



**Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Agrárias
Departamento de Aqüicultura**

**Resposta hematológica e imunológica de tilápia do Nilo após aplicação de
vacina polivalente por banho de imersão, injeção intraperitoneal e
administração oral**

Bruno Corrêa da Silva

**Florianópolis / SC
2008**



**Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Agrárias
Departamento de Aqüicultura**

**Resposta hematológica e imunológica de tilápia do Nilo após aplicação de
vacina polivalente por banho de imersão, injeção intraperitoneal e
administração oral**

Trabalho de conclusão apresentada ao
curso de graduação de Engenharia de
Aqüicultura da Universidade Federal de
Santa Catarina.

Orientador: Dr. Mauricio Laterça Martins

Bruno Corrêa da Silva

**Florianópolis / SC
2008**

Silva, Bruno Corrêa.

Resposta hematológica e imunológica de tilápia do Nilo após aplicação de vacina polivalente por diferentes vias.

Relatório de estágio supervisionado II.

CURSO DE ENGENHARIA DE AQUICULTURA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRARIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

FLORIANÓPOLIS /SC - BRASIL

34 PÁGINAS

AGRADECIMENTOS

Ao professor e amigo Mauricio Martins Laterça pela orientação e apoio em todo o projeto assim como na minha vida acadêmica,

Ao Engenheiro Agrônomo Roberto Hoop e a fundação 25 de julho pela sua contribuição para realização do experimento,

Ao meu supervisor e amigo José Luiz Moriño que com muita animação e seriedade soube conduzir todo o desenvolvimento do trabalho,

Aos amigos, Adolfo Jatobá, Felipe do Nascimento Vieira e Celso Buglione Neto pelos ensinamentos em microbiologia, conselhos, correções e paciência durante a realização do experimento,

A todos os funcionários e professores do LCM que contribuíram de alguma forma para o meu aprendizado e realização deste trabalho, em especial ao professor e eterno amigo Elpídio Beltrame,

A professora Andrea Santarosa Freire, pelos ensinamentos e por me incentivar na vida como pesquisador,

Aos meus amigos de graduação pelo companheirismo e amizade,

Aos meus familiares pela dedicação e carinho,

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

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

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

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

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

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	5
1. INTRODUÇÃO	6
1.1 ASPECTOS DA PRODUÇÃO DE TILÁPIA	6
1.2 BACTERIOSES EM TILÁPIAS	6
1.3 VACINAS PARA PEIXES	7
1.4 ESTRATÉGIAS DE VACINAÇÃO	7
1.5 VACINAS POLIVALENTES	9
1.6 HEMATOLOGIA DE PEIXES	10
1.7 SISTEMA IMUNOLÓGICO DE PEIXES	11
2. OBJETIVO	13
2.1 OBJETIVO GERAL	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3. ARTIGO	14
RESPOSTA HEMATOLÓGICA E IMUNOLÓGICA DE TILÁPIA DO NILO APÓS ADMINISTRAÇÃO DE VACINA POLIVALENTE POR DIFERENTES VIAS	16
INTRODUÇÃO	17
MATERIAL E MÉTODOS	18
RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
AGRADECIMENTOS	25
REFERENCIAS	26
5. REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores médios e desvio padrão de parâmetros hematológicos em tilápia do Nilo não vacinada; vacinada por injeção intraperitoneal o contendo 1,5 mL de suspensão contendo 2×10^8 bactérias inativadas $\cdot \text{mL}^{-1}$; via oral alimentada duas vezes ao dia com ração contendo vacina na proporção de 2×10^7 bactérias inativadas $\cdot \text{g}^{-1}$ durante 5 dias; por banho de imersão em solução contendo 2×10^7 bacterias inativadas $\cdot \text{mL}^{-1}$, durante 20 minutos; no sétimo e no vigésimo primeiro dia após a vacinação. _____19.

Tabela 2 – Resultados dos títulos de aglutinação ($\log_2 (x+1)$) e da atividade antimicrobiana ($\log_2 (x+1)$) do soro de tilápia do Nilo não vacinada; vacinada por injeção intraperitoneal com 1,5 mL de suspensão contendo 2×10^8 bactérias inativadas $\cdot \text{mL}^{-1}$; via oral alimentadas duas vezes ao dia com ração contendo vacina na proporção de 2×10^7 bactérias inativadas $\cdot \text{g}^{-1}$, durante 5 dias; vacinada por banho de imersão em solução contendo 2×10^7 bactérias inativadas $\cdot \text{mL}^{-1}$, durante 20 minutos; no sétimo e no vigésimo primeiro dia após a vacinação.._____22.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos da produção de tilápia

A tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* Linnaeus 1758 (Osteichthyes: Cichlidae), destaca-se como peixe de potencial para aquicultura, haja vista sua rusticidade, crescimento rápido e adaptação ao confinamento (HAYASHI, 1995). De acordo com Popma e Phelps (1998), a tilápia está entre as espécies de peixes mais cultivadas, a que melhor resiste à alta temperatura, à baixa concentração de oxigênio dissolvido e à alta concentração de amônia na água. As últimas informações de Fishstat Plus (2008) é que a produção mundial de tilápia do Nilo em 2006 foi de 1,99 milhões de toneladas, quase 2 vezes mais do que no início da década (1,05 milhões toneladas).

Além do comércio internacional, a tilápia nos últimos anos tornou-se um produto importante no comércio brasileiro de alimento. O Brasil tem os maiores recursos de água dos países tropicais e virtualmente todas as regiões do Brasil têm condições adequadas para o cultivo de tilápia (LIM e WEBSTER, 2006), sendo cultivada da bacia do rio Amazonas ao Rio Grande do Sul, criada em diversos sistemas, desde a cultura semi-intensiva em tanques que recebem dejetos de animais, até cultivos intensivos em tanques-rede ou gaiolas. Em Santa Catarina, a produção de peixes de águas continentais em 2005 foi de 19,1 toneladas (ICEPA, 2006), onde as principais espécies cultivadas são as tilápias e carpas com 38% e 50%, respectivamente.

1.2 Bacterioses em tilápias

O crescimento e a intensificação da produção de peixes envolvem estresse, resultando no aparecimento de doenças e gerando conseqüentemente mortalidades (VANDENBERG, 2004). A maior causa de perdas econômicas no cultivo de tilápias são as doenças de origem bacteriana, tendo como destaque os gêneros *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Flavobacterium*, *Edwardsiella*, *Streptococcus* e *Enterococcus*. Estas bactérias podem ser encontradas nos órgãos internos como rim, fígado, intestino, coração, cérebro e baço (PLUMB, 1997; SHOEMAKER e KLESIUS, 1997; CAI *et al.*, 2004; LIM e WEBSTER 2006).

Os principais sinais internos de bacterioses são: anemia, septicemia, hipertrofia do baço, órgãos internos hemorrágicos e ruptura de vasos internos. Já a sintomatologia externa começa com diminuição ou nenhuma alimentação

seguida do escurecimento da pele, natação errática, letargia, curvatura do corpo, exoftalmia, opacidade da córnea, hemorragia no opérculo e base das nadadeiras, ulceração da epiderme, anorexia e por último a morte. A principal via de transmissão destas doenças acontece de forma horizontal, feita pelo contato com peixes ou alimentos contaminados (AUSTIN e AUSTIN, 2007; PAVANELLI *et al.*, 1998; LIM e WEBSTER, 2006).

1.3 Vacinas para peixes

Para a continuação do crescimento do cultivo de tilápias, a indústria necessita de estratégias para a minimização dos efeitos das doenças. A ferramenta mais difundida para o controle das doenças bacterianas é o uso de antibióticos. Porém, estes quimioterápicos provocam seleção de bactérias resistentes e acumulação destes no ambiente e na carne dos peixes. Alternativamente, o desenvolvimento de vacinas tem se mostrado como uma ferramenta promissora (LIM e WEBSTER, 2006).

As vacinas são preparações de antígenos derivados de organismos patogênicos que estimulam o sistema imune de animais de tal maneira para o aumento da resistência a doença (TIZARD, 2002). Estes antígenos podem ser encontrados em grande quantidade nas bactérias, onde se localizam as moléculas chamadas de epítomos, que estão nas seguintes estruturas: membrana protéica exterior, polissacarídeos, proteases, LPS ou toxinas (KAATTARI e PIGANELLI, 1996). Estes estímulos ativam dois sistemas: o sistema imune não específico e o específico.

1.4 Estratégias de vacinação

A eficiência da vacina em estimular o sistema de defesa do peixe também está relacionada com as diferentes vias de administração desta, tendo cada uma suas vantagens e desvantagens. Porém, poucos estudos foram realizados a fim estabelecer a eficácia de estratégias de vacinação adaptadas às condições de cultivo (VANDENBERG, 2004; SANTOS *et al.*, 2005; LIM e WEBSTER, 2006).

Entre as diferentes vias de aplicação, as injeções individuais têm demonstrado os melhores resultados. O trabalho realizado por Klesius *et al.* (1999) mostrou que a vacina intraperitoneal (i.p.) com células inativadas de *S. iniae* reduziu 91,3% a mortalidade de tilápias infectadas com *S. iniae*, impedindo o aparecimento dos sintomas da doença, como natação errática e a exoftalmia

hemorrágica. Ruangpan *et al.* (1986) também obtiveram sucesso na injeção i.p. com células inativadas de *A. hydrophila* em tilápias, tendo na primeira semana após a vacinação uma proteção de 61% e na segunda semana uma proteção de 100%. Porém esse tipo de vacinação é trabalhoso e estressante, visto que os peixes têm que ser removidos da água e anestesiados, além de sua aplicação ser pouco viável economicamente no cultivo em larga escala. Sendo assim, esta técnica é realizada apenas para peixes de alto valor, reprodutores e peixes ornamentais (AUSTIN e AUSTIN, 2007).

