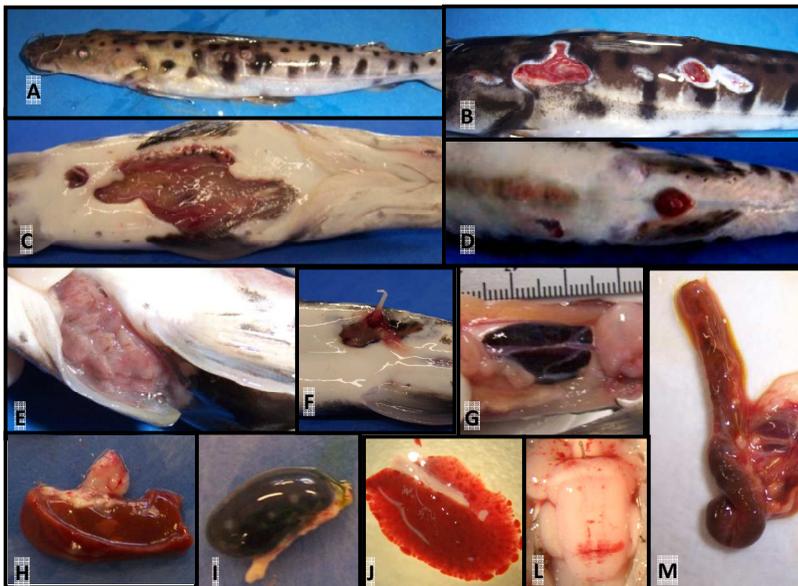
A avaliação clínica mostrou despigmentação (Figura 6a), ulceração na região ventral e dorsal (Figura 6b e 6c), hemorragia no ânus e inchaço da cavidade visceral (Figura 6d), palidez das brânquias (Figura 6e), erosão nas nadadeiras anais (Figura 6f). Internamente foram observadas alterações no fígado (pontos hemorrágicos, ulcerações, descoloração) e rim (hemorragia, hipertrofia e liquefação) (Figura 6g e 6h), pontos brancos na vesícula biliar (Figura 6i), pontos hemorrágicos no coração e cérebro (Figura 6j e 6l) e hemorragia no intestino (Figura 6m).

**Tabela 1** - Prevalência de sintomas externos e internos dos surubins híbridos sobreviventes ao desafio com diferentes concentrações de *Aeromonas hydrophila hydrophila*.

<b>Tratamentos</b>	<b>LE</b>	<b>IA</b>	<b>IIN</b>	<b>AF</b>
Não injetados	0/24	0/24	0/24	0/24
Salina	0/24	0/24	0/24	0/24
2x10 <sup>2</sup> <i>A. hydrophila</i> /mL	6/24	6/24	3/24	3/24
2x10 <sup>4</sup> <i>A. hydrophila</i> /mL	2/24	6/24	2/24	6/24
2x10 <sup>6</sup> <i>A. hydrophila</i> /mL	4/24	6/24	5/24	12/24
2x10 <sup>8</sup> <i>A. hydrophila</i> /mL	10/12	6/12	4/12	12/12
<b>Tratamentos</b>	<b>AR</b>	<b>PBV</b>	<b>PHC</b>	<b>HC</b>
Não injetados	0/24	0/24	0/24	0/24
Salina	0/24	0/24	0/24	0/24
2x10 <sup>2</sup> <i>A. hydrophila</i> /mL	5/24	6/24	6/24	4/24
2x10 <sup>4</sup> <i>A. hydrophila</i> /mL	6/24	6/24	6/24	6/24
2x10 <sup>6</sup> <i>A. hydrophila</i> /mL	6/24	5/24	11/24	10/24
2x10 <sup>8</sup> <i>A. hydrophila</i> /mL	8/12	6/12	6/12	10/12

LE – Lesões externas, IA – Inflamação no ânus, IIN – Inflamação intestinal, AF – Alteração no fígado, AR – Alteração intestinal, PBV – Pontos brancos na vesícula, PHC – Pontos hemorrágicos no coração, HC – Pontos hemorrágico no cérebro.

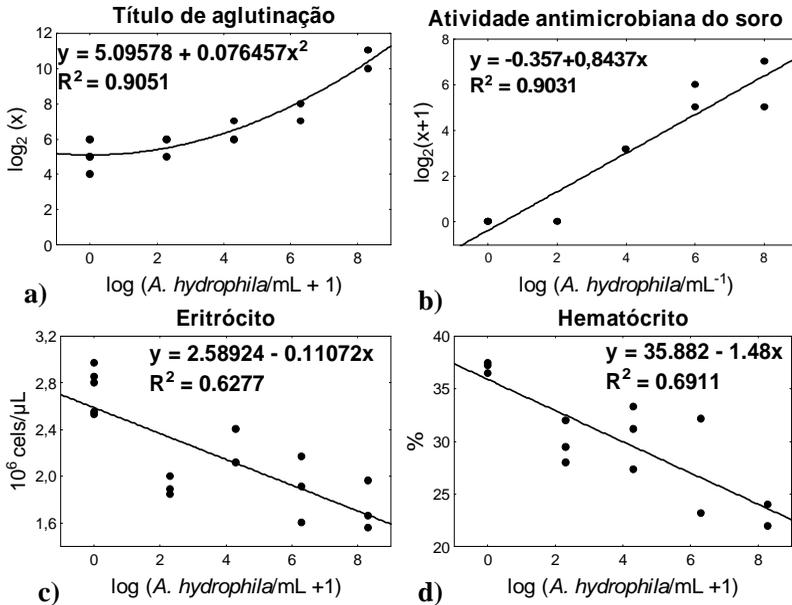
As amostras semeadas em TSA dos cérebros, fígados, rins e corações dos peixes não injetados e injetados com salina não apresentaram crescimento de bactérias detectáveis, enquanto que as amostras dos peixes desafiados apresentaram, em todas as concentrações de *Aeromonas hydrophila*, crescimento de colônias com coloração castanha e formato redondo, semelhante a *A. hydrophila* usada no desafio. Após o re-isolamento e caracterização bioquímica, estas colônias apresentaram o mesmo perfil bioquímico no API 20E da *A. hydrophila* (99,7%) utilizada no desafio. Comprovando a eficiência do desafio experimental, e que estas bactérias estavam presentes e causando danos nos órgãos internos, mesmo após 10 dias de inoculação.



