



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

Imunização com *Ichthyophthirius multifiliis* (Fouquet, 1876) em jundiá  
*Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824): efeitos na sobrevivência,  
respostas hemato-imunológica, bioquímica e histopatológica

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Aquicultura do  
Centro de Ciências Agrárias da  
Universidade Federal de Santa Catarina,  
como requisito parcial à obtenção do  
título de Mestre em Aquicultura

Orientador: Maurício Laterça Martins

Karen Roberta Tancredo

Florianópolis  
2015

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

Tancredo, Karen Roberta

Imunização com *Ichthyophthirius multifiliis* (Fouquet, 1876) em jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824): : efeitos na sobrevivência, respostas hemato-imunológica, bioquímica e histopatológica / Karen Roberta Tancredo ; orientador, Maurício Laterça Martins - Florianópolis, SC, 2015.

85 p.

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

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. hematologia. 3. vacina. 4. teronte. 5. Ciliophora. I. Martins, Maurício Laterça . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. III. Título.

**Imunização com *Ichthyophthirius multifiliis* (Fouquet, 1876) em jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824): efeitos na sobrevivência, respostas hemato-imunológica, bioquímica e histopatológica**

Por

KAREN ROBERTA TANCREDO

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 Programa

Banca Examinadora:

---

Dr. Mauricio Laterça Martins – *Orientador*

---

Dra. Gabriela Tomas Jerônimo

---

Dra. Mônica Yumi Tsuzuki

---

Dra. Natalia da Costa Marchiori



## **AGRADECIMENTOS**

Eu não poderia deixar passar em branco esses dois anos de mestrado sem agradecer aos meus colegas de laboratório por todo apoio e ajuda recebido durante este período. Vocês sempre estiveram presentes nos momentos críticos e de descontração, não me deixando desanimar jamais!

Aos muitos estagiários que tiveram a oportunidade de participar deste trabalho, obrigada pela dedicação e esforço. A força de vontade de vocês em aprender algo novo foi motivadora para mim em muitos dias de “luta” no bioensaio.

Em especial, abro um parágrafo para dedicar um agradecimento ao Prof. Maurício Laterça Martins, que desde 2009 vem me ensinando, confiando e acreditando no meu trabalho. Se hoje eu me sinto capaz de ir mais longe (bem mais longe) é por que você me deu oportunidades e conhecimento para tanto.

De coração, não me imagino fazendo outra coisa da minha vida se não me dedicando à pesquisa e ao ensino.

Obrigada,  
Karen



## RESUMO

O jundiá (*Rhamdia quelen*) representa importante fonte de renda para os produtores de peixes no sul do Brasil. No entanto, uma das causas mais importantes de perdas econômicas é a ocorrência do parasito *Icthyophthirius multifiliis* na fase de alevinagem. Uma alternativa para o controle do parasito é a utilização de vacina, por meio de imunização, que pode ser feita por meio de injeção intraperitoneal (i.p.) com terontes vivos ou por banhos de imersão. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da imunização com terontes vivos e sua influência na sobrevivência, resposta hemato-imunológica e histopatológica em jundiá. Foram realizados dois ensaios, imunização via i.p. (ensaio I) e imunização via banho de imersão (ensaio II). Os peixes foram divididos em controle; não imunizado e desafiado com 12.000 terontes/peixe; não imunizado e desafiado com 22.000 terontes/peixe; imunizado e desafiado com 12.000 terontes/peixe; imunizado e desafiado com 22.000 terontes/peixe. Nos peixes do ensaio I o número de trombócitos, leucócitos, linfócitos, neutrófilos e monócitos foram maiores 20 dias após imunização e menores nos peixes após o desafio. Os valores de imunoglobulina total foram maiores nos peixes não imunizados. Os níveis de catalase no fígado dos peixes no ensaio II foram maiores (1.738,47 U/mgprt) após 14 dias do que após 21 dias (1.114,26 U/mgprt) de imunização. Os resultados mostraram que novos parâmetros como proteínas totais, imunoglobulinas e enzimas antioxidantes podem ser utilizados para avaliar a resposta do hospedeiro à infecção. As alterações histológicas nos peixes foram consideradas leves e de ocorrência eventual, com exceção do fígado que apresentou significativa atrofia e hipertrofia de hepatócitos após imunização via i.p. O desenvolvimento de uma vacina eficiente contra o protozoário desperta grande interesse e se constitui em importante ferramenta para piscicultura sustentável.

**Palavras-chave:** Aquicultura, hematologia, vacina, teronte, Ciliophora.





## ABSTRACT

Silver catfish (*Rhamdia quelen*) represents an important source of economic income for fish farmers in Southern Brazil. Nevertheless, one of the most important cause of economic losses is the ciliate protozoan *Ichthyophthirius multifiliis* in fingerlings. An alternative to control the parasite is the immunization with live theronts by intraperitoneal injection (i.p.) or immersion bath. The i.p. immunization is the most efficient method. On the other hand, the immersion bath is more feasible for fish farmers. In two assays, this study aimed to evaluate the effects of immunization with live theronts and its influence on the survival, hemato-immunological response and histopathological analysis in jundiá. Fish were divided in control (non immunized no challenged); non immunized and challenged with 12,000 theronts/fish; non immunized and challenged with 22,000 theronts/fish; immunized and challenged with 12,000 theronts/fish; immunized and challenged with 22,000 theronts/fish. In the assay I showed higher numbers of thrombocytes, leukocytes, lymphocytes, neutrophils and monocytes 20 days after injection and lower numbers after challenge. The immunoglobulin values were higher in fish non immunized. The levels of catalase in the liver in the assay II were greater (1,738.47 U/mgprt) after 14 days than that observed after 21 days (1,114.26 U/mgprt) of immunization. The results showed that new parameters like total protein, immunoglobulin and antioxidant enzymes could be considered in evaluating the host response to infection. Histological alterations in fish were considered light and of eventual occurrence, except for liver that presented significant atrophy and hypertrophy of hepatocytes after immunization via i.p. The development of an efficient vaccine against protozoan awakens great interest and constitutes an important tool for sustainable fish farming.

**Key words:** Aquaculture, hematological vaccine, theron, Ciliophora..



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### INTRODUÇÃO GERAL

- Figura 1** Ciclo de vida do *Ichthyophthirius multifiliis*. O teronte de natação livre penetra através do muco e invade o epitélio da pele, brânquias, entre outros. Ao entrar no hospedeiro ele se transforma em trofote, que move-se ativamente dentro do epitélio. O parasito sai do peixe como tomonete maturo, que secreta um cisto de proteção e ocorrem inúmeras divisões para formar de 500-1000 células-filhas (tomitos). Os tomitos diferenciam-se em terontes infectantes, que perfuram a parede do cisto e entram na água com natação livre, em busca de um novo hospedeiro para completar o ciclo novamente. Ilustração modificada por Pádua et al. (2012) a partir de Dickerson (2012)..... 24

### CAPÍTULO 1

- Figura 1** Valores médios da atividade da catalase (U/mgprt) no fígado de *Rhamdia quelen* com 14 e 21 dias após a imunização com 10.000 terontes de *Ichthyophthirius multifiliis* vivos por peixe. Letras distintas indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tempos de amostragem..... 49

### CAPÍTULO 2

- Figura 1** Fotomicrografias do baço de *Rhamdia quelen* imunizados e desafiados com terontes de *Ichthyophthirius multifiliis*. (A) Controle polpa branca e polpa vermelha normais e artérias (\*); (B-C) Presença de melanomacrófagos (seta preta) nos peixes não imunizados. Coloração: HHE..... 68
- Figura 2** Fotomicrografias do rim de *Rhamdia quelen* imunizados e desafiados com terontes de *Ichthyophthirius multifiliis*. (A) Necrose do epitélio tubular (\*); (B) Hipertrofia do glomérulo e redução da cápsula de Bowman (seta preta) em peixe imunizado; (C) Presença de melanomacrófagos (seta preta) em peixe imunizado; (D)

Néfron imaturo (seta preta) em peixe imunizado.  
Coloração: HHE..... 69

**Figura 3** Fotomicrografias do fígado de *Rhamdia quelen* imunizados e desafiados com terontes de *Ichthyophthirius multifiliis*. (A) Estrutura geral normal de peixe controle; (B) Necrose (n) em peixes imunizados; (C-D) Peixes não imunizados apresentando alterações nos hepatócitos; (E) Esteatose (seta preta) em peixe não imunizado. Coloração: HHE. (F) Fibrose (\*) em peixe imunizado. Coloração: Tricrômico de Masson.. 70

**Figura 4** Fotomicrografias das brânquias de *Rhamdia quelen* imunizados e desafiados com terontes de *Ichthyophthirius multifiliis*. (A) Telangiectasia (t) em peixe não imunizado; (B-C) Peixes não imunizados com edema (seta preta); (D) Epitélio corrugado em peixe imunizado. Coloração: HHE..... 71

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

- Tabela 1** Parâmetros de qualidade de água (média±desvio padrão para cada ensaio de imunização com terontes vivos de *Ichthyophthirius multifiliis*..... 48
- Tabela 2** Concentração média (±desvio padrão) de proteínas totais, imunoglobulinas totais no soro e atividade da catalase (CAT) no fígado de *Rhamdia quelen* imunizados e desafiados com terontes de *Ichthyophthirius multifiliis*. Letras distintas indicam diferença significativa ( $p<0,05$ ) entre os tratamentos e entre os ensaios. PROT: proteína, Ig: imunoglobulina total..... 48
- Tabela 3** Parâmetros hematológicos (±desvio padrão), peso e comprimento de jundiás *Rhamdia quelen* imunizados via i.p. e desafiados com *Ichthyophthirius multifiliis*. Letras distintas indicam diferença significativa ( $p<0,05$ ) entre os tratamentos..... 50
- Tabela 4** Parâmetros hematológicos (±desvio padrão), peso e comprimento de jundiás *Rhamdia quelen* imunizados via banho de imersão e desafiados com *Ichthyophthirius multifiliis*. Letras distintas indicam diferença significativa ( $p<0,05$ ) entre os tratamentos..... 52

### CAPÍTULO 2

- Tabela 1** Parâmetros de qualidade de água (média±desvio padrão) para cada ensaio de imunização com terontes vivos de *Ichthyophthirius multifiliis*..... 72
- Tabela 2** Número de peixes com alterações seguido da porcentagem (entre parênteses) no rim de jundiás, *Rhamdia quelen*, imunizados com 10.000 terontes de *Ichthyophthirius multifiliis*..... 72
- Tabela 3** Número de peixes com alterações seguido da porcentagem (entre parênteses) no fígado de jundiás, *Rhamdia quelen*, imunizados com 10.000 terontes de *Ichthyophthirius multifiliis*..... 73
- Tabela 4** Número de peixes com alterações seguido da

porcentagem (entre parênteses) nas brânquias de jundiás,  
*Rhamdia quelen*, imunizados com 10.000 terontes de  
*Ichthyophthirius multifiliis*..... 74

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	17
<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	29
<b>OBJETIVOS</b> .....	29
<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	29
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	29
<b>CAPÍTULO 1</b> Parâmetros hemato-imunológicos e bioquímicos do jundiá <i>Rhamdia quelen</i> imunizado com terontes de <i>Ichthyophthirius multifiliis</i> .....	30
Highlights.....	31
Graphical abstract.....	31
Resumo.....	32
Abstract .....	33
Introdução.....	34
Material e Métodos.....	35
Resultados.....	38
Discussão.....	40
Agradecimentos.....	43
Referências.....	43
<b>CAPÍTULO 2</b> Análise histopatológica de jundiá, <i>Rhamdia quelen</i> , imunizados e desafiados com terontes de <i>Ichthyophthirius multifiliis</i> .....	54
Resumo.....	55
Abstract.....	56
Introdução.....	57
Material e Métodos.....	58
Resultados.....	60
Discussão.....	62
Agradecimentos.....	64
Referências.....	64
<b>CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	75
<b>REFERÊNCIAS INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	76





## INTRODUÇÃO GERAL

O jundiá *Rhamdia quelen*, peixe da família Pimelodidae, é uma das espécies de água doce mais estudadas na região sul do Brasil em virtude de sua ampla distribuição geográfica, de seu fácil manejo, rusticidade e boa conversão alimentar (SILVERGIP, 1996; FRACALOSSO et al., 2004). Este peixe vive em lagos e poços nos fundos dos rios, preferindo os ambientes de águas mais calmas com fundo de areia e lama, junto às margens e vegetação. Escondem-se entre pedras e troncos de onde saem à noite, à procura de alimento (GOMES, 2000).

Este bagre é encontrado do sudeste do México ao norte, e centro da Argentina ao sul. Jundiá é o nome popular dado às várias espécies distintas no Brasil e, em especial, aos peixes pertencentes ao gênero *Rhamdia*, cuja classificação ainda é confusa (BALDISSEROTTO, RADUNZ e BARCELLOS, 2010).

A produção do jundiá vem crescendo a cada ano no sul do Brasil e isso é devido não somente às suas características zootécnicas, mas também às pesquisas, experimentos e ações de extensão que vêm sendo realizadas juntos aos órgãos de pesquisa locais. O principal gargalo da cadeia produtiva ainda está na produção de formas jovens em razão do canibalismo existente na fase de larvicultura e das mortalidades relacionadas especialmente às infestações parasitárias de protozoários ciliados (AMARAL, 2013) como *Ichthyophthirius multifiliis*, *Epistylis* e *Trichodinidae*, considerados causadores das perdas tanto na alevinagem como na engorda (TAVARES-DIAS, MORAES e MARTINS, 2001; PÁDUA et al., 2012; MARTINS et al., 2010).

As doenças dos jundiás não ocorrem de maneira isolada, sendo geralmente resultantes de alterações no ambiente aquático e de práticas inadequadas de manejo, tais como: alta densidade de estocagem, transporte feito de maneira errônea e alimentação inadequada. Todos esses fatores podem provocar estresse e desequilíbrio na homeostase dos jundiás, aumentando a vulnerabilidade às doenças (BALDISSEROTTO e RADUNZ, 2004).

### **Imunoprofilaxia**

A ocorrência de doenças surge como importante fator limitante na aquicultura, sendo que a implementação de boas práticas de manejo, um programa de sanidade (PORTZ et al., 2013), adequado manejo alimentar, qualidade de água e melhoramento genético devem ser

ênfatisados para melhorar a saúde dos animais aquáticos. Entretanto, tudo isso se torna vulnerável quando acontecem surtos de doenças causadas por vírus, bactérias, fungos e parasitos, que geralmente são oportunistas e podem estar presentes no ambiente (YANONG, 2011).

Para tomar medidas de controle sanitário sobre uma doença parasitária é necessário que a causa seja clara e corretamente identificada, sendo indispensável compreender o ciclo de vida e ecologia dos parasitos. Uma vez diagnosticada a doença, o tratamento deve ser imediato a fim de evitar perdas (TONGUTHAI, 1997).

Um dos métodos que se tem aplicado para controlar as parasitoses envolve o estudo da resposta imune do sistema inato e adaptativo dos peixes por meio de vacinas (ALVAREZ-PELLITERO, 2008). A imunidade inata ou natural é a resposta não específica dos peixes contra os patógenos, onde a superfície do corpo compreende a primeira linha de defesa, sendo uma importante barreira física contra a invasão de parasitos. Além disso, algumas secreções da pele contêm lisozimas que podem danificar a superfície da membrana dos parasitos, enquanto outras, como o muco, bloqueiam a adesão dos parasitos nas células epiteliais dos peixes. Já a imunidade adaptativa ou adquirida é decorrente de um estímulo de produção e ativação de anticorpos, células reativas por meio de vacinas contra um determinado patógeno, que se desenvolve mais lentamente e é responsável pela defesa mais tardia e mais eficaz contra as infecções (WOO, 2007; DICKERSON e CLARK, 1996, ABBAS e LICHTMAN, 2009).

O sistema imunológico tem como funções participar dos processos que mantêm as condições estáveis (homeostase) durante o desenvolvimento e crescimento do organismo frente às reações inflamatórias decorrente de dano tecidual, bem como protegê-lo contra doenças, identificando e eliminando o agente patogênico (MAGNADOTTIR, 2010).

O desenvolvimento de vacinas como método imunoprolático na aquicultura tem aumentado significativamente em todo o mundo, seguindo a tendência de expansão da atividade (GUDDING et al., 1999; KLESÍUS et al., 2004; TONHEIM et al., 2008, SILVA et al., 2009; BAILONE et al., 2010; MARTINS et al., 2011a,b; PEREIRA et al., 2013). As vacinas objetivam estimular o sistema imune adaptativo, a fim de incrementar a resposta contra patógenos. O seu desenvolvimento é um processo baseado na identificação de estruturas únicas presentes nas células de um determinado microrganismo, gerando imunidade quando administrada como vacina (FIGUEIREDO e LEAL, 2008). Segundo Innes et al. (2011), as vacinas podem ser conduzidas com o

material do patógeno vivo ou inativado, que é então usado para imunizar o hospedeiro e provocar a indução à resposta imune que, por sua vez, ajuda a proteger o hospedeiro quando desafiado com o patógeno vivo, e criar assim memória imunológica mais importante e efetiva do que a resposta primária, ou seja, prepara o organismo para uma resposta imunológica mais rápida. As vacinas são específicas para cada doença, mas é usual, pelo menos, com os seres humanos e outros mamíferos, utilizar mais do que uma vacina ao mesmo tempo para proteger contra mais de uma doença, quando isso for necessário (ELLIS, 1989).

A relação entre os parâmetros imunológicos de peixes e seus parasitos é pouco conhecida quando comparada com o conhecimento gerado por estudos que são realizados com bactérias e vírus. As razões que justificam isso são: problemas encontrados na manipulação dos protozoários e helmintos em laboratório, dificuldades no seu cultivo *in vivo* e *in vitro*, complexidades do parasito e seu ciclo de vida, que pode envolver mais de um hospedeiro (HOUGHTON et al., 1988).

Com relação à resposta imunológica de peixes parasitados em cultivo, as pesquisas são escassas e a maioria voltadas para os protozoários patogênicos que são mais comuns, como *Ichthyophthirius multifiliis*, *Trypanosoma* sp., *Cryptobia* sp., *Glugea* sp., que causam grandes mortalidades nos hospedeiros (WOO, 1987a).

Alguns dos fatores que podem influenciar na eficácia da vacina são o tamanho do peixe e a temperatura da água. O sistema imune do peixe tem sua formação completa depois da fase de larval. Em geral, peixes mantidos em temperaturas fora da sua faixa ideal para o crescimento não desenvolvem bem o sistema imune e portanto não é recomendada a aplicação de vacinas. Por exemplo, bagres do canal (*Ictalurus punctatus*) vacinados contra *I. multifiliis* apresentaram maior título de anticorpos quando imunizados a temperaturas de 25 e 30°C comparados com os imunizados a 15 e 20°C (MARTINS et al., 2011b). O custo benefício para o uso das vacinas não está resumido apenas no quesito "econômico", mas no interesse em reduzir as mortalidades, a taxa de infecção e o uso de quimioterápicos nos cultivos (ELLIS, 1989).

Outras considerações importantes devem ser feitas para a vacinação de peixes, tais como: nutrição adequada, densidade de estocagem, qualidade da água, biologia do hospedeiro, ciclo de vida do parasito, custos e viabilidade (TONGUTHAI, 1997).

## Métodos de vacinação em peixes

Diferentes métodos podem ser utilizados na imunização de peixes: por via injetável, preferencialmente por injeção intraperitoneal (i.p); por imersão, em que os animais são imersos em solução aquosa contendo os antígenos vacinais; ou pela administração oral das vacinas. Esses métodos apresentam diferentes vantagens e desvantagens quanto à eficácia da imunização, praticidade, efeitos colaterais e custo-benefício (GUDDING et al., 1999). As vacinas injetáveis são as que induzem respostas inatas e adaptativas em maior intensidade e mais duradouras, em comparação com as demais vias. As vantagens deste método são: rota de imunização mais potente, permite a utilização de adjuvantes, método mais eficaz para peixes de grande porte. Quanto às desvantagens, é recomendada seu uso na aquicultura intensiva para peixes com mais de 15 g (ELLIS, 1989) e de alto valor comercial.