Já os resultados das vacinações por meio de banho de imersão são contraditórios. Alguns autores relatam que as tentativas são mal sucedidas (VANDENBERG, 2003; SANTOS *et al.*, 2005; SHOEMAKER *et al.*, 2006), enquanto que outros observam que o tratamento pode obter resultados satisfatórios. No estudo de Evans *et al.*, (2004) alevinos de tilápia do Nilo vacinados por banho de imersão obtiveram 55% de mortalidade após infecção com *S. agalactiae* contra 84% dos peixes do controle. O linguado senegalês e o robalo europeu apresentaram bons resultados quando vacinados por banho de imersão apenas após revacinação (ARIJO *et al.*, 2005; ANGELIDIS, 2006).

Para a escala de produção, o banho de imersão é vantajoso, uma vez que o produtor pode vacinar um grande número de peixes de uma vez, com menor manipulação dos peixes em relação à vacinação intrapenitroanal. Porém, algumas vezes não demonstrando tanta eficiência quanto à vacina por injeção (PAVANELLI *et al.*, 1998). A administração através do banho ainda tem outra desvantagem sobre outros métodos, pois precisa de uma grande quantidade de vacina produzida por peixe e requer longa exposição (20 a 60 minutos), necessitando monitorar a oxigenação da água e o stress dos peixes (ELLIS, 1988; AUSTIN e AUSTIN, 2007).

A vacinação oral é boa alternativa para a vacinação, pois não há manipulação dos peixes, reduzindo o estresse e de fácil administração, sendo apropriada para a imunização de grandes quantidades de peixe. Entretanto, há poucas vacinas orais comercializadas, devido à grande quantidade de antígeno requerido para estimular a resposta imune, e a falta de duração adequada da proteção ao longo do cultivo (VANDENBERG, 2004). Além disso, não se tem controle da dosagem individual de cada peixe (ELLIS, 1988). No trabalho realizado por Shoemaker *et al.* (2006) alevinos de tilápias do Nilo vacinados via

oral obtiveram entre 17,5% a 31,5% de mortalidade, contra 47,5% dos peixes não vacinados, após serem desafiados com *S. iniae*.

Um dos problemas que impedem o sucesso desta técnica é a degradação do antígeno exposto ao baixo pH gástrico. Sendo assim, o fator que mais limita o uso desse método é a proteção de níveis inconsistentes ou baixos de imunização com relação a outros métodos (ELLIS, 1988; AUSTIN e AUSTIN, 2007; IWANA e NAKANISHI, 1996).

1.5 Vacinas polivalentes

Outro problema encontrado na produção de tilápias, além do modo como os peixes são vacinados, é a existência de uma grande diversidade de agentes patogênicos. Com isto, as estratégias de vacinação incluíram pesquisas e desenvolvimentos de vacinas polivalentes (CIPRIANO, 2001). A vantagem da vacina polivalente é a proteção dos peixes contra maior diversidade de bactérias patogênicas (NIKOSKELAINEN *et al.*, 2007) podendo ser grupos distintos como gram-positivas e gram-negativas.

Essas diferentes características entre os tipos de bactérias na vacina polivalente permitem que haja nos vertebrados a produção de diferentes tipos de anticorpos que reconheceram diferentes epítomos (TIZARD, 2002). Sendo assim, a vacina teria eficiência sobre um maior grupo de patógenos.

O linguado senegalês (*Solea senegalensis*) apresentou resultados equivalentes entre as vacinas monovalentes e as divalentes contra *Vibrio harveyi* e *Photobacterium damsela piscicida* (ARIJO *et al.*, 2005). O cobia (*Rachycentron canadum*) apresentou bons resultados de imunização após ser vacinado i.p. contra três patógenos diferentes para esta espécie (LIN *et al.*, 2006).

A truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e o salmão do atlântico (*Salmo salar*) apresentaram maior estímulo imunológico após a vacina polivalente. No caso dos salmões melhor do que as vacinas monovalentes (HOEL *et al.*, 1997; NIKOSKELAINEN *et al.*, 2007), ambos os estudos obtiveram resultados diferentes de produção de anticorpo para as diferentes bactérias. Nikoskelainen *et al.* (2007) recomendam que os antígenos bacterianos devam ser escolhidos com cuidado na vacina polivalente para evitar efeitos inibitórios dos antígenos nas respostas específicas dos peixes.

1.6 Hematologia de peixes

O estudo da composição e da função dos componentes do sangue de peixes é de fundamental importância na avaliação das condições fisiológica, bioquímica e patológica dos peixes (TAVARES-DIAS, 2003). O sangue dos peixes teleósteos é formado por eritrócitos ou hemácias ou células vermelhas do sangue, leucócitos ou células brancas do sangue e trombócitos.

Os eritrócitos são as células mais numerosas do sangue, que contêm o pigmento respiratório, a hemoglobina, que tem por função transportar o O₂ e parte do CO₂ no sangue. Qualquer deficiência no eritrócito será traduzida por uma falta de O₂ nos tecidos (RANZANI-PAIVA e SILVA-SOUZA, 2004).

Em contraste com as plaquetas de mamíferos que são fragmentos de células anucleadas, os trombócitos de peixes são células completas (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004). Além do seu papel de hemostasia, os trombócitos têm relevante participação no mecanismo de defesa orgânica, demonstrado pela sua presença nos processos de coagulação e inflamação, além da atividade fagocitária nos processos de infecção (TAVARES-DIAS, 2003; MARTINS *et al.*, 2004).

Os leucócitos são células de defesa, linfócitos, monócitos, granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), e participam da resposta imunológica (FERNANDEZ *et al.*, 2002).

Os linfócitos são responsáveis pela resposta imune específica humoral e celular, promovendo a produção de anticorpos, aumento da capacidade citotóxica, atuando no processo de memória imunológica e promovendo a liberação de fatores reguladores da função imune, como as linfocinas (YOSHINAGA *et al.*, 1994). Os linfócitos se distinguem em dois grupos de populações chamados linfócitos B e T. Os linfócitos B se diferenciam em plasmócitos (linfócitos B ativados) e células de memória e participam da resposta imune humoral, enquanto os linfócitos T diferencia-se em linfócitos T auxiliares, que reconhecem antígenos específicos ligados à marcadores e liberam mensageiros químicos que estimulam a atividade de células como os fagócitos, os linfócitos B e outros linfócitos T; e linfócitos T citotóxicos, que reconhecem e destroem células infectadas, quando ativos, migram para o local de infecção ou para o timo e segregam substâncias tóxicas que matam as células anormais (TIZARD, 2002).

Os neutrófilos, ou células polimorfonucleares, são as primeiras células envolvidas nos estágios iniciais de inflamação nos peixes (MANNING, 1994). Estas células possuem a capacidade de fagocitar e, no transcorrer da resposta imune, a maioria possui o material ingerido no seu fagossomo (FERNANDEZ *et al.*, 2002). Outra função importante descrita é a atividade microbicida desencadeada durante o processo denominado “explosão respiratória”, que consiste na conversão do oxigênio molecular em compostos e metabólitos derivados do oxigênio, como radicais livres do oxigênio (PLYZYCZ *et al.*, 1989). Em situações de estresse, a quantidade dessas células pode aumentar significativamente, em 24 horas (FALCON, 2007).

Os monócitos são provavelmente as células sanguíneas mais importantes da resposta imune, não sendo importantes apenas pela produção de citocinas, mas também são as células primárias na apresentação dos antígenos em teleósteos. As células envolvidas na fagocitose e na destruição de patógenos, fazem o papel de interligar o sistema imune não específico ao específico, sendo isolados do sangue, órgão linfóide (rim) ou da cavidade peritoneal (VALLEJO *et al.*, 1992; SHOEMAKER *et al.*, 1997). Dentre as principais características destacam-se a capacidade de ingerir material estranho ao organismo, inerte e antigênico, assim como restos celulares da resposta inflamatória e de outros processos degenerativos, além de secretarem radicais livres de oxigênio e nitrogênio e destruir diferentes tipos de patógenos (FALCON, 2007).

Os eosinófilos e basófilos se encontram distribuídos pelo tecido conjuntivo, especialmente no trato gastrointestinal e nas brânquias. A função dessa célula nos peixes não está totalmente esclarecida, porém sabe-se que estas intervêm nos processos de inflamação crônica e na defesa celular mediante a degranulação, sendo encontrada na corrente sanguínea quando há infestação por parasitos. Os basófilos são considerados ausentes na maioria dos peixes (HINE, 1992).

1.7 Sistema imunológico de peixes

Os processos de defesa não específicos, assim como o específico, podem ser de dois tipos: a imunidade mediada por células e a imunidade humoral. A imunidade celular não específica envolve diversas células leucocitárias. Estas células são responsáveis por vários processos da resposta imune não específica

(inflamação, fagocitose, fagocitose com células acessórias e citotoxicidade não específica). Já a resposta humoral não específica é composta por uma variedade de substâncias (lisozima, sistema complemento, interferon, proteína C reativa, transferrina e lectina) encontradas no muco, soro e ovos dos peixes que inibem o crescimento de microorganismos infecciosos (SECOMBES, 1996; YANO, 1996).

A imunidade celular específica está relacionada à capacidade dos linfócitos T reconhecerem alguns antígenos que se ligam a epítopos de certas células. Se uma bactéria for fagocitada pelo macrófago, os fragmentos resultantes da fagocitose ligam-se a marcadores superficiais desse macrófago que os apresenta aos linfócitos T, estimulando assim a proliferação desta célula (FALCON, 2007).

