



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

PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS DE
TILÁPIA DO NILO IMUNIZADA COM VACINA POLIVALENTE E
DESAFIADA COM *Aeromonas hydrophila*

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Aquicultura
como parte dos requisitos necessários
para obtenção do título de Mestre em
Aquicultura.

Orientador: Maurício Laterça Martins
Coorientador: Cláudio Manoel Rodrigues de Melo

RICARDO LACAVA BAILONE

Florianópolis/SC
2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Bailone, Ricardo Lacava,

Parâmetros hematológicos e imunológicos de tilápia do Nilo imunizada com vacina polivalente e desafiada com *Aeromonas hydrophila* [dissertação] / Ricardo Lacava Bailone. – 2010.

52 p.: 5 tabs.

Orientador: Maurício Laterça Martins

Coorientador: Cláudio Manoel Rodrigues de Melo

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura.

1. *Oreochromis niloticus*; 2. vacinação; 3 bacteriose; 4. desafio.

**Parâmetros hematológicos e imunológicos de tilápia do Nilo
imunizada com vacina polivalente e desafiada com
Aeromonas hydrophila.**

Por

RICARDO LACAVA BAILONE

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 Aquicultura.

Prof. Cláudio Manoel Rodrigues de Melo, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Dr. Cláudio Manoel Rodrigues de Melo - *Orientador*

Dr. Evoy Zaniboni Filho

Dra. Fabiana Pilarski

Dra. Mônica Yumi Tsuzuki

Dr. Vinícius Ronzani Cerqueira

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Maurício Laterça Martins tanto pelos ensinamentos profissionais como pelos ensinamentos do dia a dia.

Ao meu co-orientador Cláudio Melo pela força e comprometimento para a realização da defesa da dissertação.

Aos antigos amigos e aos novos que me acompanharam nessa jornada: José Luís, Bruno, Gustavo, Fabíola e Gisele.

A CAPES, pelo auxílio concedido através de uma bolsa de mestrado.

Ao Instituto André Tosello, pela colaboração, cedendo cepas bacterianas para a formulação da vacina e dose do desafio.

Aos meus pais, José Carlos e Silvana, que mesmo longe sempre me apoiaram para que conseguisse passar por mais esta fase da minha vida. Igualmente aos meus irmãos André e Cíntia.

A minha família, primeiramente a minha esposa Hirla que me suportou nos momentos difíceis e me deu força para superá-los, lutando sempre do meu lado; ao meu filho Raul, que veio a vida neste período, me trazendo outra perspectiva do que é a vida; e à minha filha Maitê, por me fazer correr um pouco mais contra o tempo.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

E a todos que criaram empecilhos para o impedimento e/ou retardamento deste trabalho, pois o que não me derruba me fortalece!

Obrigado a todos!

RESUMO

Este estudo avaliou o efeito de vacina polivalente sobre as respostas hematológica e imunológica da tilápia do Nilo desafiada com *Aeromonas hydrophila*. Duas doses de vacina (1×10^4 e 1×10^8 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) \times mL⁻¹), contendo proporções iguais de *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus durans* inativadas em formalina, foram testadas por injeção intraperitoneal (i.p.). Os peixes foram desafiados seis dias após a vacinação i.p. com a dose de desafio de 1×10^7 UFC de *A. hydrophila* \times mL⁻¹ diluída em 1 mL de solução salina estéril. Seis dias após a imunização e 48h após o desafio, foi realizada a análise hematológica, atividades antimicrobiana e aglutinante do soro. Antes do desafio, o número de eritrócitos foi superior nos peixes vacinados com 1×10^8 UFC \times mL⁻¹. Após o desafio, o número total de trombócitos também foi maior nos peixes vacinados com a maior dose. Antes e após o desafio, o número total de leucócitos e o número de linfócitos apresentaram os maiores valores nos peixes vacinados. O número de monócitos nos peixes vacinados e nos injetados com salina foi maior antes do desafio. Após a imunização e o desafio, o soro de peixes vacinados com a maior dose apresentaram maior título de aglutinação contra *A. hydrophila*, *P. aeruginosa* e *E. durans*. Antes do desafio a atividade antimicrobiana do soro foi maior nos peixes não vacinados e nos vacinados com a maior dose, sendo que após o desafio os peixes não vacinados e os injetados com salina apresentaram maior atividade antimicrobiana. Este estudo mostrou que após seis dias, a vacina polivalente na concentração de 1×10^8 UFC \times mL⁻¹ estimulou a produção de eritrócitos, leucócitos, trombócitos e linfócitos circulantes e reduziu os níveis de glicose.