Na prática, as vacinas de baixo custo e que não demandam manejo intenso dos animais durante a vacinação são por meio de imersão (como os banhos ou mergulhos). No banho, a vacina é aplicada diretamente no tanque em que está o peixe, adicionando uma parte da vacina para cada dez partes de água. No mergulho, a vacina é aplicada no peixe em um pequeno tanque, de volume variável, mas é comum utilizar uma parte da vacina diluída em nove partes de água. Esses métodos são os que apresentam melhores resultados em pisciculturas tropicais, permitindo a imunização de milhares de peixes em curto período de tempo (KLESIUS et al., 2004; FIGUEIREDO e LEAL, 2008; ELLIS, 1989). Contudo, este procedimento apresenta como desvantagem a necessidade de grandes quantidades da vacina sendo recomendado para cultivos extensivos (VANDERBERG, 2004; ELLIS, 1989).

Para muitos piscicultores, o simples fato de adicionar um imunestimulante na ração já é um procedimento eficiente para o fortalecimento do sistema imune, aplicando-se mais na aquicultura extensiva, onde os viveiros são grandes. Dentre as vantagens está o menor estresse no peixe, permitindo a vacinação de um maior número de indivíduos de qualquer tamanho, sem custo extra de trabalho. As desvantagens são: o efeito da vacina requer maior quantidade para garantir proteção, adequado para peixes com dieta artificial (ELLIS, 1989) e não se sabe se todo o lote está sendo corretamente imunizado. Apesar destas desvantagens, este tipo de vacinação pode também ser realizado em sistemas intensivos com custos menores de mão de obra.

## Vacinação com parasitos

### *Cryptobia salmositica* Katz, 1951

É um protozoário hemoflagelado patogênico de salmonídeos encontrado na costa do Pacífico e América do Norte. Parasito comum no sangue tanto de peixes de água doce quanto marinhos, tem sido reportado como a causa das mortalidades em salmonídeos e juvenis de carpas (HOUGHTON et al., 1988). O parasito possui forma alongada oval, com dois flagelos; multiplica-se rapidamente no sangue causando mortalidade em peixes experimentalmente e naturalmente infectados. O cultivo intensivo do salmão facilita a transmissão e reprodução do parasito (WOO e POYNTON, 1995; WOO, 1987b). Os surtos de *Cryptobia* spp. com altas mortalidades dos hospedeiros têm ocorrido em larviculturas de peixes de água doce e nos cultivos em tanques-rede na costa oeste da América do Norte. Normalmente é transmitido indiretamente por meio da sanguessuga aquática *Piscicola salmositica*, que é um vetor natural, entretanto a transmissão direta também pode ocorrer durante a fase aguda da doença quando grande número de parasitos aparece na superfície do corpo, brânquias e trato digestório dos peixes infectados (WOO e WEHNERT, 1983; WOO e BUCHMANN, 2012).

Os sinais clínicos da doença são: letargia, anemia, anorexia, exoftalmia, edema generalizado, distensão abdominal, esplenomegalia e hepatomegalia. A severidade da criptobiose e a taxa de mortalidade variam entre as espécies de peixes (WOO, 1987c; 1994). Lesões histopatológicas em juvenis de truta arco-íris aparecem por volta de 3-4 semanas, é o começo agudo da doença (WOO e POYNTON, 1995); até 7-9 semanas pós-infecção, a doença se torna crônica e leva à anemia dos peixes (BAHMANROKH e WOO, 1994).

As pesquisas sobre o uso da vacina com o parasito vivo têm obtido sucesso na atenuação da doença, garantindo proteção aos peixes vacinados por no mínimo seis meses (WOO e LI, 1990). A vacinação não prejudica o crescimento de juvenis de truta e não tem custo bioenergético para o peixe (BEAMISH et al., 1996). A eficácia da vacina não é afetada quando os peixes são transferidos da água doce para o mar, como realizado em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) imunizados e desafiados com *C. salmositica* (LI e WOO, 1997).

Peixes vacinados ativam o sistema complemento para o desenvolvimento de anticorpos, aumentando os níveis rapidamente depois que os peixes são desafiados. Li e Woo (1995) observaram que

peixes vacinados e desafiados, após duas semanas desenvolveram proteção parcial contra *C. salmositica*, uma vez que todos os peixes desafiados após 3 semanas de vacinação ficaram imunes ao parasito. Neste sentido, Davy et al. (2007) conduziram um estudo com salmão do Atlântico (*Salmo salar*) infectados com *C. salmositica* vivos e vacinados 3 e 7 dias após a infecção. Os peixes que foram vacinados 3 dias após a infecção apresentaram baixo índice de parasitemia e altos títulos de anticorpo do que os não vacinados, e os que foram vacinados 7 dias após a infecção.

Beamish et al. (1996) analisaram o consumo alimentar, ganho de peso e ganho energético em trutas arco-íris infectadas e desafiadas com *C. salmositica*. Os juvenis de truta produziram anticorpos contra o parasito vivo atenuado e os peixes vacinados foram imunes à doença. Deste modo, a vacinação parece ter pouco custo energético e serve como controle efetivo ao patógeno.

#### *Tetrahymena pyriformis* Ehrenberg, 1830

Protozoário ciliado de vida livre, conhecido como patógeno oportunista, devido ao seu modo de sobrevivência, é comum em peixes de água doce, como os "guppies" (poecilídeos), prejudicando sua comercialização (ELLIOTT, 1959; TURKEWITZ et al., 2002). A reprodução é tipicamente por fissão binária, e algumas espécies podem produzir cistos reprodutivos (NOGA, 2010).

Dickerson et al. (1984) imunizaram o bagre do canal com *T. pyriformis* e desafiaram os peixes com *I. multifiliis*, com dois diferentes métodos de preparação do antígeno usando os cílios do parasito. Os resultados indicaram que os cílios provocaram resposta imune contra *I. multifiliis*, e a capacidade de imunização está diretamente relacionada com o tipo de cepa de *T. pyriformis*. O desafio com *I. multifiliis* também foi avaliado por Houghton et al. (1992), onde juvenis de carpas tiveram um pico de produção de anticorpos seis semanas após a imunização com *T. pyriformes* vivos, que perpetuou durante 12 semanas. Uma segunda dose da vacina foi aplicada e a produção de anticorpos continuou alta por até 16 semanas. Os peixes ainda foram desafiados com *I. multifiliis* e mostraram evidências de proteção usando cepa de *T. pyriformes*.

Diversas outras metodologias têm sido testadas contra este parasito. Chettri et al. (2009) testaram a eficácia de três ensaios de imunização contra *Tetrahymena* sp. Apesar de não ter oferecido proteção significativa contra o parasito, os peixes que foram imunizados com *Tetrahymena* morto e atenuado vivo apresentaram menores taxas

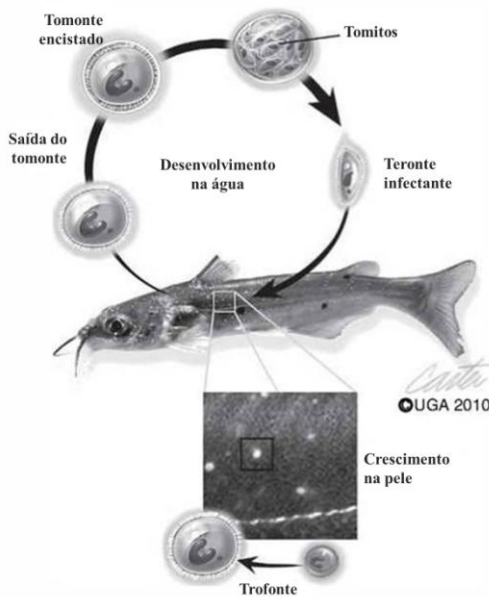
de infecção do que os peixes não imunizados. Foi conferido elevado grau de proteção contra a infecção, sugerindo que esta metodologia é eficaz para o desenvolvimento de vacinas.

*Ichthyophthirius multifiliis* (Fouquet, 1876)

É o mais importante dos Ciliophora que acomete o jundiá (*Rhamdia quelen*) devido à sua baixa especificidade de hospedeiros e ampla distribuição geográfica. Conhecido popularmente como doença dos pontos brancos, causador da Ictiofitiríase. Se não for combatido antecipadamente, causa lesões no tegumento e brânquias do hospedeiro que podem provocar a morte do peixe em curto prazo, sendo um dos parasitos que causam os prejuízos mais elevados em nível global na piscicultura de água doce (EIRAS, 2013).

Em seu ciclo de vida (Figura 1), distinguem-se quatro estágios: trofante, a forma parasita; tomonte, a forma reprodutora; tomito, o estado em divisão e teronte, a forma livre infecciosa. O estágio adulto do parasito é esférico e pode atingir grandes dimensões para um protozoário, da ordem de 1 mm de diâmetro. O macronúcleo, facilmente visível, caracteriza-se pela forma de ferradura e por ser volumoso. A membrana citoplasmática é coberta por grande quantidade de pequenos cílios que permitem à célula movimentos rotativos constantes.

No hospedeiro, os parasitos localizam-se subepidermicamente, sendo facilmente observados em qualquer parte do corpo e brânquias. Quando o parasito atinge o estado máximo de desenvolvimento, ou quando o hospedeiro morre, os trofontes liberam-se do mesmo. No exterior, nadam durante algum tempo (cerca de 2 a 6 horas) a procura de um substrato apropriado para se fixar (fundo de tanques ou aquário). No interior da epiderme, os agora chamados trofontes alimentam-se dos restos de células e fluidos do hospedeiro até atingirem um estado de maturidade que lhes permita recomeçar o ciclo (EIRAS, 1993).



**Figura 1.** Ciclo de vida do *Ichthyophthirius multifiliis*. O teronte de natação livre penetra na pele ou brânquias. Ao entrar no hospedeiro ele se transforma em trofote, que move-se ativamente dentro do epitélio. O parasito sai do peixe como tomonte maduro, que secreta um cisto de proteção e ocorrem inúmeras divisões para formar de 500-1000 células-filha (tomitos). Os tomites diferenciam-se em terontes infectantes, que perfuram a parede do cisto e nadam na água em busca de um novo hospedeiro para completar o ciclo novamente. Ilustração modificada por Pádua et al. (2012) a partir de Dickerson (2012).

Entre os danos causados por *I. multifiliis*, destacam-se forte irritação, prurido e grande produção de muco na pele e brânquias. Os hospedeiros tornam-se agitados e realizam movimentos violentos de fricção, chocando-se contra as paredes e fundo dos tanques, entrando, após algum tempo, em estado de apatia (PRIETO et al., 1991). A parasitose é particularmente grave quando ocorre nas brânquias e na superfície corporal, pois causa sérios problemas respiratórios, e se não for combatida a tempo, pode provocar rapidamente a morte do hospedeiro (HOFFMAN e BAUER, 1971; HINES e SPIRA, 1973; EWING et al., 1994).

De todas as fases, os terontes são considerados os mais vulneráveis aos tratamentos, pois os mesmos encontram-se na água e sem a proteção do cisto. Conseqüentemente, vários tratamentos estão



sendo testados na tentativa de controlar ou eliminar o parasito do ambiente de cultivo. Entre estes tratamentos, é possível destacar o uso de sal comum (cloreto de sódio), verde malaquita, formalina, cloramina-T, azul de metileno, sulfato de cobre, permanganato de potássio, aumento do fluxo e temperatura da água dos tanques, entre outros (CROSS e HURSEY, 1973; POST, 1987; SELOSSE e ROWLAND, 1990; TONGUTHAI, 1997; TIEMAN e GOODWIN, 2001; CARNEIRO et al., 2005).

De forma bem sucedida, Dickerson et al. (1985), Xu et al. (2004a) e Martins et al. (2011a) comprovaram a eficiência da imunização tanto pelo método de injeção intraperitoneal quanto por banhos de imersão utilizando terontes vivos. Clark et al. (1996) demonstraram que terontes imobilizados *in vitro* foram capazes de causar rápida saída dos parasitos de seu hospedeiro *in vivo*. Martins et al. (2011b) avaliaram o efeito da temperatura na resposta imune do bagre do canal vacinado com terontes vivos de *I. multifiliis* e registraram níveis de anticorpos significativamente maiores em peixes vacinados a temperaturas de 25 e 30°C. Já Sigh et al. (2004) registraram aumento na produção de anticorpos específicos a *I. multifiliis* nos rins e pele da truta arco-íris. De acordo com Hines e Spira (1973), peixes que sobrevivem a uma infecção por *I. multifiliis* desenvolvem resposta imune e tornam-se resistentes a reinfecções do parasito durante dois anos.

Xu et al. (2012a) utilizaram um modelo experimental bagres do canal infectados previamente com terontes de *I. multifiliis* e posteriormente expostos à bactéria *Edwardsiella ictaluri*, demonstrando que o parasito é responsável por portas de entrada para infecções secundárias. Resultados semelhantes foram obtidos por Xu et al. (2012b) mas em peixes infectados com *Aeromonas hydrophila*. Os peixes infectados com *I. multifiliis* apresentaram maior mortalidade (91,7%) em relação aos apenas infectados com a bactéria (10%), comprovando a hipótese de que o parasito predispõe os animais à bacteriose. Shoemaker et al. (2012) verificaram que animais infectados ao mesmo tempo com bactéria e com o *I. multifiliis* apresentaram maior mortalidade (71%) do que os infectados apenas com o ciliado (28,9%).

Neste sentido, os experimentos de Burkart et al. (1990) mostraram que bagres do canal vacinados com terontes vivos de *I. multifiliis* permaneceram imunes à infecção do parasito por, no mínimo, 13 meses, comprovando assim o desenvolvimento bem sucedido de resposta imune específica contra o protozoário.

No estudo de Xu et al. (2004b), a maior resposta imune e proteção de bagres do canal imunizados com terontes vivos e trofontes

inativados de *I. multifiliis* via imersão e injeção intraperitoneal foi observada nos peixes imunizados com terontes vivos por imersão ou injeção de trofontes inativados. Houve correlação positiva entre os níveis mais elevados de anticorpos e sobrevivência nos peixes imunizados.

Alishahi e Buchmann (2006) avaliaram o efeito de duas temperaturas (12 e 20°C) em trutas arco-íris vacinadas por injeção intraperitoneal usando terontes vivos e posteriormente desafiadas. Houve aumento significativo no título de imobilização nos peixes amostrados 2 e 4 semanas após a vacinação a 20°C, sugerindo que o aumento da temperatura associado ao mecanismo de resposta inata e adaptativa pode controlar as infestações por *I. multifiliis* em truta arco-íris.

Adicionalmente, estudos com diferentes espécies de protozoários têm sido conduzidos, como com *Cryptocaryon irritans*. Yambot e Song (2006) avaliaram a imunização em garoupa (*Epinephelus coioides*) contra *C. irritans*. A imunização foi feita por banho de imersão com baixa dose de terontes vivos (10 µg/peixe) e injeção intraperitoneal com alta dose de terontes mortos (100 µg/peixe). Nenhuma mortalidade foi registrada nos peixes que receberam as maiores doses da vacina, diferentemente do tratamento com baixa dose de imunização e o controle, que apresentaram maior número de trofontes 5 e 7 dias após o desafio.

### *Diplostomum* spp. (Nordmann, 1832)

Os parasitos do gênero *Diplostomum* afetam peixes de muitas áreas da Europa, Estados Unidos e África tanto cultivados como selvagens. Também acarretam problemas em peixes cultivados em água doce, onde a vegetação aquática permite a sobrevivência do hospedeiro intermediário (caramujos). Os peixes são infectados quando a cercária penetra no tegumento causando danos e migrando para os olhos do hospedeiro se transformando em metacercária. O parasitismo nos olhos pode levar à catarata parcial ou cegueira completa, redução da alimentação, crescimento e mortalidade. Um método efetivo e preventivo para controlar a doença ainda precisa ser desenvolvido. A sugestão de vacinação é usar a preparação de um antígeno com as metacercárias (HOUGHTON et al., 1988).

Em estudo preliminar, Speed e Pauley (1985) encontraram que em juvenis de truta arco-íris, que foram injetados com cercárias ou metacercárias inteiras e/ou sonicadas, houve aumento de sobrevivência

nos peixes não imunizados seguidos dos desafiados com as metacercárias vivas, mas o título de anticorpos não pôde ser detectado. O tempo de sobrevivência aumentou com a dose do antígeno e o tamanho do peixe. Diferentemente, Bortz et al. (1984) detectaram a presença de anticorpos circulantes em truta arco-íris após três semanas de imunização com 10 e 100 metacercárias sonicadas por peixe. Em um estudo com outra espécie de Digenea *Rhipidocotyle fennica* em "roach" (*Rutilus rutilus*) coletados em ambiente natural, Aaltonen et al. (1997) observaram que as respostas imunológicas foram melhores nos peixes imunizados intraperitonealmente com a cercária homogeneizada do que os expostos à cercárias vivas depois do desafio, mostrando que a especificidade e a quantidade do título de anticorpos produzidos foram influenciadas pela via de imunização.

#### *Discocotyle sagittata* (Leuckart, 1842)

Estes parasitos Monogenea são encontrados em salmonídeos cultivados em água doce com ampla distribuição no hemisfério norte (WILLIAMS e JONES, 1994). Ocorrem em baixas prevalências e intensidades de infecção no ambiente, têm seu melhor desenvolvimento em temperaturas acima de 10°C. No inverno a transmissão não ocorre e os ovos podem ficar incubados até a primavera (GANNICOTT e TINSLEY, 1998a). A temperatura ótima que favorece a transmissão é cerca de 18°C, onde os ovos se desenvolvem rapidamente e o sucesso da larva em atingir seu hospedeiro é maior (GANNICOTT e TINSLEY, 1998b).

Rubio-Godoy et al. (2003) avaliaram o efeito da imunização com extrato de *D. sagittata* em trutas arco-íris, o qual apresentou imunização parcial dos peixes. A intensidade média de parasitos Monogenea foi 50% menor nos peixes vacinados e apresentaram maior título de anticorpos do que os peixes não imunizados, sugerindo que é possível vacinar os peixes contra *D. sagittata*. Neste sentido, Kim et al. (2000) também encontraram imunização parcial de "Korean rockfish" (*Sebastes schlegeli*) quando imunizados contra *Microcotyle sebastis*. Os peixes imunizados e desafiados duas semanas após a imunização apresentaram menor intensidade de infestação do que os não imunizados e os peixes que foram desafiados sete semanas após a imunização, sugerindo que ambos fatores imune específicos e não específicos contribuíram para a proteção contra *M. sebastis*.

Embora completa proteção não tenha sido observada nos estudos com vacina e Monogenea, fica evidente que há indução à

resposta imune de anticorpos específicos. No entanto, outros mecanismos como os leucócitos e o sistema complemento podem estar envolvidos na proteção contra o parasito (BUCHMANN e BRESCIANI, 2006).

A Introdução Geral foi submetida como capítulo intitulado “**Vacinação de peixes teleósteos**”, para publicação no livro “**Farmacologia Aplicada à Aquicultura**” que tem como editores os Drs. Bernardo Baldisserotto (UFSM), Levy de Carvalho Gomes (UVV), Berta Maria Heinzmann (UFSM) e Mauro Alves da Cunha (UFSM), que será publicado em 2015.

## JUSTIFICATIVA

Com a intensificação dos cultivos, o risco de ocorrência e propagação de doenças infecciosas aumenta. O desenvolvimento sustentável da aquicultura depende da prevenção de doenças e, neste contexto, a imunoprofilaxia, reconhecida pela estimulação da imunidade específica e não específica, é o método adotado que desperta grande interesse no desenvolvimento de uma produção sustentável nos ecossistemas aquáticos. Existe uma aceitação geral e consistente com relação às vacinas, visto que estas comprovadamente estimulam o sistema imune no combate contra doenças, e desta forma, sua importância como método de controle sanitário em organismos aquáticos aumentou significativamente nos últimos anos. O jundiá *R. quelen*, espécie nativa da região sul do Brasil, representa importante fonte de renda para diversos piscicultores da região e sua produtividade e/ou alevinagem é frequentemente comprometida pela ictioftiríase.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GERAL

Contribuir para o conhecimento da resposta imunológica específica e hematológica em *Rhamdia quelen* mediada por anticorpos contra o protozoário *Ichthyophthirius multifiliis*.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a resposta bioquímica de *Rhamdia quelen* após a vacinação com *Ichthyophthirius multifiliis*.
- Verificar a resposta hematológica de *Rhamdia quelen* após a vacinação com *Ichthyophthirius multifiliis*.
- Verificar a resposta imunológica de *Rhamdia quelen* após a vacinação com *Ichthyophthirius multifiliis*.
- Verificar as alterações teciduais através da análise histológica.
- Verificar a o efeito de diferentes doses e diferentes formas de aplicação da vacina.