Já quando há a ativação do sistema humoral específico, pela entrada de um antígeno no organismo chegando a um órgão linfóide, os linfócitos B dividem-se e formam células que sofrem diferenciação, originando os plasmócitos (linfócitos B ativados) e células de memória. Os plasmócitos produzem anticorpos específicos a cada antígeno, que se encontram no sangue e migram para os locais da infecção. As células de memória ficam inativas, mas prontas a responder rapidamente, caso venha a acontecer um posterior contato com o antígeno (KAATTARI e PIGANELLI, 1996).

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia da administração da vacina polivalente por diferentes vias de aplicação em tilápia do Nilo.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a eficácia das vacinas administradas por via oral e por banho de imersão em comparação com a aplicação pela injeção intraperitoneal,
- Avaliar as variações hematológicas da aplicação da vacina polivalente em tilápia do Nilo por diferentes vias e em diferentes dias após a vacinação,
- Avaliar os estímulos da atividade antibacteriana e aglutinante do soro das tilápias do Nilo após aplicação da vacina polivalente por diferentes vias e em diferentes dias após a vacinação,
- Comparar a eficácia da vacina polivalente para a tilápia do Nilo pelos testes *in vitro* de atividade antibacteriana e aglutinante do soro das tilápias do Nilo contra *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus durans*, individualmente.

3. ARTIGO

O artigo foi formatado segundo as normas da revista *Pesquisa Veterinária Brasileira*.

Os trabalhos para submissão, podem ser enviados pelo correio, em uma via impressa, com arquivos em disquete ou CD (de preferência na versão mais recente do Word), ao Dr. Jürgen Döbereiner, Revista PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA, Embrapa-CNPAB/PSA, 23890-000 Seropédica, Rio de Janeiro, ou por via eletrônica, através do e-mail pvb@pvb.com.br. Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista. NOTE: Para abreviar sua tramitação e aceitação, os trabalhos sempre devem ser submetidos conforme as normas de apresentação da revista. Os originais submetidos fora das normas de apresentação, serão devolvidos aos autores para a devida adequação. Apesar de não serem aceitas comunicações (Short communications) sob forma de “Notas Científicas”, não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve, porém, conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os trabalhos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (peer review).

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em TÍTULO, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (ou combinações destes três

últimos), AGRADECIMENTOS e REFERÊNCIAS: a) o Título do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho; b) O(s) autor(es) deve(m) adotar um “nome de guerra” (não necessariamente o nome de batismo completo), para sua identificação científica: Paulo Fernando de Vargas Peixoto, usa Paulo V. Peixoto ou Peixoto P.V., Franklin Riet-Correa Amaral, usa Franklin Riet-Correa ou Riet-Correa F., Claudio Severo Lombardo de Barros, usa Claudio S.L. Barros ou Barros C.S.L.; c) o Abstract deverá ser apresentado com os elementos constituintes do Resumo em português, podendo ser mais extenso. Ambos devem ser seguidos de “Index Terms” ou “Termos de Indexação”, respectivamente;

d) o Resumo deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, dando os mais importantes resultados e conclusões. Nos trabalhos em inglês, o título em português do trabalho, deve constar em negrito e entre colchetes, logo após a palavra RESUMO; e) a Introdução deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho; f) em Material e Métodos devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, devem constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local; g) em Resultados deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos; Quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos (Figuras), ao invés de apresentá-los em quadros extensos; h) na Discussão, os

resultados devem ser discutidos diante da literatura. Não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los; i) as Conclusões devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho; j) Agradecimentos devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé; k) a lista de Referências, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando-se os nomes de todos os autores (em caixa alta e baixa), o título de cada publicação e, abreviado ou por extenso (se tiver dúvida), o nome da revista ou obra, usando as instruções do “Style Manual for Biological Journals” (American Institute for Biological Sciences) e/ou “Bibliographic Guide for Editors and Authors” (American Chemical Society, Washington, DC.).

2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as seguintes normas: a) os trabalhos devem ser impressos em uma só face do papel, com margens de, no mínimo, 2,5cm. A formatação do original a ser submetido para publicação deve seguir o exemplo de apresentação no último fascículo da revista (www.pvb.com.br). O texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das figuras e os Quadros no final. As Figuras (inclusive gráficos) devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Devem ser introduzidos no texto do trabalho, através da ferramenta “Inserir” do Word, pois imagens copiadas e coladas, perdem as informações do programa onde foram geradas, resultando, sempre, em má qualidade; b) a redação dos trabalhos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada. Todos os Quadros e todas as Figuras serão mencionados no texto. Estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes. Abstract e Resumo serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas. c) no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo do(s) autor(es) e E-mail do autor para correspondência; d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”; trabalhos de dois autores serão citados pelos nomes de ambos, e de três ou mais, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano; se dois trabalhos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos. Trabalhos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, “(Resumo)” ou “(Cit. Fulano 19..)”; a referência do trabalho que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exemplo: (Flores & Houssay 1917, Roberts 1963a,b, Perreau et al. 1968, Hanson 1971); f) a lista das Referências deverá ser apresentada com o mínimo de pontuação e isenta do uso de caixa alta, com os nomes científicos em itálico

(grifo), e sempre em conformidade com o padrão adotado no último fascículo da revista, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As Figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) originais, em papel ou outro suporte, deverão ser anexadas ao trabalho, mesmo quando escaneadas pelo autor. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da Figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura. Cada Figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte inferior da figura pela palavra “pé”. Fotografias deverão ser apresentadas preferentemente em preto e branco, em papel brilhante, ou em diapositivos (“slides”) coloridos. Quando as fotos forem obtidas através de câmeras digitais (com extensão “jpg”), os arquivos deverão ser enviados como obtidos (sem tratamento ou alterações); na versão online, fotos e gráficos poderão ser publicados em cores; na versão impressa, somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras poderá ser em cores. Para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

4. As legendas explicativas das Figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, e serão apresentadas no final do trabalho.

5. Os Quadros deverão ser explicativos por si mesmos e colocados no final do texto. Cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para grupamento de colunas. Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, recomeçando de a em cada Quadro; as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto, à esquerda.

Resposta hematológica e imunológica de tilápia do Nilo após administração de vacina polivalente por diferentes vias

Bruno C. Silva^{1,2*}, Mauricio L. Martins², Adolfo Jatobá¹, Celso C. Buglione Neto¹, Felipe N. Vieira¹, Gabriella V. Pereira¹, Gabriela T. Jerônimo² e
Walter Q. Seiffert¹, Jozé Luiz P. Mouriño^{1,2}

RESUMO - O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia da administração de vacina polivalente, contra *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus durans*, por diferentes vias de aplicação (injeção intraperitoneal, oral e banho de imersão) em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* Linnaeus 1758) e seus efeitos sobre os parâmetros hematológicos e imunológicos após 7 e 21 dias da vacinação. Os tratamentos consistiram de: tilápias não vacinadas; tilápias vacinadas via injeção intraperitoneal (i.p.) contendo 2×10^8 bactérias inativadas- mL^{-1} ; tilápias alimentadas com ração contendo vacina na proporção de 2×10^7 bactérias inativadas- g^{-1} , durante 5 dias; tilápias vacinadas por banho de imersão em 2×10^7 bactérias inativadas- mL^{-1} , durante 20 minutos. Os peixes vacinados apresentaram maior porcentagem de

hematócrito, número de eritrócitos e leucócitos durante o período do experimento, em relação aos não vacinados. O título de aglutinação do soro dos peixes vacinados intraperitonealmente foi superior nos dois períodos de avaliação para todas as bactérias. Apenas no 21º dia os peixes vacinados oralmente e por imersão apresentaram título de aglutinação superior aos peixes não vacinados para *A. hydrophyla* e *E. durans*. O soro dos peixes vacinados apresentou maior atividade antimicrobiana para *P. aeruginosa* e *E. coli*, do que os peixes não vacinados, nos dois períodos. As diferentes vias de administração da vacina estimularam a resposta hematológica e imunológica da tilápia do Nilo 21 após a vacinação, sendo que o número total de leucócitos, linfócitos e título aglutinante do soro dos vacinados i.p. foi maior do que os demais.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Oreochromis niloticus*, hematologia, imunologia.

INTRODUÇÃO

A intensificação da aquicultura gera estresse em peixes cultivados, gerando o aparecimento de doenças infecciosas e parasitárias, culminando em mortalidades (Vandenberg 2004). A maior causa de perdas econômicas no cultivo de tilápias são as doenças de origem bacteriana, principalmente os gêneros *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Flavobacterium*, *Edwardsiella*, *Streptococcus* e *Enterococcus*. Estas bactérias causam lesões externas podendo ser encontradas nos órgãos internos como rim, fígado, intestino, coração, cérebro e baço (Plumb 1997, Shoemaker & Klesius 1997, Cai et al. 2004, Lim & Webster 2006).

Para o bom desenvolvimento da criação de tilápias no Brasil, a indústria necessita de estratégias para minimizar os efeitos de doenças. A ferramenta mais difundida para o controle das doenças bacterianas é o uso de antibióticos, embora seu uso inapropriado possa provocar a seleção de cepas patogênicas (Klaenhammer & Kullen 1999), além de ser fonte de poluição ambiental (Boyd & Massaut 1999). Alternativamente, o desenvolvimento de vacinas tem se mostrado ferramenta promissora (Lim & Webster 2006).

