



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

Suplementação com probiótico na dieta e vacinação de surubins híbridos (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *P. corruscans*)

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
Coorientador: José Luiz Pedreira Mouriño

Gabriella do Vale Pereira

Florianópolis
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Pereira, Gabriella do Vale

Suplementação com probiótico na dieta e vacinação de surubins híbridos (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *P. corruscans*) / Gabriella do Vale Pereira ; orientador, Maurício Laterça Martins ; co-orientador, José Luiz Pedreira Mouriño. - Florianópolis, SC, 2013.

82 p.

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

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. Siluriformes. 3. Vacina. 4. *Weissella cibaria*. 5. *Aeromonas*. I. Martins, Maurício Laterça. II. Mouriño, José Luiz Pedreira. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. IV. Título.

Suplementação com probiótico na dieta e vacinação de surubins híbridos (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *P. corruscans*)

Por

GABRIELLA DO VALE PEREIRA

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM AQUICULTURA

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

Prof. Alex Pires de Oliveira Nuñez, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Dr. Maurício Laterça Martins – *Orientador*

Dr. Evoy Zaniboni Filho

Dr. Felipe do Nascimento Vieira

Dr. Rodrigo Yudi Fujimoto

Ao meu avô Nereu do Vale Pereira, exemplo de vida e dedicação acadêmica pela UFSC e amante da cultura da Ilha de Nossa Senhora do Desterro, Florianópolis.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida e pela coragem nos momentos difíceis;

Ao meu orientador e professor Maurício Laterça Martins pelo apoio e compreensão durante a execução e conclusão deste trabalho;

Ao José Luiz Pedreira Mouriño, co-orientador deste trabalho, pelo apoio acadêmico e execução deste trabalho, e por ser amigo e companheiro.

À empresa Mar e Terra Ltda, por todo suporte técnico e financeiro concedido;

Ao Felipe do Nascimento Vieira, amigo e mentor;

Ao Jatobá por ter me apresentado o curso de Engenharia de Aquicultura e o setor de microbiologia do LCM;

Ao Bruno pela paciência, prestatividade e ensinamentos nos momentos das análises deste trabalho;

Aos amigos do setor de microbiologia, Gabriel, Gabriela S., Norha, Mariana, Marcello, Jessica, Karine, Scheila, Juliana, Marysol, Efrayn e Marcela.

A todos os funcionários do LCM pela prestatividade durante os quatro anos em que estive no laboratório;

À minha mãe Maria Salete, orgulho da minha vida, que está sempre do meu lado para apoiar, mesmo nas horas difíceis;

Ao meu pai, Francisco, pela compreensão e incentivo, ajudando em todos os momentos da minha vida;

À minha irmã, Maria Eduarda, por ser a minha melhor amiga;

À dinda Nilza, minha segunda mãe, que sempre acreditou em mim e nos meus sonhos;

Ao meu avô Nereu e minha avó Misse, simplesmente por serem o incentivo da minha vida;

À toda a Trupe, Gabriela, Luisa, Raquel, Marina, Juliana e Karen pelas conversas e apoio incondicional;

Ao meu amado Guilherme Valente, pelo amor e companheirismo em todos os momentos em que passamos juntos;

Enfim a todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

RESUMO

Foi avaliada a suplementação dietética de *W. cibaria* sobre a eficácia da imunização de surubins híbridos contra septicemia hemorrágica causada por *A. hydrophila*. Os tratamentos foram: peixes alimentados com dieta contendo probiótico; peixes vacinados: e peixes vacinados e alimentados com dieta contendo probiótico; e peixes não tratados (controle). Os peixes dos dois tratamentos que receberam probiótico foram alimentados com ração contendo *W. cibaria* durante 41 dias. No 15º dia do experimento os animais dos que receberiam vacina foram vacinados intraperitonealmente, com posterior reforço oral, o qual durou quatro dias. Uma semana após o reforço, três peixes de cada unidade experimental foram coletados. A alimentação com probiótico influenciou no aumento do número de trombócitos e da concentração de lisozima quando comparados aos surubins que não receberam a bactéria *W. cibaria* na dieta. Já a vacinação influenciou no aumento do título aglutinante, concentração de lisozima e atividade antimicrobiana quando comparados aos surubins não vacinados. Porém não houve interação entre a alimentação com probióticos e a vacinação em surubins híbridos nos parâmetros analisados.

Palavras-chave: Siluriformes, vacina, *Weissella cibaria*, *Aeromonas*, desafio

ABSTRACT

It was evaluated the dietary supplementation *W. cibaria* on the effectiveness of hybrid surubins immunization against hemorrhagic septicemia caused by *A. hydrophila*. The treatments were: fish fed with diet containing probiotic, vaccinated fish, and vaccinated fish fed a diet containing probiotics, and fish and untreated (control). Fish of the two treatments that received probiotic were fed with *W. cibaria* for 41 days. On the 15th day, the animals would receive the vaccine were vaccinated intraperitoneally with subsequent oral reinforcement, which lasted four days. One week after the oral booster, three fish from each experimental unit were collected. The supplementation of probiotic influenced the increase in the number of thrombocytes and the concentration of lysozyme, when compared to surubins that don't received bacteria *W. cibaria* in the diet. Furthermore, the vaccination influenced the increase of the agglutination title, concentration of lysozyme and antimicrobial activity when compared to unvaccinated surubins. However, there was no interaction between diet with probiotics and vaccination in surubins hybrids in these parameters.

Key words: Siluriformes, vaccine, *Weissella cibaria*, *Aeromonas*, challenge

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: *Pseudoplatystoma reticulatum* (fêmea) e *P. corruscans* (macho). Peixes puros o quais cruzados obtém-se o surubim híbrido (abaixo).....23
- Figura 2: Fluxograma explicativo para seleção e identificação de cepas hemolíticas em Ágar Sangue.....25
- Figura 3: Fluxograma explicativo para seleção de probióticos em peixes.....33
- Figura 4: Desenho esquemático do delineamento experimental de alimentação com probiótico, *W. cibaria*, e vacinação intraperitoneal (i.p.) com reforço oral contra *A. hydrophila*.50
- Figura 5: Sala Bioensaio I do Laboratório de Sanidade de Organismos Aquáticos (NEPAq/CCA/UFSC).....81
- Figura 6: Visão externa da bateria de filtros biológicos do sistema de recirculação (a) constituído por: um filtro mecânico (b), um filtro biológico anaeróbico (c) e dois filtros biológicos aeróbicos (c).81
- Figura 7: Vacinação intraperitoneal de surubins híbridos (*Pseudoplatystoma reticulatum*[♀] x *P. corruscans*[♂]) contra septicemia hemorrágica bacteriana causada pela bactéria *A. hydrophila*.82
- Figura 8: Coleta do sangue por pulsão do vaso caudal (a), e parâmetros zootécnicos: comprimento total em centímetros (b) e peso em gramas (c).....82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Vantagens e desvantagens de vacinas inativadas e vivas para aplicação em peixes.....	28
Tabela 2: Diferentes vias de administração de vacinas em peixes, suas vantagens e desvantagens.....	30
Tabela 3: Valores médios e erro padrão dos parâmetros hematológicos de surubins híbridos (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i> x <i>P. reticulatum</i>) alimentados com ração contendo probiótico; vacinados contra <i>A. hydrophila</i> ; alimentados com ração contendo probiótico e vacinados contra <i>A. hydrophila</i> ; e não tratados.	55
Tabela 4: Parâmetros imunológicos plasmáticos: lisozima, proteína total, imunoglobulina total (média \pm erro padrão) plasmática e porcentagem de fagocitose em surubins híbridos (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i> x <i>P. reticulatum</i>) alimentados com ração contendo probiótico; vacinados contra <i>A. hydrophila</i> ; e alimentados com ração contendo probiótico e vacinados contra <i>A. hydrophila</i> ; e não tratados.	58
Tabela 5: Título aglutinante e atividade antibicrobiana do plasma (média \pm erro padrão) plasmática de surubins híbridos (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i> x <i>P. reticulatum</i>) alimentados com ração contendo probiótico; vacinados contra <i>A. hydrophila</i> ; e alimentados com ração contendo probiótico e vacinados contra <i>A. hydrophila</i> ; e não tratados.	59

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	19
SUPLEMENTAÇÃO COM PROBIÓTICO E IMUNIZAÇÃO NA MELHORA DO SISTEMA DE DEFESA EM PEIXES	19
1. INTRODUÇÃO.....	21
1.1 Bacterioses	23
1.2 Vacinação em peixes.....	26
1.3 Probióticos	31
1.4 Justificativa	36
2. OBJETIVOS.....	37
2.1 Objetivo Geral.....	37
2.2 Objetivos específicos	37
CAPÍTULO 2	39
SUPLEMENTAÇÃO COM PROBIÓTICO NA DIETA E VACINAÇÃO DE SURUBINS HÍBRIDOS (<i>Pseudoplatystoma reticulatum</i> [♀] x <i>P. corruscans</i> [♂])	39
RESUMO	41
Abstract	43
1. INTRODUÇÃO.....	45
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	47
2.1 Material Biológico	48
2.2 Preparo da vacina	48
2.3 Preparo do probiótico.....	49
2.3 Delineamento Experimental.....	49
2.4 Parâmetros hemato-imunológicos	51
2.5 Análises Estatísticas	53
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
3.1 Análises hematológicas.....	53

3.2 Análises imunológicas	56
4. CONCLUSÃO.....	59
6. REFERÊNCIAS.....	61
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
8. REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO	69
9. ANEXO.....	81

CAPÍTULO 1

SUPLEMENTAÇÃO COM PROBIÓTICO E IMUNIZAÇÃO NA MELHORA DO SISTEMA DE DEFESA EM PEIXES

1. INTRODUÇÃO

A produção aquícola mundial está em constante expansão (ARSLAN, M. et al.2013), assim como a piscicultura continental que apresentou em 2011 uma produção de 35.596.862 ton, 33,7% superior do que em 2007 onde produziu 26.621.449 ton (FAO, 2013). No Brasil este crescimento também se destaca: de um patamar de 207 613 ton em 2007 o Brasil produziu 541.151 ton em 2011. Entre os peixes mais cultivados no país em águas continentais a tilápia e as carpas são as de maior importância, juntas somaram 63,4% da produção nacional de pescado em 2010, seguidas dos peixes redondos nativos tambaqui (*Colossoma macropomum*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*), e seus híbridos, os quais representaram juntos 24,6% da produção (BRASIL, 2010).

Contudo, os cultivos das espécies nativas no Brasil têm potencial de crescimento superior aos cultivos de espécies exóticas, como tilápia (*Oreochromis niloticus*) e carpa (*Cyprinus carpio*) (BEUX; ZANIBONI-FILHO, 2007). Com isso, a produção brasileira de surubins (*Pseudoplatystoma* spp.) chega a 1.747 ton em 2011 (FAO, 2013).

Os bagres sul americanos (*Pseudoplatystoma reticulatum* e *Pseudoplatystoma corruscans*) (BUITRAGO-SUAREZ; BURR, 2007), quando cruzados, obtém-se uma prole de surubim híbrido (Figura 1). Esses bagres apresentam alto valor econômico devido ao excelente sabor e ausência de espinhos em seu filé, características as quais garantem ampla aceitação para comercialização e exportação para a Europa e para os Estados Unidos (ARSLAN et al., 2013).

Os surubins são carnívoros, alimentam-se de peixes menores, principalmente durante a noite e possuem hábito de reprodução migratória com alta fecundidade absoluta (grande quantidade de ovos e pequeno diâmetro). Durante o dia permanecem em repouso no fundo dos rios (CAMPOS, 2010). Segundo Santos, Martins e Pompeu (2012), os bagres da família Pimelodidae são principal alvo de captura de peixes de água doce da América do Sul por causa das excelentes características citadas anteriormente, as quais induzem à sobrepesca nas regiões em que eles ocorrem.

Com isso, o interesse na produção em cativeiro do gênero *Pseudoplatystoma* vem aumentando por causa do seu rápido crescimento, baixa conversão alimentar e alto padrão de qualidade de carne, possibilitando a exportação (GODINHO et al., 2007).

Atualmente, no cultivo deste gênero, os híbridos são comumente utilizados para aprimorar a produção de alevinos visando à diminuição de canibalismo e rápido crescimento (NUNEZ et al., 2011).

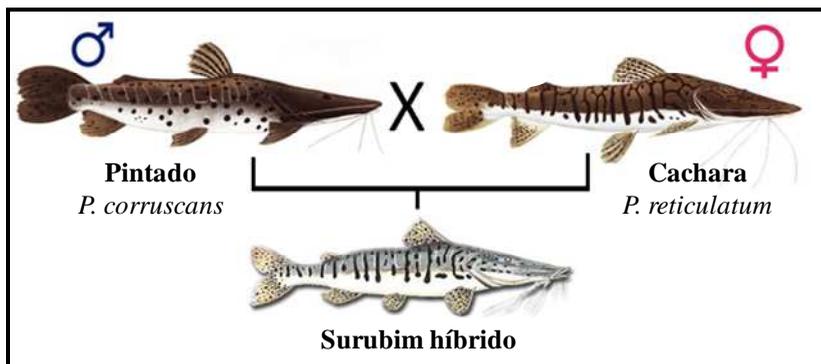
No Estado do Mato Grosso do Sul, surubins híbridos são produzidos em tanques-redes de 18 m³. A densidade de estocagem varia de 139 peixes/m³ (para juvenis de até 100 g) até 56 peixes/m³ (para peixes adultos de até 1400 g). A biomassa final chega a 70 kg/m³ e a sobrevivência final fica em torno de 90 a 95% (CAMPOS, 2010).

Alguns estudos estão sendo realizados para aprimorar o cultivo de pintado (*P. corruscans*), cachara (*P. reticulatum*) e seus híbridos, já que esses possuem um grande potencial de cultivo no Brasil (ROUBACH et al., 2003). Fagundes e Urbinati (2008) realizaram experimentos para entender a dinâmica da resposta fisiológica ao estresse comumente realizado na produção intensiva de pintado (*P. corruscans*) e concluíram que o pintado se comporta como outras espécies de peixes diante de um estresse agudo.

Já que a produção destes peixes exige desenvolvimento tecnológico, alguns trabalhos têm sido publicados recentemente, tais como: influência da densidade de estocagem em cultivo (FRASCÁ-SCORVO et al., 2008); requerimentos de proteínas e lipídeos na dieta (ARSLAN et al., 2013); suplementação de probióticos e prebióticos (MOURIÑO et al., 2012); caracterização de bactérias patogênicas (SILVA et al., 2012); performance de crescimento e custo de produção em diferentes sistemas de cultivo (ROMAGOSA; LIRANCO; SCORVO, 2011); e alterações nas estruturas morfológicas ósseas em pintados com deficiência de vitamina C (FUJIMOTO; SANTOS; CARNEIRO, 2013).

A baixa condição de qualidade de água como resultado das altas densidades de cultivo, excesso de alimentação e matéria orgânica no viveiro, manejo inadequado, além de alguns fatores ambientais, favorecem uma condição de estresse e, por conseguinte os micro-organismos podem infectar os peixes facilmente (MORAES; MARTINS, 2004). Com isso, surtos de doenças de origem bacteriana em fazendas de cultivo de surubins são comuns no inverno por causa da ampla variação de temperatura durante todo o dia. Geralmente os peixes apresentam sintomas de bacterioses tais como: hemorragias no ânus, lesões externas e vermelhidão na base das nadadeiras. Esses sinais clínicos podem levar a uma mortalidade de até 80% da produção (CAMPOS, 2004).