Palavras-chaves: vacinação, bacteriose, desafio

Hematological and immunological parameters of Nile tilapia immunized with polyvalent vaccine and challenged with *Aeromonas hydrophila*

ABSTRACT

This study evaluated the effects of polyvalent vaccination on the hematological and immunological responses in Nile tilapia challenged against *Aeromonas hydrophila*. Two doses of vaccine (1×10^4 and 1×10^8 Colony Forming Unit (CFU) \times mL⁻¹), containing the same quantities of *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus durans* inactivated by formalin were tested by intraperitoneal (i.p.) injection. Fish were challenged six days after vaccination i.p. with the dose of challenge of 1×10^7 CFU *A. hydrophila* \times mL⁻¹ diluted in 1 mL sterile saline solution. Six days after immunization and 48h after challenge hematological parameters, antimicrobial and agglutinant activities of serum were analyzed. Before challenge, the number of erythrocytes was higher in fish vaccinated with 1×10^8 CFU \times mL⁻¹, and after challenge, total number of thrombocytes was higher in those that received the greatest dose of vaccine. Before and after challenge, total number of leukocytes and the number of lymphocytes showed the highest values in vaccinated fish. The number of monocytes in fish vaccinated and saline injected was higher before challenge. After immunization and challenge, the serum of fish vaccinated with the highest dose showed the highest agglutination titer against *A. hydrophila*, *P. aeruginosa* e *E. durans*. Before challenge, high values of antimicrobial activity of serum of non-vaccinated fish and fish vaccinated with the highest dose was observed. Therefore, after challenge, non-vaccinated fish and saline injected ones showed the highest antimicrobial activity. This study showed that six days after immunization with a polyvalent vaccine in a concentration of 1×10^8 CFU \times mL⁻¹ stimulated the production of erythrocytes, leukocytes, thrombocytes and circulating lymphocytes, but reduced the glucose levels.

Key words: vaccination, bacteriosis, challenge

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Taxa de mortalidade em tilápia do Nilo 96h após injeção intraperitoneal com solução salina estéril; dose 1 (1×10^5); dose 2 (1×10^6); dose 3 (1×10^7) e dose 4 (1×10^8) UFC de *Aeromonas hydrophila* x mL⁻¹, para a determinação da dose de desafio..... 29

TABELA 2 - Concentração de glicose, percentual de hematócrito e contagens totais de eritrócitos, trombócitos e leucócitos no sangue de tilápia do Nilo, antes (6 dias após imunização) e 48h após o desafio com *Aeromonas hydrophila*, em peixes não vacinados (controle); injetados com 1 mL de solução salina estéril; vacinados com 1×10^4 e com 1×10^8 UFC de bactérias inativadas x mL⁻¹. Letras distintas indicam diferença significativa pelo teste SNK de comparação de médias ($p < 0,05$)..... 31

TABELA 3 - Contagem diferencial de leucócitos no sangue de tilápia do Nilo, antes (6 dias após imunização) e 48h após o desafio com *Aeromonas hydrophila*, em peixes não vacinados (controle), injetados com 1 mL de solução salina estéril; vacinados com 1×10^4 e com 1×10^8 UFC de bactérias inativadas x mL⁻¹. Letras distintas indicam diferença significativa pelo teste SNK de comparação de médias ($p < 0,05$)..... 32

TABELA 4 - Atividade aglutinante ($\log_2 (x+1)$) do soro sanguíneo de tilápia do Nilo contra *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus durans* antes (6 dias após imunização) e 48h após a infecção com *A. hydrophila*, nos peixes não vacinados (controle); injetados com 1 mL de solução salina estéril; vacinados com 1×10^4 e com 1×10^8 UFC de bactérias inativadas x mL⁻¹. Letras distintas indicam diferença significativa pelo teste SNK de comparação de médias ($p < 0,05$)..... 33

TABELA 5 - Atividade antimicrobiana ($\log_2 (x+1)$) do soro sanguíneo de tilápia do Nilo contra *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus. durans* e *Escherichia coli*, antes (6 dias após imunização) e 48h após a infecção com *A. hydrophila*, nos peixes não vacinados (controle); injetados com 1 mL de solução salina estéril; vacinados com 1×10^4 e com 1×10^8 UFC de bactérias inativadas x mL⁻¹. Letras distintas indicam diferença significativa pelo teste SNK de comparação de médias ($p < 0,05$) 34

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
Bacteriose em peixes	11
Ferramentas de avaliação	13
Importância da vacinação em peixes.....	15
OBJETIVOS	18
CAPÍTULO ÚNICO – Parâmetros hemato-imunológicos em tilápia do Nilo imunizada com vacina polivalente e desafiada com <i>Aeromonas hydrophila</i>	19
Resumo	20
Abstract.....	21
Introdução	22
Materiais e Métodos.....	25
Material Biológico	25
Dose de desafio para <i>Aeromonas hydrophila</i>	25
Produção da vacina	25
Vacinação e desafio	26
Hemograma e glicose plasmática.....	26
Atividade antimicrobiana do soro sanguíneo dos peixes	27
Atividade aglutinante do soro	27
Análise estatística.....	28
Resultados e Discussão	29
Dose de desafio para <i>Aeromonas hydrophila</i>	29
Hematologia e glicose plasmática.....	29
Titulo de aglutinação.....	32
Atividade antimicrobiana	34
Conclusões.....	36
Referências Bibliográficas	37
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO.....	44

INTRODUÇÃO

Segundo a FAO (2008), a produção mundial de tilápia e outros ciclídeos teve uma grande ascensão nas últimas duas décadas, atingindo cerca de 250.000 toneladas em 2006. A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) apresenta diversas características positivas para criação em cativeiro, destacando-se sua fisiologia, reprodução, genética e, principalmente, mercado (FITZSIMMONS, 2000). Possui uma grande vantagem no que diz respeito ao conhecimento técnico disponível, tanto no campo da biologia quanto no da piscicultura propriamente dita (BORGES, 1996). Devido a importância desta espécie na aquicultura, muitos aspectos de sua criação vêm sendo estudados (DEGANI e REVACH, 1991).