Vacinas são preparadas a partir de antígenos derivados de organismos patogênicos que estimulam o sistema imune de animais, aumentando a resistência à doença (Tizard 2002). Nos antígenos localizam-se os epítomos que são encontrados na membrana protéica exterior, polissacarídeos, proteases, lipopolissacarídeos (LPS) ou toxinas (Kaattari & Piganelli 1996).

Os antígenos, por sua vez, ativam dois sistemas: o sistema imune não específico e o específico, os quais possuem defesa mediada por células ou humoral. A resposta humoral não específica é composta por lisozima, sistema complemento, interferon, proteína C reativa, transferrina e lectina, sendo que a específica tem como principal via de ativação os linfócitos B e células de memória (Kaattari & Piganelli 1996, Secombes 1996; Yano 1996).

A eficácia da vacina em estimular o sistema de defesa do peixe está relacionada com diferentes vias de administração apresentando vantagens e desvantagens. Porém, poucos estudos foram realizados a fim de estabelecer a eficácia de estratégias de vacinação adaptadas às condições de cultivo (Vandenberg 2004, Santos et al. 2005, Lim & Webster 2006).

Entre as diferentes vias de administração a injeção intraperitoneal tem demonstrado os melhores resultados (Ruangpan et al. 1986, Klesius et al. 1999). Porém, torna-se trabalhosa,

estressante e de alto custo, sendo realizada apenas para peixes de alto valor, reprodutores e peixes ornamentais (Austin & Austin 1993).

Os resultados de vacinações por meio de banho de imersão e administração oral são contraditórios. Alguns autores relataram tentativas mal sucedidas (Vandenberg 2003, Santos et al. 2005, Shoemaker et al. 2006a), enquanto que outros observaram que o tratamento foi satisfatório. Evans et al. (2004) verificaram que alevinos de tilápia do Nilo vacinados por banho de imersão apresentaram 55% de mortalidade após infecção com *Streptococcus agalactiae* contra 84% nos peixes não vacinados. No trabalho realizado por Shoemaker et al. (2006a) alevinos de tilápias do Nilo vacinados por via oral apresentaram entre 17,5% a 31,5% de mortalidade após serem desafiados com *Streptococcus iniae*.

Como na produção de tilápias existe grande diversidade de agentes potencialmente patogênicos as estratégias de vacinação incluem pesquisas e desenvolvimentos de vacinas polivalentes (Cipriano 2001). A vantagem da vacina polivalente é a proteção dos peixes contra maior diversidade de bactérias gram-positivas ou gram-negativas (Nikoskelainen et al. 2007).

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia da administração de vacina polivalente, contra *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus durans*, por diferentes vias de aplicação (injeção intraperitoneal, oral e banho de imersão) em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* Linnaeus 1758) e seus efeitos sobre os parâmetros hematológicos e imunológicos após 7 e 21 dias da vacinação.

MATERIAL E MÉTODOS

As cepas de *A. hydrophila* ATCC 7966, de *E. durans* ATCC 19492 e de *P. aeruginosa* ATCC 27853, foram ativadas e isoladas pela técnica de esgotamento em meio de cultura Agar triptona de soja (TSA, Difco), incubadas a 25°C durante 48 horas e preparadas segundo Klesius et al. (2000). As colônias foram inoculadas individualmente em meio de cultura líquido de caldo de cérebro-coração (BHI, Difco) e incubadas a 30°C durante 24 horas.

Após a confirmação do crescimento das bactérias, as culturas foram acrescidas de formalina 3%, e incubadas a 30°C durante 24 horas sob agitação contínua para inativação e centrifugadas a 1800xg por 30 minutos. O sobrenadante, contendo a formalina, foi descartado e o precipitado ressuspensado em solução salina estéril a 0,65%. Para confirmação da inocuidade do processo, 100 µL das culturas ressuspensas em solução salina foram semeadas em meio de cultura TSA (Difco) e incubadas a 30°C por 72 horas. Não havendo crescimento de colônias, as suspensões foram usadas combinadas na proporção de 1:1:1 (v/v) para compor a vacina polivalente.

Os tratamentos consistiram de: NV: tilápias não vacinadas; IP: tilápias vacinadas via injeção intraperitoneal (1,5 mL da suspensão de vacina contendo 2×10^8 bactérias inativadas- mL^{-1}); OR: tilápias alimentadas duas vezes ao dia com ração contendo vacina na proporção de 2×10^7 bactérias inativadas- g^{-1} durante 5 dias; IM: tilápias vacinadas por banho de imersão em solução contendo 2×10^7 bactérias inativadas- mL^{-1} , durante 20 minutos. Os tratamentos IP e IM foram realizados no 5º dia do tratamento oral. As avaliações foram realizadas no 7º e 21º dia após a vacinação (Evans et al. 2004, Esteve-Gassent et al. 2004, Shoemaker et al. 2006a).

Foram utilizadas 72 tilápias com peso médio de $267,8 \pm 25,0$ g divididas em 12 tanques com capacidade para 300L, com aeração, filtro biológico e aquecedores. Cada tratamento continha 3 réplicas em delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Durante o período experimental os peixes foram alimentados duas vezes ao dia, a temperatura da água se manteve em $30,86 \pm 1,04$ °C, o oxigênio dissolvido $4,54 \pm 0,64$ mg·L⁻¹ e o pH $7,30 \pm 0,23$.

Para coleta de sangue os peixes foram anestesiados com eugenol (1mL:10 L), 3 tilápias por unidade experimental tiveram o sangue coletado com seringa de 3 mL (21G) contendo EDTA 10% e com seringa sem anticoagulante, por punção do vaso caudal (aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais nº23080.024659/2007-99 CEUA/UFSC). O sangue coletado sem anticoagulante ficou em repouso durante 2 horas a 25°C para coagulação, sendo posteriormente centrifugado a 1400xg por 10 minutos. O soro foi alíquotado com auxílio de micropipeta, e armazenado a -20°C até o dia da análise. Foram feitos “pool” do soro de 3 peixes da mesma unidade experimental para realização das análises imunológicas.

O sangue coletado com seringa contendo anticoagulante foi utilizado para confecção de duplicatas de extensões sangüíneas coradas com Giemsa/MayGrunwald (Rosenfeld 1947), para contagem diferencial de leucócitos e contagens totais de trombócitos e leucócitos (Martins et al. 2004). Uma alíquota foi utilizada para a determinação do hematócrito (Goldenfarb et al. 1971) e o restante armazenado em frascos de vidro no gelo para quantificar o número total de eritrócitos em hemocítômetro. Uma alíquota do soro foi utilizada para determinação do índice glicêmico em espectrofotômetro (kit Biotécnica®).

Os títulos de aglutinação foram feitos segundo o método descrito por Yildirim et al. (2003), individualmente para cada cepa de bactéria (*A. hydrophila*, *E. durans* e *P. aeruginosa*). As bactérias foram cultivadas e inativadas do mesmo modo descrito para confecção da vacina. A concentração das células inativadas utilizadas no teste foi de 0.8 no comprimento de onda de 550 nm (DO_{550nm}). O teste foi feito em microplaca de 96 poços de fundo U onde o soro foi diluído na proporção de 1:1 em solução tampão fosfato salino (PBS; 0,2M de Fosfato monobásico, 0,2M de Fosfato dibásico, 0,11M de Cloreto de Sódio, pH 7,4) no 1° poço (50 µL de solução PBS:50 µL do soro), sendo diluído serialmente em fator 2 para os demais poços até o 12°. Depois disso, foram adicionados 50 µL da bactéria inativada em todos os poços. A microplaca foi incubada a 25°C durante 18 horas em câmara úmida. A aglutinação foi confirmada com a observação de um “bottom” no fundo do poço a olho nu. O título aglutinante foi considerado como o recíproco da última diluição que apresentou aglutinação.

A atividade antimicrobiana foi realizada em microplaca de 96 poços com fundo chato adaptada de Schleider et al. (2008 *in press*). O soro dos peixes foi avaliado quanto a sua atividade antimicrobiana contra as bactérias *A. hydrophila*, *E. durans* e *P. aeruginosa*, da vacina polivalente e da *Escherichia coli*, bactéria padrão para este tipo de análise, individualmente. As bactérias utilizadas na confecção da vacina foram cultivadas em BHI (Difco), enquanto que *E. coli* foi cultivada em meio “Luria bertani” (LB) a 30°C por 24 horas, preparadas na concentração de 0,5 na escala de Macfarland e diluídas em “Poor broth” (PB) 100.000 vezes,

O soro filtrado em filtro milipore 22 µm para eliminação de possível contaminação bacteriana, 100 µL de PB foi adicionado a cada poço, e 100 µL do soro adicionado ao primeiro poço da linha. Posteriormente, foi realizada uma diluição seriada fator 2 até o 12º poço. Para controle positivo, o soro foi substituído por SSE 0,65%. Finalmente, 15 µL da bactéria foi adicionado em cada poço. Foram feitos os mesmos procedimentos para constituição do branco, porém estes não foram semeados com bactérias. A microplaca foi incubada a 25°C por 24 horas sob agitação orbital e o crescimento dos microorganismos determinado em leitora de microplaca DO_{550nm}. A atividade antimicrobiana do soro foi recíproca da última diluição que apresentou atividade bactericida ou bacteriostática.