Figura 1: *Pseudoplatystoma reticulatum* (fêmea) e *P. corruscans* (macho). Peixes puros o quais cruzados obtém-se o surubim híbrido (abaixo).



Fonte: Adaptado de Silva (2010).

1.1 Bacterioses

Bactérias causadoras de doenças em peixes são bem estudadas atualmente. As principais espécies causadoras de doenças bacterianas em peixes estão: *Streptococcus inae*, as quais podem causar doenças tanto em água doce como em água salgada (AGNEW; BARNES, 2007); *Flavobacterium psychrophilum* e *Aeromonas salmonicida*, muito encontradas no cultivo de salmão (STROM-BESTOR; WIKLUND, 2011); *Pseudomonas* spp., uma das principais bactérias agentes de mortalidade de peixes de água doce (KUMARAN et al., 2010); *Vibrio anguillarum* agente causador de doenças em animais aquáticos, principalmente marinhos (AUSTIN, 2010); *Aeromonas hydrophila* capaz de causar septicemia em peixes e anfíbios e *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, relacionada como patógeno para aquicultura com destaque para o atum (*Thunnus thynnus*) (MLADINEO; MILETIC; BOCINA, 2006; HO et al., 2011).

Dentre as bacterioses, as bactérias do gênero *Aeromonas* recebem destaque por estarem constantemente presente em ambientes aquáticos e fazerem parte da flora microbiana normal de peixes (EL-BARBARY, 2010). Este gênero foi descrito anteriormente por Rall et al. (1998) como patógeno emergente de importância crescente na piscicultura.

A *Aeromonas hydrophila* está frequentemente associada a doenças em carpas, enguias (*Anguilla* spp.), catfish (*Ictalurus punctatus*), tilápia (*Oreochromis niloticus*), truta (*Oncorhynchus mykiss*), e alguns outros animais. Essa bactéria provoca alta mortalidade e grandes perdas econômicas na aquicultura de peixes de água doce no mundo (SASAN et. al., 2011). É uma bactéria Gram-negativa móvel, característica a qual provê capacidade de invadir órgãos internos mais facilmente. Essas bactérias podem também agir como patógeno primário capaz de desencadear doenças em condições ideais de cultivo, sem um fator predisposto como diferenças bruscas de temperatura, por exemplo. A septicemia causada pela *A. hydrophila* móvel é umas das doenças mais devastadoras em cultivo de espécies aquáticas, sendo capaz de produzir desde sinais crônicos até sinais agudos em peixes provocando mortalidades (SCHRADER; HARRIES; DARWISH, 2013).

Outros autores ainda relataram que há associação entre a concentração de oxigênio, amônia e sólidos dissolvidos totais presentes na água na prevalência de casos de peixes infectados por *Aeromonas* em fazendas de cultivo (ORTEGA et al., 1996). As *Aeromonas* são conhecidas ainda como oportunistas em peixes aproveitando-se de condições de estresse como pior qualidade de água e manejo inadequado causando de surtos epidêmicos em fazendas de cultivo de peixes (BEAZ-HIDALGO; FIGUERAS, 2013).

Assim como outros grupos de bactérias patogênicas, as *Aeromonas* spp. possuem vários mecanismos, os quais as ajudam a aderir e invadir tecidos. Esses mecanismos vão desde o mais simples como as paredes de lipopolissacarídeos (LPS), as proteínas da membrana externa (OMPs), e produtos extracelulares a exemplo das hemolisinas; até mecanismos mais complexos como a comunicação bacteriana, “quorum sensing” (GUDMUNSDOTTIR; BJORNSDOTTIR, 2007; JANDA; ABBOTT, 2010).

Em surtos de mortalidades de surubim híbrido (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *P. corruscans*) em fazendas de cultivo localizadas no Mato Grosso do Sul a bactéria *A. hydrophila* causou em 2009 mortalidades significativas. Esta bactéria foi isolada (Figura 2) de rim e cérebro de animais que apresentaram sinais clínicos semelhantes aos descritos por Campos (2004) e caracterizada por Silva et al. (2012) com comprovada patogenicidade. Estes autores observaram mortalidade de $50 \pm 12,5\%$ em surubins híbridos infectados com a bactéria *A. hydrophila* na concentração de 2×10^8 UFC.mL⁻¹ (SILVA et al., 2012).

Figura 2: Fluxograma explicativo para seleção e identificação de cepas hemolíticas em Ágar Sangue.



Fonte: Adaptado de SILVA et al. (2012).

Pode-se dizer então que a bactéria *Aeromonas hydrophila* é uma das principais causadoras de surtos de mortalidade em fazendas de surubins híbridos, durante a fase de engorda, no Centro-Oeste Brasileiro.

Com o diagnóstico dessas enfermidades, a maioria dos produtores adota o uso de antibióticos como solução. Contudo, há uma tendência mundial em proibir o uso de antibióticos na produção animal. No Brasil o uso de diversos destes antibióticos foi proibido com a finalidade de aditivo alimentar no uso veterinário pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), como por exemplo o cloranfenicol e nitrofuranos (IN n° 09, 27/06/2003); tetraciclina, quinolonas e sulfonamidas sistêmicas (IN n° 26, 9/07/2009 que revoga a Portaria n° 193/1998); e espiramicina e eritromicina (IN n° 14, 17/05/2012).

Para o controle de bacterioses, os antibióticos são amplamente utilizados, porém o uso inapropriado tem algumas desvantagens, tais como aumento da codificação do plasmídeo de resistência a antibióticos, e atraso nas vendas de peixe já que estes precisam respeitar o tempo de carência para o consumo humano (SASSAN et al., 2011). Além disso, a proliferação dessas bactérias resistentes através do uso indiscriminado

de antibióticos poderão transferir seus genes de resistência a outras bactérias que nunca foram expostas ao antibiótico (TU et al., 2009).

O perfil de sensibilidade a antibióticos de *A. hydrophila* foi reportado por El-Barbary (2010) mostrando que essa bactéria é resistente a antibióticos como amoxicilina, ampicilina e penicilina, porém sensível à oxitetraciclina. Contudo, sabe-se que mesmo apresentando susceptibilidade a alguns destes antibióticos o uso indiscriminado irá selecionar ao longo do tempo cepas de *A. hydrophila* resistentes, restringindo ainda mais as alternativas de tratamentos a este patógeno.

Alternativamente ao uso de antibióticos, o desenvolvimento de vacinas está em evidência como ferramenta promissora ao combate de bacterioses em peixes, ajudando a reduzir as perdas econômicas (WANG et al., 2013), além disso o uso de probióticos tem se mostrado indispensável como promotor da melhora imunológica de animais aquáticos (MOURIÑO et al., 2011).

1.2 Vacinação em peixes

Desde muito tempo a literatura conceitua a vacinação de peixes, sendo que o objetivo da vacina é proporcionar ao indivíduo resistência à doença sem sofrer infecção potencialmente arriscada, devendo simular a infecção natural, produzindo imunidade e não uma enfermidade (ELLIS, 1988). Entretanto, a imunização é um processo corporal em que o hospedeiro produz anticorpos em resposta a determinado antígeno (HOLWAY; KLONTZ, 1971)

O primeiro trabalho científico publicado com imunização de peixe foi a vacinação de trutas (*Oncorhynchus mykiss*) por via oral contra furunculose (*A. salmonicida*), obtendo resultados de aumento na sobrevivência (DUFF, 1942). Depois deste estudo, a vacinação de peixes foi positivamente comprovada por Holway e Klontz (1971), onde foram vacinadas trutas arco-íris (*O. mykiss*) contra furunculose. A partir desse momento, o desenvolvimento de vacinas foi sendo aprimorado por pesquisadores do mundo todo com o aparecimento de novas tecnologias de fabricação.

Durante a última década, a vacinação tornou-se importante para a prevenção de doenças infecciosas em viveiros de peixes (TU et al., 2009). Entre as vacinas mais conhecidas e utilizadas temos: vacinas inativadas, vacinas de DNA, vacinas "ghosts", atenuadas, entre outras. Para melhor entendimento, Pridgeon e Klesius (2010) dividem as vacinas em duas categorias: as vacinas inativadas (mortas) e vacinas vivas (Tabela 1).

O uso de bactérias vivas atenuadas como vetor para disponibilizar antígenos ao peixe é ideal para minimizar os custos e evitar as dificuldades de purificação e isolamento de antígenos (YAN et al., 2013). Porém, bactérias vivas atenuadas estão associadas a riscos de reversão para uma forma virulenta, fator que limita o uso desta tecnologia (MAGNADOTTIR, 2010). O aumento na quantidade de anticorpos específicos e mortalidade relativa foram registrados no paulistinha ou peixe-zebra (*Danio rerio*) vacinado por banho de imersão com vacina atenuada contra vibriose (*Vibrio anguillarum*) (ZHANG et al., 2012).

Vacinas a partir do dna (vacinação com ácido nucléico) têm emergido como poderosa tecnologia, que pode ser aplicada para o desenvolvimento de vacinas. Os genes que codificam os antígenos de vacinação são clonados em um plasmídeo eucariótico, que é geralmente administrado por injeção (ebensen et al., 2011). *Streptococcus inae* administrada intraperitonealmente na forma de vacina de dna ofereceu proteção satisfatória para linguado (*scophthalmus maximus*) comprovada pela alta porcentagem relativa de sobrevivência e análises imunológicas (sun et al., 2010). Outro estudo também relata imunização contra *V. anguillarum* em perca-gigante (*lates calcarifer*) após vacinação de dna via oral encapsulada em nanopartículas, comprovada pelo aumento significativo de anticorpos específicos (kumar et al., 2008).

A inativação genética de bactérias gram-negativas, que produz fantasmas bacterianos (do inglês "*ghosts bacterial*"), tem sido relatada como abordagem nova e promissora na tecnologia de vacinas inativadas. As vacinas "*ghosts*" são produzidas pela controlada expressão do gene *phix174* *liseE*. Essa quebra resulta na formação da célula bacteriana vazia (envelopes celulares), que tem a mesma composição da superfície celular como os seus homólogos vivos. Além disso, eles exibem todos os componentes de superfície de uma forma natural e são capazes de induzir resposta imune forte das mucosas (TU, et al., 2009).

Tabela 1: Vantagens e desvantagens de vacinas inativadas e vivas para aplicação em peixes.

Vacina	Vantagem	Desvantagem
Inativada	Não existe a preocupação da cepa se tornar virulenta no futuro.	Mais de uma dose pode ser necessária para uma resposta inicial, e a sua duração pode ser menor que a vacina viva.
	Seguro ao meio ambiente	Mais trabalhosa. Necessita de adjuvante para uma maior eficácia o que pode aumentar o custo.
Vivas	Administração mais fácil.	Pode se tornar uma cepa virulenta no futuro.
	Sem necessidade de adjuvante	Pode prejudicar o meio ambiente.

Fonte: Adaptado de Pridgeon e Klesius (2010).

Foi relatado que há aumento na produção de anticorpos específicos no soro de kinguios (*Carassius auratus*) e tilápias (*Oreochromis mosambicus*) imunizadas com vacinas "ghost" de *Edwardsiella tarda* inativada por formalina e administradas oralmente, quando comparados aos animais não vacinados (KWON et al, 2006; TU et al., 2009). Estes resultados são interessantes pois seriam uma alternativa para aplicação de vacinas "ghost" em produção intensiva de peixes. Além disso, após possuir a cepa de bactéria transgênica, a fabricação da vacina convencional é menos viável do que as demais vacinas inativadas.

As vacinas inativadas preparadas a partir de células mortas por calor ou formalina (bacterina), são as mais utilizadas. Trutas arco-íris vacinadas com *Lactococcus garvieae* e *A. hydrophila* inativadas com formalina (BASTARDO et al., 2012) e bacalhau (*Gadus morhua*) vacinados com *Listonella anguillarum* inativadas por calor (CAIPANG et al., 2012) apresentam resultados positivos. Essas vacinas ainda podem conter produtos extracelulares oriundos do crescimento bacteriano (toxóides), como as hemolisinas, responsáveis pela lise de células

sanguíneas; enterotoxinas, que podem agir no epitélio intestinal e causar inflamação; e as proteases, que contribuem na patogenicidade causando danos diretos nos tecidos (COSTA, 2003). Estes produtos devem ser levados em conta na produção da vacina.

Assim como os outros preparos, as vacinas mortas por formalina ou calor apresentam resultados positivos em trutas arco-íris vacinadas com *Lactococcus garvieae* e *A. hydrophila* inativadas com formalina (BASTARDO et al., 2012) e em bacalhau (*Gadus morhua*) vacinados com *Listonella anguillarum* inativadas por calor (CAIPANG et al., 2012).

Muitos dos produtos extracelulares oriundos do crescimento bacteriano estão relacionados com a virulência específica da *A. hydrophila* como citocinas, hemolisinas e proteases, sendo estas últimas as mais importantes. Estes produtos podem ser empregados durante o preparo da vacina, contudo nenhuma vacina de proteção contra *A. hydrophila* está disponível comercialmente (SASSAN et al., 2011), por isso, é importante o desenvolvimento de tecnologias para o uso e aplicação de vacinas contra essa bactéria.

Recentemente, trabalhos usando vacinas de *A. hydrophila* confirmam a eficiência do uso destas em prevenir mortalidades em bagre do canal e tilápias do Nilo imunizados com vacinas atenuadas (PRIDGEON; KLESIUS, 2011). Em trutas arco-íris vacinadas intraperitonealmente com vacina bivalente, inativada por formol, contendo *A. hydrophila*, também foi observada alta proteção e redução da mortalidade (BASTARDO et al., 2012), bem como a vacinação oral de *A. hydrophila* foi testada em bagre ou peixe gato andador (*Clarias batrachus*) apresentando, também, resultados positivos (NAYAK et al., 2004).

A eficácia da administração da vacina em peixes depende do patógeno e de suas vias de infecção natural, assim como o estado e idade dos peixes, e da forma de preparo das vacinas. Com isso pode-se destacar vantagens e desvantagens de cada via de aplicação (Tabela 2).

Entre as diferentes estratégias de vacinação a injeção individual intraperitoneal (i.p.) apresenta melhores resultados (SILVA et al., 2009). Várias vacinas injetáveis têm sido desenvolvidas para prevenção contra bacterioses, embora muitas destas vacinas diferenciam-se em sua composição (EVANS; KLESIUS; SHOEMAKER, 2004). A vacinação por injeção tem se mostrado mais eficaz, porém exige a manipulação do pescado, que é trabalhosa, estressante para os peixes, e requer que os peixes tenham um peso mínimo para sua administração (PLANT; LAPATRA, 2011).

Tabela 2: Diferentes vias de administração de vacinas em peixes, suas vantagens e desvantagens.