**Figura 6** – Sintomatologia de surubins híbridos sobreviventes ao desafio com *Aeromonas hydrophila hydrophila*. A – Despigmentação da epiderme, B – Ulceração dorsal, C – Ulceração ventral, D – Inchaço abdominal e inflamação no ânus, E – Palidez das brânquias, F – Erosão de nadadeira, G - Hipertrofia do rim, H – Hemorragia no fígado, I – Pontos brancos na vesícula, J – Pontos hemorrágicos no coração, L – Pontos hemorrágicos no cérebro, M – Inflamação intestinal.

### **Análises hematológicas e imunológicas**

A relação do título de aglutinação e atividade antimicrobiana do soro com a concentração de *Aeromonas hydrophila* foi explicada pela relação quadrática e linear, respectivamente (Figura 7a e 7b). Nos peixes submetidos às concentrações mais elevadas ( $10^6$  e  $10^8$  UFC·mL<sup>-1</sup>) e sobreviventes, após 10 dias do desafio, foram observados valores superiores para o título de aglutinação e atividade antimicrobiana.



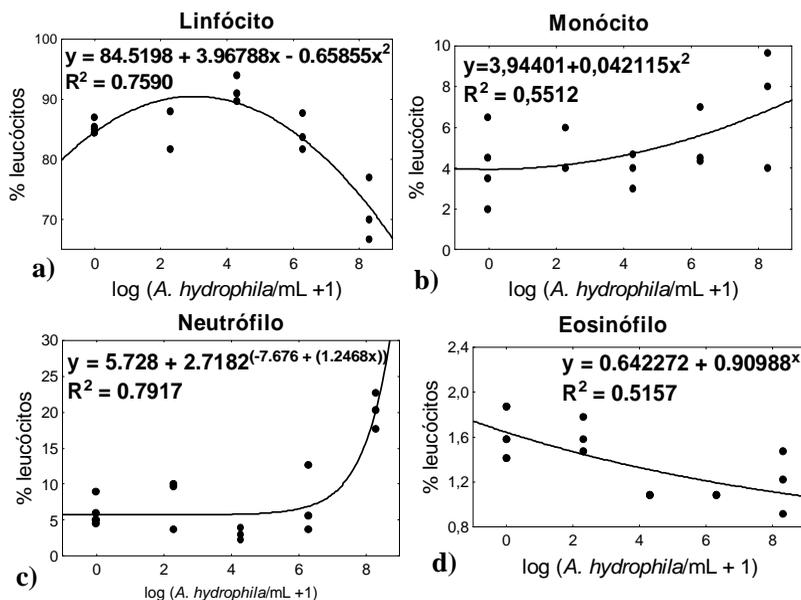
**Figura 7** - Análise de regressão do título de aglutinação, atividade antimicrobiana do soro, contagem total de eritrócito e porcentagem de hematócrito de surubins híbridos desafiados com diferentes concentrações de *Aeromonas hydrophila hydrophila*.

A contagem total de trombócitos e leucócitos, e a porcentagem de basófilos e LG-PAS não apresentaram relação significativa com a concentração de *A. hydrophila* após o desafio ( $p > 0,05$ ). Os valores variaram de 20,12 a 25,03 x 10<sup>3</sup> trombócitos·mL<sup>-1</sup>; 43,34 a 53,71 x 10<sup>3</sup> leucócitos·mL<sup>-1</sup> e 0,04 a 1,62 x 10<sup>3</sup> basófilos·mL<sup>-1</sup>. A contagem total de eritrócitos e o hematócrito (Figura 7c e 7d) foi melhor explicada pela regressão linear, apresentando decréscimo nos peixes desafiados com maiores concentrações de *A. hydrophila*.

Observou-se linfocitose nos peixes desafiados com as concentrações mais baixas de *A. hydrophila*, demonstrando pequeno estímulo na produção de linfócitos, enquanto que os desafiados com as maiores concentrações apresentaram linfopenia significativa (Figura 8a).

Neutrofilia e monocitose foram observados nos animais desafiados, principalmente nos sobreviventes desafiados com a maior concentração de *A. hydrophila* (10<sup>8</sup> UFC·mL<sup>-1</sup>), mostrando o estímulo destas células para combater a infecção instalada (Figura 8b e 8c). Já a

porcentagem de eosinófilos apresentou relação decrescente nos peixes desafiados com as maiores concentrações de *A. hydrophila* (Figura 8d).



**Figura 8** - Análise de regressão da porcentagem de linfócitos, monócitos, neutrófilos e eosinófilos de surubins híbridos desafiados com diferentes concentrações de *Aeromonas hydrophila hydrophila*.