O rápido desenvolvimento da produção aquícola, principalmente devido a intensificação dos sistemas de produção, favorece condições estressantes para peixes cultivados culminando em enfermidades e perdas econômicas (SCHRECK, 1996). Criações intensivas de peixes são frequentemente limitadas pela alta mortalidade decorrente de doenças infecciosas, principalmente as causadas por bactérias (HANSEN e OLAFSEN, 1999; SKJERMO e VADSTEIN, 1999).

Em condições adequadas, patógenos podem estar presentes nos peixes sem causarem maiores danos (ROBERTS, 1981). Contudo, quando o equilíbrio é quebrado, por alterações do sistema ambiente-parasito-hospedeiro (TAVARES-DIAS *et al.*, 1999a) representam grave ameaça ao sucesso das criações (MORAES e MARTINS, 2004). Os prejuízos causados aos hospedeiros variam em função das espécies parasitadas, número de parasitos, lesão no tecido e status sanitário do peixe (TAVARES-DIAS *et al.*, 1999b).

Dentre os principais desafios para o desenvolvimento da aquicultura, destacam-se a melhoria do desempenho e resistência as enfermidades dos organismos cultivados. As enfermidades de origem bacteriana representam grandes prejuízos econômicos e consistem em um dos fatores limitantes na criação de peixes, incluindo a tilápia do Nilo (ABDEL-TAWWAB *et al.*, 2008).

Bacterioses em peixes

Por fazer parte da microbiota da água de rios e tanques, as bactérias podem intensificar seu potencial patogênico quando condições físicas e químicas do ambiente estiverem alteradas (WALTERS e PLUMB, 1980). A maioria utiliza matéria orgânica e mineral do

ambiente aquático para crescerem e se multiplicarem, e quando favorecidas, as bactérias são capazes de invadir o ambiente nutricionalmente vantajoso dos tecidos dos peixes e iniciarem processos infecciosos (FRERICHS, 1989).

Na criação de tilápias, as bactérias do gênero *Aeromonas*, *Pseudomonas* e *Enterococcus* são frequentemente isoladas quando ocorrem surtos de mortalidades (PLUMB, 1999; MORAES e MARTINS, 2004).

Aeromonas hydrophila, bactéria oportunista que acomete grande variedade de espécies de peixes de água doce, é considerada de ampla distribuição geográfica. Causa mortalidade massiva, inclusive nos ciprinídeos, sendo o agente etiológico de várias doenças (RAHMAN *et al.*, 1997). Bastonete móvel Gram-negativo responsável pela septicemia hemorrágica caracteriza-se pela presença de pequenas lesões superficiais, hemorragias locais, particularmente nas brânquias e opérculos, úlceras, abscesso, exoftalmia, distensão abdominal, acúmulo de líquido ascítico e anemia. Sua presença é maior em temperaturas mais elevadas, particularmente na aquicultura de países tropicais, sendo um grave problema econômico (AUSTIN e AUSTIN, 1987). Segundo 'Food and Drug Administration', FDA (1999), *A. hydrophila* pode causar infecções também em humanos pela ingestão de um número suficiente de bastonetes através do alimento ou da água. No homem ela, provoca gastroenterite, meningite, úlcera de córnea e, sobretudo, enfermidade respiratória e intestinal. De acordo com RALL *et al.* (1998), no Brasil, as bactérias do gênero *Aeromonas* são descritas como patógenos emergentes de importância crescente em alimentos.

Segundo Costa (2004), *Pseudomonas* spp. são bactérias Gram-negativas, encontradas na água e na microbiota normal dos peixes, agindo como invasores secundários em peixes parasitados ou submetidos a estressores. *Pseudomonas aeruginosa*, bactéria não fermentativa e aeróbia obrigatória, ocupa um vasto habitat na natureza, sendo saprófita na água e solos úmidos (resiste pouco a dessecação) ou na superfície dos vegetais. É um patógeno oportunista, geralmente associado aos fatores predisponentes como: ferimentos; infecções parasitárias ou fúngicas. Vive igualmente em estado comensal no intestino dos animais e homem, sendo que sua presença nestes locais reflete o grau de exposição as fontes ambientais, tais como: água e solo (PALLERONI, 2005). *P. aeruginosa* é conhecida como patógeno mais oportunista em organismos imunossuprimidos e debilitados (PIER e RAMPHAL, 2005). Destaca-se por apresentar elevado potencial de

patogenicidade e resistência a terapia antimicrobiana (STOVER *et al.*, 2000).

Os Enterococos têm um potencial crescente como agente de sérias infecções, mas pouco se sabe sobre a virulência dos mesmos. Esta falta de informação pode ser atribuída ao fato de que os enterococos, os quais vivem normalmente como comensais na microbiota intestinal de indivíduos saudáveis, possuem traços de virulência muito sutis, não facilmente identificados (SHANKAR *et al.*, 1999). *Enterococcus durans* são cocos Gram-positivos que geralmente se dispõem em pares e cadeias curtas. São anaeróbios facultativos e a temperatura ótima de crescimento é de 35°C, embora a maioria dos microrganismos se desenvolva entre 10 e 45°C. Apresentam crescimento rápido em meios de cultura suplementados com sangue, produzindo colônias brancas após 24 horas de incubação (FACKLAN *et al.*, 1999).