Via de administração	Vantagens	Desvantagens
Oral	O método mais fácil já que a alimentação faz parte do manejo normal.	É muitas vezes necessário o uso de um revestimento para evitar a quebra das bactérias pelo estômago.
	Sem estresse para o animal.	Provê baixas imunizações e pode requerer mais aplicações.
Imersão	Relativamente fácil com a alteração mínima da produção.	Peixes pequenos e novos podem requerer mais aplicações, pois não possuem o sistema imune tão ativo.
	Estresse mínimo nos peixes.	Pode não prover imunizações efetivas para alguns patógenos.
Injeção	Efetiva para várias doenças.	Requer mais tempo e pessoal treinado.
	Tempo de proteção muito maior.	Peixes pequenos podem não responder bem.
	Cada peixe é tratado igualmente, dando segurança ao produtor.	Causam muito estresse aos peixes.

Fonte: Adaptado de Pridgeon e Klesius (2010).

As vacinas via banho de imersão apresentam resultados contraditórios em eficácia. Imunização via banho de imersão em baixos níveis de água, apresenta algumas vantagens, como fácil aplicação, porém a quantidade de vacina necessária para que a imunização seja feita a torna muitas vezes inviável. Por isso, é normalmente utilizado banho com uma quantidade de antígeno concentrada por um período menor de tempo, mas é descrito que uma vacinação prolongada disponibiliza maior proteção (PLANT; LAPATRA, 2011).

Já a vacinação oral é uma boa alternativa, entretanto existem poucas opções no mercado devido à grande quantidade de antígeno requerido para estimular a resposta imune. Para administrar a vacina na ração (vacina via oral) é necessário primeiro resolver certos problemas, como por exemplo o sistema que protege os antígenos das condições hidrolíticas no estômago, e um método de controle de dosagem afim de garantir que a vacina seja ingerida pelos peixes (TOBAR, et.al, 2011).

Uma alternativa a estes problemas citados acima seria a co-administração de vacinas com antiproteases e membranas permeáveis que permitem a vacina a escapar da hidrólise estomacal. Outro método seria a bio-encapsulação, como a incorporação de antígenos na dieta viva com o intuito de aumentar a resistência da degradação digestiva (VANDENBERG, 2004).

No entanto, a vacina oral não tem sido eficaz, e os antígenos são frequentemente destruídos no sistema digestório antes que atinjam as áreas sensíveis do intestino (GUDMUNDSDÓTTIR; BJÖRNSDÓTTIR, 2007). Mesmo assim, a aplicação da vacina por via oral é atraente, pois é adequada para administração em massa de peixes de todos os tamanhos. Isso não impõe pressão sobre os peixes porque não é necessário tratamento e portanto, não interfere nas práticas de manejo (TU et al., 2009). Com isso, torna-se interessante a utilização da vacina oral na forma de reforço a uma primeira vacinação.

1.3 Probióticos

Alimentações suplementadas com probiótico são comumente utilizadas na aquicultura como no camarão do pacífico, *Litopenaeus vannamei* (VIEIRA et al., 2007); em tilápias do Nilo (JATOBÁ et al., 2008); assim como em surubins híbridos (*Pseudoplatystoma* sp.) (MOURIÑO et al., 2012) resultando na melhora da saúde desses animais.

O termo probiótico é geralmente compreendido como bactérias que promovem saúde dos animais (BALCAZAR, 2006). Entretanto, a definição mais aceita hoje em dia foi dita por Gatesoupe (1999) onde probióticos são “células microbianas que são administradas de uma maneira que entrem no trato intestinal e mantenham-se vivas, com o objetivo de melhorar a saúde do animal”.

Por outro lado, Verschuere et al. (2000) afirmam que bactérias probióticas podem atuar também no ambiente em que o hospedeiro está inserido. A interação intensiva entre o ambiente e o hospedeiro na aquicultura implica que muitos probióticos são obtidos do ambiente e não necessariamente do intestino. Esta é uma definição a qual não pode ser descartada, porém o foco deste trabalho será com base em micro-organismos que atuam no trato intestinal.

As bactérias Gram positivas são as mais utilizadas como probióticos, pois em geral, possuem menos representantes patogênicos e ainda possuem um grande número de representantes quando se fala de micro-organismos probióticos, tais como bactérias dos gêneros: *Bacillus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus*, *Aerococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, (RINGO; GATESOUBE, 1998; BALCAZAR, 2006).

Contudo, é essencial saber a origem da bactéria probiótica (se for isolada do próprio peixe preferivelmente), a seguridade (não patogênica), e habilidade da mesma de manter-se viva no trato intestinal para um bom desempenho no peixe.

Embora algumas cepas de probióticos autóctones desempenhem papel positivo no bem-estar geral dos peixes, há um consenso geral de que cepas de bactérias ácido lácticas autóctones possuem maior chance de colonizar o intestino e trazer benefício à saúde do hospedeiro (SUN et al., 2013).

Por isso o método de seleção de bactérias com potencial probiótico é extremamente importante (Figura 3). Métodos de seleção de probióticos em geral incluem: avaliação da habilidade de competir com patógenos, avaliação da patogenicidade da cepa com potencial probiótico, avaliação do efeito no hospedeiro, análises econômicas e de custo benefício (BALCAZAR, 2006), lembrando sempre que os probióticos são hospedeiro-específicos, ou seja, seus efeitos positivos podem estar limitados ao seu hospedeiro natural (RINGO et al., 2010).

A microbiota gastrointestinal dos peixes está diretamente relacionada com a saúde e nutrição do hospedeiro (MOURIÑO et al., 2012; PEDROTTI et al., 2013). Muitos estudos comprovam que o uso de bactérias ácido lácticas na alimentação de peixes promovem a saúde

dos mesmos (TOURAKI et al., 2012; TAPIA-PANIAGUA et al., 2012; GHOSH; SINHA; SAHU, 2008), mas pouco se sabe por quais mecanismos essas bactérias ajudam na saúde dos animais e qual via metabólica elas podem influenciar. Contudo, pode-se destacar alguns mecanismos de ação que os probióticos possuem, tais como: competição por exclusão, fonte de nutrientes e contribuição enzimática na digestão, aumento na resposta imune, e efeitos antivirais (BALCAZAR, 2006).

Figura 3: Fluxograma explicativo para seleção de probióticos em peixes.



Fonte: Adaptado de Balcazar (2006).

O efeito antagonista de bactérias ácido lácticas contra bactérias patogênicas na parede do intestino é possivelmente mediado pela competição por nutrientes, locais de adesão e formação de metabólitos

como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e produção de bacteriocinas (RINGO et al., 2010). Porém, a colonização das bactérias ácido lácticas é influenciada por fatores relacionados ao hospedeiro (temperatura corporal, potencial redox, enzimas e resistência genética) e fatores relacionados ao micro-organismo (efeito antagonista, proteases, bacteriocinas, lisozimas, alteração de pH causada por ácidos orgânicos, entre outros) (BALCAZAR, 2006). Com isso, deve-se levar em conta esses fatores antes de utilizar uma determinada bactéria para um determinado hospedeiro.

Os probióticos podem reduzir a incidência de doenças e diminuir a severidade de surtos de doenças (RINGO et al., 2010). Por isso, muitos estudos são desenvolvidos para avaliar a efetividade dos probióticos na melhora dos parâmetros zootécnicos, imunológicos e hematológicos.

As cepas de bactérias ácido lácticas e/ou probióticas protegem os peixes de possíveis infecções por bactérias patogênicas, pois diminuem a mortalidade significativamente após infecções experimentais (BALCAZAR et al., 2009). Heo et al. (2013) observaram 100% de sobrevivência em linguado (*Paralichthys olivaceus*), após infecção com *Streptococcus iniae*, que foram alimentados com *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, contra apenas 10% de sobrevivência dos peixes não alimentados com probiótico. Já a alimentação de bagre africano (*Clarias gariepinus*) com *Bacillus thuringiensis*, resultou em sobrevivência de 90% após infecção experimental com *A. hydrophila*, enquanto que os peixes não suplementados não sobreviveram (RENESHWARY et al., 2011).

Além da proteção contra agentes infecciosos, alterações em parâmetros zootécnicos também foram observadas com a suplementação dietética com probiótico. O ganho de peso e fator de conversão alimentar em tilápias do Nilo alimentadas com probiótico foi superior aos peixes não alimentados com *Bacillus amyloliquefaciens* (RIDHA; AZAD, 2012). Melhoras nos parâmetros zootécnicos de garoupa (*Epinephelus coioides*) também foram relatados com a suplementação de *Bacillus subtilis*; e *Psychrobacter* sp. (SUN et al., 2011; LIU et al., 2012); e no peixe cabeça-de-cobra (*Channa striatus*) que receberam suplementação dietária de probiótico comercial (Efinol (R) FG) (MANJU et al., 2011).

Outro importante efeito desejado dos probióticos é seu potencial em imunomodulador no hospedeiro (COPPOLA; CONCEIÇÃO; GILTURNES, 2005). Em organismos aquáticos, há particular interesse em

aumentar a resistência às doenças, aumentando a eficiência do complexo hemato-imunológico do animal.

Alimentações com probióticos melhoram parâmetros imunológicos séricos não específicos em linguado tais como lisozima, antiprotease, peroxidase e explosão respiratória ("*burst respiratory*") (HEO et al., 2013). Diferenças significativas na concentração de lisozima também foram observadas por Sun et al. (2011) em garoupas que receberam alimentação contendo *Psychrobacter* sp. como probiótico.

Mouriño et al. (2012) observaram maior concentração de imunoglobulina total quando comparados com controle em surubins híbridos alimentados com a bactéria probiótica *Weissella cibaria*. Já Kim et al. (2012) observaram aumento na concentração de lisozima e aumento no sistema complemento de linguado após duas semanas de tratamento com probiótico *Enterococcus faecium*.

Nos trabalhos de JATOBÁ et al. (2011) e BARBOSA et al. (2011) com tilápias do Nilo e robalo (*Centropomus parallelus*) foram relatados aumento no número de linfócitos em peixes alimentados com ração suplementada com cepas probióticas. A abundância de linfócitos no sangue pode ser considerada um indicador de saúde de peixes, uma vez que essas células desempenham função importante no sistema inato e adaptativo dos peixes. O aumento no número de linfócitos no sangue circulante em peixes após alimentação com dietas contendo probióticos é comumente encontrado na literatura como em robalo (*Dicentrarchus labrax*) (PICCHIETTI et al., 2009), em tilápias ALY et al. (2008) e em trutas arco-íris (NEWAJ-FYZUL et al., 2007).

Acredita-se que os leucócitos comportam-se da mesma maneira que em outros vertebrados atuando no sistema imunológico, e que os probióticos interagem com as células do sistema imune através de células localizadas no epitélio do intestino, induzindo a sua multiplicação. Essa ativação e multiplicação de leucócitos totais foram observadas em tilápias alimentadas com *Lactobacillus plantarum* (JATOBÁ et al., 2011) e com *Pediococcus acidilactici* (FERGUSON et al., 2010) e em trutas alimentadas com *Bacillus* e *E. faecium* (MERRIFIELD et al., 2010). Porém, Mouriño et al. (2012) não observaram aumento no número total de leucócitos no sangue de surubins híbridos alimentados com dietas contendo *W. cibaria*.

Panigrahi et al. (2005) comprovaram que a forma de administração das cepas probióticas (bactérias vivas aspergidas, bactérias inativadas por calor e bactérias liofilizadas) influenciou a melhor atividade de fagocitose após 20 e 30 dias de alimentação com

probiótico *Lactobacillus rhamnosus* aspergidos na ração ou liofilizados em trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). Foi verificado aumento na resposta fagocítica de leucócitos em dourada (*Sparus aurata*), relatado por Cerezuela et al. (2012) alimentados com *Bacillus subtilis*. Assim como, constatou-se aumento da fagocitose de leucócitos isolados do rim posterior de trutas alimentados com probiótico descrito por Panigrahi et al. (2009).

O uso conjunto de vacinação e suplementação de probióticos na dieta em peixes não foi relatado na literatura até o presente momento, porém existem alguns trabalhos relacionam o uso de vacinas e probióticos em outros animais de corte.

Em frango de corte (do inglês “broilers”) alimentados com probiótico e vacinados contra coccidiose ocorreu modulação no sistema imunológico quando comparados a frangos apenas alimentados com probiótico ou apenas vaciados (STRINGFELLOW et al., 2011). A combinação de vacina contra *Escherichia coli* com probióticos (*Ruminobacter amylophilum*, *Ruminobacter succinogenes*, *Succinovibrio dextrinosolvens*, *Bacillus cereus*, *Lactobacillus acidophilus* and *Streptococcus faecium*) administrados por 15 e 30 dias em vacas grávidas também foram o melhor tratamento para o controle de diarreia e aumento no ganho de peso dos bezerros (AVILA et al., 2000) comprovando que a vacinação em animais alimentados com probiótico é eficaz em animais de corte e ainda podem transmitir essa resistência à sua prole.

Contudo, o estudo da suplementação dietética de probióticos na eficácia da vacinação em animais é um desafio, principalmente na produção continental de peixes nativos brasileiros.

1.4 Justificativa

Para a continuidade do crescimento e profissionalização da piscicultura continental brasileira, é necessário o desenvolvimento de estratégias para a minimização dos efeitos negativos das enfermidades nos cultivos.

A vacinação por injeção intraperitoneal é desenvolvida para a prevenção contra bacterioses, e apresenta os melhores resultados dentre as estratégias de vacinação em relação às respostas do sistema de defesa adaptativo. Além disso, o uso de probióticos estimula o crescimento de bactérias benéficas no intestino, melhorando a imunocompetência dos peixes.

Avaliar a influência entre diferentes estratégias de prevenção, como a suplementação prévia de probióticos na eficácia do uso de vacinas com toxóides injetadas intraperitonealmente (i.p.) em peixes, torna-se importante para que possamos estabelecer melhores estratégias sanitárias para os peixes nativos brasileiros.

Mais especificamente, os estudos do uso conjunto dessas duas estratégias de prevenção (probióticos e vacinas) à septicemia hemorrágica estão sendo iniciados atualmente. As informações limitadas sobre esses estudos proporcionam um caráter inovador e de importância para a piscicultura de águas continentais, além de contribuir para os estudos de vacinas e probióticos em híbridos de surubins do gênero *Pseudoplatystoma*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência da suplementação dietética com o probiótico, *W. cibaria* sobre a eficácia da imunização de surubins híbridos contra septicemia hemorrágica causada por *A. hydrophila*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar os parâmetros hematológicos de surubins híbridos após alimentação com probiótico e vacinação e vacinação contra *A. hydrophila*.
- Avaliar os parâmetros imunológicos de surubins híbridos após alimentação com probiótico e vacinação e vacinação contra *A. hydrophila*.

CAPÍTULO 2

SUPLEMENTAÇÃO COM PROBIÓTICO NA DIETA E VACINAÇÃO DE SURUBINS HÍBRIDOS (*Pseudoplatystoma reticulatum* ♀ x *P. corruscans* ♂)

Gabriella do Vale Pereira^{1,2}, Gabriel Fernandes Alves Jesus¹, Felipe do Nascimento Vieira¹, Scheila Anelise Pereira¹, José Luiz Pedreira Mouriño¹, Maurício Laterça Martins²

¹Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Departamento de Aquicultura, Laboratório de Camarões Marinhos – LCM, Brasil.

²AQUOS – Laboratório de Sanidade de Organismos Aquáticos, UFSC, Departamento de Aquicultura, Brasil.