Os dados foram submetidos ao teste de Bartlett e os parâmetros hematológicos que não apresentaram homogeneidade de variâncias foram transformados em $\ln(x+1)$ e os dados de aglutinação e inibição antimicrobiana transformados em $\log_2(x+1)$ antes de serem analisados antes de serem submetidos para análise de variância com parcelas subdivididas no tempo ($\alpha < 0,05$). As diferenças de médias foram detectadas pelo teste de Student Newman Keuls (SNK). As contagens hematológicas e os parâmetros imunológicos foram correlacionados através de uma matriz de correlação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Parâmetros hematológicos têm sido considerados importantes indicadores da saúde de peixes (Chen et al. 2004, Martins et al. 2004). Estudos demonstraram que a diminuição no número de eritrócitos no sangue e na porcentagem de hematócrito podem ser sinais de infecções bacterianas (McNulty et al. 2003, Benli & Yildiz 2004, Shoemaker et al. 2006b). Neste estudo, as tilápias não apresentaram diferença significativa no 7º dia na porcentagem de hematócrito ($p > 0,05$), porém o número de eritrócitos foi menor nos animais vacinados via oral e imersão ($p < 0,05$) (Tabela 1). Contudo, estes valores foram semelhantes aos observados em tilápias que não receberam estímulo de estresse no estudo realizado por Martins et al. (2004).

Já no 21º dia, tanto a contagem total de eritrócitos, como a porcentagem de hematócrito, apresentaram valores superiores nos peixes vacinados em comparação aos peixes não vacinados, sendo que os peixes submetidos ao tratamento por imersão mostraram maior porcentagem de hematócrito ($p < 0,05$) (Tabela 1). O aumento no número de eritrócitos também foi observado em kinguiú (*Carassius auratus*) 14 dias após serem vacinados contra *A. hydrophila* via oral (Irianto et al., 2003).

O aumento no número de eritrócitos na circulação sanguínea mostra que os peixes vacinados mantêm níveis de oxigênio mais estáveis nos tecidos, fato importante sob condições inadequadas de manejo. Este aumento pode estar relacionado com o maior consumo de oxigênio causado pelo processo de explosão respiratória, também denominado “respiratory burst”, já que o número de neutrófilos e a atividade antimicrobiana também foram maiores nos peixes vacinados. O processo de explosão respiratória faz parte da defesa imunológica não específica mediada por células no peixe, sendo atividade realizada por neutrófilos que converte o oxigênio molecular em

compostos metabólicos microbicidas, como radicais livres de oxigênio (Plyzycz et al. 1989, Ellis 1999).

Segundo Khoshbavar-Rostami et al. (2007) o aumento da “explosão respiratória” e do número de leucócitos são bons indicadores de respostas positivas da imunidade celular em peixes vacinados. No estudo destes autores houve aumento da “explosão respiratória” em esturjão (*Huso huso*) até 43 dias após a imunização intraperitoneal com *A. hydrophila* inativada com formalina. A truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) também apresentou aumento significativo neste processo após receber injeção intraperitoneal de vacina polivalente (Nikoskelainen et al. 2007).

Além do seu papel de hemostasia, os trombócitos têm relevante participação no mecanismo de defesa orgânica, demonstrado pela presença nos processos de coagulação e inflamação, além da atividade fagocitária em processos de infecção (Tavares-Dias 2003). Neste estudo, o número de trombócitos no sangue das tilápias mostrou-se diferente apenas nos peixes vacinados via oral no 21º dia, podendo ser explicado pelo fato da rota natural de infecção bacteriana ser por via oral (Austin & Austin 1993, Kwon et al. 2007), que segundo Kwon et al. (2007), a imunização oral seria promissora para evitar bacterioses.

O aumento na taxa de glicose plasmática em tilápia pode ser utilizada como um dos indicadores de estresse, segundo Martins et al. (2004). Porém, neste estudo, a glicose se manteve estável em todos os peixes com exceção daqueles submetidos ao banho de imersão no 7º dia ($p > 0,05$) (Tabela 1). Estes índices foram semelhantes aos encontrados em outros estudos com tilápia do Nilo sadias (Martins et al. 2004, Okamura et al. 2007).

Vários tipos de leucócitos participam da resposta celular, incluindo linfócitos, monócitos, granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e células citotóxicas (Fernandez et al. 2002). A contagem total de leucócitos e de linfócitos foi maior nos peixes vacinados via intraperitoneal, seguidos pelos por via oral e imersão no 7º dia. Enquanto que no 21º dia houve aumento no número destas células no sangue dos peixes do tratamento via oral, sendo semelhante ao tratamento intraperitoneal ($p > 0,05$). Os peixes do tratamento não vacinado apresentaram menores números de leucócitos e linfócitos ($p < 0,05$) do que os demais tratamentos (Tabela 1).

Tabela 1 – Valores médios e desvio padrão de parâmetros hematológicos em tilápia do Nilo não vacinada; vacinada por injeção intraperitoneal o contendo 1,5 mL de suspensão contendo 2×10^8 bactérias inativadas $\cdot \text{mL}^{-1}$; via oral alimentada duas vezes ao dia com ração contendo vacina na proporção de 2×10^7 bactérias inativadas $\cdot \text{g}^{-1}$ durante 5 dias; por banho de imersão em solução contendo 2×10^7 bacterias inativadas $\cdot \text{mL}^{-1}$, durante 20 minutos; no sétimo e no vigésimo primeiro dia após a vacinação.

Dias após vacinação	Tratamentos	Hematócrito (%)	Eritrócitos ($10^6 \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	Trombócitos ($10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	Leucócitos ($10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$)
7 dias	Controle	25,92±1,54 a	2,09±0,17 a	39,21±4,13 a	13,88±0,84 c
	Vacina intraperitoneal	27,94±0,80 a	2,03±0,09 a	35,41±4,14 a	28,57±3,95 a
	Vacina oral	26,47±1,90 a	1,60±0,07 b	24,79±2,53 a	18,60±1,43 b
	Banho de imersão	28,94±1,04 a	1,63±0,12 b	31,03±2,13 a	23,54±1,59 b
21 dias	Controle	20,30±1,29 c	1,96±0,05 b	31,11±2,91 b	14,47±2,02 c
	Vacina intraperitoneal	27,28±0,64 b	2,37±0,29 a	32,72±4,56 b	34,46±3,23 a
	Vacina oral	28,44±0,65 b	2,41±0,24 a	40,78±4,69 a	32,90±1,82 a

		Banho de imersão	35,28±1,93 a	2,41±0,14 a	35,91±0,42 b	22,45±1,30 b
Dias após vacinação	Tratamentos	Neutrófilos (10 ³ ·µL ⁻¹)	Linfócitos (10 ³ ·µL ⁻¹)	Monócitos (10 ³ ·µL ⁻¹)	Glicose (mg·dL ⁻¹)	
7 dias	Controle	5,01±1,25 b	8,06±0,73 b	0,78±0,06 c	73,03±11,99 a	
	Vacina intraperitoneal	11,14±1,60 a	14,32±1,84 a	2,90±0,69 a	85,72±11,13 a	
	Vacina oral	7,73±2,80 ab	9,86±1,23 b	0,98±0,18 bc	77,39±7,46 a	
	Banho de imersão	11,52±0,87 a	10,62±0,84 b	1,38±0,25 b	47,27±11,27 b	
21 dias	Controle	4,99±1,03 b	8,51±0,68 c	0,97±0,35 b	42,87±15,83 a	
	Vacina intraperitoneal	10,43±0,16 a	22,91±3,01 a	1,12±0,10 b	40,06±13,11 a	
	Vacina oral	11,88±1,43 a	19,29±2,98 a	1,73±0,25 a	55,70±12,53 a	
	Banho de imersão	8,44±0,66 a	12,71±1,96 b	1,26±0,11 b	48,12±20,86 a	

Letras distintas indicam diferenças significativas pelo teste SNK de comparação de médias ($p < 0,05$).

Os peixes dos tratamentos vacinados intraperitoneal e imersão apresentaram maior contagem de neutrófilos no 7º dia e 21º dia, enquanto que os do tratamento via oral foi significativamente maior do que os não vacinados ($p < 0,05$) apenas no 21º dia. O número de monócitos no sangue das tilápias foi maior nos peixes vacinados intraperitonealmente no 7º dia e por via oral no 21º dia (Tabela 1). Basófilos, eosinófilos e células granulocíticas especiais foram encontrados em proporções pequenas e não foram analisadas.

O aumento no número total de leucócitos nas tilápias vacinadas neste estudo, também foi observado no esturjão e na truta arco-íris vacinados intraperitonealmente contra *A. hydrophila* e três espécies patogênicas para a espécie, respectivamente (Khoshbavar-Rostami et al. 2007, Nikoskelainen et al. 2007). No estudo de Selvaraj et al. (2004) carpas (*Cyprinus carpio*) imunizadas com LPS de *A. hydrophila* e no estudo de Selvaraj et al. (2006) carpas imunizadas com β -glucano juntamente com LPS de *A. hydrophila*, apresentaram maiores contagens totais de leucócitos, do número de neutrófilos e monócitos. Porém o de linfócitos se manteve constante.

Os linfócitos são responsáveis pela resposta imune específica humoral e celular, promovendo a produção de anticorpos, aumento da capacidade citotóxica, atuando no processo de memória imunológica e na liberação de fatores reguladores da função imune, como as linfocinas (Ellis 1999). Klesius et al. (2000) reforçaram em seu estudo a importância do anticorpo na imunidade protetora das tilápias vacinadas contra *S. iniae*.

No estudo com esturjões Khoshbavar-Rostami et al. (2007) sugeriram que o aumento na população de linfócitos resultam em maior quantidade de anticorpos e conseqüentemente maior título de aglutinação.