Ferramentas de avaliação

Segundo Hrubec *et al.* (2000), existem poucas ferramentas de diagnóstico disponíveis para a avaliação de enfermidades em peixes. Uma vez que a aquicultura já se consolidou, torna-se necessário o desenvolvimento de métodos eficientes de diagnóstico. Características bioquímicas, metabólicas e hematológicas podem ser utilizadas para avaliação do estresse (CARNEIRO e URBINATI, 2001).

Em peixes, os parâmetros hematológicos variam em decorrência de fatores fisiológicos e ecológicos, como sexo, estágio de desenvolvimento gonadal, estresse, infecções, peso e comprimento corpóreo (LUSKOVÁ, 1998). Hematócrito, concentração de hemoglobina e número de linfócitos são consideradas variáveis sanguíneas indicadoras auxiliares da resposta ao estresse em peixes (CARNEIRO e URBINATI, 2001, MARTINS *et al.*, 2008).

A função de cada componente celular sanguíneo em peixes ainda é pouco elucidada (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004). Os linfócitos de peixes participam do processo inflamatório (LAMAS *et al.*, 1994), atuando como células imunocompetentes (RUIZ *et al.*, 2003). Lewis *et al.* (1979) reportaram a presença de receptores de superfície para eritrócitos nos linfócitos pequenos de *Ictalurus punctatus*, análogos aos linfócitos ‘T’ dos mamíferos. Os grandes, por sua vez, apresentavam imunoglobulinas de superfície e aderência a células de *A. hydrophila*, sendo análogos aos linfócitos B.

Segundo Siwick *et al.* (1998), imunostimulantes como vacinas, leveduras, lipopolissacarídeos e adjuvantes aumentam a resposta

proliferativa de linfócitos 'T' e 'B', bem como a mobilização enzimática e a atividade fagocitária de neutrófilos. Os neutrófilos têm papel importante na defesa contra infecções e possuem um sistema de agentes microbicidas (VALE *et al.*, 2002), sendo os leucócitos com maior atividade migratória (GRIFFIN, 1984).

Os monócitos também têm atividade fagocitária, além de transformarem-se em macrófagos e migrarem para o foco inflamatório, auxiliando neste processo (GRIFFIN, 1984). Meseguer *et al.* (1994), demonstrando reação positiva de eosinófilos frente a peroxidase, sugeriram que essas células estejam envolvidas no processo fagocitário e microbicida.

Relatos sugerem que os trombócitos estejam envolvidos na coagulação sanguínea (FISCHER *et al.*, 1998), reduzindo a predisposição a infecções (KOZINSKA *et al.*, 1999), além de apresentarem atividade fagocitária em peixes cartilagosos (WALSH e LUER, 1998) e teleósteos (HILL e ROWLEY, 1996). Martins *et al.* (2006), estudando a reação inflamatória em *Piaractus mesopotamicus* induzida pela carragenina, observou que a migração celular para a bexiga natatória foi na maioria de trombócitos.

Segundo Tavares-Dias e Moraes (2004), assim como os demais leucócitos, a função das células granulocíticas especiais não está bem elucidada. Martins *et al.* (2000) observaram elevado número dessas células circulantes em *P. mesopotamicus* injetados com carragenina.

O nível de glicose no sangue de peixes demonstra ser indicador sensível ao estresse ambiental (SILBERGELD, 1974; IWAMA *et al.*, 1995). Peixes teleósteos, em geral são intolerantes a glicose. Tilápias, por não consumirem fontes contendo elevado teor de glicose no ambiente, evoluíram sem mecanismo para redução rápida dos níveis sanguíneos (WRIGHT *et al.*, 2000). Este estado é provavelmente devido a resposta periférica ineficiente para os efeitos glicostáticos da insulina (como o que ocorre em *diabetes mellitus* humana), do que a secreção de insulina inadequada (MOMMSEN e PLISETSKAYA, 1991).

Atuando como barreira natural contra a entrada de patógenos em peixes, a pele e o muco também contem substâncias com ação imune (OURTH, 1980). Assim como os demais vertebrados, para resistir a doenças bacterianas, os peixes contam com sistema imune específico (ou adaptativo) e não específico (ou inato), entre mecanismos humorais e celulares (ELLIS, 1999).

A resposta humoral não específica inclui a produção de substâncias inibitórias de crescimento microbiano e lisinas. Em teleósteos, o sistema imune não específico tem mais importância que o

específico por possuírem apenas um tipo de imunoglobina (ANDERSON, 1992; ANDERSON *et al.*, 1992). A fagocitose, realizada principalmente por neutrófilos e macrófagos, faz parte da resposta celular inata (ELLIS, 1999). Os fagócitos contêm enzimas líticas. Quando estimulados por bactérias, produzem espécies reativas de oxigênio durante o processo de explosão respiratória, as quais são altamente bactericidas (ANDERSON, 1992; ELLIS, 1999).

Os anticorpos participam da defesa humoral específica, inibindo a aderência de bactérias ou invasão de células não fagocitárias e neutralizando toxinas bacterianas (ELLIS, 1999). Além dos anticorpos (GRAVNINGEN *et al.*, 2008), as lectinas atuam no processo de aglutinação dos antígenos. Presentes no soro sanguíneo dos peixes, são proteínas que se ligam a açúcares da superfície de bactérias (ARASON, 1996).