Corresponding author: Pereira, G. V., Laboratório de Camarões Marinhos Servidão dos Coroas s/n (fundos), Barra da Lagoa, 88061-600, Florianópolis, SC, Brasil. Tel: +55(48) 32313410 FAX: +55(48) 32313434, E-mail: aqi.gabriella@gmail.com

Running title: Probiotic and vaccination in surubim hybrid.

*Artigo formatado de acordo com as normas da revista “Aquaculture Research” (Qualis Capes B1).

RESUMO

Foi avaliada a suplementação dietética de *W. cibaria* sobre a eficácia da imunização de surubins híbridos contra septicemia hemorrágica causada por *A. hydrophila*. Os tratamentos foram: peixes alimentados com dieta contendo probiótico; peixes vacinados; e peixes vacinados e alimentados com dieta contendo probiótico; e peixes não tratados (controle). Os peixes dos dois tratamentos que receberam probiótico foram alimentados com ração contendo *W. cibaria* durante 41 dias. No 15º dia do experimento os animais dos que receberiam vacina foram vacinados intraperitonealmente, com posterior reforço oral, o qual durou quatro dias. Uma semana após o reforço, três peixes de cada unidade experimental foram coletados. A alimentação com probiótico influenciou no aumento do número de trombócitos e da concentração de lisozima quando comparados aos surubins que não receberam a bactéria *W. cibaria* na dieta. Já a vacinação influenciou no aumento do título aglutinante, concentração de lisozima e atividade antimicrobiana quando comparados aos surubins não vacinados. Porém não houve interação entre a alimentação com probióticos e a vacinação em surubins híbridos nos parâmetros analisados.

Palavras-chave: Siluriformes, vacina, *Weissella cibaria*, *Aeromonas*, desafio

Abstract

It was evaluated the dietary supplementation *W. cibaria* on the effectiveness of hybrid surubins immunization against hemorrhagic septicemia caused by *A. hydrophila*. The treatments were: fish fed with diet containing probiotic, vaccinated fish, and vaccinated fish fed a diet containing probiotics, and fish and untreated (control). Fish of the two treatments that received probiotic were fed with *W. cibaria* for 41 days. On the 15th day, the animals would receive the vaccine were vaccinated intraperitoneally with subsequent oral reinforcement, which lasted four days. One week after the oral booster, three fish from each experimental unit were collected. The supplementation of probiotic influenced the increase in the number of thrombocytes and the concentration of lysozyme, when compared to surubins that don't received bacteria *W. cibaria* in the diet. Furthermore, the vaccination influenced the increase of the agglutination title, concentration of lysozyme and antimicrobial activity when compared to unvaccinated surubins. However, there was no interaction between diet with probiotics and vaccination in surubins hybrids in these parameters.

Keywords: Siluriformes, vaccine, *Weissella cibaria*, *Aeromonas*, challenge

1. INTRODUÇÃO

Devido ao excelente sabor e ausência de espinhos intramusculares, os bagres sul americanos (*Pseudoplatystoma corruscans* Spix e Agassiz 1829 e *P. reticulatum* Eigenmann e Eigenmann 1889) possuem alto valor econômico e padrão para exportação, sendo características responsáveis por crescimento significativo na sua criação. O cultivo de híbridos desse gênero está sendo utilizado para produzir larvas com menor índice de canibalismo e crescimento mais rápido (Nunez, Castro, Fernandez, Dugue, Chu-Koo, Duponchelle, Garcia & Renno, 2011). Com a intensificação da produção de peixes nativos brasileiros, ocorre o aparecimento de doenças vinculadas à baixa qualidade do manejo aplicado nas grandes fazendas de produção, tais como altas densidades de cultivo empregadas e o excesso de alimentação para os animais cultivados (Moraes & Martins, 2004).

Em fazendas de cultivo de surubins são comuns surtos de doenças bacterianas no durante o inverno por causa da ampla variação de temperatura durante o período de um dia. Dentre os sintomas encontrados temos o sangramento do ânus e intestino, lesões externas e vermelhidão na base das nadadeiras, podendo levar a mais de 80% de mortalidade. Estes sintomas são características da septicemia hemorrágica bacteriana causada por *Aeromonas hydrophila* (Campos, 2004; Silva, Mouriño, Vieira, Jatobá, Seiffert & Martins, 2012). Essa bactéria é encontrada em diversas espécies de peixes, a qual provoca significativas mortalidades em pisciculturas continentais no mundo (Sasan, Abd Rahim, Ling, Radu, Davoud, 2011). Cepas de *A. hydrophila* foram isoladas e caracterizadas por Silva *et al.* (2012) como principal patógeno para surubins híbridos em fazendas de Mato Grosso do Sul.

Com o aparecimento desses surtos, muitos produtores usam antibióticos no cultivo de peixes, porém seu uso leva à seleção de bactérias resistentes e acumulam resíduos na carne dos peixes (Sasan *et al.*, 2011). Para evitar esses problemas, o desenvolvimento de medidas profiláticas como vacinas e probióticos tem se mostrado ferramentas promissoras no combate à bacterioses em peixes (Vandenberg, 2004; Mouriño, Vieira, Jatobá, Silva, Jesus, Seiffert & Martins, 2012).

Bactérias probióticas são amplamente utilizadas na aquicultura como promotoras da saúde de peixes, aumentando a sobrevivência e

beneficiando parâmetros hematológicos (Jatobá, Vieira, Buglione-Neto, Mouriño, Silva, Seiffter & Andreatta, 2011) e imunológicos (Coppola, Conceição & Gil-Turnes, 2005). Elas protegem os peixes de possíveis infecções por bactérias patogênicas, pois diminuem significativamente a mortalidade após infecções experimentais como relatado por Balcazar, De Blas, Ruiz-Zarzuela, Cunningham, Vendrell & Muzquiz (2007).

Diversos trabalhos vêm sendo desenvolvidos para entender a dinâmica do probiótico na saúde de peixes. Melhoria na saúde de peixes tratados com probióticos foi confirmada em tilápias (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus) alimentadas com *Lactobacillus plantarum* (Jatobá et al., 2011), em trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) alimentadas com *Bacillus* e *E. faecium* (Merrifield, Dimitroglou, Bradley, Baker & Davies, 2010), em juvenis de robalo (*Centropomus parallelus*, Poey) alimentados com *L. plantarum* (Barbosa, Jatobá, Vieira, Silva, Mouriño, Andreatta, Seiffert, Cerqueira, 2011) e em surubins híbridos (*Pseudoplatystoma corruscans* x *P. fasciatum*) alimentados com *Weissella cibaria* (Mouriño et al., 2012).

Assim como os probióticos, o desenvolvimento de vacinas é uma ferramenta promissora no controle de bacterioses em peixes ajudando a reduzir as perdas econômicas (Wang, Yang, Zang, Liu, Lu & 2013). Porém, é importante salientar que vários fatores podem influenciar na eficácia da vacina, os quais vão desde o preparo, a via de administração e a forma de absorção.

Entre os diferentes métodos de preparo, as vacinas inativadas por calor ou formalina são as mais utilizadas (Magnadottir, 2010) podendo conter apenas bacterina (células inativadas) ou também os toxóides (produtos extracelulares inativados), os quais são secretados pelas bactérias durante o crescimento, tais como: hemolisinas, lipases, enterotoxinas e proteases (Da Costa, Peixoto, Boijink, Castagna, Meurer & De Vargas, 2008) que adicionados à vacina aumentam sua eficiência e produção de anticorpos específicos (Shome & Shome, 2005).

A via de administração de vacinas é essencial para sua efetividade, destacando-se a injeção intraperitoneal individual como a que apresenta melhores resultados, embora exija altos custos de manejo (Romalde, Luzardo-Alvarez, Ravelo, Toranzo & Blanco-Wendenz, 2004). Esse método de administração pode ser aprimorado utilizando reforços (segunda aplicação da vacina), os quais aumentam a sua duração, pois amplificam a produção de anticorpos e células de memória imunológica (Cheng, Jiao, Zhang & Sun, 2010).

A vacinação oral é uma boa forma para a administração do reforço, por ser prática e de baixo custo, viável em fazendas de cultivo.

Entretanto, a vacinação oral não apresenta boa eficiência porque são afetadas pelo baixo pH estomacal dos peixes (Vandenberg 2004; Magnadottir, 2010). Alguns estudos foram desenvolvidos com resultados positivos na aplicação de vacina e reforços orais utilizando vacinas atenuadas em linguado japonês (*Paralichthys olivaceus*) contra *Edwardsiella tarda* (Sun, Liu & Sun, 2010), micropartículas protegendo as células do pH do estômago em tilápias vacinadas contra *Flavobacterium columnare* (Leal, Carvalho-Castro, Sacchetin, Lopes, Moraes & Figueiredo, 2010), e ainda utilizando vacinas orais inativadas por formalina em tilápias contra *Aeromonas hydrophila* (Silva, Martins, Jatobá, Neto, Vieira, Pereira, Jeronimo, Seiffert & Mourinho, 2009).

Trabalhos avaliando o uso conjunto de vacinação e alimentação com probióticos em peixes visando a prevenção à septicemia hemorrágica não são encontrados na literatura. Porém o uso conjunto de alimentação com probióticos e vacinação já foi utilizado anteriormente com resultados positivos em frango de corte (Stringfellow, Caldwell, Lee, Mohnl, Beltran, Schatzmayr, Fitz-Coy, Broussard, & Farnell, 2011) comprovado pela modulação do sistema imunológico, e em vacas grávidas as quais não só aumentaram a resposta imunológica como também passaram esta proteção para sua prole (Avila, Paulillo, Schocken-Iturrino, Lucas, Orgaz & Quintana, 2000).

Por isso, avaliar a influência da suplementação de probióticos na eficácia do uso de vacinas com toxóides injetadas intraperitonealmente (i.p.) em peixes é importante em relação à microbiota dos peixes e seus parâmetros imunológicos e hematológicos.

O objetivo deste ensaio foi avaliar a influência da suplementação dietética com o probiótico, *W. cibaria* sobre a eficácia da imunização de surubins híbridos contra septicemia hemorrágica causada por *A. hydrophila* avaliada pelos parâmetros imunológicos e hematológicos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório AQUOS, localizado no NEPAQ-Núcleo de Estudos em Patologia Aquícola da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Brasil. As análises hematológicas e imunológicas, assim como a manutenção de cepas, e o preparo da vacina e probiótico foram realizados no setor de Microbiologia do Laboratório de Camarões Marinhos (LCM) da UFSC.

2.1 Material Biológico

Foram utilizados 192 surubins híbridos provenientes do cruzamento entre machos de pintado (*P. corruscans*) e fêmeas de cachara (*P. reticulatum*) da Piscicultura Piraí, localizada no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil.

A cepa hemolítica patogênica de *A. hydrophila* (CPQBA 228-08 DRM), foi isolada durante surtos de mortalidade no ano de 2009, de híbridos doentes de fazendas do estado de Mato Grosso do Sul (Silva *et al.*, 2012) e mantida em tubos de ensaio contendo meio de cultura caldo de cérebro e coração (BHI Himedia[®] do inglês "*brain heart infusion*") e ativadas em placas de Petri contendo Agar triptona de soja (TSA Himedia[®] do inglês "*Tryptic Soy Agar*") e incubadas a 28°C por 12 h.

A cepa probiótica utilizada foi *W. cibaria* (CPQBA 001-10 DRM 02), isolada a partir de surubins híbridos sadios e assintomáticos (Mouriño *et al.*, 2012), mantida em tubos de ensaio contendo caldo Man-Rogosa-Sharpe broth (MRS Difco[®]), e ativada em placas de Petri contendo Agar MRS com 1% de azul de anilina, e incubada a 35°C por 48 h.

2.2 Preparo da vacina

Para preparar a vacina, a cepa de *A. hydrophila* foi crescida em meio de cultura BHI por 18 h a 30°C, inativada com 10% de formalina tamponada a 10% por 18 h a 30°C, e centrifugada a 4000 g a 4°C por 30 min. Posteriormente, a bactéria foi ressuspensa em uma solução de tampão fosfato salino, (PBS 1, 0.04 M de fosfato monobásico, 0.16 M de fosfato dibásico, 0.11 M de cloreto de sódio, pH 7.4) resultando em concentração bacteriana de 2×10^8 unidades formadoras de colônia (UFC).mL⁻¹, de acordo com a curva de crescimento da bactéria (absorbância x concentração de bactéria) realizada anteriormente com auxílio do leitor de microplacas segundo metodologia de Silva *et al.* (2012).

O sobrenadante resultante do processo de centrifugação da vacina foi retirado e aquecido a 100°C por 30 min, a fim de inativação das toxinas. Posteriormente o toxóide foi adicionado a uma porção da solução bacteriana de na proporção de 1:10, ou seja, 10% de toxóide para cada volume de bacterina desejado (adaptado de Arijo, Rico, Chabrigon, Diaz-Rosales, Martinez-Manzanares, Balebona, Magarinos, Toranzo & Morinigo, 2005). Foi feita anti-sepsia da pele com álcool 70% antes da vacinação, a qual foi feita por injeção no lado direito na

cavidade intraperitoneal (i. p.) utilizando uma seringa de insulina de 1 mL com agulha de 13 x 0,45 mm (Injex[®]).

Para o reforço oral, utilizou-se a mesma formulação da vacina com as concentrações acima descritas. Sendo assim, 100 mL da vacina foram pulverizadas (utilizando um borrifador plástico estéril) por kg de dieta comercial ou contendo probiótico. Posteriormente à absorção de todo o líquido, a dieta foi seca a 30°C durante 12 h em estufa bacteriológica para evitar possíveis contaminações por causa da umidade da dieta.

2.3 Preparo do probiótico

O probiótico foi preparado com a bactéria ácido láctica, *W. cibaria*, repicada em tubos de ensaio contendo caldo MRS Difco[®], e incubada a 35°C por 48 h. Depois de crescida, a cepa de bactéria probiótica foi aspergida (utilizando um borrifador plástico estéril) na ração comercial 100 mL.kg⁻¹ do inoculo de *W. cibaria* na concentração de 1×10^8 UFC.mL⁻¹. A dieta então foi seca em estufa com circulação de ar a 35° C por 24 h, ou até que a ração estivesse totalmente seca. Este processo foi repetido a cada 15 dias para garantir a alta concentração de inóculo na dieta.

A fim de averiguar a concentração da *W. cibaria* na ração, um grama da ração preparada com probiótico foi macerada em almofariz estéril com 1 mL de solução salina estéril de 0,65% de NaCl e posteriormente diluída serialmente nove vezes em tubos de ensaio em fator 1:10. As diluições de 10^{-5} a 10^{-9} foram semeadas em placas de Petri contendo os meios de cultura MRS e TSA. As placas de MRS foram incubadas a 35°C por 48 h e as de TSA incubadas a 28 °C por 24 h. Esse procedimento foi repetido toda vez que a ração suplementada com probiótico era preparada. A concentração do probiótico presente na ração foi de $5,53 \times 10^6$ UFC.g⁻¹.