## DISCUSSÃO

*Aeromonas hydrophila hydrophila* têm sido relatada como patógeno primário de peixes e as doenças atribuídas a esta bactéria têm grande importância econômica nos cultivos de peixes continentais (Woo & Bruno 2003). Assim como neste estudo, esta bactéria foi isolada de diversos surtos de mortalidade em cultivos de salmonídeos (*Salmo trutta*, *Oncorhynchus mykiss*, *O.tshawyscha*) (Rehulka 2002; Woo & Bruno 2003), carpas (*Cyprinus carpio* e *Labeo rohita*) (Sahoo, Meher, Das Mahapatra, Saha, Jana & Reddy 2004; Selvaraj et al. 2004, paulistinha (*Danio rerio*) (Rodriguez, Novoa & Figueras 2008), colisa (*Colisa lalia*) (Hossain 2008) e inclusive em bagres como peixe gato (*Clarias batrachus*) (Mastan & Rao 2007) e jundiá (*Rhamdia quelen*) (Barcellos, Kreutz, Rodrigues, Santos, Motta, Ritter, Bedin & Silva 2008).

Sintomas semelhantes aos descritos neste trabalho são comumente encontrados em peixes com septicemia hemorrágica bacteriana (Woo & Bruno, 2003; Austin & Austin, 2007), sendo observados em jundiás (Bojink & Brandão 2001), carpa rohu (Das Mahapatra, Gjerde, Sahoo, Saha., Barat, Sahoo, Mohanty, Ødegård, Rye & Salte 2008), paulistinha (Rodriguez et al. 2008), carpa comum (Schroers, Van der Marel, Neuhaus & Steinhagen 2009).

Neste estudo, os fatores ambientais e de manejo estavam adequados para a espécie, o que explicaria a sobrevivência de peixes, mesmo com ulcerações na epiderme e septicemia nos órgãos internos em estado avançado (Figura 1), já que nos cultivos as mortalidades costumam ocorrer no inverno com temperaturas abaixo de 18°C.

O anticorpo é um dos maiores responsáveis pelo processo de aglutinação em peixes (Ellis 1999), explicando assim o aumento deste índice em peixes desafiados, principalmente com as maiores concentrações, sendo estes sobreviventes os mais imunoestimulados a produzir anticorpos devido à maior carga bacteriana. Truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e carpa comum também apresentaram aumento no título de aglutinação após desafio com LPS de *Aeromonas salmonicida* e *A. hydrophila*, respectivamente (Nakhla, Szalai, Banoub & Keough 1997; Selvaraj et al. 2004).

Já o soro dos surubins infectados com *A. hydrophila* apresentou maior atividade antimicrobiana contra a bactéria da infecção corroborando os estudos de carpa rohu infectadas experimentalmente com *A. hydrophila* (Sahoo et al. 2004; Sahu, Das, Mishra, Pradhan, Samal & Sarangi 2008).

A redução no número de eritrócitos e no percentual de hematócrito nos peixes desafiados com maiores concentrações de *A. hydrophila*, corroborou as observações de Rehulka, (2002) em truta arco-íris desafiada com *Aeromonas sobria* e *A. caviae*. Segundo Clauss et al. (2008) doenças em peixes causam anomalias em eritrócitos e consequentemente anemia, sendo *Aeromonas* spp. a causa mais comum de anemia hemolítica em peixes.

Ao contrário deste estudo, em pacu (Garcia et al. 2007) e tilápia do Nilo (Martins, Mourriño, Amaral, Vieira, Dotta, Jatobá, Pedrotti, Jerônimo, Buglione-Neto & Pereira-Jr. 2008), as contagens de trombócitos e leucócitos totais aumentaram após os desafios com *Aeromonas hydrophila* e *Enterococcus* sp., respectivamente. É importante enfatizar que nos estudos de Garcia et al. (2007) e Martins et al. (2008) as amostras de sangue foram coletadas 24 horas após infecção

enquanto no presente estudo as amostras foram coletadas 10 dias após o desafio.

A porcentagem de linfócitos circulantes em relação à concentração de *A. hydrophila*, neste estudo, seguiu o padrão sugerido por Clauss et al. (2008) o qual infere que a linfocitose em peixes pode sugerir um estímulo imune, enquanto a linfopenia sugere condição de imunossupressão. Fato comprovado pelo aumento no número destas células em tilápia do Nilo após vacinação polivalente, conforme observado por Bailone et al. (2010). Estes autores verificaram que 48 horas após o desafio o número de linfócitos em peixes vacinados se manteve maior do que os peixes não vacinados. Em pacu, Garcia et al. (2007) observaram redução de linfócitos após o desafio com *A. hydrophila* ( $6 \times 10^6$  UFC·mL<sup>-1</sup>). Shao, Liu & Xiang (2004) relataram que *A. hydrophila* pode causar apoptose em linfócitos de kinguios (*Carassius auratus*), sendo o primeiro relato de apoptose de bactérias patogênicas em células imunológicas de peixe, explicando assim a redução destas células nos peixes desafiados com as maiores concentrações.

Monocitose e neutrofilia são normalmente observados em processos inflamatórios (Clauss et al. 2008), como foi observado nos surubins sobreviventes ao desafio com *A. hydrophila*. Além da monocitose e neutrofilia, o decréscimo no número de eosinófilos observado neste estudo foi também verificado em pacu e carpa comum desafiados com *A. hydrophila* e LPS de *A. hydrophila*, respectivamente (Selvaraj et al. 2004; Garcia et al. 2007).

A atividade antimicrobiana do soro sanguíneo dos peixes teleósteos se deve a diversos tipos de proteínas e enzimas, produzidas pelos monócitos e neutrófilos, como: lisozima, transferrina, peptídeos antimicrobianos e antiproteases (Ellis, 1999). Sendo assim o aumento destas células nos peixes desafiados com as maiores concentrações de patógeno pode ter propiciado o aumento da atividade antimicrobiana do soro destes peixes.