## CAPÍTULO 1

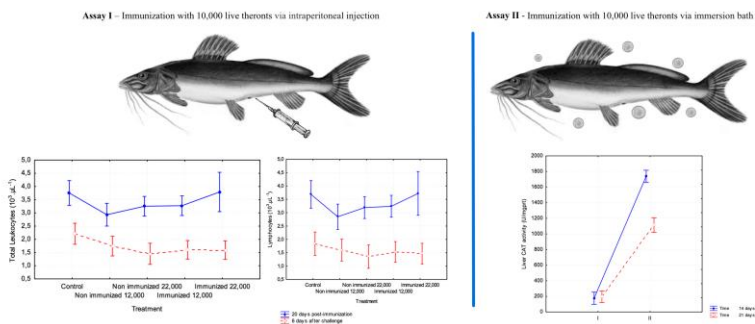
**Parâmetros hemato-imunológicos e bioquímicos do jundiá *Rhamdia quelen* imunizado com terontes de *Ichthyophthirius multifiliis***

O artigo será enviado para publicação no periódico **Fish & Shellfish Immunology** (ISSN: 1050-4648), tendo sido redigido segundo as normas da revista.

## Highlights

- O jundiá, peixe da América do Sul, foi imunizado com terontes via intraperitoneal (i.p.) e banho de imersão
- A vacinação i.p. com terontes aumentou o número de leucócitos, trombócitos, linfócitos e monócitos
- A vacinação via banho de imersão aumentou a atividade da catalase no fígado dos peixes
- Proteína total e catalase são parâmetros a serem considerados em ensaios de imunização

## Graphical Abstract



## Resumo

Este estudo investigou a imunização por injeção intraperitoneal (i.p.) (ensaio I) e banho de imersão (ensaio II) com terontes vivos de *Ichthyophthirius multifiliis* em *Rhamdia quelen* e sua influência nos parâmetros hemato-imunológicos e bioquímicos. Os peixes foram divididos em controle (não imunizado, não desafiado); não imunizado e desafiado com 12.000 terontes/peixe; não imunizado e desafiado com 22.000 terontes/peixe; imunizado e desafiado com 12.000 terontes/peixe; imunizado e desafiado com 22.000 terontes/peixe. Seis dias após o desafio, tanto no ensaio I quanto no II, a prevalência de *I. multifiliis* nas brânquias foi maior nos peixes não imunizados (33,33% e 27,77%, respectivamente). Nos peixes do ensaio I o número de trombócitos, leucócitos, linfócitos, neutrófilos e monócitos foram maiores 20 dias após imunização e menores nos peixes após o desafio. Os valores de imunoglobulina total foram maiores nos peixes não imunizados. Os peixes imunizados por banho de imersão (ensaio II) apresentaram maiores valores de catalase (CAT) no fígado (1.245,49 U/mgprt) quando comparados com os imunizados via i.p. (198,79 U/mgprt). Os níveis de CAT no fígado dos peixes no ensaio II foram maiores (1.738,47 U/mgprt) após 14 dias do que após 21 dias (1.114,26 U/mgprt) de imunização. Os resultados mostraram que novos parâmetros como proteínas totais, imunoglobulinas e enzimas antioxidantes podem ser utilizados para avaliar a resposta do hospedeiro à infecção.

**Palavras-chave:** peixe, teronte, catalase, hematologia, vacina, Ciliophora.



## Abstract

This study investigated the immunization by intraperitoneal injection (i.p.) (assay I) and immersion bath (assay II) with live theronts of *Ichthyophthirius multifiliis* in *Rhamdia quelen* and its influence on the hemato-immunological and biochemical parameters. Fish were divided in control (non immunized no challenged); non immunized and challenged with 12,000 theronts/fish; non immunized and challenged with 22,000 theronts/fish; immunized and challenged with 12,000 theronts/fish; immunized and challenged with 22,000 theronts/fish. Six days after challenge, either in the assay I or in the assay II the prevalence of *I. multifiliis* in the gills was higher in non immunized fish (33.33% and 27.77%, respectively). In the assay I showed higher numbers of thrombocytes, leukocytes, lymphocytes, neutrophils and monocytes 20 days after injection and lower numbers after challenge. The immunoglobulin values were higher in fish non immunized. Fish immunized by immersion bath (assay II) showed greater values of catalase (CAT) in the liver (1,245.49 U/mgprt) when compared to i.p. (198.79 U/mgprt). The levels of CAT in the liver of fish from the assay II were greater (1.738,47 U/mgprt) 14 days after immunization than that observed 21 days after (1.114,26 U/mgprt). The results showed that new parameters like total protein, immunoglobulin and antioxidant enzymes could be considered in evaluating the host response to infection.

**Key words:** fish; theronts, catalase, hematology, vaccine, Ciliophora.

## 1.Introdução

O jundiá *Rhamdia quelen* (Pimelodidae), é uma das espécies de água doce mais estudadas na região sul do Brasil em virtude de sua ampla distribuição geográfica, e devido à caracterização positiva para seu cultivo como: fácil manejo, rusticidade e boa conversão alimentar [1,2]. Este bagre é encontrado do sudeste do México ao norte, e centro da Argentina ao sul [3]. O principal obstáculo da cadeia produtiva ainda está na produção de formas jovens em razão do canibalismo existente na fase de larvicultura, e das mortalidades relacionadas com protozoários ciliados [4], como *Ichthyophthirius multifiliis*, *Epistylis* e tricodinídeos, considerados causadores de perdas tanto na alevinagem como na engorda [5,6,7].

*Ichthyophthirius multifiliis* (Fouquet, 1876) é o mais importante dos Ciliophora que acomete o jundiá devido à baixa especificidade de hospedeiro e ampla distribuição geográfica, causador da Ictiofitiríase ou doença dos pontos brancos. Se não for combatido antecipadamente, causa lesões no tegumento e brânquias do hospedeiro que podem provocar a morte do peixe, sendo um dos parasitos que causam os prejuízos mais elevados em nível global na piscicultura mundial [8].

Como maneira alternativa aos tratamentos convencionais com produtos químicos, diversos estudos têm sido realizados com o objetivo de testar a eficiência de vacinas em diferentes métodos de imunização contra *I. multifiliis*, por meio de diferentes estágios do seu ciclo de vida, e diminuir os níveis de infestação nos cultivos. De forma bem sucedida, [9,10,11] comprovaram a eficiência da imunização tanto pelo método de injeção intraperitoneal (i.p.) quanto por banhos de imersão. Clark et al. [12] demonstraram que terontes imobilizados *in vitro* foram capazes de causar rápida saída dos parasitos de seu hospedeiro *in vivo*. Martins et al. [13] avaliaram o efeito da temperatura na resposta imune do bagre do canal *Ictalurus punctatus* vacinado com terontes vivos de *I. multifiliis* e registraram níveis de anticorpos significativamente maiores em peixes vacinados a temperaturas mais altas.

Segundo Innes et al. [14], as vacinas podem ser conduzidas com o material do patógeno vivo ou morto, que é então usado para imunizar o hospedeiro e provocar a indução à resposta imune que, por sua vez, auxilia na proteção do hospedeiro quando desafiado com o patógeno vivo, desenvolvendo memória imunológica mais efetiva do que a resposta primária.

A relação entre os parâmetros imunológicos de peixes vacinados, seus parasitos e parâmetros hematológicos é pouco

conhecida quando comparada com o conhecimento gerado por estudos com bactérias e vírus. As razões que justificam isso são os problemas encontrados na manipulação dos protozoários e helmintos em laboratório, dificuldades no cultivo *in vivo* e *in vitro* destes organismos, complexidades do parasito e seu ciclo de vida que pode envolver mais de um hospedeiro [15].

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da vacinação via i.p. e banho de imersão com terontes vivos de *I. multifillis* em *R. quelen* sobre os parâmetros hemato-imunológicos, proteínas totais e atividade da catalase, enzima envolvida no estresse oxidativo.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Desenho experimental

Alevinos de jundiás foram adquiridos na Piscicultura Krahn (26°41'24"S e 49°11'03"O), Município de Pomerode, Santa Catarina, Brasil e aclimatados por 7 dias antes de ser ditribuído nos ensaios. Semanalmente os parâmetros de qualidade de água (Tabela 1) como oxigênio dissolvido, temperatura, pH foram medidos com multiparâmetro Hanna® HI9829 (Hanna Instruments Brasil, Barueri, SP) e a amônia total, nitrato e nitrito com kit colorimétrico da Alfakit® (Alfakit, Florianópolis, SC). A alimentação foi fornecida duas vezes ao dia até a saciedade aparente. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos do Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC/PP00864).

### 2.2. Ensaio I - Imunização por injeção intraperitoneal

Os peixes foram aclimatados em uma caixa de 500 L e submetidos a dois banhos consecutivos diários com 5 mg.L<sup>-1</sup> de permanganato de potássio por 1 h para eliminar parasitos [13]. Após uma semana de aclimatação, os peixes foram ditribuídos em 15 tanques de 100 L com 20 peixes em cada em sistema de recirculação fechado, mantidos assim até o desafio, que ocorreu 21 dias após a imunização. Foram testados em cinco tratamentos com três repetições cada: controle não imunizado não desafiado; não imunizado e desafiado com 12.000 terontes/peixe; não imunizado e desafiado com 22.000 terontes/peixe; imunizado e desafiado com 12.000 terontes/peixe; imunizado e desafiado com 22.000 terontes/peixe.

Para os peixes não imunizados, foi utilizada uma solução tampão fosfato-salino (PBS, pH 7,2) contendo 1 mL via i.p. Nos peixes

imunizados, foi injetado 1 mL de solução contendo 10.000 terontes vivos por peixe.

### 2.3. *Ensaio II - Imunização por banho de imersão*

Os peixes foram distribuídos e aclimatados igualmente a metodologia do ensaio I. Para os peixes não imunizados, uma solução tampão fosfato-salino (PBS, pH 7,2) foi utilizada via banho de imersão. Os peixes vacinados foram imersos em uma solução contendo 10.000 terontes vivos por peixe durante uma hora. Após este período, foram banhados em permanganato de potássio para eliminar os parasitos.

### 2.4. *Obtenção dos terontes*

Trofontes de *I. multifiliis* foram isolados de jundiás parasitados mantidos em um tanque com capacidade de 50 L e os terontes obtidos como descrito por Xu et al. [16]. Resumidamente, os peixes foram anestesiados com eugenol (75 mg.L<sup>-1</sup>) e eutanasiados por comoção cerebral. Os trofontes maduros foram raspados da superfície corporal com auxílio de lamínula e transferidos para placa de Petri, onde foram incubados por 24 h à 24°C em ausência de luz. A água da placa de Petri foi então filtrada com o auxílio de uma rede de plâncton com 45 µm de malha para coleta dos terontes.

Para a imunização, 10.000 terontes foram contados a partir de 3 amostras de terontes em auxílio de câmara de Sedgewick-Rafter em microscópio óptico e utilizados em cada peixe referente aos grupos imunizados. Durante todo o ensaio, 400 jundiás foram mantidos em laboratório para obtenção da forma infectante do parasito.

### 2.5. *Desafio e determinação do nível de infecção*

Vinte e um dias após a imunização, a temperatura da água foi ajustada à 25°C em todos os tanques e os peixes foram desafiados com 12.000 e 22.000 terontes vivos durante 1 h e liberados na água, como descrito por Xu et al. [16]. A taxa de mortalidade foi registrada até 10 dias após o desafio ou até a estabilização da mortalidade. Seis dias após o desafio com terontes, três peixes de cada repetição foram coletados para avaliação parasitária e hematológica.

### 2.6. *Análise parasitológica*

Após anestesiados em eugenol (75mg/L), os peixes foram pesados (peso total em gramas) e seu comprimento total medido (cm). Em seguida foram sacrificados, por comoção cerebral, para coleta das brânquias e muco. As brânquias foram banhadas em água à temperatura

de 60°C e após poucos minutos, fixados em álcool 70° para posterior observação e quantificação de parasitos em estereomicroscópio, o muco foi analisado à fresco Jerônimo et al. [17].

### 2.7. Proteína total e Imunoglobulina

Após 14 e 21 dias da imunização, o soro foi coletado para a análise de proteína total com kit Lab Test® (Labtest, Belo Horizonte, MG). A concentração de imunoglobulina total foi medida de acordo com o método descrito por Amar et al. [20], onde misturou-se 50 µL do soro com 50 µL de solução de polietileno-glicol 12% (PEG) (Sigma-Aldrich). A mistura foi incubada a 25°C por 2 h, a fim de, precipitar as moléculas de imunoglobulina. O precipitado de imunoglobulina foi removido por centrifugação (5.000 g a 6°C, por 10 min), e o sobrenadante retirado e mensurado. A quantidade de proteína total foi feita pelo uso do kit, utilizando-se albumina bovina para confecção da curva padrão. A concentração de imunoglobulina total está expressa em mg·mL<sup>-1</sup>, sendo calculada pela fórmula:

Total Ig (mg.mL<sup>-1</sup>) = Proteína Total do Soro - Proteína tratada com PEG

### 2.8. Análises bioquímicas

As amostras de fígado foram coletadas 14 e 21 dias após a imunização com 10.000 terontes vivos por peixe. As amostras foram pesadas e homogeneizadas na proporção de 100 mg para 600 µL de tampão fosfato Tris HCL 50 mM, KCL 0,15 M, pH 7,4 e PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil), com auxílio de homogeneizador tipo *Potter* (Glas-Col). Em seguida, foram transferidas para microtubos de 2 mL e centrifugadas a 9.000 g por 30 min a 4°C. Amostras de sobrenadante (S9) foram transferidas para tubos Eppendorf de 0,6 mL e armazenadas a -80° C para posterior realização das análises bioquímicas. Alíquotas foram guardadas para os testes de enzima (catalase), e de dosagem de proteína para normalização dos resultados.

#### 2.8.1. Concentração de proteínas

A concentração de proteínas totais foi determinada de acordo com Lowry modificado por Peterson [21], utilizando-se albumina de soro bovino como padrão realizado em microplaca. Os resultados dessa análise foram utilizados para normalizar os dados da atividade da enzima catalase.

### 2.8.2. *Catalase (CAT)*

A atividade da catalase foi analisada pela velocidade de consumo do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) no primeiro minuto da reação em 240 nm ( $\epsilon=40 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) de acordo com Beutler [22], onde o decréscimo de absorbância foi associado à velocidade de degradação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  em água e oxigênio molecular. O ensaio enzimático de 40 s foi realizado em tampão fostato (KPi) 50 Mm, EDTA 0,5 Mm, pH 7,0, contendo 0,012% de Triton X-100.

### 2.9. *Análise hematológica*

Amostras de sangue foram coletadas 20 dias após a imunização (três peixes por repetição) e 6 dias após o desafio (três peixes por repetição). Os peixes foram anestesiados por imersão em solução de 75  $\text{mg.L}^{-1}$  de eugenol e em seguida o sangue foi retirado por punção da veia caudal com o auxílio de seringa contendo EDTA a 10% para confecção de extensões sanguíneas coradas com MayGrunwald/Giemsa/Wright [18]. Uma alíquota do sangue coletado foi usada para determinação do hematócrito e da taxa de hemoglobina; e cálculo dos índices hematimétricos volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) [18] e o restante foi conservado em Eppendorf no gelo para a quantificação do número total de eritrócitos em câmara de Neubauer. Os números totais de trombócitos e leucócitos foram contados a partir de extensões sanguíneas pelo método indireto [19].

### 2.10. *Análise estatística*

Os dados foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov e Bartlett para verificar normalidade e homocedasticidade, respectivamente. Estando os pressupostos garantidos, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) unifatorial ou fatorial. Para comparação de médias na ANOVA foi utilizado o teste de Tukey, utilizando o software STATISTICA (Statsoft). A transformação dos dados foi usada conforme pertinência e as diferenças foram consideradas significativas quando  $p<0,05$ .

## 3. Resultados

Com relação a análise do nível de infestação das brânquias nos peixes do ensaio I, os jundiás não imunizados e desafiados com 12.000 e 22.000 terontes, apresentaram prevalência (P) de 50% de *I. multifiliis* e intensidade média (IM) de  $3,11\pm 2,06$ . Nos peixes imunizados e

desafiados com 12.000 e 22.000 terontes a prevalência foi de 27,8% e intensidade média de  $5,0 \pm 3,3$ . Na análise total do muco a fresco não foi observada a presença dos pontos brancos ou de trofonte em nenhum dos tratamentos e, conseqüentemente, não foi registrada mortalidade após o desafio.

No ensaio II, observou-se maiores valores de prevalência de 22,2% e intensidade média de  $1,5 \pm 0,7$  nas brânquias dos peixes não imunizados e desafiados com 12.000 e 22.000 terontes, quando comparados com os imunizados ( $P= 5,5\%$   $IM= 1 \pm 0,23$ ). No muco dos peixes, não foi observada a presença de pontos brancos tanto nos peixes não imunizados como nos imunizados.

### 3.1. *Proteína total e Imunoglobulina*

Comparando entre os tratamentos e entre os ensaios de imunização, não houve diferença significativa na análise de proteínas totais e catalase. Comparando entre tratamentos, entretanto, os valores de imunoglobulina total foram maiores nos peixes não imunizados (Tabela 2).

### 3.2. *Análises bioquímicas*

Não houve interação significativa da CAT no fígado entre os tratamentos. No entanto, houve diferença significativa para CAT no fígado comparando-se os métodos de imunização. No ensaio II (banho de imersão) estes valores foram maiores (1.245,49 e 198,79 U/mgprt respectivamente) quando comparado com o ensaio I (Tabela 2). Os peixes do ensaio II apresentaram maior atividade da CAT (1.738,47 U/mgprt) 14 dias pós imunização (Figura 1).

### 3.3 *Análise hematológica*

De acordo com os resultados obtidos por meio de ANOVA fatorial, comparando os tratamentos entre os tempos de amostragem, o número de trombócitos, leucócitos, linfócitos, monócitos e eritrócitos foram significativamente menores 6 dias após o desafio em todos os tratamentos, no ensaio I (Tabela 3). Já no ensaio II, não houve diferença significativa (Tabela 4).

O número de linfócitos, CHCM, HCM e hemoglobina foram maiores nos peixes imunizados via imersão. No entanto, o número de neutrófilo e trombócitos circulantes foram maiores nos peixes imunizados via injeção i.p.

### 3. Discussão

Diversos fatores podem influenciar no sucesso da imunização com *I. multifiliis*, incluindo o método de vacinação, ciclo de vida do parasito, concentração e cepa infectante, condições experimentais e espécie de peixe [23,24,25,26].

Surtos de *I. multifiliis* ocorrem quando as condições do ambiente são favoráveis para a rápida multiplicação do parasito, como a temperatura da água e condições de estresse dos hospedeiros [27]. Durante a realização destes ensaios, os peixes permaneceram no sistema de recirculação à temperatura média de 25°C por 90 dias até o início do ensaio. Dessa forma, é possível que seu sistema imunológico tenha sido reforçado, uma vez que as prevalências do parasito foram baixas em todos os tratamentos. Embora não tenha ocorrido mortalidade, a maior prevalência de parasitos em peixes não imunizados após o desafio mostra que a infecção teve sucesso.

Como os peixes foram submetidos a banhos de permanganato de potássio antes de serem colocados no sistema, nenhum outro grupo de parasitos foi observado, não interferindo nos resultados. Diferente do presente estudo, Martins et al. [11], registraram em *I. punctatus* não vacinados e vacinados a 15, 20 e 15-25°C mais de 100 trofontes por peixe na contagem total de parasitos, seis dias após o desafio, e conseqüentemente com maior mortalidade. Shoemaker et al. [25] verificaram que animais infectados com *Edwardsiella ictaluri* e *I. multifiliis* apresentaram maior mortalidade (71%) do que os infectados apenas com *I. multifiliis* (28,9%).