2.3 Delineamento Experimental

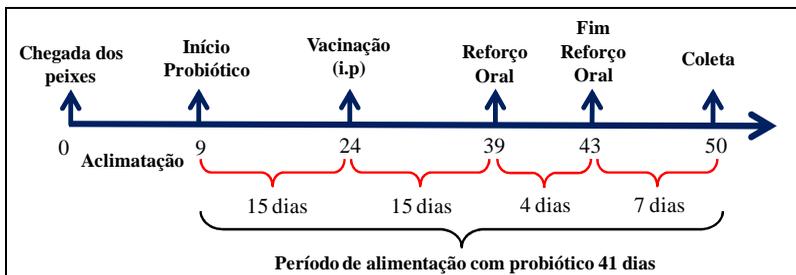
Os surubins com peso inicial de $44,35 \pm 3,07$ g (média \pm desvio padrão), foram divididos em 24 tanques de 100 L, totalizando oito peixes por tanque e aclimatados por 9 dias, todos alimentados com dieta comercial (Supra 42% PB para Juvenil tanque-rede 2-4 mm). A dieta foi fornecida quatro vezes ao dia, totalizando aproximadamente 3,0% da biomassa. O fotoperíodo foi de 24 h de escuro uma vez que este ciclo dita o ritmo de alimentação dos peixes já que são classificados com

hábitos noturnos (Piaia; Townsend; Baldisserotto, 1999). Diariamente monitorou-se o oxigênio dissolvido, amônia total, nitrito, nitrato, pH e temperatura, quando necessário, renovou-se de 20 a 60% da água do sistema. Os tanques estavam acoplados em um sistema de recirculação de água semiaberto, com filtros mecânico e biológicos (aeróbicos e anaeróbicos) e esterilização ultravioleta.

Foram realizados três tratamentos com seis repetições: peixes alimentados com dieta contendo probiótico, peixes vacinados e peixes vacinados e alimentados com dieta contendo probiótico; e peixes não tratados (controle).

Após o período de aclimação nos tanques, os peixes dos dois tratamentos alimentados com dieta contendo probiótico, receberam ração comercial (Supra 42% PB juvenil tanque-rede 2-4 mm) contendo o probiótico *W. cibaria*, enquanto os demais receberam a mesma ração comercial sem probiótico. Essa alimentação foi mantida por 41 dias, até o final do experimento (Figura 4). Passados 15 dias do início do experimento os animais dos dois tratamentos com vacina foram vacinados i.p. contra *A. hydrophila* com 0,01 mL da vacina contendo 2×10^8 UFC.mL⁻¹/g de peixe. Após 15 dias da primeira vacinação, iniciou-se o reforço oral o qual durou quatro dias. As dietas contendo a vacina também foram administradas quatro vezes ao dia totalizando 3% da biomassa. Uma semana após o término do reforço os peixes foram coletados para posteriores análises.

Fig. 4: Desenho esquemático do delineamento experimental de alimentação com probiótico, *W. cibaria*, e vacinação intraperitoneal (i.p.) com reforço oral contra *A. hydrophila*.



2.4 Parâmetros hemato-imunológicos

Após o término do experimento, três peixes de cada unidade experimental foram anestesiados com benzocaína (1g:10 L), medidos e pesados. O sangue foi coletado por punção do vaso caudal com seringas de 3 mL (21 G) contendo anticoagulante (EDTA). Uma parte do sangue foi utilizada para a realização das análises hematológicas e a outra parte foi separada para a realização do ensaio de fagocitose, e do restante do material coletado foi feito um "pool" do sangue dos peixes do mesmo tanque para a obtenção do plasma por centrifugação.

O sangue coletado foi utilizado para a confecção de extensões sanguíneas em duplicata e coradas com Giemsa/May Grunwald (Rosenfeld, 1947) para a contagem diferencial de leucócitos, bem como contagem total de leucócitos (WBC) e trombócitos pelo método indireto Martins, Nomura, Myiazaki, Pilarsky, Ribeiro, Castro & Campos, (2004). Uma alíquota foi usada para a determinação do hematócrito (Goldenfarb, Bowyer, Hall & Brosius, 1971) e o restante foi estocado em frascos de vidro mantidos em gelo para posterior quantificação do número total de eritrócitos (RBC) em câmara de Neubauer.

O tubo de ensaio contendo um "pool" de sangue de cada réplica foi centrifugado a 1400 g por 10 min para obtenção do plasma sanguíneo e armazenamento a -20°C para posteriores análises imunológicas.

A proteína total do plasma sanguíneo foi mensurada com o kit Proteína Total (Lab Test[®]). A concentração de imunoglobulina total foi mensurada de acordo com o método descrito por Amar, Kiron, Satoh, Okamoto & Watanabe (2000), onde misturou-se 50 μL do plasma com 50 μL de solução de polietileno glicol (PEG) (Sigma-Aldrich) 12%, e a mistura incubada a temperatura ambiente por duas horas, a fim de precipitar as moléculas de imunoglobulina. O precipitado de imunoglobulina foi removido por centrifugação (5000 g a 4°C por 10 min) e o sobrenadante retirado e mensurado a quantidade de proteína total também pelo kit Proteína Total (Lab Test[®]), utilizando-se albumina bovina para confecção da curva padrão. A concentração de imunoglobulina total está expressa em $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, sendo calculada pela fórmula:

$$\text{Total Ig (mg/mL)} = \text{proteína total do soro} - \text{proteína tratada com PEG}$$

A atividade de lisozima no plasma sanguíneo foi determinada pela metodologia adaptada de Sankaran & Gurnani (1972), onde uma

suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* liofilizado (Sigma-Aldrich) foi diluída em tampão fosfato salina (PBS 2, 0,04 M fosfato monobásico, pH 6,2) na concentração de $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$, imediatamente antes de sua utilização. Vinte microlitros do plasma, em quintuplicata, foram semeados em microplaca de fundo chato e adicionados 200 μL da suspensão de células de *M. lysodeikticus* em cada poço. Logo após, foi feita a leitura da absorbância inicial em 492nm, posteriormente incubou-se as microplacas por 10 min a 35°C, e realizou-se a leitura das absorbâncias finais. A redução na absorbância das amostras foi convertida em concentração de lisozima ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) determinada pela curva padrão realizada anteriormente com lisozima de clara de ovos da galinha (HEWL, Sigma-Aldrich).

O título da atividade aglutinante do plasma foi realizado em microplacas de fundo “U” onde o plasma foi diluído serialmente na proporção de 1:1 em PBS 1 do primeiro ao 12° poço. Após esse procedimento, 50 μL da bactéria inativada por formalina (*A. hydrophila*) foi adicionada em todos os poços na densidade óptica de aproximadamente 0,4 em 550 nm. A microplaca foi incubada a 25°C por 18 h em câmara úmida. A aglutinação foi confirmada visualmente observando um *bottom* (precipitado de bactéria) no fundo do poço. O título de aglutinação foi considerado recíproco ao último poço que apresentou aglutinação (Silva *et al.*, 2009).

A atividade antimicrobiana do plasma foi realizada contra duas bactérias: *A. hydrophila* (Gram negativa) e *Enterococcus durans* (Gram positiva ATCC 19492), em microplaca de 96 poços com fundo chato, como a metodologia utilizada por Silva *et al.* (2009). O inóculo da *A. hydrophila* foi crescido em BHI a 30°C por 12 h, e *E. durans* em caldo tripton de soja (TSB Himedia® do inglês *Tryptic soy Agar*) preparados na concentração de 0,5 na escala de Macfarland e diluído em meio de cultura caldo pobre (PB do inglês *poor broth* 1% Peptona Himedia®, 0,5 % NaCl) 100.000 vezes. Posteriormente, foi realizada diluição seriada do plasma em meio PB no 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 plasma. Finalmente, 20 μL das bactérias foi adicionado em cada poço da amostra diluída do plasma e do controle positivo. A microplaca contendo *E. durans* foi incubada a 28°C por 24 h, e a microplaca contendo *A. hydrophila* foi incubada a 28°C por 12 h. O crescimento dos micro-organismos foi determinado em leitora de microplaca (Expert Plus Asys®) para leitura a 550 nm. A atividade antimicrobiana do plasma é recíproca à última diluição que apresentou atividade bactericida.

Para a determinação da porcentagem de leucócitos fagocitários, 0,5 mL do sangue e 0,25 ml de uma suspensão de 1×10^6 UFC.mL⁻¹ de *A. hydrophila* inativada com 10% de formalina tamponada (10%) foram adicionados em tubos de ensaio em que foram mantidos em 28°C por 30 minutos e homogeneizados a cada 10 min. Após isso, o sangue foi utilizado para a confecção de extensões sanguíneas em duplicata e as lâminas coradas com Giemsa/MayGrunwald (Rosenfeld, 1947). O número de leucócitos fagocitários foi contado pela porcentagem do número total de leucócitos da extensão (Martins, Vieira, Jeronimo, Mouriño, Dotta, Speck, Bezerra, Pedrotti, Buglione-Neto & Pereira, 2009).

2.5 Análises Estatísticas

Os dados foram analisados quanto à normalidade e ao teste de Bartlett para verificar a homocedasticidade. Os dados que não apresentaram as variâncias homogêneas foram transformados em $\log(x+1)$, e posteriormente submetidos à análise de variância fatorial 2x2 suplementado pelo teste de Tukey para separação das médias. Todas as análises foram submetidas ao nível de significância de 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os parâmetros de qualidade de água oxigênio dissolvido ($8,06 \pm 0,56$ mg L⁻¹), amônia total ($1,5 \pm 0,5$ mg L⁻¹), nitrito ($0,67 \pm 0,65$ mg L⁻¹), nitrato ($1,96 \pm 1,44$ mg L⁻¹), pH ($7,83 \pm 0,39$) e temperatura ($27,5 \pm 2,46$ °C) mantiveram-se dentro do limite para o cultivo de peixes segundo Boyd (1990). Foi verificada a mortalidade dos peixes durante todo o período experimental. Os peixes que apareceram mortos durante o experimento foram retirados e quantificados. A sobrevivência no final do experimento foi: peixes alimentados com dieta contendo probiótico (95,84), peixes vacinados (97,92) e peixes vacinados e alimentados com dieta contendo probiótico (100%); e peixes não tratados (controle) (93,75).

3.1 Análises hematológicas

O número de linfócitos presente no sangue dos dois grupos de peixes vacinados foi inferior em relação aos peixes não vacinados (Tabela 3). Vacinações intraperitoneais em tilápias, porém apresentaram aumento no número de linfócitos, após infecção com *A. hydrophila*

(Silva *et al.*, 2009). Entretanto, foi relatado que infecções de *A. hydrophila* diminuem o número de linfócitos no sangue de surubins híbridos não vacinados (Silva *et al.*, 2012). Com isso, pode-se afirmar que o menor número de linfócitos no sangue dos surubins vacinados em relação aos peixes alimentados com probiótico pode estar relacionado com a vacinação.

Nos animais que receberam dieta contendo probiótico o número de trombócitos foi superior quando comparado com os que não receberam probiótico na dieta (Tabela 3).

Os trombócitos têm papel importante no mecanismo de defesa orgânica dos peixes, pois são responsáveis pela coagulação e respostas inflamatórias além de terem atividade fagocítica durante infecções (Jatobá *et al.*, 2011). Pode-se dizer que a ração suplementada com probiótico influenciou no aumento do número de trombócitos no sangue dos surubins híbridos.

O aumento no número de trombócitos em tilápias já foi relatado anteriormente por Jatobá *et al.* (2011), e por Barbosa *et al.* (2011) em robalo, ambos alimentados com a bactéria ácido láctica *L. plantarum*. Porém, Mouriño *et al.* (2012) não encontraram diferença na contagem de trombócitos em surubins híbridos alimentados com *W. cibaria* quando comparado aos peixes não suplementados.

No entanto, não foi observada interação entre a vacinação e a alimentação com probiótico em nenhum parâmetro hematológico.

Tabela 3: Valores médios e erro padrão dos parâmetros hematológicos de surubins híbridos (*Pseudoplatystoma reticulatum*[♀], Spix e Agassiz x *P. corruscans*[♂], Eigenmann e Eigenmann) alimentados com ração contendo probiótico (Probiótico); vacinados contra *A. hydrophila* alimentados com ração contendo probiótico (Probiótico+vacina) e vacinados (Vacina) contra *A. hydrophila*; e não tratados (Controle).

Tratamentos	RBC ($\times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$)	Trombócitos ($\times 10^3 \cdot \text{mL}^{-1}$)	WBC ($\times 10^3 \cdot \text{mL}^{-1}$)	Linfócitos ($\times 10^3 \cdot \text{mL}^{-1}$)	Monócitos ($\times 10^3 \cdot \text{mL}^{-1}$)
Controle	1,64 ± 0,07	36,9 ± 1,21 ^a	79,5 ± 5,95	63,9 ± 5,23 ^b	1,91 ± 0,03
Probiótico	1,85 ± 0,02	44,1 ± 4,68 ^b	83,0 ± 8,08	81,8 ± 5,08 ^b	1,32 ± 0,01
Vacina	1,66 ± 0,03	23,8 ± 4,31 ^a	83,4 ± 4,50	60,1 ± 5,33 ^a	1,30 ± 0,02
Probiótico+vacina	1,67 ± 0,06	46,4 ± 5,04 ^b	86,4 ± 4,75	57,3 ± 8,14 ^a	1,52 ± 0,03
<i>p</i> do fator probiótico	0,068446	0,001678	0,595889	0,229583	0,550917
<i>p</i> do fator vacina	0,170268	0,203834	0,547952	0,030445	0,525978
<i>p</i> da interação	0,077059	0,074783	0,972808	0,103493	0,213258
Tratamentos	Eosinófilos ($\times 10^3 \cdot \text{mL}^{-1}$)	Basófilos ($\times 10^3 \cdot \text{mL}^{-1}$)	Neutrófilos ($\times 10^3 \cdot \text{mL}^{-1}$)	LG-PAS ($\times 10^3 \cdot \text{mL}^{-1}$)	Hematócrito (%)
Controle	0,67 ± 0,23	21,8 ± 0,35	3,02 ± 0,81	0,00 ± 0,00	24,9 ± 1,40
Probiótico	0,70 ± 0,29	15,7 ± 0,30	3,07 ± 0,55	0,00 ± 0,00	26,0 ± 0,80
Vacina	0,29 ± 0,13	22,9 ± 0,50	2,81 ± 0,61	0,07 ± 0,07	23,3 ± 0,57
Probiótico+vacina	0,41 ± 0,10	23,9 ± 0,57	3,77 ± 0,70	0,00 ± 0,00	24,3 ± 0,82
<i>p</i> do fator probiótico	0,729999	0,570656	0,468069	0,329257	0,281385
<i>p</i> do fator vacina	0,124594	0,310845	0,719312	0,329257	0,101812
<i>p</i> da interação	0,824305	0,437895	0,515520	0,329257	0,914649

* Letras diferentes indicam diferenças significativa no Teste Tukey ($p \leq 0,05$).