Mesmo os peixes não apresentando mortalidades, os desafios com as menores concentrações podem ser agravadas em situações a campo, com alterações ambientais, como por exemplo, mudança brusca de temperatura, ou como infecções secundárias por outras bactérias ou parasitos, podendo causar grandes perdas econômicas. Sendo assim, novos experimentos devem ser feitos para avaliar a patogenicidade desta cepa em conjunto a outros fatores estressantes aos surubins.

## CONCLUSÃO

A cepa bacteriana isolada neste estudo (CPQBA 228-08 DRM) e caracterizada como *Aeromonas hydrophila hydrophila* causou mortalidades e sintomatologia característica de bacterioses, alterações hematológicas e imunológicas importantes, além de ser capaz de infectar diversos órgãos como fígado, rim, coração e cérebro. Sendo assim, esta cepa é causadora de septicemia hemorrágica nos cultivos de surubins híbridos (*Pseudoplatystoma corruscans* x *P. fasciatum*).

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-577657/2008-9; 301072/2007-8), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA) e Macroprograma 1 “Bases Tecnológicas para o Desenvolvimento Sustentável da Aquicultura”, EMBRAPA-AQUABRASIL. À empresa Mar & Terra, do Estado de Mato Grosso do Sul-Brasil e ao Laboratório de Camarões Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina (LCM-UFSC). O manuscrito foi revisado pelo Dr. Rodrigo Yudi Fujimoto e Dr. Evoy Zaniboni-Filho.

## REFERÊNCIAS

- Austin B. & Austin D.A. (2007) *Bacterial fish pathogens in farmed and wild fish*. 2nd ed. Ellis Horwood Ltd., Chichester, England, 364p.
- Bailone R.L., Martins M.L., Mouriño J.L.P., Vieira F.N., Pedrotti F.S., Nunes G.C. & Silva B.C. (2010) Hematology and agglutination titer after polyvalent immunization and subsequent challenge with *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Archivos de Medicina Veterinaria*, **42**. In press.
- Barcellos L.J.G., Kreutz L.C., Rodrigues L.B., Santos L.R., Motta A.C., Ritter F., Bedin A.C. & Silva L.B. (2008) *Aeromonas hydrophila* em *Rhamdia quelen*: aspectos macro e microscópico das lesões e perfil de resistência a antimicrobianos. *Boletim Instituto de Pesca* **34(3)**, 355-363.
- Boijink C.L. & Brandão C.A. (2001) Inoculation with *Aeromonas hydrophila* bacteria and the survival of juvenile jundiá, *Rhamdia quelen* (Teleostei: Pimelodidae). *Ciência Rural* **31(3)**, 503-507.

- Campos, J.L. (2004) Pintado culture in Brazil. *Global Aquaculture Advocate* **42**, 42-43.
- Carnahan A.M., Behram S. & Joseph S.W. (1991) Aerokey II: a flexible key for identifying clinical aeromonas species. *Journal of Clinical Microbiology* **29**, 2843-2849.
- Clauss T.M., Dove A.D.M. & Arnold J.E. (2008) Hematologic Disorders of Fish. *Veterinary Clinics of Exotic Animal Practice* **11**, 445-462.
- Das Mahapatra K., Gjerde B., Sahoo P.K., Saha J.N., Barat A., Sahoo M., Mohanty B.R., Ødegård J., Rye M. & Salte R. (2008) Genetic variations in survival of rohu carp (*Labeo rohita*, Hamilton) after *Aeromonas hydrophila* infection in challenge tests. *Aquaculture* **279**, 29-34.
- Deodhar L.P., Saraswathi K. & Varudkar, A. (1991) *Aeromonas* spp. and their association with human diarrheal disease. *Journal of Clinical Microbiology* **29(5)**, 853-856.
- Ellis A.E. (1999) Immunity to bacteria in fish. *Fish & Shellfish Immunology* **9**, 291-308.
- Garcia F., Pilarski F., Onaka E.M., Moraes F.R. & Martins M.L. (2007) Hematology of *Piaractus mesopotamicus* fed diets supplemented with vitamins C and E, challenged by *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture* **271**, 39-46.
- Gianquito P.C. & Volpato G.L. (2005) Chemical cues related to conspecific size in pintado catfish, *Pseudoplatystoma corruscans*. *Acta Ethologica* **8**, 65-69.
- Godinho A.L., Kynard B. & Godinho H.P. (2007) Migration and spawning of female surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*, Pimelodidae) in the São Francisco river, Brazil. *Environmental Biology of Fishes* **80**, 421-433.
- Goldenfarb P.B., Bowyer F.P., Hall E. & Brosius E. (1971) Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. *American Journal of Clinical Pathology* **56**, 35-39.
- Holliman, A. (1993) The veterinary approach to trout. In: BROWN, L. (Ed.). *Aquaculture for veterinarians: fish husbandry and medicine*. Oxford: Pergamon Press, p.223-247.

Hossain M. (2008) Isolation of pathogenic bacteria from the skin ulcerous symptomatic gourami (*Colisa lalia*) through 16S rDNA analysis. *University Journal of Zoology, Rajshahi University* **27**, 21-24.

Ishikawa N.M., Ranzani-Paiva M.J.T. & Lombardi J.V. (2008) Total leukocyte counts methods in fish, *Oreochromis niloticus*. *Archives of Veterinary Science* **13** (1), 54-63.