Neste estudo, as cepas de *I. multifiliis* foram obtidas de *R. quelen* segundo a metodologia proposta por Xu et al. [16], de ciclos separados, a cada repetição de um teste, novos peixes infectados eram coletados, já que a atividade dos terontes vivos diminuía com o passar das horas e foi observada a presença de bactérias após o período *overnight*. Sun et al. [28] analisando o sequenciamento genômico do parasito encontrou bactérias endossimbionticas no citoplasma de *I. multifiliis*. Fokin [29] afirmou que estas bactérias são relativamente comuns em ciliados de vida livre. Até o presente momento não se conhece a virulência ou o efeito da presença dessas bactérias na sobrevivência dos terontes [30].

Considerando que *I. multifiliis* é parasito também de outras espécies de peixes, sugere-se testar os terontes isolados de peixes diferentes, e assim comparar se a resistência das cepas depende do tipo de hospedeiro, uma vez que Xu & Klesius [10], verificaram a



infectividade do parasito isolado de *Carassius auratus* em *I. punctatus* durante 105 ciclos de infecção, perpetuando por dois anos, concluindo que os ciclos de 1-25 foram significativamente mais efetivos. No Brasil, alguns trabalhos com peixes ornamentais e pimelodídeos (*Pseudoplatystoma* sp.) tem verificado a infestação por *I. multifiliis* [6,31,32,33] utilizando tratamentos convencionais.

Com relação aos parâmetros hematológicos Tavares-Dias et al. [34], conduziram um estudo para caracterizar as variáveis hematológicas do jundiá, reproduzidos em condições de laboratório até atingirem 10 meses de idade. O número de eritrócitos variou de 1,55 a  $2,92 \times 10^6/\mu\text{L}$ , a hemoglobina de 4,95 a  $9,09 \text{ g.dL}^{-1}$ , hematócrito de 17 a 34% e CHCM de 20,24 a  $35,91 \text{ g.dL}^{-1}$ . Comparando com os valores do presente estudo, o número de eritrócitos foi menor do que o padrão de normalidade e diminuiu mais após o desafio nos peixes imunizados via i.p. No ensaio II, observou-se menores valores de eritrócitos, e dentro da faixa de variação para hemoglobina, hematócrito e CHCM, porém não diferentes entre as coletas, semelhante aos obtidos por Tavares-Dias [34].

De acordo com Martins et al. [13], *I. punctatus*, vacinados com terontes vivos e mantidos em 30°C e 20-30°C, apresentaram aumento significativo no número de eritrócitos, leucócitos, trombócitos e monócitos, 20 dias após imunização, já com seis dias após o desafio os peixes apresentaram decréscimo na contagem dos leucócitos, trombócitos e monócitos. Semelhante aos resultados do ensaio I, o número de trombócitos, leucócitos, linfócitos, neutrófilos e monócitos, foram maiores 20 dias após imunização e menores nos peixes após o desafio. Schoemaker et al. [25] observaram redução no número de linfócitos com 2, 8 e 19 dias, em *I. punctatus* co-infectados com *E. ictaluri* e *I. multifiliis* quando comparado com os animais não infectados, resultados contrários aos observados nos peixes imunizados via banho de imersão (ensaio II) no presente estudo.

As imunoglobulinas são também chamadas de anticorpos, presentes no sangue e nas secreções das mucosas, onde agem para neutralizar e eliminar microorganismos e toxinas [35]. Os estudos de Martins et al. [13] com *I. punctatus* vacinados contra *I. multifiliis* mostraram maior título de anticorpos após 21 dias de imunização às temperaturas de 25 e 30°C comparados com os imunizados a 15 e 20°C. Neste estudo, houve diferença entre os valores de imunoglobulina total dos peixes vacinados e não vacinados, porém não foi possível fazer a comparação entre os ensaios.

A resposta imune inata geralmente age rapidamente enquanto que a resposta imune adaptativa pode levar mais tempo. Nos peixes, este período pode ser de 10-12 semanas, e pode comprometer a eficácia das vacinas [36]. Os mecanismos da resposta imune e a interação de *I. multifiliis* com seu hospedeiro tem sido estudados ao longo dos anos utilizando o título de imobilização com o soro, que envolve a interação de células específicas do sistema humoral dos peixes [27,37,38], porém análises bioquímicas ainda não foram realizadas e análises hematológicas mostram poucos registros [11,13,25].

Juvenis de *R. quelen* expostos ao pH 5,0 e 7,0 e *I. multifiliis* apresentaram atividade significativamente baixa da catalase no músculo, quando comparado com o controle, concluindo que a infecção por *I. multifiliis* é menos severa em jundiás mantidos em pH 5,0 [39]. A atividade da catalase no fígado neste estudo foi maior nos peixes imunizados via banho de imersão depois de 14 dias.

Os níveis de proteínas totais e CAT no fígado são parâmetros importantes na resposta imune de peixes, este é o primeiro registro de estudo que busca relacionar esses parâmetros à imunização contra *I. multifiliis*. O aumento da atividade da CAT e outras enzimas são comuns em estudos de peixes submetidos a manejo, má qualidade de água ou poluentes [39,40,41]. O fígado é um órgão vital responsável pela detoxicação de produtos endógenos e exógenos como diferentes tipos de toxinas, drogas, metais pesados ou pesticidas [42].

A infecção dos peixes por patógenos pode induzir ao estresse oxidativo, alterando os mecanismos de defesa antioxidante [43]. O estresse oxidativo é gerado durante a fagocitose, onde há produção de radicais livres por meio do complexo enzimático NADPH oxidase. Se estes radicais não forem decompostos, eles podem reagir com outras moléculas vitais causando danos ao organismo do hospedeiro. Para isso, o organismo conta com um sistema antioxidante enzimático formado por várias enzimas, dentre elas a catalase, importante no combate a danos oxidativos [44,45].

Os resultados deste estudo demonstraram que *R. quelen* apresentou poucas diferenças entre os peixes imunizados, os não imunizados e controle. Os jundiás apresentaram maiores números de trombócitos, leucócitos, linfócitos, neutrófilos e monócitos 20 dias após imunização e menores números após o desafio. Outro ponto importante foi o aumento da atividade da catalase no fígado dos peixes imunizados via banho de imersão depois de 14 dias, que pode estar relacionado com a defesa antioxidante contra radicais livres gerados pelo estresse da imunização quando comparado com os imunizados via i.p. Sugere-se

para estudos futuros utilizar peixes menores do que 40 g e que não tenham o sistema imune bem desenvolvido [10,13,25,46,47,48], e o uso de cepas de *I. multifiliis* provenientes de outros hospedeiros. Apesar de não ter apresentado mortalidade, a infecção teve sucesso uma vez que a prevalência de parasitos foi maior nos peixes não imunizados. Os resultados mostraram que novos parâmetros como proteínas totais, imunoglobulinas e enzimas antioxidantes podem ser utilizados para avaliar a resposta do hospedeiro à infecção.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro (CNPq 472598/2011-2) e bolsa de Produtividade em Pesquisa à M.L. Martins (CNPq 302493/2010-7), a Jacó J. Matos técnico do Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica pelo suporte nas análises enzimáticas e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro à K.R. Tancredo.

### **Referências**

- [1] Silvergrip AMC. A systematic revision of the neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae). PhD Thesis. Swedish Museum Natural History: Stockholm, Sweden; 1996.
- [2] Fracalossi DM, Meyer G, Santamaria FM, Weingartner M, Zaniboni Filho E. Desempenho do jundiá, *Rhamdia quelen*, e do dourado, *Salminus brasiliensis*, em viveiros de terra na região Sul do Brasil. *Acta Sci Anim Sci* 2004; 26:345-52.
- [3] Baldisserotto B, Radunz JN, Barcellos LG. Jundiá (*Rhamdia* sp.). In: Baldisserotto B, Gomes LC, editores. Espécies nativas para piscicultura no Brasil, Editora UFSM; 2010.
- [4] Amaral H. Influência da Rede jundiá na piscicultura do estado de Santa Catarina. In: Barcellos LJJ, Fagundes M, Ferreira D, editores. Workshop sobre jundiá: História e perspectivas. Editora UPF; 2013.
- [5] Tavares-Dias M, Moraes FR, Martins ML. Fauna parasitária de peixes oriundos de “pesque-pague” do município de Franca, São Paulo, Brasil. I. Protozoários. *Rev Bras Zool* 2001; 18:67-79.
- [6] Pádua SB, Ishikawa MM, Kasai RYD, Jerônimo GT, Carrijo-Mauad JR. Parasitic infestations in hybrid surubim catfish fry

- (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *P. corruscans*). Rev Bras Med Vet 2012; 34:235-40.
- [7] Martins ML, Marchiori N, Nunes G, Rodrigues MP. First record of *Trichodina heterodontata* (Ciliophora: Trichodinidae) from channel catfish, *Ictalurus punctatus* cultivated in Brazil. Braz J Biol 2010; 70:637-44.
- [8] Eiras JC. Ciliophora. In: Pavanelli GC, Takemoto RM, Eiras JC, editores. Parasitologia de peixes de água doce do Brasil, Maringá: Eduem; 2013, p. 233-47.
- [9] Dickerson HW, Loher AL, Gratzek JB. Experimental intraperitoneal infection of channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque) with *Ichthyophthirius multifiliis* (Fouquet). J Fish Dis 1985; 8:139-42.
- [10] Xu D-H, Klesius PH. Two years study on the infectivity of *Ichthyophthirius multifiliis* in channel catfish *Ictalurus punctatus*. Dis Aquat Org 2004; 59:131-34.
- [11] Martins ML, Shoemaker CA, Xu D-H, Klesius PH. Effect of parasitism on vaccine efficacy against *Streptococcus iniae* in Nile tilapia. Aquaculture 2011a; 314:18-23.
- [12] Clark TG, Lin TL, Dickerson HW. Surface antigen cross-linking triggers forced exit of a protozoan parasite from its host. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93:6825-29.
- [13] Martins ML, Xu D-H, Shoemaker CA, Kleisus PH. Temperature effects on immune response and hematological parameters of channel catfish *Ictalurus punctatus* vaccinated with live theronts of *Ichthyophthirius multifiliis*. Fish & Shellfish Immunol 2011b; 31:774-80.
- [14] Innes EA, Bartley PM, Rocchi M, Benavidis-Silvan J, Burrells A, Hotchkiss E, Chianini F, Canton G, Katzer F. Developing vaccines to control protozoan parasites in ruminants: Dead or alive? Vet Parasitol 2011; 180:155-63.
- [15] Houghton G, Matthews RA, Harris JE. Vaccination against protozoan and helminth parasites of fish. In: Ellis AE. Fish Vaccination, San Diego: Academic Press, 1988, p. 224-36.
- [16] Xu D-H, Klesius PH, Shoemaker CA, Evans JJ. The early development of *Ichthyophthirius multifiliis* in channel catfish *in vitro*. J Aquat Anim Health 2000; 12:290-96.
- [17] Jerônimo GT, Martins ML, Ishikawa MM, Ventura AS, Tavares-Dias M. Métodos Para Coleta De Parasitos. Circular Técnica Embrapa Macapá 2011; 39.

- [18] Ranzani-Paiva MJT, Pádua SB, Tavares-Dias M, Egami MI. Métodos para análise hematológica em peixes. Maringá: Eduem; 2013.
- [19] Ishikawa MN, Ranzani-Paiva MJT, Lombardi JV. Metodologia para quantificação de leucócitos totais em peixe, *Oreochromis niloticus*. Arch Vet Sci 2008; 13:54-63.
- [20] Amar EC, Kiron V, Satoh S, Okamoto N, Watanabe T. Effect of dietary  $\beta$ -carotene on the immune response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Fish Sci 2000; 66:1068-75.
- [21] Peterson GL. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. wich is more generally applicable. Anal Biochem 1977; 83:346-56.
- [22] Beutler E. Red cell metabolism: a manual of biochemical methods. New York: Grune & Stratton; 1975.
- [23] Xu D-H, Klesius PH, Shoemaker CA. Effect of immunization of channel catfish with inactivated trophonts on serum and cutaneous antibody titers and survival against *Ichthyophthirius multifiliis*. Fish & Shellfish Immunol 2009; 26:614-18.
- [24] Xu D-H, Klesius PH, Bosworth BG, Chatakondi N. Susceptibility of three strains of blue catfish, *Ictalurus furcatus* (Valenciennes), to *Ichthyophthirius multifiliis*. J Fish Dis 2012; 35:887-95.
- [25] Shoemaker CA, Martins ML, Xu D-H, Klesius PH. Effect of *Ichthyophthirius multifiliis* parasitism on the survival, hematology and bacterial load in channel catfish previously exposed to *Edwardsiella ictaluri*. Parasitol Res 2012; 111:2223-28.
- [26] Xu D-H, Klesius PH. Comparison of serum antibody responses and host protection against parasite *Ichthyophthirius multifiliis* between channel catfish and channel blue hybrid catfish. Fish & Shellfish Immunol 2013; 34:1356-59.
- [27] Dickerson HW. *Ichthyophthirius multifiliis* and *Cryptocaryon irritans* (Phylum Ciliophora). In: Woo PTK, editor. Fish Diseases and Disorders. Protozoan and Metazoan Infections. 2<sup>nd</sup> ed., vol 1. UK: CABI Publishing, Wallingford; 2006.p. 116-53.
- [28] Sun HY, Noe J, Barber J, Coyne RS, Cassidy-Hanley D, Clark TG, Findly RC, Dickerson HW. Endosymbiotic bacteria in the parasitic ciliate *Ichthyophthirius multifiliis*. Appl Environ Microb 2009;75:7445-52.
- [29] Fokin SI. Bacterial endocytobionts of Ciliophora and their interactions with the host cell. Int Rev Cytol 2004; 236:181-249.

- [30] Dickerson HW. *Ichthyophthirius multifiliis*. In: Woo PTK, Buchmann K (eds) Fish parasites: pathobiology and protection. London UK: CAB; 2012. 383p.
- [31] Ghiraldelli L, Adamante WB, Martins ML, Mouriño JLP, Streit AAR, Berestinas AC, Loureiro C., Francisco C.J. Infecção com trofozoítos de *Ichthyophthirius multifiliis* (Ciliophora) em *Poecilia vivipara* (Poeciliidae) como hospedeiro experimental. Ciênc Anim Bras 2007; 8:105-10.
- [32] Tavares-Dias M, Lemos JRG, Martins ML. Parasitic fauna of eight species of ornamental freshwater fish species from the middle Negro River in the Brazilian Amazon Region. Rev Bras Parasitol Vet 2010; 19:103-07.
- [33] Ventura AS, Jerônimo GT, Gonçalves ELT, Tamporoski BRF, Martins ML, Ishikawa MM. Fauna parasitária dos híbridos siluriformes cachapinta e jundiara nos primeiros estágios de desenvolvimento. Pesq Agropec Bras 2013; 48:943-49.
- [34] Tavares-Dias M, Melo JFB, Moraes G, Moraes FR. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. IV. Variáveis do jundiá *Rhamdia quelen* (Pimelodidae). Ciênc Rural 2002; 32:693-98.
- [35] Abbas AK, Lichtman AH. Basic Immunology: functions and disorders of the immune system. 3<sup>rd</sup> ed. Saunders ELSEVIER; 2009.
- [36] Magnadottir B. Immunological control of fish diseases. Mar Biotechnol 2010; 12:361-379.
- [37] Buchmann K, Sigh J, Nielsen CV, Dalgaard M. Host responses against the fish parasitizing ciliate *Ichthyophthirius multifiliis*. Vet Parasitol 2001; 100:105-16.
- [38] Matthews RA. *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet and ichthyophthiriosis in freshwater teleosts. Adv Parasit 2005; 59:159-241.
- [39] Garcia LO, Becker AG, Bertuzzi T, Cunha MA, Kochhann D, Finamor IA, et al. Oxidative stress parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) juveniles infected with *Ichthyophthirius multifiliis* and maintained at different levels of water pH. Vet Parasitol 2011; 178:15-21.
- [40] Crestani M, Menezes C, Gluszcak L, Miron DS, Spanevello R, Silveira A, et al. Effect of clomazone herbicide on biochemical and histological aspects of silver catfish (*Rhamdia quelen*) and recovery pattern. Chemosphere 2007; 67:2305-11.
- [41] Pereira-Da-Silva EM, Melo MP, Oliveira RHF, Pugine SMP. Atividade da catalase e da lactato desidrogenase em tilápias

- submetidas a estresse de confinamento: efeito da cor do ambiente. *Ciênc Rural* 2012; 42:894-99.
- [42] Roberts RJ. Fish pathology. London: Wiley Blackwell; 2001.
- [43] Martínez-Álvarez RM, Morales AE, Sanz A. Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors. *Rev Fish Biol Fisher* 2005; 15:75-88.
- [44] Warner HR. Superoxide dismutase, aging, and degenerative disease. *Free Radical Biol Med* 1994; 3: 249-58.
- [45] Hermes-Lima M, Zenteno-Savín T. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2002; 133:537-56.
- [46] Dickerson HW, Clark TG, Findly RC. *Ichthyophthirius multifiliis* has membrane-associated immobilization antigens. *J Protozool* 1989; 36:159-64.
- [47] Carneiro PCF, Schorer E, Mikos JD. Conventional therapeutic treatments on the control of the parasite *Ichthyophthirius multifiliis* in *Rhamdia quelen*. *Pesq Agropec Bras* 2005; 40:99-102.
- [48] Xu D-H, Shoemaker CA, Martins ML, Pridgeon JW, Klesius PH. Enhanced susceptibility of channel catfish to the bacterium *Edwardsiella ictaluri* after parasitism by *Ichthyophthirius multifiliis*. *Vet Microbiol* 2012; 158:216–19.

**Tabela 1**

Parâmetros de qualidade de água (média  $\pm$  desvio padrão) para cada ensaio de imunização com terontes vivos de *Ichthyophthirius multifiliis* em jundiá *Rhamdia quelen*.

	Ensaio I	Ensaio II
Oxigênio dissolvido (mg.L <sup>-1</sup> )	6,09 $\pm$ 0,91	7,18 $\pm$ 1,57
Temperatura (°C)	25,66 $\pm$ 0,97	25,91 $\pm$ 1,55
pH	5,83 $\pm$ 0,67	5,07 $\pm$ 0,88
Amônia total (mg.L <sup>-1</sup> )	0,25 $\pm$ 0,37	1,3 $\pm$ 0,97
Nitrato (mg.L <sup>-1</sup> )	0,94 $\pm$ 0,81	0,1 $\pm$ 0,12
Nitrito (mg.L <sup>-1</sup> )	0,005 $\pm$ 0,009	0,006 $\pm$ 0,005

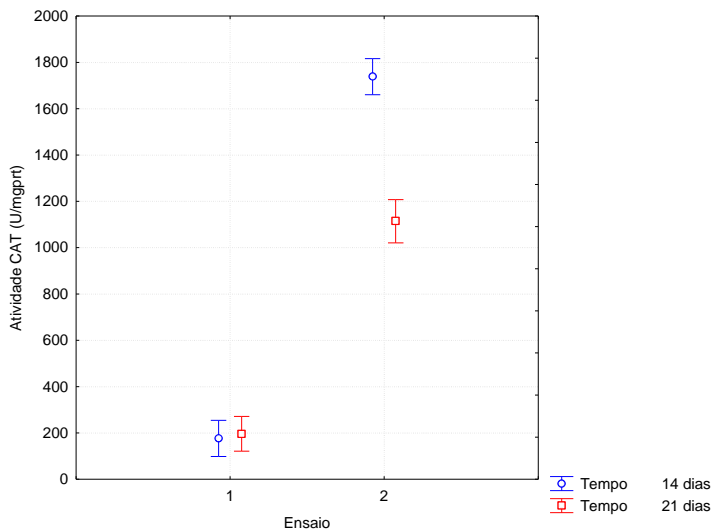
**Tabela 2**

Comparação dos parâmetros imunológicos entre tratamentos (A) e entre ensaios (B) de proteínas totais, imunoglobulinas totais no soro e atividade da catalase (CAT) no fígado de *Rhamdia quelen* imunizados e desafiados com terontes de *Ichthyophthirius multifiliis*. Letras distintas indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos e entre os ensaios. PROT: proteína, Ig: imunoglobulina total.