3.2 Análises imunológicas

A lisozima é responsável pela defesa contra bactérias Gram positivas e quebra da parede celular das bactérias estando associada ao sistema imune inato dos peixes (Giron-Perez, Velazquez-Fernandez, Diaz-Resendiz, Diaz-Salas, Canto-Montero, Medina-Diaz, Robledo-Marengo, Rojas-Garcia & Zaitseva, 2009). Os surubins alimentados com dieta contendo probiótico e os surubins vacinados apresentaram maior concentração de lisozima plasmática separadamente, não apresentando efeito sinérgico (Tabela 3), corroborando os estudos de Irianto, Robertson & Austin (2003) em kinguio (*Carassius auratus*, L.), de Khoshbavar-Rostami, Soltani & Hassan, (2007) em esturjão (*Huso huso*, L.), de Merrifield *et al.* (2010) e Panigrahi, Azad, Das, Dandpat, Das, Behera & Mishra (2009) em trutas arco-íris, e de Attia, Mesalhy, Galil & Fath (2012) em tilápia.

O presente estudo mostrou que os tratamentos com peixes vacinados e peixes alimentados com probiótico apresentaram atividade de lisozima plasmática superior à atividade plasmática dos peixes não tratados, porém não houve interação do fator probiótico com o fator vacina no aumento da concentração de lisozima plasmática dos peixes.

Como exposto por Panigrahi *et al.* (2009) o aumento da atividade fagocítica em peixes após alimentação com cepas probióticas é válido. Este aumento de atividade fagocítica pode ser visto em trutas arco-íris alimentadas com diferentes cepas probióticas (*Lactococcus lactis* sp., *Leuconostoc mesenteroides* e *Lactobacillus sakei*) (Balcazar *et al.*, 2007). No entanto, não foi observado diferenças entre os tratamentos na porcentagem de leucócitos fagocitários dos surubins do presente trabalho (Tabela 4).

Neste estudo não foram observadas diferenças na concentração plasmática de proteína total, imunoglobulina total e porcentagem de fagocitose (Tabela 4). O estudo de Mouriño *et al.* (2012) mostrou que não houve diferença na concentração de proteínas totais no soro sanguíneo de surubins híbridos alimentados com *W. cibaria* em relação aos não suplementados, bem como aumento na concentração de imunoglobulinas em surubins híbridos alimentados com probiótico em relação aos peixes não suplementados.

As imunoglobulinas são produzidas e secretadas pelos linfócitos B e responsáveis por importante defesa adaptativa em peixes teleosteos (Choi & Kim, 2011). Era esperado que os peixes vacinados neste

trabalho apresentassem aumento na concentração de imunoglobulinas totais presente no plasma, já que estas proteínas de defesa são comprovadamente ativadas após vacinação, como observado por Gudmundsdottir, Jonsdottir, Steinhorsdottir, Magnadottir & Gudmundsdottir (1997) em salmão do Atlântico (*Salmo salar*, L.) após imunização contra *Aeromonas salmonicida achromogenes*; Mikkelsen, Lund, Larsen & Seppola, (2011) em bacalhau (*Gadus morhua*, L.) vacinados contra *Vibrio anguillarum*; e Pasnik, Evans & Klesius (2006) em tilápias do Nilo imunizada contra *Streptococcus agalactiae*. Porém, o aumento de imunoglobulinas nesses trabalhos foi observado após infecção, aumentando assim a resposta imunológica e consequentemente a concentração de imunoglobulinas totais e específicas.

A atividade antimicrobiana do plasma sanguíneo dos surubins híbridos apresentou diferença significativa entre os tratamentos contra *A. hydrophila*, porém contra *Enterococcus durans* a atividade antimicrobiana não foi diferente (Tabela 5).

Os peptídeos antimicrobianos presentes no plasma, tais como as defensinas, possuem mecanismos de desestabilização de membranas de bactérias patogênicas contra *A. hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens* e *Vibrio anguillarum* (Mirski, Gryko, Bartoszcze, Bielawska-Drozd & Tyszkiewicz, 2011). Segundo Silva *et al.* (2013) a atividade antimicrobiana do soro de surubins híbridos vacinados intraperitonealmente foi superior que em peixes vacinados por imersão ou não vacinados. Em tilápias do Nilo imunizadas com vacina polivalente contendo *A. hydrophila*, *P. aeruginosa* e *E. coli*, por diferentes vias (intraperitoneal, oral e imersão) a atividade antimicrobiana do soro nos peixes vacinados foi maior contra *P. aeruginosa* e *E. coli* do que nos peixes não vacinados, sete e 21 dias após a infecção (Silva *et al.*, 2009).

Tabela 4: Parâmetros imunológicos plasmáticos: lisozima, proteína total, imunoglobulina total (média \pm erro padrão) plasmática e porcentagem de fagocitose em surubins híbridos (*Pseudoplatystoma reticulatum*⁺, Spix e Agassiz x *P. corruscans*^c, Eigenmann e Eigenmann) alimentados com ração contendo probiótico (Probiótico); vacinados contra *A. hydrophila* alimentados com ração contendo probiótico (Probiótico+vacina) e vacinados (Vacina) contra *A. hydrophila*; e não tratados (Controle).

Tratamentos	Lisozima ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Proteína total (mg.mL^{-1})	Imunoglobulina total (mg.mL^{-1})	Fagocitose (%)
Não tratado	10,32 \pm 0,39 ^a	23,64 \pm 0,65	0,96 \pm 0,39	7,22 \pm 0,72
Probiótico	10,71 \pm 0,61 ^b	24,60 \pm 0,59	1,61 \pm 0,50	9,75 \pm 1,16
Vacina	10,79 \pm 0,47 ^b	24,04 \pm 0,59	1,38 \pm 0,34	10,92 \pm 1,01
Probiótico+vacina	12,93 \pm 0,26 ^b	23,83 \pm 0,53	1,05 \pm 0,30	9,75 \pm 1,44
<i>p</i> do fator probiótico	0,018765	0,256662	0,674756	0,558108
<i>p</i> do fator vacina	0,024562	0,827398	0,853697	0,117067
<i>p</i> da interação	0,092330	0,655884	0,230215	0,117067

* Letras diferentes indicam diferenças significativas no Teste Tukey ($p \leq 0,05$).

Ademais, o título aglutinante foi superior nos dois grupos em que os peixes foram vacinados (Tabela 5). Nos estudos de Silva, Jatobá, Vieira, Mouriño, Bolivar, Seiffert, & Martins (2013), o título de aglutinação sérica em surubins híbrido vacinados intraperitonealmente antes do desafio com *A. hydrophila* também foi maior do que em peixes não vacinados. Aumento no título aglutinante contra *A. hydrophila*, *E. durans*, e *P. aeruginosa* foi observado em tilápias do Nilo, após infecção (Bailone, Martins, Mouriño, Vieira, Pedrotti, Nunes & Silva, 2010). Esses resultados indicam que a vacina induziu a aglutinação plasmática nos peixes e aumentou a proteção contra possíveis infecções posteriores, quando comparado com peixes não vacinados ou somente alimentados com ração suplementada com probiótico.

Tabela 5: Título aglutinante e atividade antimicrobiana do plasma (média \pm erro padrão) plasmática de surubins híbridos (*Pseudoplatystoma reticulatum*[♀], Spix e Agassiz x *P. corruscans*[♂], Eigenmann e Eigenmann) alimentados com ração contendo probiótico (Probiótico); vacinados contra *A. hydrophila* alimentados com ração contendo probiótico (Probiótico+vacina) e vacinados (Vacina) contra *A. hydrophila*; e não tratados (Controle).

Tratamentos	Título aglutinante			Atividade antimicrobiana		
	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>E. durans</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>E. durans</i>
Não tratado	7,33 \pm 0,21 ^a	10,40 \pm 0,39 ^a	9,80 \pm 0,00			
Probiótico	8,17 \pm 0,30 ^a	10,80 \pm 0,19 ^a	10,00 \pm 0,24			
Vacina	9,50 \pm 0,42 ^b	12,20 \pm 0,67 ^b	10,20 \pm 0,58			
Probiótico+vacina	9,66 \pm 0,21 ^b	11,60 \pm 0,73 ^b	9,40 \pm 0,37			
<i>p</i> do fator probiótico	0,114263	0,857213	0,425920			
<i>p</i> do fator vacina	0,000006	0,030488	0,789424			
<i>p</i> da interação	0,283987	0,374978	0,192460			

* Letras diferentes indicam diferenças significativa no Teste Tukey ($p \leq 0,05$).

4. CONCLUSÃO

A vacina promove aumento do título aglutinante, da concentração de lisozima e da atividade antimicrobiana em surubins híbridos. Isso confirma a modulação do sistema imunológico de surubins híbridos após vacinação contra *A. hydrophila*.

A alimentação com probiótico *W. cibaria* em condições experimentais por sua vez contribui para a resposta imunológica comprovada pelo aumento da lisozima e da contagem de trombócitos.

Com isso, pode-se afirmar que suplementação dietária com probiótico, *W. cibaria*, não teve interação com a vacinação de surubins híbridos (*Pseudoplatystoma corruscans* x *P. reticulatum*) contra *A. hydrophila*, contudo promovem a resposta dos parâmetros imunológicos e hematológicos diferentes dos peixes.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro ao professor M.L. Martins (CNPq 302493/2010-7); e à bolsa de pós-doutorado para J.L.P. Mouriño. Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado para G.V. Pereira e à Mar & Terra Ind. Com de Pescados S/A pelo apoio financeiro.

6. REFERÊNCIAS

- Amar EC, Kiron V, Satoh S, Okamoto N, Watanabe T (2000) Effect of dietary β -carotene on the immune response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fisheries Science*, **66**, 1068-1075.
- Arijo S, Rico R, Chabrillon M, Diaz-Rosales P, Martinez-Manzanares E, Balebona MC, Magarinos B, Toranzo AE, Morinigo MA (2005) Effectiveness of a divalent vaccine for sole, *Solea senegalensis* (Kaup), against *Vibrio harveyi* and *Photobacterium damsela* subsp *piscicida*. *J Fish Dis*, **28**, 33-38.
- Attia A, Mesalhy S, Galil Y A, Fath M (2012) Effect of injection vaccination against *Pseudomonas fluorescens* on specific and non-specific immune response of Nile tilapia (*Oreochromis Niloticus*) using different prepared antigens. *Open Access Scientific Reports*, **1**, 12.
- Avila FA, Paulillo AC, Schocken-Iturrino RP, Lucas FA, Orgaz A, Quintana JL (2000) Evaluation of the efficiency of a probiotic in the control of diarrhea and weight gain in calves. *Arq Bras Med Vet Zoo*, **52**, 41-46.
- Bailone RL, Martins ML, Mouriño JLP, Vieira FN, Pedrotti FS, Nunes GC, Silva BC (2010) Hematology and agglutination titer after polyvalent immunization and subsequent challenge with *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Arch Med Vet*, **42**, 221-227.
- Balcazar JL, de Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Vendrell D, Girones O, Muzquiz JL (2007) Enhancement of the immune response and protection induced by probiotic lactic acid bacteria against furunculosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fems Immunol Med Mic*, **51**, 185-193.
- Barbosa MC, Jatobá A, Vieira FD, Silva BC, Mouriño JLP, Andreatta ER, Seiffert WQ, Cerqueira VR (2011) cultivation of juvenile fat snook (*Centropomus parallelus* poey, 1860) fed probiotic in laboratory conditions. *Braz Arch Biol Techn*, **54**, 795-801.

- Boyd CE (1990) *Water quality in ponds for aquaculture*, Alabama Agricultural Experiment Station, (ed. by Auburn University), pp. 482. Auburn University, Ala.
- Campos JL (2004) Pintado culture in Brazil. *Global Aquaculture Advocate*, **42**, 42-43.
- Cheng S, Jiao XD, Zhang M, Sun L (2010) Analysis of the vaccine potential of a laboratory *Escherichia coli* strain in a Japanese flounder model. *Fish Shellfish Immunol*, **28**, 275-280.
- Choi SH, Kim KH (2011) Generation of two auxotrophic genes knock-out *Edwardsiella tarda* and assessment of its potential as a combined vaccine in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish Shellfish Immunol*, **31**, 58-65.
- Coppola MD, Conceição FR, Gil-Turnes C (2005) Effect of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus cereus* var. *toyoi* on the humoral and cellular response of mice to vaccines. *Food Agr Immunol*, **16**, 213-219.
- da Costa MM, Peixoto RD, Bojink CD, Castagna L, Meurer F, de Vargas AC (2008) Antimicrobial sensibility of bacterial isolates from jundia (*Rhamdia quelen*). *Pesqui. Vet. bras*, **28**, 477-480.
- Giron-Perez MI, Velazquez-Fernandez J, Diaz-Resendiz K, Diaz-Salas F, Canto-Montero C, Medina-Diaz I, Robledo-Marenco M, Rojas-Garcia A, Zaitseva G (2009) Immunologic parameters evaluations in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to sublethal concentrations of diazinon. *Fish Shellfish Immunol*, **27**, 383-385.
- Goldenfarb PB, Bowyer FP, Hall E, Brosious E (1971) Reproducibility in Hematology Laboratory - Microhematocrit Determination. *Am J Clin Pathol*, **56**, 35-39.
- Gudmundsdottir BK, Jonsdottir H, Steinhorsdottir V, Magnadottir B, Gudmundsdottir S (1997) Survival and humoral antibody response of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., vaccinated against *Aeromonas salmonicida* ssp. *achromogenes*. *J Fish Dis*, **20**, 351-360.

- Irianto A, Robertson PA, Austin B (2003) Oral administration of formalin-inactivated cells of *Aeromonas hydrophila* A3-51 controls infection by atypical *A. salmonicida* in goldfish, *Carassius auratus* (L.). *J Fish Dis*, **26**, 117-120.
- Jatobá A, Vieira Fd, Buglione-Neto C, Mouriño J, Silva BC, Seiffter W, Andreatta E (2011) Diet supplemented with probiotic for Nile tilapia in polyculture system with marine shrimp. *Fish Physiol Biochem*, **37**, 725-732.
- Khoshbavar-Rostami HA, Soltani M, Hassan HMD (2007) Immune responses of great sturgeon *Huso huso* to *Aeromonas hydrophila* bacterin. *J Fish Biol*, **70**, 1931-1938.
- Leal CAG, Carvalho-Castro GA, Sacchetin PSC, Lopes CO, Moraes AM, Figueiredo HCP (2010) Oral and parenteral vaccines against *Flavobacterium columnare*: evaluation of humoral immune response by ELISA and in vivo efficiency in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquacult Int*, **18**, 657-666.
- Martins ML, Nomura DT, Myiazaki DMY, Pilarsky F, Ribeiro K, Castro MP, Campos CFM (2004) Physiological and haematological response of *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) exposed to single and consecutive stress of capture. *Acta Sci Anim Sci*, **26**, 449-456.
- Martins ML, Vieira FN, Jeronimo GT, Mouriño JL, Dotta G, Speck GM, Bezerra AJ, Pedrotti FS, Buglione-Neto CC, Pereira G, Jr. (2009) Leukocyte response and phagocytic activity in Nile tilapia experimentally infected with *Enterococcus* sp. *Fish Physiol Biochem*, **35**, 219-222.
- Merrifield DL, Bradley G, Baker RTM, Davies SJ (2010) Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) II. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria postantibiotic treatment. *Aquacult Nutr*, **16**, 496-503.
- Mikkelsen H, Lund V, Larsen R, Seppola M (2011) Vibriosis vaccines based on various sero-subgroups of *Vibrio anguillarum* O2

induce specific protection in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) juveniles. *Fish Shellfish Immun*, **30**, 330-339.