A resposta celular específica é composta principalmente por leucócitos (linfócitos, monócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos) e células citotóxicas (SECOMBES, 1996). Os linfócitos também participam da resposta humoral, e podem ser de dois tipos: 'B', diferenciando em plasmócitos e célula de memória; e 'T', atuando especificamente no reconhecimento de antígenos, migração para o sítio infectado e destruição de células infectadas, além do controle da resposta imune (TIZARD, 2002).

Estudando parâmetros hematológicos em tilápias desafiadas com *Enterococcus sp.* Martins *et al.* (2008) observaram aumento do número de trombócitos, linfócitos e hematócrito nos peixes infectados. Contudo, os níveis de glicose e número de eritrócitos não foram influenciados, o que foi sugerido pelos autores ser devido ao inóculo insuficiente para provocar alteração destes parâmetros ou da hematopoiese.

Importância da vacinação em peixes

Em relação as bacterioses, a profilaxia baseada no isolamento sanitário é difícil de ser alcançada devido a presença de outras espécies de peixes e invertebrados no meio e até mesmo pela qualidade da água. Já a antibioticoterapia, frequentemente utilizada na criação intensiva de larvas, pode resultar no aumento da resistência microbiana, acúmulo de resíduo nos tecidos (VADSTEIN, 1997) e imunossupressão (VAN MUISWINKEL *et al.*, 1985).

Portanto, a imunoprofilaxia através da estimulação do sistema imune específico e não específico dos peixes é a chave para o desenvolvimento de uma produção sustentável nos ecossistemas

aquáticos (GUDDING *et al.*, 1999). A vacinação, utilizando agentes inativados, é considerada um método preventivo, além de contribuir para a redução do uso de quimioterápicos e antimicrobianos (GUDMUNDSDÓTTIR e BJÖRNSDÓTTIR, 2007).

É necessário o desenvolvimento de programas de imunização contra enfermidades e para o uso de produtos preventivos, ecologicamente seguros, a fim de manter a saúde de animais aquáticos. Assim, torna-se importante investir na pesquisa de produtos imunológicos polivalentes e de amplo espectro, podendo ser utilizados em mais de uma espécie de peixe. Pesquisas com imunologia de peixes ainda são escassas no Brasil. Contudo, a aplicação de vacinas contra enfermidades bacterianas e virais tem demonstrado bons resultados em relação aos aspectos científicos e econômicos (COSTA, 2004).

Na Noruega, o uso de antibióticos foi reduzido de 47 toneladas para aproximadamente uma tonelada de substância ativa ao ano depois que a vacinação se tornou estratégia comum para o controle de doenças bacterianas nas fazendas de peixes (MARKESTAD e GRAVE, 1997).

Programas de vacinação eficientes têm diminuído a frequência de surtos de doenças bacterianas e reduzido o uso de antibióticos (HASTEIN *et al.*, 2005). Contudo, a diversidade antigênica de bactérias patogênicas sugere que mesmo que seja adquirida resistência a uma linhagem particular, não será garantida proteção contra outras linhagens potencialmente patogênicas do mesmo gênero. Por esse motivo, seria necessário o desenvolvimento de vacinas polivalentes como produto comercial viável (ROBERTS, 1993).

Segundo Gudding *et al.* (1999), peixes podem ser imunizados por três vias: injeção (preferencialmente via intraperitoneal), imersão ou oral. Tais métodos apresentam variações quanto ao nível de proteção oferecida, efeitos-colaterais, praticidade e custo-benefício.

A via oral é simples, barata e ideal para administração em massa e para peixes de todos os tamanhos. Entretanto, tentativas de vacinação oral contra aeromoniose (POST, 1966; SCHACHTE, 1978), vibriose, iersiniose e furunculose (MICHEL, 1979; JOHNSON e AMEND, 1983; NELSON *et al.*, 1985;) têm produzido respostas de curta duração e/ou respostas inadequadas. Um dos fatores importantes para a resposta pobre e inconsistente da vacinação oral é a degradação digestiva dos antígenos no intestino delgado, antes da vacina alcançar áreas de resposta imune no intestino grosso e outros órgãos linfóides (JOHNSON e AMEND, 1983; ROMBOUT *et al.*, 1986). Atualmente, para a vacinação oral, pesquisadores têm dado ênfase a proteção dos antígenos

visando evitar sua digestão e decomposição durante a passagem pelo estômago e pelo intestino delgado (JOOSTEN *et al.*, 1997).

O banho de imersão, por infiltração hiperosmótica, apesar de eficiente para várias espécies de peixe e bactérias (RUANGPAN *et al.*, 1986), não demonstrou resultados satisfatórios para tilápias contra linhagens de *A. hydrophila*. Trabalhos demonstraram que a vacinação contra furunculose por meio de banhos de imersão, promoveu proteção imune baixa a moderada (SMITH *et al.* 1980; ADAMS *et al.*, 1988) ou apenas quando os animais foram desafiados com baixa concentração da bactéria (PALMER e SMITH, 1980; RODGERS, 1990).