Martins M.L., Mouriño J.L.P., Amaral G.V., Vieira F.N., Dotta G., Jatobá A.M.B., Pedrotti F.S., Jerônimo G.T., Buglione-Neto C.C. & Pereira-Jr. G. (2008) Haematological changes in Nile tilapia experimentally infected with *Enterococcus* sp. *Brazilian Journal of Biology* **68**(3), 657-661.

Mastan S.A. & Rao M.L.V.G. (2007) Isolation and characterization of bacteria associated with ulcerative disease fish, *Clarias batrachus*. *Bioscience Biotech Research Asia* **4**(2), 665-670.

Nakhla A.N., Szalai A.J., Banoub J.H. & Keough K.M.W. (1997) Serum anti-LPS antibody production by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in response to the administration of free and liposomally-incorporated LPS from *Aeromonas salmonicida*. *Fish & Shellfish Immunology* **7**, 387-401.

Rehulka J. (2002) *Aeromonas* causes severe skin lesions in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): clinical pathology, haematology and biochemistry. *Acta Veterinaria* **71**, 351-360.

Rodriguez I., Novoa B. & Figueras A. (2008) Immune response of zebrafish (*Danio rerio*) against a newly isolated bacterial pathogen *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology* **25**, 239-249.

Sahoo P.K., Meher P.K., Das Mahapatra K., Saha J.N., Jana R.K. & Reddy P.V.G.K. (2004) Immune responses in different fullsib families of Indian major carp, *Labeo rohita*, exhibiting differential resistance to *Aeromonas hydrophila* infection. *Aquaculture* **238**, 115-125.

Sahu S., Das B.K., Mishra B.K., Pradhan J.U., Samal S.K. & Sarangi N. (2008) Effect of dietary *Curcuma longa* on enzymatic and immunological profiles of rohu, *Labeo rohita* (Ham.), infected with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Research* **39**, 1720-1730.

Schroers V., Van der Marel M., Neuhaus H. & Steinhagen D. (2009) Changes of intestinal mucus glycoproteins after peroral application of

*Aeromonas hydrophila* to common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture* **288**, 184-189.

Selvaraj V., Sampath K. & Sekar V. (2004) Extraction and Characterization of Lipopolysaccharide from *Aeromonas hydrophila* and Its Effects on Survival and Hematology of the Carp, *Cyprinus carpio*. *Asian Fisheries Science* **17**, 163-173.

Shao J., Liu J. & Xiang L. (2004) *Aeromonas hydrophila* induces apoptosis in *Carassius auratus* lymphocytes *in vitro*. *Aquaculture* **229**, 11–23.

Silva B.C., Martins M.L., Jatobá A., Buglione 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.

Tavares-Dias M. & Moraes F.R. (2004) *Hematologia de peixes teleósteos*. Villimpress, Ribeirão Preto, SP, 144p.

Woo P.T.K. & Bruno D.W. (2003) *Fish Diseases and Disorders, Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections*, CABI Publishing, Wallingford, Oxfordshire, U.K., 874p.



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após isolar, caracteriza e comprovar que *Aeromonas hydrophila hydrophila* é causadora de septicemia hemorrágica bacteriana em surubins híbridos (*Pseudoplatystoma corruscans* x *P. fasciatum*), as perspectivas futuras é que sejam realizadas desafios com diferentes vias de infecção para determinar qual melhor via indica uma melhor condição para que seja realizado trabalhos futuros. Além disso, pode-se testar a susceptibilidade das linhagens puras de pintado (*P. corruscans*) e cachara (*P. fasciatum*) comparado com a linhagem híbrida a este agente patológico.

Outras perspectivas do grupo são os trabalhos para desenvolver medidas preventivas a esta bacteriose, como: probióticos, vacinas e uso de ácidos orgânicos nas dietas. Estas medidas preventivas serão desenvolvidas em laboratório e posteriormente testadas a campo em parceria com a empresa Mar & Terra.



## REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

- ABBAS AK, LICHTMAN AH. 2003. Cellular and Molecular Immunology. 5th ed. Elsevier Science. Philadelphia, PA: Elsevier, 10 p.
- AGOSTINHO, A. A.; JULIO JÚNIOR, H. F. Peixes da bacia do alto Paraná. In: LOWEMCCONNEL, R. H. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1999. p. 374-400.
- ALLAN, B.J.; STEVENSON, R.M. Extracellular virulence factors of *Aeromonas hydrophila* in fish infections. **Canadian Journal of Microbiology**, v.27(10), p.1114-1122, 1981.
- ALPERI, A. et al. Analysis of 16S rRNA gene mutations in a subset of *Aeromonas* strains and their impact in species delineation. **International Microbiology**, v.11, p.185-194, 2008.
- ANDRADE, L.S. et al. Canibalismo entre larvas de pintado, *Pseudoplatystoma corruscans*, cultivadas sob diferentes densidades de estocagem. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 26, p. 299-302, 2004.
- ARDO, L. et al. Chinese herbs (*Astragalus membranaceus* and *Lonicera japonica*) and boron enhance the non-specific immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and resistance against *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture**, v.275, p.26-33, 2008.
- ARSLAN, M. Effects of different dietary lipid sources on the survival, growth, and fatty acid composition of south american catfish, *Pseudoplatystoma fasciatum*, surubim, juveniles. **Journal World Aquaculture Society**, v.39, p.51-61, 2008.
- AUSTIN, B.; AUSTIN, D.B. **Bacterial fish pathogens in farmed and wild fish**. 2nd ed. Ellis Horwood Ltd., Chichester, England, 2007, 364p.
- BAILONE, R.L. et al. Hematology and agglutination titer after polyvalent immunization and subsequent challenge with *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 42, 2010. In press
- BARCELLOS, L.J.G. ET al. *Aeromonas hydrophila* em *Rhamdia quelen*: aspectos macro e microscópico das lesões e perfil de resistência a antimicrobianos. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 34(3), p, 355-363, 2008.