Mirski T, Gryko R, Bartoszcze M, Bielawska-Drozd A, Tyszkiewicz W (2011) Antimicrobial peptides: new possibilities to combat infections in humans and animals. *Med Weter*, **67**, 517-521.

Moraes, F R & Martins, M L. (2004) Favorable conditions and principal teleostean diseases in intensive fish farming. In: *Special Topics In Tropical Intensive Freshwater Fish Farming* (ed. by Tecart), pp. 343-383. São Paulo.

Mouriño JLP, Vieira FD, Jatobá AB, da Silva BC, Jesus GFA, Seiffert WQ, Martins ML (2012) Effect of dietary supplementation of inulin and *W. cibaria* on haemato-immunological parameters of hybrid surubim (*Pseudoplatystoma* sp). *Aquacult Nutr*, **18**, 73-80.

Nunez J, Castro D, Fernandez C, Dugue R, Chu-Koo F, Duponchelle F, Garcia C, Renno JF (2011) Hatching rate and larval growth variations in *Pseudoplatystoma punctifer*: maternal and paternal effects. *Aquac Res*, **42**, 764-775.

Panigrahi A, Azad IS, Das BK, Dandpat J, Das G, Behera S, Mishra SS (2009) Probiotic induced immunomodulation: investigation into the cellular and molecular mechanism involved. *Research Journal of Biotechnology*, **4**, 7-13.

Pasnik DJ, Evans JJ, Klesius PH (2006) Passive immunization of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) provides significant protection against *Streptococcus agalactiae*. *Fish Shellfish Immun*, **21**, 365-371.

Piaia R, Townsend CR, Baldisserotto B (1999) Growth and survival of fingerlings of silver catfish exposed to different photoperiods. *Aquacult Int*, **7**, 201-205.

Romalde JL, Luzardo-Alvarez A, Ravelo C, Toranzo AE, Blanco-Wendz J (2004) Oral immunization using alginate microparticles as a useful strategy for booster vaccination against fish lactococcosis. *Aquaculture*, **236**, 119-129.

- Rosenfeld, G. (1947) Pancromic stain for haematology and clinical cytology. A new combination of the components May-Grünwald and Giemsa in just one formula for rapid staining. *Mem. Inst. Butantan*, **20**, 329-334.
- Sankaran K, Gurnani S (1972) Variation in catalytic activity of lysozyme in fishes. *Indian J Biochem Bio*, **9**, 162-165.
- Sasan H, Abd Rahim R, Ling FH, Radu S, Davoud HM (2011) Construction of vaccine from *Lactococcus lactis* bacteria using *Aeromonas hydrophila* virulent Aerolysin gene. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, **10**, 143-154.
- Silva BC, Jatobá A, Vieira FN, Mouriño JLP, Bolívar N, Seiffert WQ, Martins ML (2013) Immunization of hybrid surubim (*Pseudoplatystoma corruscans* x *P. fasciatum*) against motile *Aeromonas hydrophila* septicemia. *Braz Arch Biol Techn*, **56**, 81-84.
- Silva BC, Martins ML, Jatobá A, Neto CCB, Vieira FN, Pereira GV, Jeronimo GT, Seiffert WQ, Mouriño JLP (2009) Hematological and immunological responses of Nile tilapia after polyvalent vaccine administration by different routes. *Pesqui. vet. bras*, **29**, 874-880.
- Silva BC, Mouriño JLP, Vieira FN, Jatobá A, Seiffert WQ, Martins ML (2012) Haemorrhagic septicaemia in the hybrid surubim (*Pseudoplatystoma corruscans* x *Pseudoplatystoma fasciatum*) caused by *Aeromonas hydrophila*. *Aquac Res*, **43**, 908-916.
- Stringfellow K, Caldwell D, Lee J, Mohnl M, Beltran R, Schatzmayr G, Fitz-Coy S, Broussard C, Farnell M (2011) Evaluation of probiotic administration on the immune response of coccidiosis-vaccinated broilers. *Poultry Sci*, **90**, 1652-1658.
- Sun Y, Liu CS, Sun L (2010) Isolation and analysis of the vaccine potential of an attenuated *Edwardsiella tarda* strain. *Vaccine*, **28**, 6344-6350.
- Vandenberg GW (2004) Oral vaccines for finfish: academic theory or commercial reality? *Anim Health Res Rev*, **5**, 301-304.

Wang N, Yang Z, Zang MF, Liu YJ, Lu CP (2013) Identification of Omp38 by immunoproteomic analysis and evaluation as a potential vaccine antigen against *Aeromonas hydrophila* in Chinese breams. *Fish Shellfish Immun*, **34**, 74-81.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

É relatado na literatura que o uso de vacinas e probióticos aumentam a resposta imunológica de peixes. Por isso, o uso associado de vacina com a suplementação de probióticos possui grande importância, pois pode promover animais mais preparados a desenvolver respostas dos parâmetros imunológicos e hematológicos perante uma infecção.

Este trabalho é a base para futuros estudos na linha do uso de probióticos e vacinação em peixes nativos. Avaliar como seria a resposta hematológica e imunológica após infecção dos peixes, submetidos aos mesmos tratamentos desse trabalho, com a bactéria patogênica *A. hydrophila* e seus sorotipos seria interessante, já que nem toda a cepa desta bactéria se comporta da mesma maneira. E ainda avaliar infecções contra outras bactérias patogênicas comuns na aquicultura continental, por exemplo, as *Enterococcus* sp. e *Flavobacterium* sp. para averiguar se a vacina desenvolvida neste trabalho e suas vias de aplicação, também imuniza os peixes contra essas bactérias.

Experimentos visando os parâmetros zootécnicos dos surubins híbridos tais como: ganho de peso; fator de conversão alimentar; crescimento; consumo de ração e mortalidade acumulada são perspectivas do nosso grupo, uma vez que esses parâmetros são os mais importantes quando falamos de produção de peixes em fazendas de cultivo.

8. REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

AGNEW, W.; BARNES, A. C. *Streptococcus iniae*: An aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination. **Veterinary Microbiology**, v. 122, n. 1-2, p. 1-15, 2007.

ALY, S. M.; AHMED, Y. A. G.; GHAREEB, A. A. A.; MOHAMED, M. F. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 25, n. 1-2, p. 128-136, 2008.

ARSLAN, M.; DABROWSKI, K.; FERRER, S.; DIETRICH, M.; RODRIGUEZ, G. Growth, body chemical composition and trypsin activity of South American catfish, surubim (*Pseudoplatystoma* sp.) juveniles fed different dietary protein and lipid levels. **Aquaculture Research**, v. 44, n. 5, p. 760-771, 2013.

AUSTIN, B. Vibrios as causal agents of zoonoses. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3-4, p. 310-317, 2010.

AVILA, F. A., PAULILLO, A. C., SCHOCKEN-ITURRINO, R. P., LUCAS, F. A., ORGAZ, A. & QUINTANA, J. L. Evaluation of the efficiency of a probiotic in the control of diarrhea and weight gain in calves. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 52, n. 1, p. 41-46, 2000.

BALCAZAR, J. L.; VENDRELL, D.; DE BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; MUZQUIZ, J. L. Effect of *Lactococcus lactis* CLFP 100 and *Leuconostoc mesenteroides* CLFP 196 on *Aeromonas salmonicida* Infection in Brown Trout (*Salmo trutta*). **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 17, n. 3, p. 153-157, 2009.

BALCAZAR, J. L.; DE BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; CUNNINGHAM, D.; VENDRELL, D.; MUZQUIZ, J.L. The role of probiotics in aquaculture. **Veterinary Microbiology**, v. 114, n. 3-4, p. 173-186, 2006.

BARBOSA, M. C.; JATOBÁ, A.; VIEIRA, F. N.; SILVA, B. C.; MOURIÑO, J. L. P.; ANDREATTA, E. R.; SEIFFERT, W. Q.; CERQUEIRA, V. R. Cultivation of juvenile fat snook (*Centropomus parallelus* Poey, 1860) fed probiotic in laboratory conditions. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 4, p. 795-801, 2011.

BASTARDO, A.; RAVELO, C.; CASTRO, N.; CALHEIROS, J.; ROMALDE, J. L. Effectiveness of bivalent vaccines against *Aeromonas hydrophila* and *Lactococcus garvieae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 32, n. 5, p. 756-61, 2012.

BEAZ-HIDALGO, R.; FIGUERAS, M. J. *Aeromonas* spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease. **Journal of Fish Diseases**, v. 36, n. 4, p. 371-388, 2013.

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.

BRASIL. Ministério de Pesca e Aquicultura (MPA). **Boletim estatístico de pesca e aquicultura**, Brasil, 2010.

BUITRAGO-SUAREZ, U. A.; BURR, B. M. Taxonomy of the catfish genus *Pseudoplatystoma* Bleeker (Siluriformes: Pimelodidae) with recognition of eight species. **Zootaxa**, n. 1512, p. 1-38, 2007.

CAIPANG, C. M.; HYNES, N.; PUANGKAEW, J.; BRINCHMANN, M. F.; KIRON, V. Intraperitoneal vaccination of Atlantic cod, *Gadus morhua* with heat-killed *Listonella anguillarum* enhances serum antibacterial activity and expression of immune response genes. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 24, n. 3, p. 314-22, 2008.

CAMPOS, J. L. O cultivo de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*, Spix; Agassiz, 1829), outras espécies do gênero *Pseudoplatystoma* e seus híbridos. In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. Espécies nativas para piscicultura no Brasil. 2. ed. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2010. p. 335-358.

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

CEREZUELA, R.; GUARDIOLA, F.A.; MESEGUER, J.; ESTEBAN, M. Á. Increases in immune parameters by inulin and *Bacillus subtilis* dietary administration to gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) did not correlate with disease resistance to *Photobacterium damsela*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 32, n. 6, p. 1032-1040, 2012.

COPPOLA, M. D.; CONCEICAO, F. R.; GIL-TURNES, C. Effect of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus cereus* var. toyoi on the humoral and cellular response of mice to vaccines. **Food and Agricultural Immunology**, v. 16, n. 3-4, p. 213-219, Dec 2005.

COSTA, A. B. **Caracterização de bactérias do complexo *Aeromonas* isoladas de peixes de água doce e sua atividade patogênica**. 2003. 54p. Tese (Doutorado em Agronomia). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2003.

DUFF, D. C. B. The Oral Immunization of Trout Against Bacterium Salmonicida. **The Journal of Immunology**, v. 44, n. 1, p. 87-94, 1942.

EBENSEN, T.; PAUKNER, S.; LINK, C.; KUDELA, P.; DE DOMENICO, C.; LUBITZ, W.; GUZMAN, C. A. Bacterial ghosts are an efficient delivery system for DNA vaccines. **The journal of immunology**, v.172, p. 6858-6865, 2004.

EL-BARBARY, M. I. Some clinical, microbiological and molecular characteristics of *Aeromonas hydrophila* isolated from various naturally infected fishes. **Aquaculture International**, v. 18, n. 5, p. 943-954, Aug 2010.

ELLIS, A. E. **Fish vaccination**. London: Academic Press, 1988. 255p.

EVANS, J. J.; KLESIOUS, P. H.; SHOEMAKER, C. A. Efficacy of *Streptococcus agalactiae* (group B) vaccine in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by intraperitoneal and bath immersion administration. **Vaccine**, v. 22, p. 3769-3773, 2004.

FAGUNDES, M.; URBINATI, E. C. Stress in pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) during farming procedures. **Aquaculture**, v. 276, n. 1-4, p. 112-119, 2008.

FAO - Fisheries and Aquaculture Information and Statistics Service - 28/06/2013.

FERGUSON, R. M. W.; MERRIFIELD, D. L.; HARPER, G. M.; RAWLING, M. D.; MUSTAFA, S.; PICCHIETTI, S.; BALCAZAR, L.; DAVIES, S. J. The effect of *Pediococcus acidilactici* on the gut microbiota and immune status of on-growing red tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 3, p. 851-862, 2010.

FRANCA-SCORVO, C. M. D.; BACCARIN, A. E.; VIDOTTI, R. M.; ROMAGOSA, E.; SCORVO, J. D.; AYROZA, L. M. D. Influence of stoking densities, intensive and semi-intensive rearing systems on carcass yield, nutritional quality of the fillet and organoleptic characteristics of pintado *Pseudoplatystoma corruscans*. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 34, n. 4, p. 511-518, 2008.

FUJIMOTO, R. Y. ; SANTOS, R. F. B; CARNEIRO, D. J. Morphological deformities in the osseous structure in spotted sorubim *Pseudoplatystoma coruscans* (agassiz & spix, 1829) with vitamin c deficiency. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, p. 379-384, 2013.

GATESOUBE, F. J. The use of probiotics in aquaculture. **Aquaculture**, v. 180, n. 1-2, p. 147-165, 1999.

GHOSH, S.; SINHA, A.; SAHU, C. Dietary probiotic supplementation in growth and health of live-bearing ornamental fishes. **Aquaculture Nutrition**, v. 14, n. 4, p. 289-299, 2008.

GODINHO, A. L.; KYNARD, B.; GODINHO, H. P. Migration and spawning of female surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*, Pimelodidae) in the Sao Francisco river, Brazil. **Environ Biol Fishes**, v. 80, n. 4, p. 421-433, 2007.

GUDMUNDSOTTIR, B. K.; BJORNSDOTTIR, B. Vaccination against atypical furunculosis and winter ulcer disease of fish. **Vaccine**, v. 25, n. 30, p. 5512-5523, 2007.

HEO, W.-S.; KIM, Y.-R.; KIM, E.-Y.; BAI, S. C.; KONG, I.-S. Effects of dietary probiotic, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* I2, supplementation on the growth and immune response of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Aquaculture**, v. 376–379, n. 0, p. 20-24, 2013.

HO, L. P.; HAN-YOU LIN, J.; LIU, H.C.; CHEN, H.E.; CHEN, T.Y.; YANG, H. L. Identification of antigens for the development of a subunit vaccine against *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 30, n. 1, p. 412-9, 2011.

HOLWAY, J. E.; KLONTZ, G. W. Procedure for testing antigenicity of vaccines for immunization of fish against furunculosis. **Progressive Fish-Culturist**, v. 33, n. 1, p. 42-&, 1971.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 1, p. 35-73, 2010.

JATOBÁ, A.; VIEIRA, F. N.; BUGLIONE-NETO, C. C.; MOURIÑO, J. L.; SILVA, B. C.; SEIFTER, W. Q. ANDREATTA, E. R. Diet supplemented with probiotic for Nile tilapia in polyculture system with marine shrimp. **Fish Physiology Biochemistry**, v. 37, p. 725-732, 2011.

JATOBÁ, A.; VIEIRA, F. D.; NETO, C. B.; SILVA, B. C.; MOURIÑO, J. L. P.; JERONIMO, G. T.; DOTTA, G.; MARTINS, M. L. Lactic-acid bacteria isolated from the intestinal tract of Nile tilapia utilized as probiotic. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 43, n. 9, p. 1201-1207, 2008.

KIM, Y. R.; KIM, E. Y.; CHOI, S. Y.; HOSSAIN, M. T.; OH, R.; HEO, W. S.; LEE, J. M.; CHO, Y. C.; KONG, I. S. Effect of a Probiotic Strain, *Enterococcus faecium*, on the Immune Responses of Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 526-529, 2012.