Estudando diferentes níveis de proteção contra furunculose, Midtlyng *et al.* (1996), compararam dez regimes de vacinação (dose única ou repetida, administração oral, por imersão ou intraperitoneal e monovalente ou polivalente), sendo que a injeção intraperitoneal de vacina polivalente promoveu maior imunidade contra furunculose.

Kozinska e Guz (2004) imunizaram carpas-comum (*Cyprinus carpio*) contra aeromoniose, testando 0,2 mL via intraperitoneal de solução de: cultura ou células bacterianas inativada com formalina, Lipopolissacarídeos⁻¹250 ou Lipopolissacarídeos-50. Após 30 dias, os peixes foram desafiados e monitorados por 14 dias, obtendo-se 0%, 10%, 20% e 20% de mortalidade, respectivamente, enquanto aqueles não vacinados obtiveram 70%.

O sucesso da imunoprofilaxia na prevenção de furunculose, causada por *Aeromonas salmonicida*, em salmonídeos, sugere que esta doença também possa ser controlada pela vacinação (WIKLUND e DALSGAARD, 1998). Lund *et al.* (2002), imunizaram *Anarhichas minor* contra *A. salmonicida* com administração intraperitoneal de soluções monovalentes e polivalentes, contendo diferentes cepas de bactéria. Após sete semanas, os peixes foram desafiados com *A. salmonicida* e a taxa de mortalidade observada por 25 dias. Os peixes tratados com vacina polivalente apresentaram menores mortalidades em relação aos tratados com vacinas monovalentes, e ambos obtiveram resultados significativamente melhores quando comparados ao grupo controle.

Ingilae *et al.* (2000), vacinaram *Hippoglossus hippoglossus* e *A. minor* contra *A. salmonicida* através de diferentes métodos de imunização, sendo banho de imersão e três por injeção intraperitoneal. Após 10 dias, os peixes foram desafiados contra *A. salmonicida* e a resposta imune foi verificada somente nos peixes vacinados intraperitonealmente. A taxa de mortalidade dos peixes vacinados por banho de imersão foi semelhante ao grupo controle.

Dessa forma, mais estudos com imunização devem ser realizados para comprovar a eficiência da vacina, em condições de criação, com peixes amplamente produzidos no Brasil, como a tilápia, desafiando-os contra cepas patogênicas isoladas preferencialmente dos próprios animais acometidos.

O artigo científico foi submetido a revista “*Archivos de Medicina Veterinaria*”, ISSN 0301-732X, Qualis B1 na área de Zootecnia e Recursos Pesqueiros

OBJETIVOS

Geral

Colaborar para o desenvolvimento de uma vacina polivalente eficaz na prevenção de *Aeromonas hydrophila* em cultivos de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*), mitigando os impactos econômicos causados por este patógeno.

Específicos

Avaliar os efeitos de uma vacina polivalente inoculada intraperitonealmente em tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*) através de parâmetros hematológicos e imunológicos em duas situações: seis dias após a imunização e 48 horas após o desafio com a bactéria *Aeromonas hydrophila*.

CAPÍTULO ÚNICO

Parâmetros hematológicos e imunológicos de tilápia do nilo imunizada com vacina polivalente e desafiada com *Aeromonas hydrophila*

Ricardo Lacava Bailone⁽¹⁾, Maurício Laterça Martins⁽²⁾, José Luiz Pedreira Mouriño^(2,3), Felipe do Nascimento Vieira^(2,3), Fabíola Santiago Pedrotti^(2,3), Gustavo Capistrano Nunes⁽²⁾, Bruno Correa da Silva^(2,3)

⁽¹⁾Serviço de Inspeção Federal – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (M.A.P.A.), R. Nuno da Gama Deça, 1240, Jardim Europa, 15775-000, Santa Fé do Sul, SP, Brasil.

⁽²⁾Laboratório AQUOS - Sanidade de Organismos Aquáticos, Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias (CCA), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Rod. Admar Gonzaga, 1346, 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil.

⁽³⁾Setor de Microbiologia, Laboratório de Camarões Marinhos, Departamento de Aquicultura, CCA, UFSC.

*Correspondência: mlaterca@cca.ufsc.br

Resumo - Este estudo avaliou o efeito de uma vacina polivalente inoculada intraperitonealmente sobre as respostas hematológica e imunológica da tilápia do nilo desafiada com *Aeromonas hydrophila*. Duas doses de vacina (1×10^4 e 1×10^8 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) \times mL⁻¹) contendo proporções iguais de *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus. durans* inativadas em formalina, foram testadas por injeção intraperitoneal (i.p). Os peixes foram desafiados seis dias após a vacinação i.p. com 1×10^7 UFC de *A. hydrophila* \times mL⁻¹ diluída em 1 mL de solução salina estéril. Seis dias após a imunização e 48h após o desafio, foi realizada a análise hematológica, atividades antimicrobiana e aglutinante do soro. Antes do desafio, o número de eritrócitos foi superior nos peixes vacinados com 1×10^8 UFC \times mL⁻¹. Após o desafio, o número total de trombócitos também foi maior nos vacinados com a maior dose. Antes e após o desafio, o número total de leucócitos e o número de linfócitos apresentaram os maiores valores nos peixes vacinados. O número de monócitos nos peixes vacinados e nos injetados com solução salina foi maior antes do desafio. Após a imunização e o desafio o soro de peixes vacinados com a maior dose apresentaram maior título de aglutinação contra *A. hydrophila*, *P. aeruginosa* e *E. durans*. Antes do desafio a atividade antimicrobiana do soro foi maior nos peixes não vacinados e nos vacinados com a maior dose, sendo que após o desafio os peixes não vacinados e os injetados com salina apresentaram maior atividade antimicrobiana. Este estudo mostrou que após seis dias, a vacina polivalente na concentração de 1×10^8 UFC \times mL⁻¹ estimulou a produção de eritrócitos, leucócitos, trombócitos e linfócitos circulantes e reduziu os níveis de glicose.