Tratamento	PROT total (mg.mL <sup>-1</sup> )	Ig (mg.mL <sup>-1</sup> )	CAT (U/mgprt)
Controle	5,80 $\pm$ 0,90 <sup>a</sup>	2,65 $\pm$ 1,13 <sup>abc</sup>	585,07 $\pm$ 820,70 <sup>a</sup>
A NI 12.000	5,75 $\pm$ 0,85 <sup>a</sup>	3,40 $\pm$ 0,70 <sup>c</sup>	407,25 $\pm$ 753,81 <sup>a</sup>
NI 22.000	5,66 $\pm$ 0,80 <sup>a</sup>	3,20 $\pm$ 1,00 <sup>bc</sup>	267,21 $\pm$ 652,44 <sup>a</sup>
I 12.000	4,72 $\pm$ 1,02 <sup>a</sup>	1,78 $\pm$ 0,95 <sup>a</sup>	248,40 $\pm$ 633,53 <sup>a</sup>
I 22.000	4,95 $\pm$ 1,24 <sup>a</sup>	1,78 $\pm$ 0,70 <sup>ab</sup>	262,47 $\pm$ 700,97 <sup>a</sup>
B Ensaio I (i.p.)	5,48 $\pm$ 0,94 <sup>a</sup>	2,60 $\pm$ 1,01 <sup>a</sup>	198,79 $\pm$ 69,37 <sup>a</sup>
Ensaio II (banho de imersão)	5,51 $\pm$ 1,06 <sup>a</sup>	3,13 $\pm$ 1,06 <sup>a</sup>	1245,49 $\pm$ 471,92 <sup>b</sup>

NI - Não imunizado e desafiado com 12.000 terontes. NI - Não imunizado e desafiado com 22.000 terontes. I - Imunizado e desafiado com 12.000. I - Imunizado e desafiado com 22.000.





**Fig. 1.**

Valores médios da atividade da catalase (U/mgprt) no fígado de *Rhamdia quelen* com 14 e 21 dias após a imunização com 10.000 terontes de *Ichthyophthirius multifiliis* vivos por peixe. Ensaio I: via i.p., ensaio II: banho de imersão. Letras distintas indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tempos de amostragem.

**Tabela 3**

Parâmetros hematológicos, peso e comprimento (média  $\pm$ desvio padrão) de jundiás *Rhamdia quelen* imunizados via i.p. e desafiados com *Ichthyophthirius multifiliis*. Letras distintas indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos e ensaios.

Parâmetros	20 dias após imunização		
	Controle	NI 22.000	I 12.000
P (g)	31,12 $\pm$ 8,59 <sup>ab</sup>	45,45 $\pm$ 14,58 <sup>bc</sup>	35,40 $\pm$ 8,40 <sup>ab</sup>
C (cm)	15,50 $\pm$ 1,38 <sup>ac</sup>	17,63 $\pm$ 1,93 <sup>ab</sup>	16,52 $\pm$ 1,19 <sup>abc</sup>
HTC (%)	19,20 $\pm$ 5,83 <sup>a</sup>	22,75 $\pm$ 6,29 <sup>abc</sup>	16,81 $\pm$ 7,35 <sup>a</sup>
ERI ( $\times 10^6 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	0,80 $\pm$ 0,03 <sup>c</sup>	0,60 $\pm$ 0,06 <sup>bc</sup>	0,52 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>
HEM (g dL <sup>-1</sup> )	6,65 $\pm$ 0,86 <sup>ab</sup>	6,77 $\pm$ 1,77 <sup>ab</sup>	6,15 $\pm$ 2,04 <sup>a</sup>
CHCM (g dL <sup>-1</sup> )	32,23 $\pm$ 10,84 <sup>a</sup>	33,93 $\pm$ 13,09 <sup>a</sup>	45,00 $\pm$ 32,39 <sup>a</sup>
VCM (fL)	2,13 $\pm$ 1,12 <sup>ab</sup>	4,06 $\pm$ 2,80 <sup>c</sup>	2,33 $\pm$ 0,90 <sup>abc</sup>
HCM (pg)	0,43 $\pm$ 0,16 <sup>abc</sup>	0,67 $\pm$ 0,93 <sup>bc</sup>	0,65 $\pm$ 0,55 <sup>bc</sup>
TROM ( $\times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	2,84 $\pm$ 1,40 <sup>b</sup>	2,66 $\pm$ 1,21 <sup>b</sup>	2,46 $\pm$ 1,56 <sup>b</sup>
LEUC ( $\times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	3,75 $\pm$ 2,38 <sup>b</sup>	2,93 $\pm$ 1,57 <sup>bc</sup>	3,27 $\pm$ 1,62 <sup>b</sup>
LINF ( $\times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	3,68 $\pm$ 2,19 <sup>b</sup>	2,84 $\pm$ 1,51 <sup>bc</sup>	3,23 $\pm$ 1,57 <sup>b</sup>
NEUT ( $\times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	1,02 $\pm$ 0,11 <sup>c</sup>	0,58 $\pm$ 0,10 <sup>abc</sup>	0,35 $\pm$ 0,04 <sup>ab</sup>
MONO ( $\times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	0,72 $\pm$ 0,15 <sup>d</sup>	0,39 $\pm$ 0,03 <sup>abc</sup>	0,37 $\pm$ 0,04 <sup>ac</sup>
Parâmetros	6 dias após desafio		
P (g)	24,22 $\pm$ 11,14 <sup>a</sup>	39,00 $\pm$ 9,50 <sup>ab</sup>	35,51 $\pm$ 6,42 <sup>ab</sup>
C (cm)	14,58 $\pm$ 1,73 <sup>c</sup>	17,22 $\pm$ 1,27 <sup>ab</sup>	16,48 $\pm$ 2,18 <sup>abc</sup>
HTC (%)	28,71 $\pm$ 6,09 <sup>abc</sup>	30,81 $\pm$ 4,87 <sup>bc</sup>	28,38 $\pm$ 4,64 <sup>abc</sup>
ERI ( $\times 10^6 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	0,16 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	0,15 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,17 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>
HEM (g dL <sup>-1</sup> )	8,46 $\pm$ 1,46 <sup>ab</sup>	8,50 $\pm$ 1,23 <sup>ab</sup>	8,02 $\pm$ 0,93 <sup>ab</sup>
CHCM (g dL <sup>-1</sup> )	29,47 $\pm$ 9,89 <sup>a</sup>	27,09 $\pm$ 4,04 <sup>a</sup>	26,54 $\pm$ 2,54 <sup>a</sup>
			28,68 $\pm$ 3,52 <sup>a</sup>
			33,42 $\pm$ 7,23 <sup>ab</sup>
			16,22 $\pm$ 1,10 <sup>abc</sup>
			32,50 $\pm$ 4,09 <sup>c</sup>
			0,21 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>
			8,85 $\pm$ 1,21 <sup>b</sup>
			27,39 $\pm$ 3,11 <sup>a</sup>

VCM (fL)	1,90±1,13 <sup>ab</sup>	1,82±0,50 <sup>ab</sup>	1,86±0,45 <sup>ab</sup>	1,65±0,76 <sup>ab</sup>	1,34±0,25 <sup>a</sup>
HCM (pg)	0,39±0,13 <sup>ab</sup>	0,40±0,16 <sup>ab</sup>	0,40±0,14 <sup>ab</sup>	0,37±0,17 <sup>a</sup>	0,31±0,05 <sup>a</sup>
TROM (x10 <sup>3</sup> .µL <sup>-1</sup> )	0,83±1,58 <sup>a</sup>	1,30±5,21 <sup>a</sup>	1,24±2,75 <sup>a</sup>	1,08±0,75 <sup>a</sup>	1,29±1,78 <sup>a</sup>
LEUC(x10 <sup>3</sup> .µL <sup>-1</sup> )	2,21±7,96 <sup>ac</sup>	1,74±3,32 <sup>a</sup>	1,45±2,46 <sup>a</sup>	1,60±3,93 <sup>a</sup>	1,58±1,09 <sup>a</sup>
LINF (x10 <sup>3</sup> .µL <sup>-1</sup> )	1,83±7,37 <sup>ac</sup>	1,59±3,03 <sup>a</sup>	1,35±2,09 <sup>a</sup>	1,53±3,92 <sup>a</sup>	1,46±1,19 <sup>a</sup>
NEUT (x10 <sup>3</sup> .µL <sup>-1</sup> )	0,86±1,08 <sup>bc</sup>	0,54±0,42 <sup>abc</sup>	0,32±0,35 <sup>ab</sup>	0,25±0,25 <sup>c</sup>	0,32±0,24 <sup>ab</sup>
MONO (x10 <sup>3</sup> .µL <sup>-1</sup> )	0,075±0,08 <sup>ab</sup>	0,017±0,02 <sup>b</sup>	0,06±0,07 <sup>ab</sup>	0,018±0,03 <sup>b</sup>	0,10±0,05 <sup>abc</sup>

P: peso, C: comprimento, HTC: hematócrito, ERI: eritrócito, HEM: hemoglobina, CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular, VCM: volume corpuscular médio, HCM: hemoglobina corpuscular média, TROM: trombócitos, LEUC: leucócitos, LINF: linfócitos, NEUT: neutrófilos, MONO: monócitos. NI - Não imunizado e desafiado com 12.000 terontes. NI - Não imunizado e desafiado com 22.000 terontes. I - Imunizado e desafiado com 22.000. I - Imunizado e desafiado com 22.000.

**Tabela 4**

Parâmetros hematológicos, peso e comprimento (média  $\pm$  desvio padrão) de jundiás *Rhamdia quelen* imunizados via banho de imersão e desafiados com *Ichthyophthirius multifiliis*. Letras distintas indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos e ensaios.

Parâmetros	20 dias após imunização				
	Controle	NI 12.000	NI 22.000	I 12.000	I 22.000
P (g)	9,44 $\pm$ 2,91 <sup>a</sup>	7,60 $\pm$ 2,16 <sup>a</sup>	8,48 $\pm$ 1,51 <sup>a</sup>	8,01 $\pm$ 2,36 <sup>a</sup>	7,77 $\pm$ 2,52 <sup>a</sup>
C (cm)	9,21 $\pm$ 2,61 <sup>a</sup>	10,30 $\pm$ 1,11 <sup>a</sup>	9,98 $\pm$ 2,19 <sup>a</sup>	9,86 $\pm$ 1,88 <sup>a</sup>	10,32 $\pm$ 1,05 <sup>a</sup>
HTC (%)	25,11 $\pm$ 2,71 <sup>a</sup>	22,00 $\pm$ 10,00 <sup>a</sup>	25,00 $\pm$ 11,59 <sup>a</sup>	28,00 $\pm$ 4,60 <sup>a</sup>	25,83 $\pm$ 4,35 <sup>a</sup>
ERI ( $\times 10^6 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	0,05 $\pm$ 1,82 <sup>a</sup>	0,03 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	0,03 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,06 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	0,04 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>
HEM (g $\cdot$ dL <sup>-1</sup> )	6,22 $\pm$ 0,76 <sup>a</sup>	6,56 $\pm$ 0,80 <sup>a</sup>	7,03 $\pm$ 0,93 <sup>a</sup>	7,48 $\pm$ 1,03 <sup>a</sup>	7,01 $\pm$ 1,05 <sup>a</sup>
CHCM (g $\cdot$ dL <sup>-1</sup> )	25,07 $\pm$ 4,42 <sup>a</sup>	29,76 $\pm$ 2,41 <sup>a</sup>	28,64 $\pm$ 3,94 <sup>a</sup>	27,69 $\pm$ 6,45 <sup>a</sup>	27,44 $\pm$ 3,75 <sup>a</sup>
VCM (fL)	7,55 $\pm$ 6,56 <sup>a</sup>	8,18 $\pm$ 2,03 <sup>a</sup>	9,86 $\pm$ 4,98 <sup>a</sup>	7,64 $\pm$ 3,35 <sup>a</sup>	9,29 $\pm$ 6,31 <sup>a</sup>
HCM (pg)	0,11 $\pm$ 1,29 <sup>a</sup>	0,37 $\pm$ 0,47 <sup>a</sup>	0,40 $\pm$ 1,55 <sup>a</sup>	0,24 $\pm$ 1,13 <sup>a</sup>	0,36 $\pm$ 1,77 <sup>a</sup>
TROM ( $\times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	0,80 $\pm$ 0,66 <sup>abc</sup>	0,62 $\pm$ 0,12 <sup>abc</sup>	0,82 $\pm$ 0,53 <sup>ac</sup>	1,21 $\pm$ 0,77 <sup>a</sup>	0,95 $\pm$ 0,85 <sup>a</sup>
LEUC ( $\times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	1,99 $\pm$ 1,82 <sup>a</sup>	1,18 $\pm$ 0,32 <sup>ab</sup>	1,28 $\pm$ 0,82 <sup>a</sup>	1,49 $\pm$ 0,91 <sup>ab</sup>	0,57 $\pm$ 0,48 <sup>b</sup>
LINF ( $\times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	1,92 $\pm$ 1,77 <sup>a</sup>	1,06 $\pm$ 0,30 <sup>a</sup>	1,26 $\pm$ 0,77 <sup>a</sup>	1,38 $\pm$ 0,82 <sup>a</sup>	0,55 $\pm$ 0,47 <sup>a</sup>
NEUT ( $\times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	0,07 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	0,03 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,13 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>	0,08 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	0,01 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
MONO ( $\times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>d</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	0,03 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,03 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	0,01 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>
Parâmetros	6 dias após desafio				
P (g)	9,18 $\pm$ 3,49 <sup>a</sup>	10,93 $\pm$ 3,48 <sup>a</sup>	7,53 $\pm$ 1,43 <sup>a</sup>	9,22 $\pm$ 1,32 <sup>a</sup>	10,00 $\pm$ 2,63 <sup>a</sup>
C (cm)	10,44 $\pm$ 1,37 <sup>a</sup>	11,39 $\pm$ 1,05 <sup>a</sup>	9,78 $\pm$ 1,11 <sup>a</sup>	10,76 $\pm$ 0,47 <sup>a</sup>	10,90 $\pm$ 0,91 <sup>a</sup>
HTC (%)	25,43 $\pm$ 4,39 <sup>a</sup>	27,88 $\pm$ 5,66 <sup>a</sup>	21,50 $\pm$ 8,06 <sup>a</sup>	24,64 $\pm$ 5,87 <sup>a</sup>	21,83 $\pm$ 6,18 <sup>a</sup>
ERI ( $\times 10^6 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	0,04 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	0,04 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	0,01 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	0,03 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
HEM (g $\cdot$ dL <sup>-1</sup> )	7,79 $\pm$ 1,29 <sup>a</sup>	8,00 $\pm$ 0,95 <sup>a</sup>	7,05 $\pm$ 0,56 <sup>a</sup>	7,16 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>	7,72 $\pm$ 0,47 <sup>a</sup>
CHCM (g $\cdot$ dL <sup>-1</sup> )	34,30 $\pm$ 11,62 <sup>a</sup>	30,67 $\pm$ 7,78 <sup>a</sup>	35,09 $\pm$ 19,96 <sup>a</sup>	31,55 $\pm$ 7,53 <sup>a</sup>	36,70 $\pm$ 11,40 <sup>a</sup>

VCM (fL)	9,20±6,64 <sup>a</sup>	11,12±56,85 <sup>a</sup>	7,28±6,93 <sup>a</sup>	37,50±33,58 <sup>a</sup>	12,47±10,53 <sup>a</sup>
HCM (pg)	0,41±2,42 <sup>a</sup>	0,37±11,82 <sup>a</sup>	0,58±5,90 <sup>a</sup>	0,97±7,19 <sup>a</sup>	0,51±2,99 <sup>a</sup>
TROM ( $\times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	0,34±0,41 <sup>b</sup>	0,56±0,60 <sup>abc</sup>	0,22±0,36 <sup>abc</sup>	0,029±0,05 <sup>bc</sup>	0,35±0,42 <sup>abc</sup>
LEUC ( $\times 10^5 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	1,42±1,15 <sup>ab</sup>	1,56±1,72 <sup>ab</sup>	0,40±0,43 <sup>ab</sup>	0,19±0,26 <sup>ab</sup>	1,54±1,32 <sup>a</sup>
LINF ( $\times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	1,37±1,10 <sup>a</sup>	1,51±1,69 <sup>a</sup>	0,38±0,41 <sup>a</sup>	0,16±0,22 <sup>a</sup>	1,52±1,31 <sup>a</sup>
NEUT ( $\times 10^5 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	0,04±0,05 <sup>a</sup>	0,04±0,04 <sup>a</sup>	0,01±0,01 <sup>a</sup>	0,02±0,03 <sup>a</sup>	0,02±0,02 <sup>a</sup>
MONO ( $\times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	0,01±0,01 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,01±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>

P: peso, C: comprimento, HTC: hematócrito, ERI: eritócito, HEM: hemoglobina, CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular, VCM: volume corpuscular médio, HCM: hemoglobina corpuscular média, TROM: trombócitos, LEUC: leucócitos, LINF: linfócitos, NEUT: neutrófilos, MONO: monócitos. NI - Não imunizado e desafiado com 12.000 terontes. NI - Não imunizado e desafiado com 22.000 terontes. I - Imunizado e desafiado com 12.000. I - Imunizado e desafiado com 22.000.

## CAPÍTULO 2

**Análise histopatológica de jundiá, *Rhamdia quelen*, imunizados e desafiados com terontes de *Ichthyophthirius multifiliis***

O artigo será enviado para publicação no periódico **Journal of Applied Ichthyology** (ISSN: 1439-0426), tendo sido redigido segundo as normas da revista.

## Resumo

O desenvolvimento de vacinas como método imunoprolático na aquicultura tem aumentado significativamente. *Ichthyophthirius multifiliis*, é o mais importante dos protozoários ciliados que acomete o jundiá (*Rhamdia quelen*) devido à baixa especificidade de hospedeiro e ampla distribuição geográfica. Este estudo analisou a histopatologia de jundiá imunizados após o desafio com terontes vivos de *I. multifiliis* em dois ensaios: I- imunização via injeção intraperitoneal (i.p.) e II- via banho de imersão compostos pelos seguintes tratamentos: controle (não imunizado não desafiado); não imunizado e desafiado com 12.000 terontes/peixe; não imunizado e desafiado com 22.000 terontes/peixe; imunizado e desafiado com 12.000 terontes/peixe; imunizado e desafiado com 22.000 terontes/peixe. Seis dias após o desafio, foram coletadas as amostras para histopatologia e determinação do nível de infecção. Tanto no ensaio I quanto no II, a prevalência de *I. multifiliis* nas brânquias foi maior nos peixes não imunizados (33,33% e 27,77%, respectivamente). Os melanomacrófagos estavam presentes em 53% e 50% das amostras dos animais não imunizados e desafiados com 12.000 e 22.000 terontes, respectivamente (ensaio I). Os peixes do ensaio II imunizados e desafiados apresentaram maior área de atrofia dos hepatócitos no fígado. Maior número de melanomacrófagos no rim dos peixes não imunizados do ensaio I foi observado comparado com o controle. Os resultados demonstram que não houve diferença quando se comparou as lesões branquiais dos peixes imunizados e não imunizados com o controle em ambos os ensaios. As alterações histológicas nos peixes foram consideradas leves e de ocorrência eventual, com exceção do fígado que apresentou significativa atrofia e hipertrofia de hepatócitos após imunização via i.p.

**Palavras-chaves:** infecção, protozoário, pontos brancos, vacina, hepatócitos, telangiectasia.

## Abstract

The development of vaccines as an immune-prophylaxis method in aquaculture has increased significantly. *Ichthyophthirius multifiliis*, is the most important Ciliophora affecting the silver catfish (*Rhamdia quelen*) due to its low host specificity and wide geographic distribution. This study analyzed the histopathology of jundiá immunized after challenge with live theronts of *I. multifiliis* in two assays: I- immunization via intraperitoneal injection (i.p.) and II- via immersion bath at the following treatments: control (non-immunized no challenged); non-immunized and challenged with 12,000 theronts/fish; non-immunized and challenged with 22,000 theronts/fish; immunized and challenged with 12,000 theronts/fish; immunized and challenged with 22,000 theronts/fish. Six days after challenge, the samples for histopathological and parasitological analysis were collected. Either in the assay I or in the assay II, the prevalence of *I. multifiliis* in the gills was higher in non-immunized fish (PBS) (33,33% and 27,77%, respectively). The melanomacrophages were present in 53% and 50% of the samples in non-immunized fish (PBS 12000 e 22000), respectively (assay I). Fish from the assay II immunized and challenged showed more atrophied areas of the hepatocytes. Higher number of melanomacrophage in the kidney of non-immunized fish in the assay I was observed when compared to control. The results showed no difference in the gill lesions in both immunized and non-immunized fish compared to control. Histological alterations in the organs of silver catfish were considered light and of eventual occurrence except for the liver that presented significant atrophy and hypertrophy of hepatocytes after immunization via i.p.