O título de aglutinação do soro dos peixes vacinados intraperitonealmente foi significativamente maior ($p < 0,05$) no 7º dia e 21º dia para as três bactérias utilizadas no teste. O soro dos peixes dos tratamentos via oral e imersão, por sua vez, apresentou maior título de aglutinação do que os peixes não vacinados para a *A. hydrophila* e menor do que os vacinados intraperitonealmente. Já o título de aglutinação da *E. durans* foi maior nos peixes destes

tratamentos do que os não vacinados e igual aos vacinados via intraperitoneal, apenas no 21º dia ($p < 0,05$) (Tabela 2).

Muitos estudos relataram aumento no título de aglutinação após os peixes serem vacinados. Tilápias do Nilo apresentaram maior aglutinação após vacina intraperitoneal contra *S. iniae* (Klesius et al. 2000), além do que, apresentaram bons índices após serem infectadas com *S. iniae*, e estes índices só baixaram na décima semana após infecção (Shoemaker et al. 2006b). No estudo de Selvaraj et al. (2004), carpas imunizadas com LPS de *A. hydrophila* também apresentaram maior título de aglutinação, assim como os esturjões vacinados intraperitonealmente contra *A. hydrophila*, os quais mostraram bons índices até 29 dias após a vacinação (Khoshbavar-Rostami et al. 2007).

Uma das funções do anticorpo é a aglutinação de antígenos (Tizard 2002), sendo que a lectina, além de proteína aglutinante, também pode atuar como opsonina para fagocitose e ativadora do sistema complemento, fazendo parte do sistema não específico de peixes (Ellis 1999). As diferenças entre os títulos de aglutinação para as diferentes bactérias da vacina polivalente deste estudo mostraram que esta análise obteve resposta específica para cada bactéria e juntamente com a correlação positiva ($r=0,74$) entre o número de linfócitos e a aglutinação, sugerindo que os anticorpos tiveram grande participação na aglutinação das bactérias. Swain et al. (2007) relataram que carpas indianas (*Labeo rohita*) após vacinação polivalente apresentaram maior título de aglutinação, porém com índices diferentes para cada bactéria, assim como neste estudo.

Os neutrófilos e os monócitos são células responsáveis pela fagocitose com funções bactericidas, pois secretam radicais livres de oxigênio e nitrogênio capazes de destruir diferentes tipos de patógenos. Monócitos ainda possuem o papel de interligar o sistema imune não específico ao específico, pela produção de citocinas que levam as informações aos linfócitos, estimulando a sua ativação (Ellis 1999). Os maiores números de monócitos no 7º dia nos peixes vacinados intraperitonealmente e no 14º dia nos peixes via oral contribuíram para o aumento no número de linfócitos nestes tratamentos nos respectivos dias após a vacinação.

Além das substâncias bactericidas produzidas pelos neutrófilos e monócitos, existem moléculas do sistema humoral não específico como as lisozimas (Ellis 1999). Lisozima é uma enzima encontrada em peixes com atividade lítica contra bactérias gram-positivas e negativas (Saurabh & Sahoo 2008). Alguns estudos mostraram o aumento da ativação da lisozima após a vacinação, de “kinguio” e “esturjão” contra *A. hydrophila* via oral e intraperitoneal, respectivamente (Irianto et al. 2003, Khoshbavar-Rostami et al. 2007). Já “enguia” (*Anguilla anguilla*) que receberam vacina polivalente por diferentes vias (Esteve-Gassent et al. 2004) e tilápia do Nilo infectada com *S. iniae* (Shoemaker et al. 2006b) que não mostraram alteração na atividade da lisozima.

O soro dos peixes de todos os tratamentos não apresentou atividade antimicrobiana contra *A. hydrophila* e *E. durans*, neste estudo. Já *P. aeruginosa* e *E. coli* tiveram seu crescimento inibido pelo soro dos peixes vacinados por todas as três vias de administração, no 7º dia e no 21º

dia (Tabela 2). Porém, não se tem certeza de quais enzimas, proteínas ou outras moléculas, possuem ação bactericida ou são responsáveis por estas inibições.

Tabela 2 – Resultados dos títulos de aglutinação ($\log_2(x+1)$) e da atividade antimicrobiana ($\log_2(x+1)$) do soro de tilápia do Nilo não vacinada; vacinada por injeção intraperitoneal com 1,5 mL de suspensão contendo 2×10^8 bactérias inativadas $\cdot \text{mL}^{-1}$; via oral alimentadas duas vezes ao dia com ração contendo vacina na proporção de 2×10^7 bactérias inativadas g^{-1} , durante 5 dias; vacinada por banho de imersão em solução contendo 2×10^7 bactérias inativadas $\cdot \text{mL}^{-1}$, durante 20 minutos; no sétimo e no vigésimo primeiro dia após a vacinação.

Dias após vacinação	Tratamentos	Título de aglutinação		
		<i>A. hydrophila</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. durans</i>
7 dias	Controle	3,19±0,88 c	0,53±0,92 b	3,17±0,00 b
	Vacina intraperitoneal	10,00±1,00 a	3,50±1,46 a	5,04±0,00 a
	Vacina oral	3,78±0,56 b	1,06±0,92 b	2,89±0,49 b
	Banho de imersão	5,71±1,49 b	1,06±0,92 b	2,89±0,49 b
21 dias	Controle	2,75±0,60 c	0,00±0,00 b	2,75±0,60 b
	Vacina intraperitoneal	10,33 ± 0,58 a	4,43±1,46 a	3,78±0,53 a
	Vacina oral	5,70±0,56 b	0,00±0,00 b	3,78±0,53 a
	Banho de imersão	6,04±1,96 b	0,00±0,00 b	3,79±1,08 a

Dias após vacinação	Tratamentos	Atividade antimicrobiana			
		<i>A. hydrophila</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. durans</i>	<i>E. coli</i>
7 dias	Controle	0,00±0,00 a	0,53±0,92 b	0,00±0,00 a	1,06±0,92 b
	Vacina intraperitoneal	0,00±0,00 a	8,34±1,15 a	0,00±0,00 a	7,36±2,84 a
	Vacina oral	0,00±0,00 a	6,70±2,47 a	0,00±0,00 a	8,01±1,00 a
	Banho de imersão	0,00±0,00 a	7,35±2,06 a	0,00±0,00 a	7,68±1,15 a
21 dias	Controle	0,00±0,00 a	3,48±0,53 b	0,00±0,00 a	1,58±1,58 b
	Vacina intraperitoneal	0,00±0,00 a	10,50±0,71 a	0,00±0,00 a	9,51±3,53 a
	Vacina oral	0,00±0,00 a	5,71±2,04 a	0,00±0,00 a	7,51±2,11 a
	Banho de imersão	0,00±0,00 a	4,09±0,00 a	0,00±0,00 a	4,67±3,32 a

Letras distintas indicam diferenças significativas pelo teste SNK de comparação de médias ($p < 0,05$).

Neste estudo os resultados do título de aglutinação e da atividade antimicrobiana do soro foram diferentes para cada tipo de bactéria. *A. hydrophila* e *E. durans* apresentaram resistência aos antimicrobianos, porém seus títulos de aglutinação foram maiores nas tilápias vacinadas. Enquanto que *P. aeruginosa* teve seu crescimento inibido pelo soro dos peixes, mas apresentou alguma aglutinação apenas nos peixes vacinados via intraperitoneal. Uma das hipóteses para isto é que nos peixes vacinados via oral e imersão houve reação cruzada entre os antígenos inibindo a resposta específica contra *P. aeruginosa*. Esta reação cruzada foi observada em outros estudos, como no salmão do atlântico (*Salmo salar*) e na truta arco-íris, que apresentaram, respectivamente, reação cruzada entre *A. salmonicida* e *V. salmonicida*, *Listonella anguillarum* e *Flavobacterium psychrophilum* (Hoel et al. 1997, Nikoskelainen et al. 2007).

Outra hipótese é que os peixes dos tratamentos via oral e imersão não conseguiram mostrar bons resultados de aglutinação para *P. aeruginosa* por terem assimilado quantidades ineficientes de bactérias inativadas para obter resposta adequada. Ellis (1999) afirmou que anticorpos reconhecem proteínas das membranas externas reguladoras de ferro (PRF's) e, quando esta proteína se expressa pouco na membrana da bactéria, o anticorpo necessitará de quantidades maiores de bactérias para conseguir agir.

Vacinas administradas por via intraperitoneal têm demonstrado bons resultados em diversos estudos, porém têm se buscado técnicas de vacinação que sejam mais práticas para vacinar grande quantidade de peixes. As tilápias vacinadas via intraperitoneal contra *S. iniae* apresentaram alta porcentagens relativas de sobrevivência, enquanto que este índice para vacina oral e imersão apresentando resultados poucos satisfatórios (Evans et al. 2004, Shoemaker et al. 2006c). Porém, a vacina contra *S. iniae* mostrou bons resultados a campo para as tilápias do Nilo vacinadas por duas vezes por banho de imersão, antes e após a reversão sexual (Klesius et al. 2008). O linguado senegalês (*Solea senegalensis*) e o robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*) também apresentaram boa proteção com banho de imersão apenas quando revacinados (Arijo et al. 2005, Angelidis 2006).

O linguado (*Scophthalmus maximus*) e as enguias apresentaram resultados satisfatórios, apenas após a vacinação intraperitoneal em comparação aqueles por banho de imersão (Esteve-Gassent et al. 2004, Santos et al. 2005), corroborando o presente resultado em peixes vacinados intraperitonealmente. Porém, os animais vacinados via oral e imersão também apresentaram resultados satisfatórios, chegando a igualar ou até superar em alguns parâmetros os por via intraperitoneal, principalmente no 21º dia.