Termos para indexação: vacinação, bacteriose, desafio

Abstract - This study evaluated the effects of polyvalent vaccination on the hematological and immunological responses in Nile tilapia challenged against *Aeromonas hydrophila*. Two doses of vaccine (1×10^4 and 1×10^8 Colony Forming Unit (CFU) $\times \text{mL}^{-1}$) containing the same quantities of *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus. durans* inactivated by formalin were tested by intraperitoneal (i.p) injection. Fish were challenged six days after vaccination i.p. with 1×10^7 CFU *A. hydrophila* $\times \text{mL}^{-1}$ diluted in 1 mL sterile saline solution. Six days after immunization and 48h after challenge hematological parameters, antimicrobial and agglutinant activities of serum were analyzed. Before challenge, the number of erythrocytes was higher in fish vaccinated with 1×10^8 CFU $\times \text{mL}^{-1}$, and after challenge, total number of thrombocytes was higher in those that received the greatest dose of vaccine. Before and after challenge, total number of leukocytes and the number of lymphocytes showed the highest values in vaccinated fish. The number of monocytes in fish vaccinated and saline injected was higher before challenge. After immunization and challenge, the serum of fish vaccinated with the highest dose showed the highest agglutination titer against *A. hydrophila*, *P. aeruginosa* e *E. durans*. Before challenge, high values of antimicrobial activity of serum of non-vaccinated fish and fish vaccinated with the highest dose was observed. Therefore, after challenge, non-vaccinated fish and saline injected ones showed the highest antimicrobial activity. This study showed that six days after immunization with a polyvalent vaccine in a concentration of 1×10^8 CFU $\times \text{mL}^{-1}$ stimulated the production of erythrocytes, leukocytes, thrombocytes and circulating lymphocytes, but reduced the glucose levels.

Key-words: vaccination, bacteriosis, challenge

Introdução

Segundo a FAO (2008), nas últimas duas décadas a produção mundial de tilápia e outros ciclídeos obtiveram grande ascensão, atingindo cerca de 250.000 ton. em 2006. A tilápia do nilo é conhecida por apresentar diversas características positivas para a criação em cativeiro, destacando-se sua fisiologia, reprodução, genética e principalmente mercado (Fitzsimmons, 2000).

Entretanto, o rápido desenvolvimento da produção aquícola, principalmente devido a intensificação dos sistemas de produção, favorece condições estressantes para peixes de criação culminando em enfermidades e perdas econômicas (Schreck, 1996). Dentre os principais desafios para o desenvolvimento da aquicultura, destacam-se a melhoria do desempenho e resistência a enfermidades de organismos cultivados. Doenças bacterianas, contudo, consistem em um dos fatores limitantes para a criação de peixes (Abdel-Tawwab *et al.*, 2008).

Por fazer parte da microbiota da água de tanques e viveiros, bactérias podem intensificar seu potencial patogênico quando condições físicas e químicas do ambiente estiverem alteradas (Walters & Plumb, 1980). A bactéria oportunista Gram negativa *Aeromonas hydrophila* afeta grande variedade de espécies de peixes de água doce, sendo de ampla distribuição geográfica. Pode causar mortalidade massiva, inclusive em ciprinídeos (Rahman *et al.*, 1997).

A antibioticoterapia, frequentemente utilizada na criação intensiva de larvas, pode resultar no aumento da resistência microbiana, acúmulo de resíduo nos tecidos (Vadstein, 1997) e imunossupressão (Van Muiswinkel *et al.*, 1985). Portanto, a imunoprofilaxia por meio da estimulação do sistema imune específico e não específico dos peixes é a chave para o desenvolvimento de uma produção sustentável nos ecossistemas aquáticos (Gudding *et al.*, 1999). A vacinação, utilizando-se de agentes inativados, é considerada um bom método preventivo, além de contribuir para a redução do uso de quimioterápicos e antimicrobianos (Gudmundsdóttir & Björnsdóttir, 2007).

Pesquisas em imunologia de peixes ainda são escassas no Brasil. Contudo, a aplicação de vacinas contra enfermidades bacterianas tem demonstrado bons resultados em relação aos aspectos científicos e econômicos, reduzindo a utilização de químicos e antibióticos (Costa, 2004).

Vários fatores interferem na resposta imune dos peixes, como estágio de desenvolvimento, tamanho, estado imunológico e nutricional (Tatner & Manning, 1983; Bly *et al.*, 1997; Nakanishi & Otake,

1997). A eficácia da vacina, por sua vez, é influenciada pela via de administração, dose e natureza do antígeno, uso de adjuvantes, além do ambiente e temperatura da água (Tatner, 1987; Lillehaug *et al.*, 1993; Bly *et al.*, 1997). Assim, para o desenvolvimento de vacinas eficientes, mais informações devem ser consideradas quanto a natureza dos agentes infecciosos e diferentes respostas do hospedeiro a infecção (Gudmundsdóttir & Björnsdóttir, 2007).