**Key words:** infection, protozoan, white spot, vaccine, hepatocytes, telangiectasia.



## Introdução

A produção do jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy and Gaimard, 1824) vem crescendo a cada ano no sul do Brasil por características zootécnicas, acompanhada de pesquisa e extensão realizadas na região. O principal obstáculo na sua cadeia produtiva está relacionado à produção de formas jovens em razão do canibalismo na fase de larvicultura e das mortalidades devido às infestações parasitárias por protozoários ciliados (Amaral, 2013) como *Ichthyophthirius multifiliis*, *Epistylis* e tricodínideos, considerados causadores das perdas tanto na alevinagem como na engorda (Tavares-Dias et al, 2001; Pádua et al., 2012; Martins et al., 2010, 2013).

*Ichthyophthirius multifiliis* (Fouquet, 1876), é um dos mais importantes protozoários parasitos que afeta a saúde do jundiá devido à sua baixa especificidade de hospedeiro e ampla distribuição geográfica. Se não for combatido rapidamente, causa lesões na pele e brânquias do hospedeiro levando à morte em curto espaço de tempo e causando prejuízos elevados na piscicultura mundial de água doce (Eiras, 2013).

Vários tratamentos tem sido testados na tentativa de controlar ou eliminar o parasito do ambiente de cultivo. Entre eles destaca-se o uso de cloreto de sódio (Miron et al., 2003), cloramina-T (Cross e Hursey, 1973), verde malaquita e sulfato de cobre (Carneiro et al., 2005), formalina e permanganato de potássio (Tieman e Goodwin, 2001), aumento do fluxo da água dos tanques (Bodensteiner et al., 2000), bicarbonato de sódio (Forwood et al., 2014) e filtração da água (Heinecke e Buckmann, 2009).

Alternativamente, o desenvolvimento de vacinas como método imunoprolático na aquicultura tem aumentado significativamente em todo o mundo, seguindo a tendência de expansão da atividade (Gudding et al., 1999; Martins et al., 2011a, 2011b; Tonheim et al., 2008), porém pouco se sabe sobre alterações histológicas em peixes após a imunização e o desafio com *I. multifiliis* e ainda nenhum estudo foi realizado com *Rhamdia quelen*.

Diferentes métodos podem ser utilizados na vacinação dos peixes: por injeção intraperitoneal (i.p); por imersão, em que os animais são imersos em solução aquosa contendo os antígenos vacinais; ou pela administração oral das vacinas. Esses métodos apresentam diferentes vantagens e desvantagens quanto à eficácia da imunização, praticidade, efeitos colaterais e custo-benefício (Gudding et al., 1999).

Este estudo avaliou por meio de histopatologia a influência da imunização em *R. quelen* após o desafio com terontes vivos de *I. multifiliis*.

## **Material e Métodos**

### **Desenho experimental**

Alevinos de jundiás foram adquiridos na Piscicultura Krahn (26°41'24"S e 49°11'03"O), Município de Pomerode, Santa Catarina, Brasil e aclimatados por 7 dias antes de ser distribuído nos ensaios. Semanalmente os parâmetros de qualidade de água (Tabela 1) como oxigênio dissolvido, temperatura, pH foram medidos com multiparâmetro Hanna® HI9829 (Hanna Instruments Brasil, Barueri, SP) e a amônia total, nitrato e nitrito com kit colorimétrico da Alfakit® (Alfakit, Florianópolis, SC). A alimentação foi fornecida duas vezes ao dia até a saciedade aparente. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos do Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC/PP00864).

### **Ensaio I - Imunização por injeção intraperitoneal**

Os peixes foram aclimatados em uma caixa de 500 L e submetidos a dois banhos consecutivos diários com 5 mg.L<sup>-1</sup> de permanganato de potássio por 1 h para eliminar parasitos (Martins, 2011b). Após uma semana de aclimação, os peixes foram distribuídos em 15 tanques de 100 L com 20 peixes em cada em sistema de recirculação fechado, mantidos assim até o desafio, que ocorreu 21 dias após a imunização. Foram testados em cinco tratamentos com três repetições cada: controle não imunizado não desafiado; não imunizado e desafiado com 12.000 terontes/peixe; não imunizado e desafiado com 22.000 terontes/peixe; imunizado e desafiado com 12.000 terontes/peixe; imunizado e desafiado com 22.000 terontes/peixe.

Para os peixes não imunizados, foi utilizada uma solução tampão fosfato-salino (PBS, pH 7,2) contendo 1 mL via i.p. Nos peixes imunizados, foi injetado 1 mL de solução contendo 10.000 terontes vivos por peixe.

### **Ensaio II - Imunização por banho de imersão**

Os peixes foram distribuídos e aclimatados igualmente a metodologia do ensaio I. Para os peixes não imunizados, uma solução tampão fosfato-salino (PBS, pH 7,2) foi utilizada via banho de imersão. Os peixes vacinados foram imersos em uma solução contendo 10.000

terontes vivos por peixe durante uma hora. Após este período, foram banhados em permanganato de potássio para eliminar os parasitos.

### **Obtenção dos terontes**

Trofontes de *I. multifiliis* foram isolados de jundiás parasitados mantidos em um tanque com capacidade de 50 L e os terontes obtidos como descrito por Xu et al. (2000). Resumidamente, os peixes foram anestesiados com eugenol (75 mg.L<sup>-1</sup>) e eutanasiados por comoção cerebral. Os trofontes maduros foram raspados da superfície corporal com auxílio de lamínula e transferidos para placa de Petri, onde foram incubados por 24 h à 24°C em ausência de luz. A água da placa de Petri foi então filtrada com o auxílio de uma rede de plâncton com 45 µm de malha para coleta dos terontes.

Para a imunização, 10.000 terontes foram contados a partir de 3 amostras de terontes em auxílio de câmara de Sedgewick-Rafter em microscópio óptico e utilizados em cada peixe referente aos grupos imunizados. Durante todo o ensaio, 400 jundiás foram mantidos em laboratório para obtenção da forma infectante do parasito.

### **Desafio e determinação do nível de infecção**

Vinte e um dias após a imunização, a temperatura da água foi ajustada à 25°C em todos os tanques e os peixes foram desafiados com 12.000 e 22.000 terontes vivos durante 1 h e liberados na água, como descrito por Xu et al. (2000). A taxa de mortalidade foi registrada até 10 dias após o desafio ou até a estabilização da mortalidade. Seis dias após o desafio com terontes, três peixes de cada repetição foram coletados para determinar os níveis de infecção parasitária.

### **Análise parasitológica**

Após anestesiados em eugenol (75mg/L), os peixes foram pesados (peso total em gramas) e seu comprimento total medido (cm). Em seguida foram sacrificados, por comoção cerebral, para coleta das brânquias e muco. As brânquias foram banhadas em água à temperatura de 60°C e após poucos minutos, fixados em álcool 70° para posterior observação e quantificação de parasitos em estereomicroscópio, o muco foi analisado à fresco (Jerônimo et al., 2011).

### **Análise histopatológica**

Seis dias após o desafio, os peixes foram anestesiados com eugenol (75 mg/L) e eutanasiados para coleta de fragmentos de brânquias, fígado, baço e rins, fixados em formalina 10% tamponada,

emblocados em parafina processados segundo técnicas usuais em histologia, para cortes transversais de 4  $\mu\text{m}$  de espessura e corados com hematoxilina de Harris e eosina (HHE) para identificação padrão das estruturas (Howard et al., 2004) e por tricrômico de Masson (Michalany, 1990) para visualização do tecido de fibras de colágeno decorrentes de alguma regeneração tecidual. As lâminas foram observadas em microscópio de luz e fotomicrografadas em microscópio com contraste de fase ZEISS Axio Vert.A1.

### **Análise estatística**

As análises estatísticas dos cortes histológicos foram realizadas por meio de tabelas de contingência estratificadas, uma para cada tratamento e órgão analisado. A análise estratificada teve como objetivo reduzir a influência de possíveis fatores de confusão e garantir uma análise robusta (Davis, 1991). Para verificar a diferença entre cada tratamento e controle, foram levadas em considerações as comparações entre as alterações histopatológicas de dano para cada órgão. Todas as análises foram realizadas com o auxílio do programa OpenEpi, versão 3, sendo utilizado o método de Mantel- Haenszel para o cálculo da razão de risco agrupada (Stefano, 2007) e o teste Exato de Fisher a 5% de probabilidade.

### **Resultados**

Com relação ao nível de infestação nas brânquias dos peixes do ensaio I, os animais não imunizados e desafiados com 12000 e 22000 terontes, apresentaram prevalência (P) de 50% de *I. multifiliis* e intensidade média (IM) de  $3,11 \pm 2,06$ . Nos imunizados e desafiados com 12.000 e 22.000 a prevalência foi de 27,8% e intensidade média foi de  $5,0 \pm 3,3$ . Na análise do muco a fresco não foi observada a presença dos pontos brancos ou de terontes em nenhum dos tratamentos e, conseqüentemente, não foi registrada mortalidade após o desafio. No ensaio II, observou-se maiores valores de prevalência de 22,2% e intensidade média de  $1,5 \pm 0,7$ ) nas brânquias dos peixes não imunizados e desafiados, quando comparado com os imunizados e desafiados (P= 5,5% IM=  $1 \pm 0,23$ ). No muco destes peixes, não foi observada a presença de pontos brancos tanto nos peixes não imunizados como nos imunizados.

A análise histopatológica do baço apresentou aspecto normal da polpa branca e polpa vermelha (Fig. 1A) e alguns melanomacrófagos

isolados em todos os tratamentos, assim como no controle. Nos animais não imunizados e desafiados com 12.000 e 22.000 terontes, os melanomacrófagos estavam presentes em 53% e 50%, respectivamente (ensaio I). Já no ensaio II, 33% dos peixes não imunizados apresentaram melanomacrófagos (Fig. 1B-C) comparados com os peixes imunizados que foi de 27%. Não houve diferença estatística na quantidade de melano macrófagos isolados.

No rim, as características observadas foram necrose do epitélio tubular (Fig. 2A), hipertrofia de glomérulo com redução do espaço da cápsula de Bowman (Fig. 2B), hialinização epitélio tubular, presença de melanomacrófagos (Fig. 2C), néfron imaturo (Fig. 2D) e hemorragia focal. Apenas a presença de melanomacrófagos no rim dos peixes não imunizados e desafiados com 22000 terontes foi maior significativamente ( $p= 0,006$ ) nos peixes controle no ensaio I (Tabela 2). No ensaio II foram observadas as mesmas lesões, semelhantes aos peixes controle.

A análise do fígado evidenciou áreas de necrose eventual (Fig. 3B), atrofia e hipertrofia de hepatócitos (Fig. 3 C-D), congestão, esteatose (Fig. 3E), fibrose (Fig. 3F), concentração de leucócitos mononucleares em alguns vasos, e presença de melanomacrófagos, tanto nos peixes imunizados e desafiados do ensaio I quanto no ensaio II. O teste Exato de Fisher ( $p<0,05$ ) mostrou que os peixes não imunizados e desafiados com 12.000 e imunizados e desafiados com 22.000 terontes apresentaram maior hipertrofia dos hepatócitos ( $p= 0,009$ ) quando comparado com os peixes controle.

Tanto os peixes imunizados como os não imunizados via i.p. mostraram maiores áreas de atrofia de hepatócitos comparados com o controle (Tabela 3). Nos peixes do ensaio II, não imunizados e desafiados com 12.000 e imunizados e desafiados com 22.000 terontes, o fígado apresentou maior concentração de sangue na periferia do órgão ou congestão ( $p= 0,01$  e  $0,04$  respectivamente). A tabela 3 mostra que houve diferença significativa entre as amostras de fígado dos peixes não imunizados e imunizados, com maior área de atrofia dos hepatócitos.

Nas brânquias, observou-se telangiectasia eventual em peixes não imunizados em ambos os ensaios (Fig. 4A), edema na base da lamela secundária e hiperplasia (Fig. 4B-C), epitélio corrugado (Fig. 4F), hipertrofia das células de cloreto e células de muco. Pela análise estatística, os resultados não diferiram significativamente ( $p>0,05$ ) quando as lesões branquiais dos peixes imunizados e não imunizados foram comparadas com os animais controle em ambos os ensaios (Tabela 4).

## Discussão

Os estudos histopatológicos são com frequência, forte adjuvante no diagnóstico de doenças de peixes verificando-se interesse crescente, especialmente com o avanço da piscicultura (Saraiva, 2006), afim de verificar os possíveis danos causados pelos parasitos nos hospedeiros (Pádua et al., 2014).

Surtos de *I. multifiliis* ocorrem quando as condições do ambiente são favoráveis para a rápida multiplicação do parasito, como a temperatura da água e condições de estresse dos hospedeiros (Dickerson, 2006). Apesar de não ter havido mortalidade, a infecção teve sucesso, uma vez que a prevalência de parasitos foi maior nos peixes após o desafio. Possivelmente os animais tenham aumentado sua resposta imunológica justificando a falta de mortalidade.

O baço é o único órgão linfático que ocorre em peixes teleosteos (Roberts, 2001), sendo que centros de melanomacrófagos são frequentemente observados próximos dos vasos sanguíneos. Brum et al. (2013), observaram que todos os baços de *R. quelen* apresentaram hiperplasia da polpa vermelha e fibrose acentuada, típicos de esplenomegalia esclero-congestiva, resultado de lenta circulação pelo baço, ocasionado por congestão hepática nos peixes provenientes de piscicultura e fibrose no parênquima hepático dos peixes selvagens, principalmente nos animais coletados nos pontos sem resíduo de herbicida de rizicultura, uma vez que esses peixes encontravam-se em exposição crônica ao herbicida clomazone.

A aparência da polpa vermelha e branca dos baços de *R. quelen* do presente estudo, estavam normais, com alguns melanomacrófagos isolados. Houve tendência a formação dos centros de melanomacrófagos possivelmente devido ao estresse sofrido pela imunização e desafio em ambos os ensaios.

Os centros de melanomacrófagos são agregados de células reticulares, linfócitos, plasmócitos e macrófagos. Tais células desenvolvem respostas a antígenos no tecido mielóide, necessárias para estabelecer a memória imunológica (Kennedy-Stoskopf, 1993).

A sensibilidade do rim foi observada com a presença de melanomacrófagos isolados nos peixes não imunizados. O rim apresentou hipertrofia de glomérulo com redução do espaço da cápsula de Bowman, necrose do epitélio tubular, néfron imaturo e hemorragia focal. Semelhante a este estudo, Pamplona et al. (2011), registraram em *R. quelen* expostos às concentrações de 5 e 50  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de dipirona, aumento do espaço de Bowmann, e na maior concentração a alteração

da estrutura dos glomérulos, que variou de dilatação dos capilares à destruição total da estrutura. Em peixes de água doce, o rim participa da regulação de sal no organismo eliminando o excesso de água pela filtração nos glomérulos (Mumford et al., 2007).

O fígado é um órgão vulnerável à grande variedade de insultos metabólicos, tóxicos, microbianos, circulatórios e neoplásicos. A lesão hepática também ocorre secundariamente a algumas doenças. A enorme reserva funcional do fígado mascara o impacto clínico da lesão hepática leve, mas com a progressão de doença difusa ou interrupção do fluxo biliar, as consequências da perturbação da função hepática podem causar risco de morte (Robbins e Cotran, 2005).

No presente estudo, as maiores alterações observadas no fígado dos peixes imunizados e não imunizados foi a presença de atrofia e hipertrofia de hepatócitos. Como não foi registrada esta lesão nos peixes controle, pode-se afirmar que tenha sido resultante do desafio nos peixes, tanto no ensaio I quanto no II. Os sinais clínicos de insuficiência hepática são o resultado da incapacidade dos hepatócitos executarem suas funções homeostáticas (Robbins e Cotran, 2005).

As brânquias não apresentaram lesões teciduais graves associadas aos ensaios de imunização e parasitismo. Foram moderadas, sendo que os peixes controle apresentaram brânquias com o aspecto mais sadio. A telangiectasia ou aneurisma lamelar, encontrada nos peixes não imunizados e imunizados deste estudo foi eventual, sugerindo que eles se encontravam em maior condição de estresse decorrente do desafio. Em piaçu (*Leporinus macrocephalus*) e pacu (*Piaractus mesopotamicus*) parasitados por *Monogenea*, protozoários e mixosporídeos (Schalch et al., 2006) as alterações branquiais foram semelhantes às do presente estudo com resposta inespecífica do hospedeiro à agressão, independentemente do tipo de agente agressor. Esta alteração pode ocorrer frequentemente e ser de origem parasitária ou provocada por diferentes tipos de poluição química (Roberts, 2001).

A infecção por *I. multifiliis* ocorre de maneira rápida e intensa, causando severos danos nas brânquias, como observado por Carneiro et al. (2005) em jundiás submetidos a tratamentos convencionais, onde as análises mostraram hiperemia e hiperplasia nas células do epitélio branquial próximas ao parasito. Nos cortes histológicos deste estudo, nenhum parasito foi constatado nos filamentos branquiais.

As alterações histológicas observadas neste estudo foram consideradas leves e de ocorrência eventual, com exceção do fígado que apresentou maiores áreas de hipertrofia e atrofia de hepatócitos após imunização via i.p e desafio. A relação da análise histopatológica entre

os ensaios de imunização ou vacina é sugerida, como fonte de avaliação dos possíveis efeitos após o desafio, principalmente comparando entre métodos diferentes de proteção contra os patógenos.

## Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro (CNPq-472598/2011-2) e bolsa de Produtividade em Pesquisa à M.L. Martins (CNPq 302493/2010-7), à MSc Patrícia Garcia pelo treinamento nos procedimentos histológicos e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro à K.R. Tancredo.

## Referências

- Amaral, H., 2013: Influência da Rede jundiá na piscicultura do estado de Santa Catarina. In: Workshop sobre jundiá: História e perspectivas. Ed: Barcellos, L.J.G., Fagundes, M., Ferreira, D. Passo Fundo, Brasil, 266 p.
- Brum, A.; Dotta, G.; Roumbedakis, K.; Gonçalves, E.L.T.; Garcia, L.P.; Garcia, P.; Scussel, V.M.; Martins, M., 2013: Hematological and histopathological changes in silver catfish *Rhamdia quelen* (Siluriformes) exposed to clomazone herbicide in the Madre River, Santa Catarina State, Southern Brazil. *J. Environ. Sci. Heal B*, **49**, 169-175.
- Bodensteiner, L.R., Sheehan, R.J., Wills, P.S., Brandenburg, A.M., Lewis, W. M., 2000: Flowing Water: An Effective Treatment for Ichthyophthiriasis. *J. Aquat. Anim. Health*. **12**, 209-219.
- Carneiro, P.C.F.; Schorer, E.; Mikos, J. D., 2005: Conventional therapeutic treatments on the control of the parasite *Ichthyophthirius multifiliis* in *Rhamdia quelen*. *Pesq. Agropec. Bras.* **40**, 99-102.
- Cross, D.G.; Hursey, P.A., 1973: Cloramine-T for the control of *Ichthyophthirius multifiliis* (Fouquet). *J. Fish Biol.* **5**, 789-798.
- Davis, C.S., 1991: Statistical analysis of stratified 2x2 tables. *Inf. Cont. and Hosp. Epidem.* **12**, 173-178.
- Dickerson, H.W., 2006: *Ichthyophthirius multifiliis* and *Cryptocaryon irritans* (Phylum Ciliophora). In: Fish Diseases and Disorders, Protozoan and Metazoan Infections. Ed: Woo, P.T.K. CABI Publishing, Wallingford, UK, p. 116-53.