BEELEN, R. et al. Blood values of young Brazilian catfish *Pseudoplatystoma corruscans* (Agassiz, 1829). **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v.20(2), p.147-150, 1998.

BEELEN, R. et al. Production and characterization of a putative T-cell marker in hybrid surubim catfish *Pseudoplatystoma corruscans* (Agassiz) x *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus). **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 26, p. 201-207, 2004.

BEUX, L.F.; ZANIBONI-FILHO, E. Survival and the growth of pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) post-larvae on different salinities. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, vol.50 (5), p.821-829, 2007.

BOIJINK, C.L.; BRANDÃO, C.A. Inoculation with *Aeromonas hydrophila* bacteria and the survival of juvenile jundiá, *Rhamdia quelen* (Teleostei: Pimelodidae). *Ciência Rural*, v.31(3), p.503-507, 2001.

BRITO, M.F.G.; BAZOLLI, N. Reproduction of the surubim catfish (Pisces, Pimelodidae) in the São Francisco River, Pirapora Region, Minas Gerais, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55(5), p.624-633, 2003.

CAHILL, M. Virulence factors in motile *Aeromonas* species. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 69, p.1-16, 1990.

CAMPOS, J.L. Pintado culture in Brazil. **Global Aquaculture Advocate**, v. 42, p.42-43, 2004.

CAMPOS, P., MARTINO, R.C.; TRUGO, L.C. Amino acid composition of Brazilian surubim fish (*Pseudoplatystoma corruscans*) fed diets with different levels and sources of fat. **Food Chemistry**, v.96, p.126–130, 2006.

CAMPOS, P. et al. Fauna parasitária de cachara *Pseudoplatystoma fasciatum* (Siluriforme:Pimelodidae) do rio Aquidauana, Pantanal Sul Mato-grossense,Brasil. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 30, p. 91-96, 2008.

CARNAHAN, A. M.; BEHRAM, S.; JOSEPH, S.W. Aerokey II: a flexible key for identifying clinical *Aeromonas* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, p.2843-2849, 1991.

CLAUSS, T.M.; DOVE, A.D.M.; ARNOLD, J.E. Hematologic Disorders of Fish. **Veterinary Clinics of Exotic Animal Practice**, v.11, p.445–462, 2008.

CONROY, G. Diseases found in tilapia culture in latin America. **Global Aquaculture Advocate**, v. 4, p. 52-55, 2001.

CORRÊA, R.F.S.S.; BRASIL-SATO, M.C. Digenea in the surubim *Pseudoplatystoma corruscans* (Spix and Agassiz, 1829) (Siluriformes: Pimelodidae) of the upper São Francisco River, State of Minas Gerais, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.51, p.1181-1185, 2008.

CREPALDI, D.V. et al. O surubim na aquacultura do Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.30, p. 150-158, 2006.

DAS MAHAPATRA, K. et al. Genetic variations in survival of rohu carp (*Labeo rohita*, Hamilton) after *Aeromonas hydrophila* infection in challenge tests. **Aquaculture**, v. 279, p. 29-34, 2008.

DEODHAR, L.P.; SARASWATHI, K.; VARUDKAR, A. *Aeromonas* spp. and their association with human diarrheal disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v.29(5), p.853-856, 1991.

DUNG, T.T. et al. Common diseases of pangasius catfish farmed in Vietnam. **Global Aquaculture Advocate**, v.11(4), p.77-78, 2008.

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

EVANS, A.S. Causation and disease: the Henle-Koch postulates revisited. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 49, p.175-95, 1976.

FAGUNDES, M.; URBINATI, E.C. Stress in pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) during farming procedures. **Aquaculture**, v.276, p.112-119, 2008.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). **The State of World Fisheries and Aquaculture**, Roma:SOFA, 2008, 21p.

FARUK, M.A.R. et al. Economic loss from fish disease on rural freshwater aquaculture of Bangladesh. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.7 (12), p.2086-2091, 2004.

FERNANDEZ, A.B.; DE BLAS, I.; RUIZ, I. El sistema inmune de los teleósteos (I): Células y órganos. **Revista AcuaTic**, v.16, 2002.

FUJIMOTO, R.Y.; CARNEIRO, D. J. Adição de ascorbil polifosfato, como fonte de vitamina C, em dietas para alevinos de pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* (Agassiz, 1829). **Acta Scientiarum**, v. 23(4), p. 855-861, 2001.

GARCIA, F. et al. Hematology of *Piaractus mesopotamicus* fed diets supplemented with vitamins C and E, challenged by *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture**, v.271, p.39-46, 2007.

GIANQUITO, P.C.; VOLPATO, G.L. Chemical cues related to conspecific size in pintado catfish (*Pseudoplatystoma corruscans*), post-larvae on different salinities. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.50(5), p.821-829, 2007.

GODINHO, A.L.; KYNARD, B.; GODINHO, H.P. Migration and spawning of female surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*, Pimelodidae) in the São Francisco river, Brazil. **Environmental Biology of Fish**, v.80, p.421-433, 2007.

GRIFFIN, B.R.; MITCHELL, A.J. Susceptibility of channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), to *Edwardsiella ictaluri* challenge following copper sulphate exposure. **Journal of Fish Disease**, v. 30, p. 581–585, 2007.