A truta arco-íris e o salmão do atlântico apresentaram maiores estímulos do sistema imunológico após a vacina polivalente. No caso dos salmões, até melhor do que as vacinas monovalentes. Em ambos os estudos, foram obtidos resultados diferentes de produção de anticorpo para as diferentes bactérias (Hoel et al. 1997, Nikoskelainen et al. 2007). Nikoskelainen et al. (2007) recomendam que os antígenos bacterianos devam ser escolhidos com cuidado na vacina polivalente para evitar efeitos inibitórios dos antígenos nas respostas específicas de peixes.

A vacina polivalente foi eficaz, tendo o soro dos peixes vacinados aglutinado *A. hydrophila* e *E. durans*, com comprovada ação antimicrobiana contra *P. aeruginosa*. As diferentes administrações da vacina estimularam a resposta hematológica e imunológica da tilápia do Nilo, sendo a vacina intraperitoneal a via que apresentou maiores aglutinações. Porém, o banho de imersão e a vacina oral apresentaram resultados satisfatórios. Os resultados também mostraram que as diferentes vias e os diferentes antígenos apresentaram estímulos em tempos diferentes para alguns parâmetros.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à fundação 25 de Julho e ao Engº Agrônomo Roberto Hoop por ceder os peixes para o experimento, ao CNPq pelas bolsas de Iniciação Científica a Bruno C. Silva, Produtividade em Pesquisa a Maurício L. Martins (CNPq 301072/2007-8) e pelo auxílio

financeiro ao projeto (CNPq 472968/2007-6). Os autores são ainda especialmente gratos ao querido amigo Professor Elpídio Beltrame, por todo o agradável tempo de convivência e a ajuda e apoio aos membros do Setor de Microbiologia do Laboratório de Camarões Marinhos – UFSC.

REFERENCIAS

Angelidis P. 2006. Immersion booster vaccination effect on sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) juveniles. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 90:46–49.

Arijo S., Rico R., Chabrillon M., Díaz-Rosales P., Martínez-Manzanares E., Balebona M.C., Magariños B., Toranzo A.E & Moriñigo M.A. 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.

Austin B. & AUSTIN D.B. 1993. Bacterial fish pathogens in farmed and wild fish. 2nd ed. Ellis Horwood Ltd., Chichester, England, 364p.

Benli A.C.K., & Yildiz H.Y. 2004. Blood parameters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) spontaneously infected with *Edwardsiella tarda*. Aquacult. Res. 35:1388–1390.

Boyd C.E. & Massaut L. 1999. Risks associated with the use of chemicals in pond aquaculture, Aquaculture, 20:13-132.

Cai, W.; Li, S. & Ma, J. 2004. Diseases resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), blue tilapia (*Oreochromis aureus*) and their hybrid (female Nile tilapia male blue tilapia) to *Aeromonas sobria*. Aquaculture 229:79-87.

Chen C.Y., Wooster G.A. & Bowser P.R. 2004. Comparative blood chemistry and histopathology of tilapia infected with *Vibrio vulnificus* or *Streptococcus iniae* or exposed to carbon tetrachloride, gentamicin, or copper sulphate. Aquaculture 239:421-443.

Cipriano, R. C. 2001. *Aeromonas hydrophila* and motile aeromonad septicaemias of fish. Fish Disease Leaflet 68, U.S. Department of the Interior, Fish and Wildlife Service, Division of Fisheries Research, Washington, D.C.

Ellis, A.E. 1999. Immunity to bacteria in fish. Fish Shellfish Immunol 9:291–308.

Esteve-Gassent M. D., Fouz B. & Amaro C. 2004. Efficacy of a bivalent vaccine against eel diseases caused by *Vibrio vulnificus* after its administration by four different routes. Fish Shellfish Immunol. 16:93-105.

Evans J.J., Klesius P.H. & Shoemaker C.A. 2004. Efficacy of *Streptococcus agalactiae* (group B) vaccine in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by intraperitoneal and bath immersion administration. Vaccine 22: 3769-3773.

Fernandez A.B., De Blasi I. & Ruiz I. 2002. El sistema inmune de los teleósteos (I): Células y órganos. Rev. AcuaTic 16.

- Goldenfarb P.B., Bowyer F.P., Hall E. & Brosius E. 1971. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. *Am. J. Clin. Pathol.* 56:35-39.
- Hoel K., Salonius K. & Lillehaug A. 1997. Vibrio antigens of polyvalent vaccines enhance the humoral immune response to *Aeromonas salmonicida* antigens in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 7:71–80.
- Irianto A., Robertson P.A. & 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.
- Kaattari S.L. & Piganelli J.D. 1996. The specific immune system: humoral defense. In:lwama G. & Nakanishi T. Editors, *The Fish Immune System*, Academic Press, San Diego 207–243.
- Khoshbavar-Rostami H.A., Soltani M. & Hassan H.M.D. 2007. Immune responses of great sturgeon *Huso huso* to *Aeromonas hydrophila* bacterin. *J. Fish Biol.* 70:1931-1938.
- Klaenhammer T.D. & Kullen M.J. 1999. Selection and design of probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 50:45– 57.
- Klesius P.H., Shoemaker C.A. & Evans J.J. 1999. Efficacy of a killed *Streptococcus iniae* vaccine in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Eur. Assoc. Fish Pathol.*,19(1):1-3.
- Klesius P.H., Shoemaker C.A. & Evans J.J. 2000. Efficacy of single and combined *Streptococcus iniae* isolate vaccine administered by intraperitoneal and intramuscular routes in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 188:237-246.
- Klesius P.H., Shoemaker C.A. & Evans J.J. 2008. Immersion vaccination of tilapia (*Oreochromis niloticus*) using a *Streptococcus iniae* vaccine. *Aquaculture America Conference 2008*. February 9-12, 2008. Lake Buena Vista, Florida. p.183 (Resumo).
- Kwon S.R., Lee E.H., Nam Y.K., Kim S.K. & Kim K.H. 2007. Efficacy of oral immunization with *Edwardsiella tarda* ghosts against edwardsiellosis in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture* 269:84–88.
- Lim C. & Webster C.D. 2006 *Tilapia: biology, culture and nutrition*. An Imprint of the Haworth Press, New York, United Stated. 678p.
- Martins M.L., Pilarsky F., Onaka E.M., Nomura D.T., Fenerick J., Ribeiro K., Myiazaki D.M.Y., Castro M.P. & Malheiros E.B. 2004. Hematologia e resposta inflamatória aguda em *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) submetida aos estímulos único e consecutivo de estresse de captura. *Bol. Inst. Pesca* 30:71-80.
- McNulty S.T., Klesius P.H., Shoemaker C.A. & Evans J.J. 2003. Hematological changes in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) infected with *Streptococcus iniae* by nare inoculation. *J. World Aquacult. Soc.* 34:418-422.

- Nikoskelainen S., Verho S., Jarvinen S., Madetoja J., Wiklund T. & Lilius E. 2007. Multiple whole bacterial antigens in polyvalent vaccine may result in inhibition of specific responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.* 22:206-217.
- Okamura D, Araújo F.G., Logato P.V.R., Murgas L.D.S., Freitas R.T.F. & Araújo R.V, 2007. Efeito da vitamina C sobre o hematócrito e glicemia de alevinos de tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*) em transporte simulado. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*59(4):883-888.
- Plumb J.A.1997. Infectious diseases of tilapia. In: Tilapia aquaculture in the Americas, vol. I. Costa-Pierce, B.A. & Rakocy, J.E. eds. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Luisiana, USA, 212-228.
- Plyzycz B., Flory C.M., Galvan I. & Bayne C.J. 1989. Leucocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) pronephros: cell types producing superoxide anion. *Dev. Comp. Immunol.* 13:217-224.
- Rosenfeld G. 1947. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May-Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. *Mem. Inst. Butantan* 20:329-334.
- Ruangpan L., Kitao T. & Yoshida Y. 1986. Protective efficacy os *Aeromonas hydrophila* vaccine in Nile tilapia. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 12:345-360.
- Santos Y., Garcia-Marquez S., Pereira P.G., Pazos F., Riaza A., Silva R., El Morabit A. & Ubeira F.M. 2005 Efficacy of furunculosis vaccines in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.): evaluation of immersion, oral and injection delivery. *J. Fish Dis.* 28:165–172.
- Saurabh S. & Sahoo P.K. 2008. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquacult. Res.* 39:223-239.
- Schleder D.D., Kayser M., Sühnel S., Ferreira J.F., Rupp G.S. & Barraco M.A. 2008 *in press*. Modulation of some hemato-immunological parameters during the reproductive cycle of the scallop *Nodipecten nodosus* in association with a carotenoid-enriched diet. *Aquaculture*.
- Secombes C.J. 1996. The Nonspecific Immune System: Celular Defensas. In: Iwana G. & Nakanishi T. *The Fish Immune System*. London: Academic Press, p.63-105.
- Selvaraj V., Sampath K. & Sekar V. 2004. Extraction and Characterization of Lipopolysaccharide from *Aeromonas hydrophila* and Its Effects on Survival and Hematology of the Carp, *Cyprinus carpio*. *Asian Fish. Sci.* 17:163-173.
- Selvaraj V., Sampath K. & Sekar V. 2006. Adjuvant and immunostimulatory effects of b-glucan administration in combination with lipopolysaccharide enhances survival and some immune parameters in carp challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 114:15–24.
- Shoemaker C.A. & Klesius P.H. 1997. Streptococcal disease problems and control: a review. In: K. FITZSIMMONS (Ed.) *Tilápia Aquaculture* vol. 2, Northeast Regional Agricultural Engineering Service, Ithaca, 671–680.