- Eiras, J.C., 2013: Ciliophora. In: Parasitologia de peixes de água doce do Brasil. Eds: Pavanelli, G.C.; Takemoto, R.M.; Eiras, J.C. Maringá, Brasil, 233-247.
- Forwood, J.M.; Harris, J.O.; Landos, M.; Deveney, M.R., 2014: Minimum effective concentrations of formalin and sodium percarbonate on the free-living stages of an Australian isolate of *Ichthyophthirius multifiliis*. Parasitol. Res. **113**, 3251-3258.
- Fujimoto, R.Y., Neves, M.S., Santos, R.F.B., Cruz, C., Diniz, D.G., Eiras, J.C., 2014: Histopathological evaluation of seven Amazon species of freshwater ornamental armored catfish. Acta. Sci. Anim. Sci. **36**, 349-355.
- Gudding, R.; Lillehauga, A.; Evensen, O., 1999: Recent developments in fish vaccinology. Vet. Immunol. Immunopathol. **72**, 203-212.
- Heinecke, R.D., Buckmann, K., 2009: Control of *Ichthyophthirius multifiliis* using a combination of water filtration and sodium percarbonate: Dose-response studies, Aquaculture. **288**, 32-35.
- Howard, D.W.; Lewis, E.J.; Keller, B.J.; Smith, C.S., 2004: Histological techniques for marine bivalve mollusks and crustaceans. NOAA Technical Memorandum NOS NCCOC. **5**, 1-218.
- Jerônimo, G.T; Martins, M.L; Ishikawa, M.M; Ventura, A.S; Tavares-Dias, M., 2011: Métodos Para Coleta De Parasitos. Circular Técnica Embrapa Macapá; **39**.
- Kennedy-Stoskopf, S. 1993: Immunology. In Fish Medicine. Ed: Stoskopf, M. K. Philadelphia, USA, 149-159.
- Martins, M.L., Marchiori, N.; Nunes, G., Rodrigues, M.P., 2010: First record of *Trichodina heterodentata* (Ciliophora: Trichodinidae) from channel catfish, *Ictalurus punctatus* cultivated in Brazil. Braz. J. Biol. **70**, 637-644.
- Martins, M.L., Xu, D-H., Shoemaker, C.A., Kleisus, P.H., 2011a: Temperature effects on immune response and hematological parameters of channel catfish *Ictalurus punctatus* vaccinated with live theronts of *Ichthyophthirius multifiliis*. Fish and Shellfish Immunology. **31**, 774-780.
- Martins ML, Shoemaker CA, Xu D-H, Klesius PH., 2011b: Effect of parasitism on vaccine efficacy against *Streptococcus iniae* in Nile tilapia. Aquaculture. **314**, 18-23.
- Martins, M.L., Marchiori, N.C., Garcia, P., 2013: Doenças parasitárias do jundiá. In: Workshop sobre jundiá: História e perspectivas. Ed: Barcellos, L.J.G., Fagundes, M., Ferreira, D. Passo Fundo, Brasil, 266 p.

- Michalany, J., 1990: Técnica histológica em anatomia patológica: Técnica histológica em anatomia patológica com instruções para o cirurgião, enfermeira e citotécnico. Michalany, São Paulo, Brasil, p. 40-112.
- Miron, D.S., Silva, L.V.F., Golombieski, J.I., Baldisserotto, B., 2003: Efficacy of different salt (NaCl) concentrations in the treatment of *Ichthyophthirius multifiliis*-infected silver catfish, *Rhamdia quelen*, fingerlin. J. Appl. Aquacult. **14**, 155-161.
- Mumford, S., Heidel, J., Smith, C., Morrison, J., MacConnell, B., Blazer, V., 2007: Fish Histology and Histopathology. Disponível em: [http://nctc.fws.gov/resources/course-resources/fish-histology/Fish\\_Histology\\_Manual\\_v4.pdf](http://nctc.fws.gov/resources/course-resources/fish-histology/Fish_Histology_Manual_v4.pdf). 357p.
- Pádua, S.B.; Martins, M.L.; Carraschi, S.P.; Cruz, C.; Ishikawa, M.M., 2012: *Trichodina heterodentata* (Ciliophora: Trichodinidae): a new parasite for *Piaractus mesopotamicus* (Pisces: Characidae). Zootaxa. **3422**, 62-68.
- Pádua, S.B., Jerônimo, G.T., Ishikawa, M.M., Belo, M.A.A., Martins, M.L., Pelisari, T., Kasai, R.Y.D., Carrijo-Mauad, J.R., 2014: Parasitological assessment and host-parasite relationship in farmed cachara catfish fingerlings (*Pseudoplatystoma reticulatum* Eigenmann & Eigenmann 1889), Mato Grosso do Sul, Brazil. Neotrop. Helmitol. **8**, 37-45.
- Pamplona, J.H.; Oba, E.T., Silva, T.A., Ramos, L.P., Ramsdorf, W.A., Cestari, M.M., Oliveira Ribeiro, C.A.; Zampronio, A.R., Silva de Assis, H.C., 2011: Subchronic effects of dipyrone on the fish species *Rhamdia quelen*. Ecotoxicol. Environ. Saf. **74**, 342-349.
- Robbins, S.; Cotran, R.S., 2005: Patologia - Bases Patológicas das Doenças. Rio de Janeiro, Brasil, 1592 p.
- Roberts, R.J., 2001: Fish pathology. W.B. Saunders, London, UK, 472 p.
- Saraiva, A., 2006: Aspectos gerais de histologia e de histopatologia de peixes. In: Sanidade de Organismos Aquáticos no Brasil. Ed: Silva-Souza, A.T. Maringá, Brasil, p. 239-252.
- Schalch, S.H.C, Moraes, F.R, Moraes, J.R.E., 2006: Efeitos do parasitismo sobre a estrutura branquial de *Leporinus macrocephalus* Garavello e Britsk, 1988 (Anastomidae) e *Piaractus mesopotamicus* Holberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae). Brazil. J. Vet. Parasitol. **15**, 11-115.
- Stefano, P.; Ezio, B., 2007: The Mantel-Haenszel procedure in epidemiological studies: an introduction. Ann. Fac. Med. Vet. Parma. **27**, 17-32.

- Tavares-Dias, M.; Moraes, F.R.; Martins, M.L., 2001: Parasitic fauna of cultivated fishes in feefishing farm of Franca, São Paulo State, Brazil. I. Protozoans. *Rev. Bras. Zool.* **18**, 67-79.
- Tieman, D. M.; Goodwin, A. E., 2001: Treatments for ich infestations in channel catfish evaluated under static and flow-through water conditions. *N. Am. J. Aquacul.* **63**, 293-299.
- Tonheim, T.C.; Bogwald, J.; Dalmo, R.A., 2008: What happens to the DNA vaccine in fish? A review of current knowledge. *Fish Shellfish Immunol.* **25**, 1-18.
- Xu, D-H.; Klesius, P.H.; Shoemaker, C.A.; Evans, J.J., 2000: The early development of *Ichthyophthirius multifiliis* in channel catfish *in vitro*. *J. Aquat. Anim. Health.* **12**, 290-296.

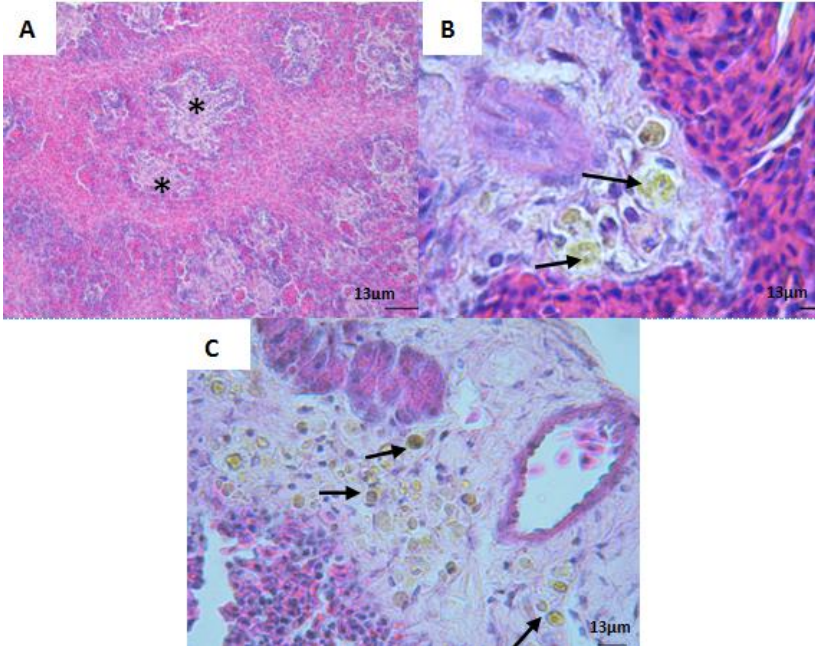


Fig.1. Fotomicrografias do baço de *Rhamdia quelen* imunizados e desafiados com terontes de *Ichthyophthirius multifiliis*. (A) Controle polpa branca e polpa vermelha normais e artérias (\*); (B-C) Presença de melanomacrófagos (seta preta) nos peixes não imunizados. Coloração: HHE.

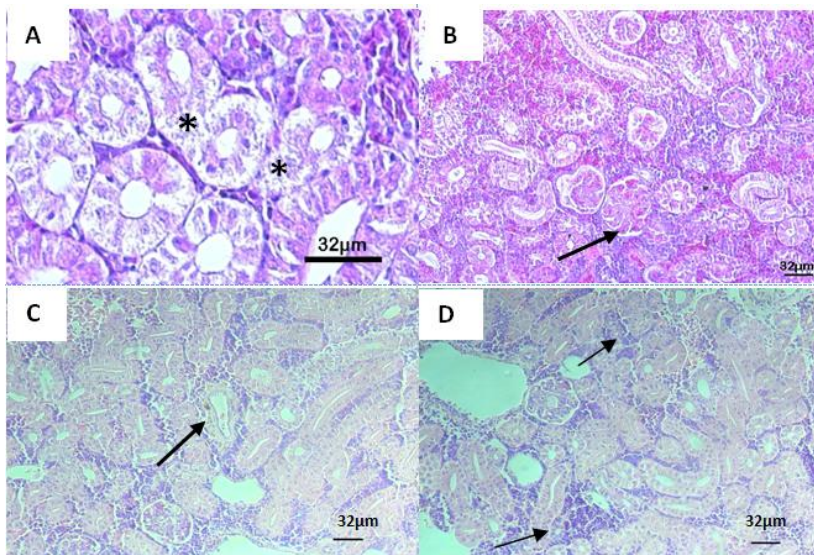


Fig. 2. Fotomicrografias do rim de *Rhamdia quelen* imunizados e desafiados com terontes de *Ichthyophthirius multifiliis*. **(A)** Necrose do epitélio tubular (\*); **(B)** Hipertrofia do glomérulo e redução da cápsula de Bowman (seta preta) em peixe imunizado; **(C)** Presença de melanomacrófagos (seta preta) em peixe imunizado; **(D)** Néfron imaturo (seta preta) em peixe imunizado. Coloração: HHE.

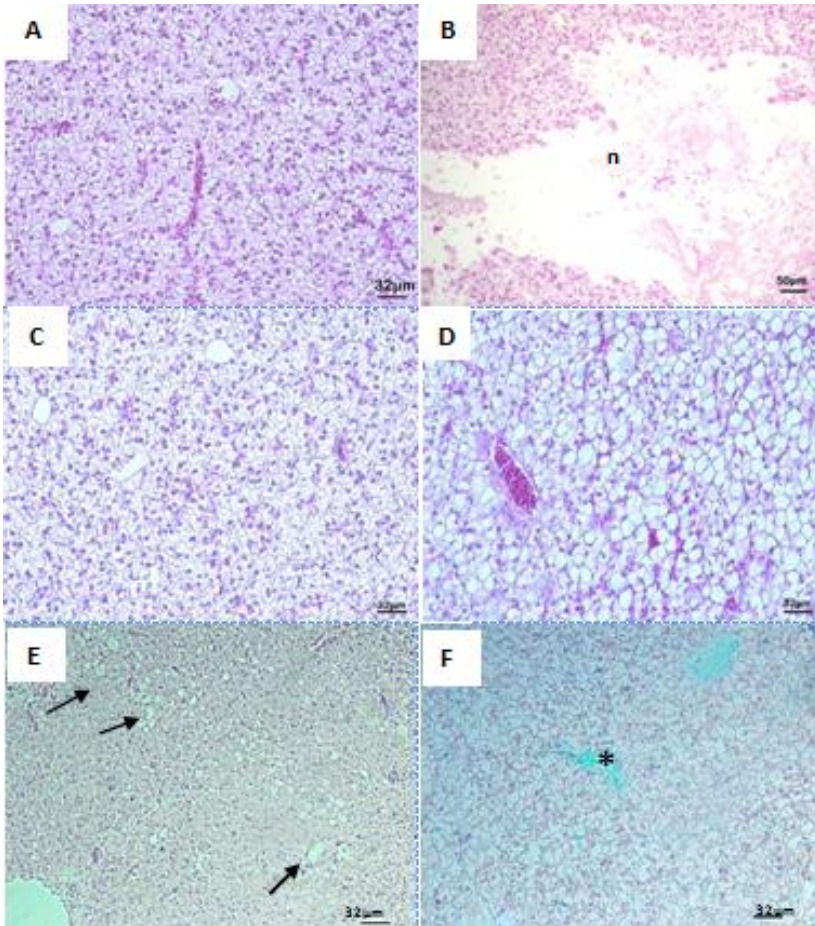


Fig. 3. Fotomicrografias do fígado de *Rhamdia quelen* imunizados e desafiados com terontes de *Ichthyophthirius multifiliis*. (A) Estrutura geral normal de peixe controle; (B) Necrose (n) em peixes imunizados; (C-D) Peixes não imunizados apresentando alterações nos hepatócitos; (E) Esteatose (seta preta) em peixe não imunizado. Coloração: HHE. (F) Fibrose (\*) em peixe imunizado. Coloração: tricrômico de Masson.



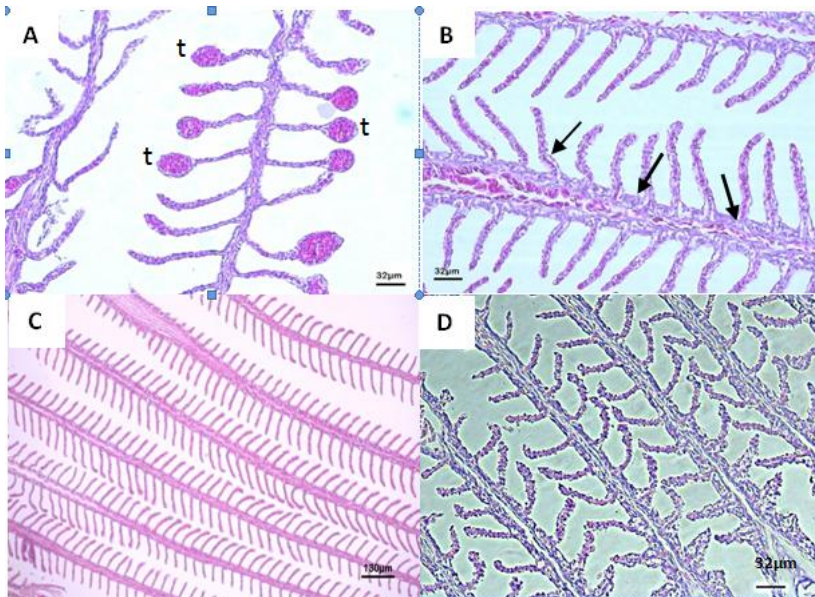


Fig. 4. Fotomicrografias de brânquias de *Rhamdia quelen* imunizados e desafiados com terontes de *Ichthyophthirius multifiliis*. (A) Telangiectasia (t) em peixe não imunizado; (B-C) Peixes não imunizados com edema (seta preta); (D) Epitélio corrugado em peixe imunizado. Coloração: HHE.

Tabela 1. Parâmetros de qualidade de água (média±desvio padrão) para cada ensaio de imunização após desafio com terontes de *Ichthyophthirius multifiliis*.

	Ensaio I	Ensaio II
Oxigênio dissolvido (mg.L <sup>-1</sup> )	6,09±0,91	7,18±1,57
Temperatura (°C)	25,66±0,97	25,91±1,55
pH	5,83±0,67	5,07±0,88
Amônia total (mg.L <sup>-1</sup> )	0,25±0,37	1,3±0,97
Nitrato (mg.L <sup>-1</sup> )	0,94±0,81	0,1±0,12
Nitrito (mg.L <sup>-1</sup> )	0,005±0,009	0,006±0,005

Tabela 2. Número de peixes com alterações seguido da porcentagem (entre parênteses) no rim de *Rhamdia quelen* imunizados e desafiados com terontes de *Ichthyophthirius multifiliis*.

	Alteração	Controle	NI 12.000	NI 22.000	I 12.000	I 22.000
Ensaio I	PHF	0 (0)	4 (50)	3 (50)	5 (62)	5 (55)
	NMET	6 (75)	3 (37)	5 (62)	4 (66)	6 (100)
	PM	1 (11)	3 (37)	7 (87)*	2 (33)	3 (60)
	H	6 (75)	7 (87)	4 (50)	4 (50)	3 (60)
	NIM	1 (12)	4 (50)	1 (12)	1 (16)	0 (0)
	ILM	0 (0)	4 (50)	4 (50)	4 (25)	0 (0)
		Alteração	Controle	NI 12.000	NI 22.000	I 12.000
Ensaio II	PHF	0 (0)	0 (0)	2 (40)	2 (28)	0 (0)
	NMET	0 (0)	5 (83)	5 (100)	4 (57)	3 (75)
	PM	1 (100)	3 (50)	1 (20)	5 (71)	4 (100)
	H	0 (0)	2 (28)	1 (20)	4 (57)	3 (75)
	NIM	0 (0)	3 (50)	3 (60)	3 (42)	2 (50)
	ILM	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

PHF – Pontos hemorrágicos focais. NMET – Necrose multifocal do epitélio tubular. PM – Presença de melanomacrófagos. H – Hialinização. NIM – Néfron imaturo. ILM – Infiltrado de leucócitos mononucleares. \*indica diferença significativa (p<0,05) em relação ao controle. NI - Não imunizado e desafiado com 22.000 terontes. I – Imunizado e desafiado com 12.000. I – Imunizado e desafiado com 22.000.



Tabela 3. Número de peixes com alterações seguido da porcentagem (entre parênteses) no fígado de *Rhamdia quelen*, imunizados e desafiados com terontes de *Ichthyophthirius multifiliis*.

Alteração		Controle	NI 12.000	NI 22.000	I 12.000	I 22.000
Ensaio I	N	3 (33)	6 (66)	4 (44)	5 (62)	5 (55)
	C	4 (44)	8 (88)	6 (66)	4 (50)	7 (77)
	HH	0 (0)	6 (66)*	4 (44)	4 (50)	6 (66)*
	AH	0 (0)	4 (44)*	5 (55)*	6 (75)*	6 (66)*
	PM	0 (0)	6 (66)*	1 (11)	3 (37)	1 (11)
	ILM	3 (33)	4 (44)	5 (55)	7 (87)	6 (66)
	FB	0 (0)	3 (66)	0 (0)	0 (0)	1 (11)
Alteração		Controle	NI 12.000	NI 22.000	I 12.000	I 22.000
Ensaio II	N	0 (0)	2 (25)	4 (44)	2 (25)	2 (22)
	C	2 (22)	8 (100)*	5 (55)	5 (62)	6 (66)*
	HH	3 (33)	8 (100)	7 (77)	3 (37)	8 (88)
	AH	0 (0)	1 (14)	3 (33)	7 (87)*	4 (44)*
	PM	0 (0)	2 (25)	1 (11)	0 (0)	0 (0)
	ILM	0 (0)	2 (25)	2 (22)	1 (11)	4 (44)
	FB	0 (0)	0 (0)	3 (33)	1 (14)	2 (22)

N – Necrose. C - Congestão. HH – Hipertrofia do hepatócito. AH – Atrofia do hepatócito. PM – Presença de melanomacrófagos. ILM – Infiltrado de leucócitos mononucleares. FB – Fibrose. \*indica diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle. NI - Não imunizado e desafiado com 22.000 terontes. I – Imunizado e desafiado com 12.000. I – Imunizado e desafiado com 22.000.

Tabela 4. Número de peixes com alterações seguido da porcentagem (entre parênteses) nas brânquias de *Rhamdia quelen* imunizados e desafiados com terontes de *Ichthyophthirius multifiliis*.