HAGIWARA, H. et al. Study of the lesions induced in *Seriola dumerili* by intradermal or intraperitoneal injection of *Streptococcus dysgalactiae*. **Journal of Comparative Pathology**, v.140, p. 25-30, 2009.

HINE, P.M. The granulocytes of fish. **Fish & Shellfish Immunology**, v.2, p.79-88, 1992.

HOLLIMAN, A. The veterinary approach to trout. In: BROWN. L. (Ed.). **Aquaculture for veterinarians: fish husbandry and medicine**. Oxford: Pergamon Press, p.223-247, 1993.

HOSSAIN, M. Isolation of pathogenic bacteria from the skin ulcerous symptomatic gourami (*Colisa lalia*) through 16S rDNA analysis. **University Journal of Zoology, Rajshahi University**, v.27, p.21-24, 2008.

HOWARD, S.P.; BUCKLEY, J.T. Activation of the hole-forming toxin aerolysin by extracellular processing. **Journal of Bacteriology**, v.163, p.336-340, 1985.

KAATTARI, S.L.; PIGANELLI, J.D. The specific immune system: humoral defense. In: G. Iwama and T. Nakanishi, Editors, **The Fish Immune System**, Academic Press, San Diego, pp. 207–243. 1996.

LEONARDO, A.F.G. et al. Induced spawning of hatchery-raised Brazilian catfish, cachara *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766). **Aquaculture**, v.240, p.451-461, 2004.

LEONARDO, A.F.G. et al. Occurrence and significance of ovarian and follicular regression in cachara *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766): a histology approach. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58(5), p.831-840, 2006.

- LIM, C.; WEBSTER, C.D. **Tilápia: biology, culture and nutrition**. An Imprint of the Haworth Press, New York, United States. 2006.
- MAGNADÓTTIR, B. Innate immunity of fish (overview). **Fish & Shellfish Immunology**, v.20, p.137-151, 2006.
- MAJUMDAR, T. et al. Possible role of a plasmid in the pathogenesis of a fish disease caused by *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture**, v.256, p.95-104, 2006.
- MANNING, M.J. Fishes. In: TURNER (Ed.), **Immunology**. Chichester: John Wiley and Sons, p.69-100. 1994.
- MARTINO, R.C. et al. Performance, carcass composition and nutrient utilization of surubim *Pseudoplatystoma corruscans* (Agassiz) fed diets with varying carbohydrate and lipid levels. **Aquaculture Nutrition**, v.11, p.131-137, 2005.
- MARTINS M.L. et al. Hematologia e resposta inflamatória aguda em *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) submetida aos estímulos único e consecutivo de estresse de captura. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.30, p.71-80, 2004.
- MARTINS, M.L. et al. *Aeromonas caviae* durante surto de mortalidade em tilápia do Nilo e suplementação com vitamina C na dieta. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 34(4), p.585-590, 2008a.
- MARTINS, M.L. et al. Haematological changes in Nile tilapia experimentally infected with *Enterococcus* sp. **Brazilian Journal of. Biology**, v. 68(3), p.657-661, 2008b.
- MASTAN, S.A.; RAO, M.L.V.G. Isolation and characterization of bacteria associated with ulcerative disease fish, *Clarias batrachus*. **Biosciences Biotechnology Research Asia**, v.4(2), p.665-670, 2007.
- MELLO, P. H. et al. Threatened fishes of the world: *Pseudoplatystoma corruscans* (Agassiz, 1829) (Siluriformes: Pimelodidae). **Environmental Biology of Fishes**, v. 85, p. 359-360, 2009.
- MIRANDA, M. O. T.; RIBEIRO, L. P. Características zootécnicas do surubim *Pseudoplatystoma corruscans*. In: MIRANDA, M. O. T. **Surubim**. Belo Horizonte: IBAMA, 1997. p.43-56.
- NOGA, E.J. **Fish disease: diagnosis and treatment**. Ames: Blackwell, 2000, 367p.

NUNEZ, J. et al. Induced breeding and larval rearing of Surubim *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766), from the Bolivian Amazon. **Aquaculture Research**, v.39, p.764-776, 2008.

PAVANELLI, G.C.; EIRAS, J.C.; TAKEMOTO, R.M. **Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento**. Editora da Universidade Estadual de Maringá, 305p. 1998.

PENDERS, J.; STOBBERINGH, E.E. Antibiotic resistance of motile aeromonads in indoor catfish and eel farms in the southern part of The Netherlands. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.31, p.261-265, 2008.

PLYZYCZ, B. et al. Leucocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) pronephros: cell types producing superoxide anion. **Developmental and Comparative Immunology**, v.13, p.217-224. 1989.

RAHMAN, M.H.; SUZUKI, S.; KAWAI, K. The effect of temperature on *Aeromonas hydrophila* infection in goldfish, *Carassius auratus*. **Journal of Applied Ichthyology**, v.17, p.282-285. 2001.

RALL, V.L.M.; PEDROSO, D.M.M.; HEIDTMANN, S. *Aeromonas* species isolated from fish (*Pseudoplatystoma* sp), virulence factors and drug susceptibility. **Revista de Microbiologia**, v. 29, p. 222-227, 1998.

RANZANI-PAIVA, M.J.T.; SILVA-SOUZA, A.T. Hematologia de Peixes Brasileiros. In: **Sanidade de Organismos Aquáticos** / organizadores Maria José Tavares Ranzani-Paiva, Ricardo Massato Takemoto, Maria de Los Angeles Perez Lizama. – São Paulo: Editora Varela, 2004.