KUMAR, S. R.; AHMED, V. P. I.; PARAMESWARAN, V.; SUDHAKARAN, R.; BABU, V. S.; HAMEED, A. S. S. Potential use of chitosan nanoparticles for oral delivery of DNA vaccine in Asian sea bass (*Lates calcarifer*) to protect from *Vibrio* (*Listonella*) *anguillarum*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 25, n. 1–2, p. 47-56, 2008.

KUMARAN, S.; DEIVASIGAMANI, B.; ALAGAPPAN, K. M.; SAKTHIVEL, M.; PRASAD, S. G. Isolation and characterization of *Pseudomonas* sp KUMS3 from Asian sea bass (*Lates calcarifer*) with fin rot. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 26, n. 2, p. 359-363, 2010.

KWON, S. R.; NAM, Y. K.; KIM, S. K.; KIM, K. H. Protection of tilapia (*Oreochromis mosambicus*) from edwardsiellosis by vaccination with *Edwardsiella tarda* ghosts. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 20, n. 4, p. 621-626, 2006.

LIU, C.-H.; CHIU, C.-H.; WANG, S.-W.; CHENG, W. Dietary administration of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, enhances the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, *Epinephelus coioides*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 33, n. 4, p. 699-706, 2012.

MAGNADOTTIR, B. Immunological control of fish diseases. **Marine Biotechnology**, v. 12, n. 4, p. 361-379, Aug 2010.

MANJU, R.A., HANIFFA, M.A., SINGH, S.V.A., RAMAKRISHNAN, C.M., DHANARAJ, M., INNOCENT, B.X., SEETHARAMAN, S. & AROCKIARAJ, A.J. Effect of dietary administration of efinol (R) FG on growth and enzymatic activities of *Channa striatus* (Bloch, 1793). **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 10, n. 6, p. 796-801, 2011.

MERRIFIELD, D. L.; DIMITROGLOU, A.; BRADLEY, G.; BAKER, R. T. M.; DAVIES, S. J. Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) I. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria. **Aquaculture Nutrition**, v. 16, n. 5, p. 504-510, 2010.

MLADINEO, I.; MILETIC, I.; BOCINA, I. *Photobacterium damsela* subsp *piscicida* outbreak in cage-reared Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus*. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 18, n. 1, p. 51-54, 2006.

MORAES, F. R.; MARTINS, M. L. Favorable conditions and principal teleostean diseases in intensive fish farming. In: **Especial topics in tropical intensive freshwater fish farming**. São Paulo: TecArt, 2004. p. 343-383.

- MOURIÑO, J. L. P. et al. Effect of dietary supplementation of inulin and *W. cibaria* on haemato-immunological parameters of hybrid surubim (*Pseudoplatystoma* sp). **Aquaculture Nutrition**, v. 18, n. 1, p. 73-80, 2011.
- NAYAK, D. K.; ASHA, A.; SHANKAR, K. M.; MOHAN, C. Evaluation of biofilm of *Aeromonas hydrophila* for oral vaccination of *Clarias batrachus* - a carnivore model. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 16, n. 5, p. 613-619, 2004.
- NEWAJ-FYZUL, A.; ADESIYUN, A. A.; MUTANI, A.; RAMSUBHAG, A.; BRUNT, J.; AUSTIN, B. *Bacillus subtilis* AB1 controls *Aeromonas* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 5, p. 1699-1706, 2007.
- NUNEZ, J.; CASTRO, D.; FERNANDEZ, C.; DUGUE, R.; CHU-KOO, F.; DUPONCHELLE, F.; GARCIA, C.; RENNO, J. F. Hatching rate and larval growth variations in *Pseudoplatystoma punctifer*: maternal and paternal effects. **Aquaculture Research**, v. 42, n. 6, p. 764-775, 2011.
- ORTEGA, C.; MUZQUIZ, J. L.; FERNANDEZ, A.; RUIZ, I.; DE BIAS, I.; SIMON, M. C.; ALONSO, J. L. Water quality parameters associated with *Aeromonas* spp-affected hatcheries. **Veterinary Research**, v. 27, n. 4, p. 553-560, 1996.
- PANIGRAHI, A.; AZAD, I. S.; DAS, B. K.; DANDPAT, J.; DAS, G.; BEHERA, S.; MISHRA, S. S. Probiotic induced immunomodulation: investigation into the cellular and molecular mechanism involved. **Research Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 3, p. 7-13, 2009.
- PANIGRAHI, A.; KIRON, V.; PUANGKAEW, J.; KOBAYASHI, T.; SATOH, S.; SUGITA, H. The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Aquaculture**, v. 243, n. 1-4, p. 241-254, 2005.
- PEDROTTI, F. S.; DAVIES, S.; MERRIFIELD, D. L.; MARQUES, M. R. F.; FRAGA, A. P. M.; MOURIÑO, J. L. P.; FRACALOSSO, D. M. The autochthonous microbiota of the freshwater omnivores jundiá (*Rhamdia quelen*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*) and the effect of

dietary carbohydrates. **Aquaculture Research**, v.10, n. 1, p. n/a-n/a, 2013.

PICCHIETTI, S.; FAUSTO, A. M.; RANDELLI, E.; CARNEVALI, O.; TADDEI, A. R.; BUONOCORE, F.; SCAPIGLIATI, G.; ABELLI, L. Early treatment with *Lactobacillus delbrueckii* strain induces an increase in intestinal T-cells and granulocytes and modulates immune-related genes of larval *Dicentrarchus labrax* (L.). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 26, n. 3, p. 368-376, 2009.

PLANT, K. P.; LAPATRA, S. E. Advances in fish vaccine delivery. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 35, n. 12, p. 1256-1262, 2011.

PRIDGEON, J. W.; KLESIUS, P. H. Development and efficacy of a novobiocin-resistant *Streptococcus iniae* as a novel vaccine in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Vaccine**, v. 29, n. 35, p. 5986-5993, 2011.

PRIDGEON, J. W.; KLESIUS, P.H. Fish vaccines in aquaculture: proactive treatment protects salmon, catfish, other fish. **Global Aquaculture Advocate**, 2010.

RALL, V. L. M.; IARIA S .T.; HEIDTMANN S.; PIMENTA F.C.; GAMBA R.C.; PEDROSO D. M. M. Aeromonas species isolated from Pintado fish (*Pseudoplatystoma* sp): Virulence factors and drug susceptibility. **Revista de Microbiologia**, v. 29, n. 3, p.222-227, 1998.

RENESHWARY, C.; RAJALAKSHMI, M.; MARIMUTHU, K.; XAVIER, R. Dietary administration of *Bacillus thuringiensis* on the cellular innate immune response of African catfish (*Clarias gariepinus*) against *Aeromonas hydrophila*. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 15, n. 1, p. 53-60, 2011.

RIDHA, M. T.; AZAD, I. S. Preliminary evaluation of growth performance and immune response of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* supplemented with two putative probiotic bacteria. **Aquaculture Research**, v. 43, n. 6, p. 843-852, 2012.

RINGO, E.; LOVMO, L.; KRISTIANSEN, M.; BAKKEN, Y.; SALINAS, I.; MYKLEBUST, R.; OLSEN, R.E.; MAYHEW, T. M.

Lactic acid bacteria vs. pathogens in the gastrointestinal tract of fish: a review. **Aquaculture Research**, v. 41, n. 4, p. 451-467, 2010.

RINGO, E.; GATESOUBE, F. J. Lactic acid bacteria in fish: a review. **Aquaculture**, v. 160, n. 3-4, p. 177-203, 1998.

ROMAGOSA, E.; LIRANCO, A. D. D. S.; SCORVO, J. D. Growth performance of *Pseudoplatystoma corruscans* stocked in rearing systems: semi-intensive (ponds) and intensive (cages). **Ciência Rural**, v. 41, n. 3, p. 524-530, 2011.

ROUBACH, R.; CORREIA, E. S.; ZAIDEN, S. F.; MARTINO, R. C.; CAVALLI, R. O. Aquaculture in Brazil. **World Aquaculture**, v. 34, n. 1, p. 28-34, 2003.

SANTOS, R. V. R.; MARTINS, S. G. F.; POMPEU, P. S. An individual-based model for evolutionary effects of selective fishing applied to *Pseudoplatystoma corruscans*. **Physica A: Statistical Mechanics and its Applications**, v. 391, n. 21, p. 5112-5120, 2012.

SASAN, H.; ABD RAHIM, R.; LING, F.H.; RADU, S.; DAVOUD, H. M. Construction of vaccine from *Lactococcus lactis* bacteria using *Aeromonas hydrophila* virulent Aerolysin gene. **Iranian Journal of Fisheries Sciences**, v. 10, n. 1, p. 143-154, 2011.

SCHRADER, K. K.; HARRIES, M. D.; DARWISH, A. M. In vitro comparisons of the inhibitory activity of florfenicol, copper sulphate and potassium permanganate towards *Aeromonas hydrophila* and *Flavobacterium columnare*. **Aquaculture Research**, v. 44, n. 2, p. 212-219, 2013.

SILVA, B.C. **Septicemia hemorrágica em surubim híbrido (*Pseudoplatystoma corruscans* x *P. fasciatum*) causada por *Aeromonas hydrophila***. Dissertação (Mestre em Aquicultura) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 70 p., 2010.

SILVA, B. C.; MOURIÑO, J. L. P.; VIEIRA, F. N.; JATOBÁ, A.; SEIFFERT, W. Q.; MARTINS, M. L. Haemorrhagic septicemia in the hybrid surubim (*Pseudoplatystoma corruscans* x *Pseudoplatystoma*

fasciatum) caused by *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture Research**, v. 43, p. 908-916, 2012.

SILVA, B. C.; MARTINS, M. L.; JATOBÁ, A.; NETO, C. C. B.; VIEIRA, F. N., PEREIRA, G. V.; JERONIMO, G. T.; SEIFFERT, W. Q.; MOURIÑO, J.L.P. Hematological and immunological responses of Nile tilapia after polyvalent vaccine administration by different routes. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 11, p. 874-880, 2009.

STRINGFELLOW, K., CALDWELL, D., LEE, J., MOHNL, M., BELTRAN, R., SCHATZMAYR, G., FITZ-COY, S., BROUSSARD, C. & FARNELL, M. Evaluation of probiotic administration on the immune response of coccidiosis-vaccinated broilers. **Poultry Science**, v. 90, n. 8, p. 1652-1658, 2011.

STROM-BESTOR, M.; WIKLUND, T. Inhibitory activity of *Pseudomonas* sp on *Flavobacterium psychrophilum*, in vitro. **Journal of Fish Diseases**, v. 34, n. 4, p. 255-264, 2011.

SUN, Y.; HU, Y H.; LIU, C S.; SUN, L. Construction and analysis of an experimental *Streptococcus iniae* DNA vaccine. **Vaccine**, v. 28, n. 23, p. 3905-3912, 2010.

SUN, Y.-Z.; YANG, H.-L.; HUANG, K.-P.; YE, J.-D.; ZHANG, C.-X. Application of autochthonous *Bacillus* bioencapsulated in copepod to grouper *Epinephelus coioides* larvae. **Aquaculture**, v. 392–395, n. 0, p. 44-50, 2013.

SUN, Y. Z.; YANG, H. L.; MA, R. L.; ZHANG, C. X.; LIN, W. Y. Effect of dietary administration of *Psychrobacter* sp. on the growth, feed utilization, digestive enzymes and immune responses of grouper *Epinephelus coioides*. **Aquaculture Nutrition**, v. 17, n. 3, p. 733-740, 2011.

TAPIA-PANIAGUA, S. T.; DÍAZ-ROSALES, P.; LEÓN-RUBIO, J. M.; GARCÍA DE LA BANDA, I.; LOBO, C.; ALARCÓN, F. J.; CHABRILLÓN, M.; ROSAS-LEDESMA, P.; VARELA, J. L.; RUIZ-JARABO, I.; ARIJO, S.; ESTEBAN, M. A., MARTÍNEZ-MANZANARES, E.; MANCERA, J. M.; BALEBONA, M C.; MORIÑIGO, M. A. Use of the probiotic *Shewanella putrefaciens* Pdp11 on the culture of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) and

gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). **Aquaculture International**, v. 20, n. 6, p. 1025-1039, 2012.

TOBAR, J. A.; JEREZ, S.; CARUFFO, M.; BRAVO, C.; CONTRERAS, F.; BUCAREY, S. A.; HAREL, M. Oral vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar*) against salmonid rickettsial septicaemia. **Vaccine**, v.29, n.12, p.2336-2340, 2011.

TOURAKI, M.; KARAMANLIDOU, G.; KARAVIDA, P.; CHRYSI, K. Evaluation of the probiotics *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum* bioencapsulated in *Artemia nauplii* against vibriosis in European sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*, L.). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 6, p. 2425-2433, 2012.

TU, F.P.; CHU, W.H.; ZHUANG, X. Y.; LU, C.P. Effect of oral immunization with *Aeromonas hydrophila* ghosts on protection against experimental fish infection. **Letters In Applied Microbiology**, v.50, n.1, p. 13-17,2009.

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

VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 4, p. 655-671, 2000.

VIEIRA, F. N.; PEDROTTI, F. S.; BUGLIONE, C. C.; MOURIÑO, J. L. P.; BELTRAME, E.; MARTINS, M. L.; RAMIRES, C.; VINATEA, L. A. Lactic-acid bacteria increase the survival of marine shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after infection with *Vibrio harveyi*. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 4, p. 251-255, 2007.

WANG, N.; YANG, Z.; ZANG, M. F.; LIU, Y. J.; LU, C. P. Identification of Omp38 by immunoproteomic analysis and evaluation as a potential vaccine antigen against *Aeromonas hydrophila* in Chinese breams. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 34, n. 1, p. 74-81, 2013.

YAN, Y.; MU, W.; ZHANG, L.; GUAN, L.; LIU, Q.; ZHANG, Y. Asd-based balanced-lethal system in attenuated *Edwardsiella tarda* to

express a heterologous antigen for a multivalent bacterial vaccine. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 34, n. 5, p. 1188-1194, 2013.

ZHANG, Z.; WU, H.; XIAO, J.; WANG, Q.; LIU, Q.; ZHANG, Y. Immune responses of zebrafish (*Danio rerio*) induced by bath-vaccination with a live attenuated *Vibrio anguillarum* vaccine candidate. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 33, n. 1, p. 36-41, 2012.

9. ANEXO

Figura 5: Sala Bioensaio I do Laboratório de Sanidade de Organismos Aquáticos (NEPAq/CCA/UFSC).



Figura 6: Visão externa da bateria de filtros biológicos do sistema de recirculação (a) constituído por: um filtro mecânico (b), um filtro biológico anaeróbico (c) e dois filtros biológicos aeróbicos (d).



Figura 7: Vacinação intraperitoneal de surubins híbridos (*Pseudoplatystoma reticulatum*[♀] x *P. corruscans*[♂]) contra septicemia hemorrágica bacteriana causada pela bactéria *A. hydrophila*.



Figura 8: Coleta do sangue por pulsão do vaso caudal (a), e parâmetros zootécnicos: comprimento total em centímetros (b) e peso em gramas (c).