	Alteração	Controle	NI 12.000	NI 22.000	I 12.000	I 22.000
Ensaio I	EBLS	9 (100)	6 (66)	7 (77)	9 (100)	7 (77)
	T	1 (11)	2 (28)	1 (12)	2 (22)	1 (12)
	EC	8 (88)	5 (71)	7 (87)	8 (88)	6 (75)
	HCC	0 (0)	2 (25)	2 (25)	0 (0)	2 (25)
	HCM	2 (22)	3 (37)	4 (50)	4 (50)	4 (50)
	HI	0 (0)	1 (12)	3 (37)	0 (0)	0 (0)
	Alteração	Controle	NI 12.000	NI 22.000	I 12.000	I 22.000
Ensaio II	EBLS	3 (50)	4 (80)	3 (100)	5 (83)	3 (50)
	T	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (16)
	EC	4 (66)	4 (80)	3 (100)	5 (83)	6 (100)
	HCC	0 (0)	1 (20)	0 (0)	0 (0)	2 (33)
	HCM	0 (0)	2 (40)	1 (33)	0 (0)	0 (0)
	HI	1 (14)	1 (20)	0 (0)	1 (20)	3 (50)

EBLS – Edema na base da lamela secundária. T - Telangiectasia. EC – Epitélio corrugado. HCC – Hipertrofia na célula de cloreto. HCM – Hipertrofia na célula de muco. HI – Hiperplasia. \*indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle. NI - Não imunizado e desafiado com 22.000 terontes. I – Imunizado e desafiado com 12.000. I – Imunizado e desafiado com 22.000.

## CONCLUSÕES GERAIS

Este estudo fornece dados para subsidiar pesquisas sobre a utilização das vacinas na aquicultura como método imuno-profilático contra *Ichthyophthirius multifiliis*, protozoário ciliado que mais acomete os cultivos de jundiá (*Rhamdia quelen*). Embora alguns ajustes são sugeridos pelos autores, devido os entraves encontrados no decorrer dos ensaios, como a obtenção da cepa de teronte infectante, foi possível observar por meio das análises hematológicas, enzimáticas e histológicas a influência da imunização quando os peixes apresentaram maiores números de trombócitos, leucócitos, linfócitos, neutrófilos e monócitos 20 vinte dias após a imunização via i.p., aumento da atividade da catalase no fígado dos peixes imunizados via banho de imersão depois de 14 dias e as alterações histológicas nos hepatócitos do fígado, responsáveis pela função homeostática do organismo.

A vacinação com parasitos ainda é pouco conhecida quando comparada com o conhecimento gerado por estudos que são realizados com bactérias e vírus, devido a dificuldades de se obter um protocolo eficiente de manutenção do conteúdo de imunização devido à complexidade do parasito e seu ciclo de vida.

## REFERÊNCIAS INTRODUÇÃO GERAL

AALTONEN, T.M., VALTONEN, E.T.; JOKINEN, E.I. Humoral response of roach (*Rutilus rutilus*) to digenean *Rhipidocotyle fennica* infection. **Parasitology**, v. 114, p. 285-291, 1997.

ABBAS, A.K; LICHTMAN, A.H. **Basic Immunology: functions and disorders of the imune system**. 3<sup>rd</sup> ed. Saunders ELSEVIER; 2009.

ALISHAHI, M.; BUCHMANN, K. Temperature-independent protection against *Ichthyophthirius multifiliis* following immunization of rainbow trout using live theronts. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 72, p. 269-273, 2006.

ALVAREZ-PELLITERO, P. Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 126, p. 171–198, 2008.

AMARAL, H. Influência da Redejundiá na piscicultura do estado de Santa Catarina. In: BARCELLOS, L.J.G., FAGUNDES, M., FERREIRA, D. (Org.). **Workshop sobre jundiá: História e perspectivas**. Editora UPF, 266 p., 2013.

BAHMANROKH, M., WOO, P.T.K. The histopathology of cryptobiosis in juvenile *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **8th International Congress of Parasitology, Izmir, Turkey**, 2, 434, 1994.

BAILONE, R.L.; MARTINS, M.L.; MOURIÑO, J.L.P.; VIEIRA, F.N.; PEDROTTI, F.S.; NUNES, G.; SILVA, B.C. Hematology and agglutination titer after polyvalent immunization and subsequent challenge with *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 42, p. 221-227, 2010.

BALDISSEROTTO, B.; RADUNZ, J.N. **Criação de jundiá**. Santa Maria: Editora UFSM, 232 p., 2004.

BALDISSEROTTO, B.; RADUNZ, J.N.; BARCELLOS, L.G. Jundiá (*Rhamdia* sp.). In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. (Org.).

**Espécies nativas para piscicultura no Brasil.** Editora UFSM, 608 p., 2010.

BEAMISH, F.W.H.; SITJA-BOBADILLA A.; JEBBINK, J.A.; WOO, P.T.K. Bioenergetic cost of cryptobiosis in fish: rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) infected with *Cryptobia salmositica* and with an attenuated live vaccine. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 25, p. 1-8, 1996.

BORTZ, B.M.; KENNEY, G.E.; PAULEY, G.B.; GARCIA-ORTIGOZA, E.; ANDERSON, D.P. The immune response in immunized and naturally infected rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to *Diplostomum spathaceum* as detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Developmental & Comparative Immunology**, v. 8, p. 813-822, 1984.

BUCHMANN, K.; BRESCIANI, J. Monogenea (Phylum Platyhelminthes). In: WOO, P.T.K. **Fish diseases and disorders**, CAB, Oxfordshire, p. 297-344, 2006.

BURKART, M.A.; CLARK, T.G.; DICKERSON, H.W. Immunization of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque, against *Ichthyophthirius multifiliis* (Fouquet): killed versus live vaccines. **Journal of Fish Diseases**, v. 13, p. 401-410, 1990.

CARNEIRO, P.C.F.; SCHORER, E.; MIKOS, J.D. Conventional therapeutic treatments on the control of the parasite *Ichthyophthirius multifiliis* in *Rhamdia quelen*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, p. 99-102, 2005.

CHETTRI, J.K.; LEIBOWITZ, M.P.; OFIR, R.; ZILBERG, D. Protective immunization against *Tetrahymena* sp. infection in guppies (*Poecilia reticulata*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 27, n. 2, p. 302-308, 2009.

CLARK, T.G.; LIN, T.L.; DICKERSON, H.W. Surface antigen cross-linking triggers forced exit of a protozoan parasite from its host. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 6825-6829, 1996.

CROSS, D.G.; HURSEY, P.A. Cloramine-T for the control of *Ichthyophthirius multifiliis* (Fouquet). **Journal of Fish Biology**, v. 5, p. 789-798, 1973.

DAVY, C.M.; CRISPO, E.; WOO, P.T.K. Use of live vaccine to modulate *Cryptobia salmositica* infections in *Salmo salar*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 76, p. 45-48, 2007.

DICKERSON, H.W.; CLARK, T.G. Immune response of fishes to ciliates. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 6, p. 106-120, 1996.

DICKERSON, H.W.; BROWN, J.; DAWE, D.L.; GRATZEK, J.B. *Tetrahymena pyriformis* as a protective antigen against *Ichthyophthirius multifiliis* infection: comparisons between isolates and ciliary preparations. **Journal of Fish Biology**, v. 24, n. 5, p. 523-528, 1984.

DICKERSON, H.W.; LOHER, A.L.; GRATZEK, J.B. Experimental intraperitoneal infection of channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque) with *Ichthyophthirius multifiliis* (Fouquet). **Journal of Fish Diseases**, v. 8, p. 139-142, 1985.

DICKERSON, H.W. *Ichthyophthirius multifiliis*. In: Woo PTK, Buchmann K (eds) **Fish parasites: pathobiology and protection**. London UK: CAB; 2012. 383p.

EIRAS, J.C. Ciliophora. In: PAVANELLI, G.C.; TAKEMOTO, R.M.; EIRAS, J.C. (Org.). **Parasitologia de peixes de água doce do Brasil**. Maringá: Eduem, p. 233-247, 2013.

EIRAS, J. **Elementos de Ictioparasitologia**. Fundação Eng. Antônio de Almeida, Porto, 1993, 339 p.

ELLIS, A.E. Fish vaccination. **Aquaculture Information Series**, n. 4, p. 1-8, 1989.

ELLIOTT, A.M. Biology of *Tetrahymena*. **Annual Review of Microbiology**, v. 13, p. 79-96, 1959.

EWING, M.S.; BLACK, M.C.; BLAZER, K.M.; KOCAN, K.M. Plasma chloride and gill epithelial response of channel catfish infestation with

*Ichthyophthirius multifiliis*. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 6, p. 187-196, 1994.

FIGUEIREDO, H.C.P.; LEAL, C.A.G. Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 8-14, 2008.

FRACALOSSO, D.M.; MEYER, G.; SANTAMARIA, F.M.; WEINGARTNER, M.; ZANIBONI FILHO, E. Desempenho do jundiá, *Rhamdia quelen*, e do dourado, *Salminus brasiliensis*, em viveiros de terra na região Sul do Brasil. **Acta Scientiarum**, v. 26, n. 3, p. 345-352, 2004.

GANNICOTT A.M.; TINSLEY, R.C. Larval survival characteristics and behaviour of the gill monogenean *Discocotyle sagittata*. **Parasitology**, v. 117, p. 491-498, 1998a.

GANNICOTT A.M.; TINSLEY, R.C. Environmental effects on transmission of *Discocotyle sagittata*. **Parasitology**, v. 117, p. 499-504, 1998b.

GOMES, A.R.C.; GOLOMBIESKI, J.I.; GOMES, A.R.C.; BALDISSEROTTO, B. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 179-185, 2000.

GUDDING, R.; LILLEHAUGA, A.; EVENSEN, O. Recent developments in fish vaccinology. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 72, p. 203-212, 1999.

HINES, R.S.; SPIRA, D.T. *Ichthyophthirius multifiliis* (Fouquet) in the mirror carp, *Cyprinus carpio* (L.). I. Course of infection. **Journal of Fish Biology**, v. 5, p. 385-392, 1973.

HOFFMAN, G.L.; BAUER, O.N. Fish parasitology in water reservoirs: review. In: Reservoir Fisheries and Limnology. Special publication, Washington, DC. **American Fisheries Society**, v. 8, p. 459-551, 1971.

HOUGHTON, G.; MATTHEWS, R.A.; HARRIS, J.E. Vaccination against Protozoan and Helminth Parasites of Fish. In: ELLIS, A.E. **Fish Vaccination**, Academic Press, San Diego, CA, 224-236, 1988.

HOUGHTON, G.; HEALEY, L.J.; MATTHEWS, R.A. The cellular proliferative response, humoral antibody response, and cross reactivity studies of *Tetrahymena pyriformis* with *Ichthyophthirius multifiliis* in juvenile carp (*Cyprinus carpio* L.). **Developmental & Comparative Immunology**, v. 16, n. 4, p. 301-312, 1992.

INNES, E.A., BARTLEY, P.M.; ROCCHI, M.; BENAVIDAS-SILVAN, J.; BURRELLS, A.; HOTCHKISS, E.; CHIANINI, F.; CANTON, G.; KATZER, F. Developing vaccines to control protozoan parasites in ruminants: Dead or alive? **Veterinary Parasitology**, v. 180, p. 155-163, 2011.

KIM, H.K.; HWANG, Y.J.; CHO, J.B.; PARK, SI. Immunization of cultured juvenile rockfish *Sebastes schlegeli* against *Microcotyle seabastis* (Monogenea). **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 40, p. 29-32, 2000.

KLESZIUS, P.H.; EVANS, J.; SHOEMAKER, C.A. Warmwater fish vaccinology in catfish production. **Animal Health Research Reviews**, v. 5, p. 305-311, 2004.

LI, S.; WOO, P.T.K. Efficacy of a live *Cryptobia salmositica* vaccine, and the mechanism of protection in vaccinated *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) against cryptobiosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 48, p. 343 -353, 1995.

LI, S.; WOO, P.T.K., Vaccination of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) against cryptobiosis: efficacy of the vaccine in fresh and sea water. **Journal of Fish Diseases**, v. 20, p. 369-374, 1997.

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



MARTINS, M.L., MARCHIORI, N.; NUNES, G., RODRIGUES, M.P. First record of *Trichodina heterodentata* (Ciliophora: Trichodinidae) from channel catfish, *Ictalurus punctatus* cultivated in Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, p. 637-644, 2010.

MARTINS, M.L, SHOEMAKER, C.A, XU, D-H, KLESIUS, P.H. Effect of parasitism on vaccine efficacy against *Streptococcus iniae* in Nile tilapia. **Aquaculture**, v. 314, p. 18-23. 2011a.

MARTINS, M.L.; XU, D-H.; SHOEMAKER, C.A.; KLEISUS, P.H. Temperature effects on immune response and hematological parameters of channel catfish *Ictalurus punctatus* vaccinated with live theronts of *Ichthyophthirius multifiliis*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 31, p. 774-780, 2011b.

NOGA, E.J. **Fish disease: diagnosis and treatment**. Iwoa, EUA, Ed. Wiley-Blackwell, 2<sup>a</sup> ed, 2010, 519p.

PÁDUA, S.B; MENEZES-FILHO, R.N; DIAS-NETO, J.; JERÔNIMO, G.T; ISHIKAWA, M.M; MARTINS, M.L. Ictiofitiríase: conhecendo a doença para elaborar estratégias de controle. **Panorama da Aquicultura**, v. 22, n. 131, 22-31, 2012.

PEREIRA, G.V.; SILVA, B.C.; VIEIRA, F.N.; SEIFERT, W.Q.; USHIZIMA, T.T.; MOURIÑO, J.L.P.; MARTINS M.L. Vaccination strategies with oral booster for surubim hybrid (*Pseudoplatystoma corruscans* x *P. reticulatum*) against haemorrhagic septicaemia. **Aquaculture Research**, p. 1-11, 2013 online view.

PORTZ, L.; ANTONUCCI, A.M.; UEDA, B.H.; DOTTA, G.; GUIDELLI, G.; ROUMBEDAKIS, K.; MARTINS, M.L.; CARNIEL, M.K.; TAVECHIO, W.L.G. Parasitos de peixes de cultivo e ornamentais. In: **Parasitologia de peixes de água doce do Brasil**. PAVANELLI, G.C.; TAKEMOTO, R.M.; EIRAS, J.C. (eds), EDUEM, Maringá, p. 85-114, 2013.

POST, G.W. **Textbook of fish health**. Ed. Rev. Neptune City. T.F.H. Publications, 1987, 288 p.

PRIETO, A.; FAJER, E.; VINJOY, M. **Manual para la prevencion e el tratamiento de enfermedades en peces de cultivo en agua doce.** Santiago: FAO, 1991, 65 p.

RUBIO-GODOY, M.; SIGH, J.; BUCHMANN, K.; TINSLEY, R.C. Immunization of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* against *Discocotyle sagittata* (Monogenea). **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 55, p. 23-30, 2003.

SELOSSE, P. M.; ROWLAND, S. J. Use of common salt treat ichthyophthiriasis in Australian warm water fishes. **The Progressive Fish Culturist**, v. 52, p. 124-127, 1990.

SHOEMAKER, C.A.; MARTINS, M.L.; XU, D-H., KLEISUS, P.H. Effect of *Ichthyophthirius multifiliis* parasitism on the survival, hematology and bacterial load in channel catfish previously exposed to *Edwardsiella ictaluri*. **Parasitology Research**, v. 111, p. 2223-2228, 2012.

SIGH, J.; LINDENSTROM, T.; BUCHMANN, K. The parasitic ciliate *Ichthyophthirius multifiliis* induces expression of immune relevant genes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Journal of Fish Diseases**, v. 27, n. 7, p. 409-417, 2004.

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

SILVERGRIP, A.M.C. **A systematic revision of the neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae).** 156 f. Tese (Doutorado), Swedish Museum Natural History, Stockholm, Sweden, 1996.

SPEED, P.; PAULEY, G.B. Feasibility of protecting rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, by immunizing against the eye fluke, *Diplostomum spathaceum*. **Journal Fish Biology**, v. 26, p. 739-744, 1985.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R.; MARTINS, M.L. Fauna parasitária de peixes oriundos de “pesque-pague” do município de Franca, São Paulo, Brasil. I. Protozoários. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 18, n. 1, p. 67-79, 2001.

TIEMAN, D. M.; GOODWIN, A. E. Treatments for ich infestations in channel catfish evaluated under static and flow-through water conditions. **North American Journal of Aquaculture**, v. 63, p. 293-299, 2001.

TONGUTHAI, K. Control of freshwater fish parasites: a southeast Asian Perspective. **International Journal for Parasitology**, v. 27, n. 10, p. 1185- 1191, 1997.

TONHEIM, T.C.; BOGWALD, J.; DALMO, R.A. What happens to the DNA vaccine in fish? A review of current knowledge. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 25, n. 1-2, p. 1-18, 2008.

TURKEWITZ, A.P.; ORIAS, E.; KAPLER, G. Functional Genomics: The coming of age for *Tetrahymena thermophila*. **Trends in Genetics**, v. 18, p. 35-40, 2002.

VANDERBERG, G.W. Oral vaccines for finfish: academic theory or comercial reality? **Animal Health Research Reviews**, v. 5, p. 301-304, 2004.

WILLIAMS, H; JONES, A. **Parasitic worms of fish**. Taylor & Francis, London, 1994, 593p.

WOO, P.T.K. Immune response of fish to parasitic protozoa. **Parasitology Today**, v. 3, n. 6, p. 186-188, 1987a.

WOO, P.T.K. *Cryptobia* and cryptobiosis in fishes. **Advances in Parasitology**, v. 26, p. 199–237, 1987b.

WOO, P.T.K. *Cryptobia* and cryptobiosis in fishes. In: BAKER JR, MULLER, R (eds) **Advances in Parasitology**. Academic Press, London, p 199-237, 1987c.

WOO, P.T.K. Flagellate parasites of fishes. In: KREIER, J.P (ed). **Parasitic Protozoa**, v. 8, 2ed, Academic Press, New York, p 1-80, 1994, 328 p.

WOO, P.T.K. Protective immunity in fish against protozoan diseases. **Parassitologia**, v. 49, p. 185-191, 2007.

WOO, P.T.K.; WEHNERT, S. Direct transmission of a haemoflagellate, *Cryptobia salmositica* Katz, 1951, (Kinetoplastida: Bodonina) between rainbow trout under laboratory conditions. **Journal of Protozoology**, v. 39, p. 334-337, 1983.

WOO, P.T.K.; LI, S. *In vitro* attenuation of *Cryptobia salmositica* and its use as a live vaccine against cryptobiosis in *Oncorhynchus mykiss*. **Journal of Parasitology**, v. 76, p. 752-755, 1990.

WOO, P.T.K.; POYNTON, S. Diplomonadida, Kinetoplastida and Amoebida. In: P.T.K. WOO (Editor). **Fish Diseases and Disorders I. Protozoan and Metazoan Infections**. CAB International, Oxon, U.K. p. 27-96, 1995, 791 p.

WOO, P.T.K.; BUCHMANN, K. **Fish parasites: pathobiology and protection**. CAB, London, UK, 2012, 383p.

XU, D-H.; KLESIUS, P.H.; SHELBY, R.A. Immune responses and host protection of channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), against *Ichthyophthirius multifiliis* after immunization with live theronts and sonicated trophonts. **Journal of Fish Diseases**, v. 27, n. 3, p. 135-141, 2004a.

XU, D-H.; KLESIUS, P.H. Two years study on the infectivity of *Ichthyophthirius multifiliis* in channel catfish *Ictalurus punctatus*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 59, p. 131-134, 2004b.

XU, D-H.; SHOEMAKER, C.A.; KLESIUS, P.H. *Ichthyophthirius multifiliis* as a potential vector of *Edwardsiella ictaluri* in channel catfish. **FEMS Microbiology Letters**, v. 329, p. 160–167, 2012a.

XU, D-H.; PRIDGEON, J.W.; KLESIUS, P.H.; SHOEMAKER, C.A. Parasitism by protozoan *Ichthyophthirius multifiliis* enhanced invasion

of *Aeromonas hydrophila* in tissues of channel catfish. **Veterinary Parasitology**, v. 184, p. 101-107, 2012b.

YAMBOT, A.V.; SONG, Y.L. Immunization of grouper, *Epinephelus coioides*, confers protection against a protozoan parasite, *Cryptocaryon irritans*. **Aquaculture**, v. 260, n. 1-4, p. 1-9, 2006.

YANONG, R.P.E. Use of vaccines in finfish aquaculture. **Institute of Food and Agricultural Sciences (IFAS)**, FA 156, 2011.