REGO, A.A. Cestóides proteocefalídeos parasitas de *Pseudoplatystoma* (Pisces, Pimelodidae) da América do Sul. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.4, p. 269-282, 2002.

REHULKA, J. *Aeromonas* causes severe skin lesions in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): clinical pathology, haematology and biochemistry. **Acta Veterinaria (Czech Republic)**, v.71, p.351–360, 2002.

RODRIGUEZ, I.; NOVOA, B.; FIGUERAS, A. Immune response of zebrafish (*Danio rerio*) against a newly isolated bacterial pathogen *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 25, p. 239-249, 2008.

ROMALDE, J.L. et al. *Streptococcus phocae*, an emerging pathogen for salmonid culture. **Veterinary Microbiology**, v. 130, p.198–207, 2008.

- ROUBACH, R. et al. Aquaculture in Brazil. **World Aquaculture**, v. 34 (1), p. 28-34, 2003.
- SAHOO, P.K. et al. Immune responses in different fullsib families of Indian major carp, *Labeo rohita*, exhibiting differential resistance to *Aeromonas hydrophila* infection. **Aquaculture**, v.238, p.115–125, 2004.
- SAHU, S. et al. Effect of dietary *Curcuma longa* on enzymatic and immunological profiles of rohu, *Labeo rohita* (Ham.), infected with *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture Research**, v.39, p.1720–1730, 2008.
- SAKAI, D.K. Significance of extracellular protease for growth of a heterotrophic bacterium, *Aeromonas salmonicida*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.50, p.1031-1037, 1985.
- SATAKE, F.; PÁDUA, S.B.; ISHIKAWA, M.M. Distúrbios morfológicos em células sanguíneas de peixes em cultivo: uma ferramenta prognóstica. In: TAVARES-DIAS (Organizador), **Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo**, Macapá: EMBRAPA, 2009.
- SAURABH, S.; SAHOO, P.K. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system, **Aquaculture Research**, v.39, p.233–239, 2008.
- SECOMBES, C.J. The Nonspecific Immune System: Celular Defensas. In: IWAMA, G., NAKANISHI, T. **The Fish Immune System**. London: Academic Press, p. 63-105. 1996.
- SHAO, J.; LIU, J.; XIANG, L. *Aeromonas hydrophila* induces apoptosis in *Carassius auratus* lymphocytes in vitro. **Aquaculture**, v.229, p.11–23, 2004.
- SHOEMAKER, C.A.; KLESIUS, P.H.; PLUMB, J.A. Killing of *Edwardsiella ictaluri* by macrophages from channel catfish immune and susceptible to enteric septicemia of catfish. **Veterinary of. Immunology and Immunopathology**, v.58, p.181-190, 1997.
- SILVA, B.C. et al. Hematological and immunological responses of Nile tilapia after polyvalent vaccine administration by different routes. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29(11), p. 874-880, 2009.
- SOUZA, V.M.et al. Quantitative evaluation of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed in surubim fish (*Pseudoplatystoma* sp). **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p.527-528, 2008.
- SWAIN, P.; SAHOO, P. K.; AYYAPPAN, S. **Fish and shellfish immunology: an introduction**. Delhi, India: Narendra Publishing House,296p, 2006.

SWAIN, P. et al. Serum antibody response of Indian major carp, *Labeo rohita* to three species of pathogenic bacteria; *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda* and *Pseudomonas fluorescens*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.117, p.137-141, 2007.

TAVARES-DIAS, M. **Variáveis hematológicas de teleósteos brasileiros de importância zootécnica**. 209p. Tese (Doutorado em Aqüicultura) – Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2003.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. **Hematologia de peixes teleósteos**. Villimpress, Ribeirão Preto, SP, 144p, 2004.

TIZARD, I.R. **Imunologia veterinária: uma introdução**. São Paulo: Roca, 532p. 2002.

VALLEJO, A.N.; MILLER, N.W.; CLEM, L.W. Antigen processing and presentation in teleost immune responses. **Annual Review of Fish Diseases**, v.2, p.73-89, 1992.

VANDENBERG, G.W. Oral vaccines for finfish: academic theory or commercial reality? **Animal Health Research**, v. 52, p.301-304, 2004.

WAKABAYASHI, H.; KANAI, T.K.; HSU, O.; EGUSA, S. Pathogenic activities of *Aeromonas hydrophila* biovar *hydrophila* (Chester) Popoff and Veron, 1976, to fishes. **Fish Pathology**, v.15,p.319-325, 1981.

WOO, P.T.K.; BRUNO, D.W. **Fish Diseases and Disorders, Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections**, CABI Publishing, Wallingford, Oxfordshire, U.K., 874p, 2003.

YANO, T. The nonspecific immune system: Humoral defense. In: IWANA, G.; NAKANISHI, T. **The Fish Immune System**, Academic Press, San Diego, p. 207-243. 1996.

YOSHINAGA, K. et al. Individual variations of Natural Killer activity of rainbow trout leucocytes against IPN virus-infected and uninfected RTG-2 cells. **Fish Pathology**, v.29, p.1-4, 1994.

ZANARDI, M.F.; BOQUEMBUZO, J.E.; KOBERSTEIN, T.C.R.D. Desempenho de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) alimentados com três diferentes dietas. **Revista Acadêmica Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 6 (4), p. 445-450, 2008.

ZANIBONI-FILHO, E. Piscicultura das espécies nativas de água doce. In: POLI, C.R.; POLI, A.T.; ANDREATTA, E.; BELTRAME, E. **Aqüicultura: Experiências Brasileiras** Florianópolis: Multitarefa Editora, p.337-368, 2004.