- Shoemaker C.A., Vandenberg G.W., Desormeaux A., Klesius P.H. & Evans J.J. 2006a. Efficacy of a *Streptococcus iniae* modified bacterin delivered using Oralject™ technology in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 255:151-156.
- Shomaker C.A., Lim C., Yildirim-Aksoy M., Welker T.L. & Klesius P. 2006b. Growth response and acquired resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) that survived *Streptococcus iniae* infection. *Aquacult. Res.* 37:1238-1245.
- Shoemaker C.A., Vandenberg G.W., Désormeaux A., Klesius P.H. & Evans J.J. 2006c. Efficacy of a *Streptococcus iniae* modified bacterin delivered using Oralject™ technology in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*. 255:151–156.
- Swain P., Behura A., Dash S. & Nayak S.K. 2007. Serum antibody response of Indian major carp, *Labeo rohita* to three species of pathogenic bacteria; *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda* and *Pseudomonas fluorescens*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 117:137–141.
- Tavares-Dias M. 2003. Variáveis hematológicas de teleósteos brasileiros de importância zootécnica. 209p. Tese (Doutorado em Aqüicultura) – Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- Tizard I.R. 2002. *Imunologia veterinária: uma introdução*. São Paulo: Roca, 532p.
- Vandenberg G.W., Gaudreault C., Dallaire V. & Munger G. 2003. A novel system for oral vaccination of salmonids against furunculosis. In: *Proceedings of Aquaculture in America*, Louisville, KY, USA.
- Vandenberg G.W. 2004. Oral vaccines for finfish: academic theory or commercial reality? *Anim. Health Res. Rev.* 52:301–304.
- Yano T. 1996. The nonspecific immune system: Humoral defense. In: IWANA G. & NAKANISHI T. *The Fish Immune System*, Academic Press, San Diego, 207–243.
- Yildirim M., Lim C., Wan P. & Klesius P.H. 2003. Growth performance and immune response of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fed diets containing graded levels of gossypol–acetic acid. *Aquaculture* 219:751-768.

5. REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

ANGELIDIS, P. Immersion booster vaccination effect on sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*) juveniles. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, v.90, p.46–49, 2006.

ARIJO, S.; RICO, R.; CHABRILLON, M.; DÍAZ-ROSALES, P.; MARTÍNEZ-MANZANARES, E.; BALEBONA, M.C.; MAGARIÑOS, B.; TORANZO, A.E; MORIÑIGO, M.A. Effectiveness of a divalent vaccine for sole, *Solea senegalensis* (Kaup), against *Vibrio harveyi* and *Photobacterium damsela subsp. piscicida*. *Journal of Fish Diseases*, v.28, p.33-38, 2005.

AUSTIN, B.; AUSTIN, D.B. *Bacterial fish pathogens in farmed and wild fish*. 2nd ed. Ellis Horwood Ltd., Chichester, England, 2007, 364p.

CAI, W.; LI, S.; MA, J.. Diseases resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), blue tilapia (*Oreochromis aureus*) and their hybrid (female Nile tilapia_male blue tilapia) to *Aeromonas sobria*. *Aquaculture*, v. 229, p. 79-87, 2004.

CIPRIANO, R. C. *Aeromonas hydrophila* and motile aeromonad septicaemias of fish. *Fish Disease Leaflet 68*, U.S. Department of the Interior, Fish and Wildlife Service, Division of Fisheries Research, Washington, D.C. 2001.

ELLIS, A.E. *Fish vaccination*. Academic Press, New York, 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.

FISHSTAT PLUS. 2008. *Universal software for fishery statistical time series. version 2.3.2000*. FAO Fisheries Department, Fisheries informations, Data and Statistics Unit.

FALCON, D.R. *β-glucano e vitamina C no desempenho produtivo e parâmetros fisiopatológicos em juvenil de tilápia do Nilo: nível de suplementação e tempo de administração*. Tese de doutorado, Pós Graduação em Aqüicultura, Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticalbal. 158p. 2007.

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

HAYASHI, C. Breves considerações sobre as tilápias. In: RIBEIRO, R.P., HAYASHI, C., FURUYA, W.M. (Eds.) *Curso de piscicultura-Criação racional de tilápias*. 4p. 1995.

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

HOEL, K.; SALONIUS, K.; LILLEHAUG, A. *Vibrio* antigens of polyvalent vaccines enhance the humoral immune response to *Aeromonas salmonicida* antigens in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish & Shellfish Immunol.*, v.7. p. 71–80, 1997.

ICEPA - INSTITUTO CEPA Síntese anual da agricultura de Santa Catarina 2005/2006, disponível em www.icepa.com.br.

IWANA, G.; NAKANISHI, T. *The Fish Immune System*, Academic Press, San Diego, p. 207–243. 1996.

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

KLESZIUS, P.H., SHOEMAKER, C.A., EVANS, J.J. Efficacy of a killed *Streptococcus iniae* vaccine in tilápia (*Oreochromis niloticus*). *Eur. Assoc. Fish Pathol.*, v. 19, n. 1, p. 39, 1999.

LIM, C.; WEBSTER, C.D. *Tilápia: biology, culture and nutrition*. An Imprint of the Haworth Press, New York, United States. 2006.

LIN, J.H.; CHEN, T.; CHEN, M.; CHEN, H. CHOU, R.; CHEN, T.; SU, M.; YANG, H. Vaccination with three inactivated pathogens of cobia (*Rachycentron canadum*) stimulates protective immunity. *Aquaculture*, v.255, p.125–132. 2006.

MANNING, M.J. Fishes. *In: TURNER (Ed.), Immunology*. Chichester: John Wiley and Sons, p.69-100. 1994.

MARTINS M.L., PILARSKY F., ONAKA E.M., NOMURA D.T., FENERICK J., RIBEIRO K., MYIAZAKI D.M.Y., CASTRO M.P.; MALHEIROS E.B. Hematologia e resposta inflamatória aguda em *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) submetida aos estímulos único e consecutivo de estresse de captura. *Boletim do Instituto de Pesca*, v.30, p.71-80, 2004.

NIKOSKELAINEN, S.; VERHO, S.; JARVINEN, S.; MADETOJA, J.; WIKLUND, T.; LILJUS, E. Multiple whole bacterial antigens in polyvalent vaccine may result in inhibition of specific responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology*, v.22 p.206-217. 2007.

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

PLUMB, J.A. Infectious diseases of tilapia. *In: Tilapia aquaculture in the Americas*, vol. I. Costa-Pierce, B.A. & Rakocy, J.E. eds. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Luisiana, USA, p.212-228. 1997.

PLYZYCZ, B.; FLORY, C.M.; GALVAN, I.; BAYNE, C.J. Leucocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) pronephros: cell types producing superoxide anion. *Dev. Comp. Immunol.*, v.13, p.217-224. 1989.

POPMA, T.J.; PHELPS, R.P. Status report to commercial tilapia producers on monose x fingerling production techniques. *In: AQUICULTURA BRASIL'98*, Recife. Anais... Recife: SIMBRAQ, 1998. p.127-145. 1998.

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

RUNGPAN, L.; KITAO, T.; YOSHIDA, Y. Protective efficacy os *Aeromonas hydrophila* vaccine in Nile tilapia. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.12, p.345-360, 1986.

SANTOS, Y.; GARCIA-MARQUEZ, S.; PEREIRA, P.G.; PAZOS, F.; RIAZA, A.; SILVA, R.; EL MORABIT A.; UBEIRA, F.M. Efficacy of furunculosis vaccines in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.): evaluation of immersion, oral and injection delivery. *J. Fish Dis.*, v. 28, p.165–172, 2005.

SECOMBES, C.J. The Nonspecific Immune System: Celular Defensas. *In: IWAMA, G., NAKANISHI, T. The Fish Immune System.* London: Academic Press, p. 63-105. 1996.

SHOEMAKER, C.A.; KLESIUS, P.H. Streptococcal disease problems and control: a review. *In: K. FITZSIMMONS (Ed.) Tilápia Aquaculture* vol. 2, Northeast Regional Agricultural Engineering Service, Ithaca, p. 671–680. 1997.

SHOEMAKER, C.A.; KLESIUS, P.H.; PLUMB, J.A. Killing of *Edwardsiella ictaluri* by macrophages from channel catfish immune and susceptible to enteric septicemia of catfish. *Vet. Immunol. Immunopatho.*, v.58, p.181-190, 1997.

SHOEMAKER, C.A.; VANDENBERG G.W.; DÉSORMEAUX, A.; KLESIUS, P.H.; EVANS, J.J. Efficacy of a *Streptococcus iniae* modified bacterin delivered using Oralject™ technology in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, v. 255, p.151-156, 2006.

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

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

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

VALLEJO, A.N.; MILLER, N.W.; CLEM, L.W. Antigen processing and presentation in teleost immune responses. *In: FAISAL, M., HETRICK, F.M. (Ed.), Ann. Rev. Fish Dis., v.2, p.73-89, 1992.*

VANDENBERG, G.W.; GAUDREAU, C.; DALLAIRE, V.; MUNGER, G. A novel system for oral vaccination of salmonids against furunculosis. *In: Proceedings of Aquaculture in America, Louisville, KY, USA. 2003.*

VANDENBERG, G.W. Oral vaccines for finfish: academic theory or commercial reality? *Anim. Health Res. Rev., v. 52, p. 301–304, 2004.*

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

YOSHINAGA, K.; OKAMOTO, N.; KURATA, O.; IKEDA, Y. Individual variations of Natural Killer activity of rainbow trout leucocytes against IPN virus-infected and uninfected RTG-2 cells. *Fish Pathol., v.29, p.1-4, 1994.*