A eficiência da vacinação é determinada pela maior e mais longa indução de resposta dos linfócitos T de memória, em função da forma pela qual a multiplicação celular é induzida e do tamanho do efector da população celular (*burst-size*) (Salerno-Gonçalves & Szein, 2006). As células T de memória são relativamente lentas em gerar uma função efectora quando comparadas as células T efectoras, porém são menos susceptíveis a apoptose durante a fase inicial de ativação celular (Salek-Ardakani & Croft, 2006).

Os anticorpos participam da defesa humoral específica, inibindo a aderência de bactérias ou a invasão de células não fagocitárias e neutralizando toxinas bacterianas (Ellis, 1999). Presentes no soro sanguíneo dos peixes, as lectinas são proteínas que se ligam a açúcares da superfície de bactérias (Arason, 1996), e atuam no processo de aglutinação dos antígenos além dos anticorpos (Gravningen *et al.*, 2008).

A resposta celular específica é composta principalmente por leucócitos (linfócitos, monócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos) e células citotóxicas (Secombes, 1996). Os linfócitos, principais células envolvidas na resposta humoral podem ser de dois tipos: B, diferenciando em plasmócitos e célula de memória; e T, atuando especificamente no reconhecimento de antígenos, migração para o sítio infectado e destruição de células infectadas, além do controle da resposta imune (Tizard, 2002).

Níveis de resistência de peixes podem ser determinados avaliando-se sua taxa de sobrevivência após infecção bacteriana experimental (Wasson & Kelly, 1990). Um método amplamente utilizado para avaliar a eficiência de uma vacina é o cálculo da taxa de sobrevivência relativa, considerando-se peixes controle e vacinados (Ellis, 1988).

Avaliando a resposta de tilápia (*Oreochromis niloticus*) contra *A. hydrophila*, Sarder *et al.* (2001) observaram as atividades da lisozima e fagocitária, bem como o quadro hematológico, além da taxa de mortalidade acumulada após infecção experimental com o patógeno. Em experimento com imunização de *Scophthalmus maximus* contra

Edwardsiella tarda, Castro *et al.* (2008) avaliaram a taxa de sobrevivência e níveis de anticorpos.

Destacando-se a importância de se estabelecer um protocolo de vacinação nas pisciculturas comerciais a fim de reduzir o surto de bacterioses no cultivo, o objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de resposta hemato-imunológica em tilápia do nilo após administração de vacina polivalente (*A. hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus durans*) e desafiada com *A. hydrophila*.

Materiais e Métodos

Material biológico

O experimento foi conduzido no Departamento de Aquicultura, Laboratório AQUOS- Sanidade de Organismos Aquáticos, CCA, UFSC, Florianópolis, SC, com tilápias da linhagem GIFT, cedidas pela Fundação 25 de Julho, Joinville, SC.

As cepas de *A. hydrophila* ATCC 7966, *Enterococcus durans* ATCC 19492, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Escherichia coli* ATCC 25922 utilizadas neste ensaio foram cedidas pelo Instituto André Tossello (Campinas, SP), e cultivadas no setor de Microbiologia do Laboratório de Camarões Marinhos, CCA, UFSC, Florianópolis, SC.

Dose de desafio para *Aeromonas hydrophila*

Peixes com peso de $196,97 \pm 25,00$ g e comprimento total de $18,53 \pm 1,20$ cm foram distribuídos em tanques plásticos de 150 L de água com aeração contínua e renovação diária de 30%, e alimentados *ad libitum* com ração comercial contendo 28% de proteína bruta, duas vezes ao dia. Após aclimação por 5 dias, os peixes foram injetados intraperitonealmente com concentrações crescentes da bactéria. Os tratamentos, conduzidos em triplicatas, consistiram das doses 0; 1×10^5 ; 1×10^6 ; 1×10^7 e 1×10^8 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) x mL⁻¹/peixe, diluídas em 1 mL de solução salina 0,65% estéril, contendo cinco peixes por repetição.

Os testes foram conduzidos por 96h após inoculação em sistema estático, sem substituição ou sifonagem de água nem alimentação dos peixes. Diariamente, observou-se a taxa de mortalidade e monitoraram-se os parâmetros físico-químicos da água: oxigênio dissolvido $5,54 \pm 0,44$ mg x L⁻¹; temperatura $24,93 \pm 2,49$ °C; pH $7,29 \pm 0,30$; amônia total $0,45 \pm 0,48$ mg x L⁻¹.

Verificada a mortalidade em todas as unidades após 96h, estimou-se a dose de desafio para *A. hydrophila*. A concentração bacteriana que provocou aproximadamente a mortalidade de 50% dos peixes em 96h foi utilizada para o desafio.

Produção da vacina

As cepas bacterianas de *A. hydrophila*, *P. aeruginosa* e *E. durans* foram cultivadas separadamente em tubos de ensaio de 10mL contendo meio de cultura líquido BHI (Brain and Heart Infusion, Difco), incubadas por 24h sob agitação contínua. Após averiguação das populações bacterianas, foram mensuradas em porções iguais e

adicionadas em formalina (0,5%), sendo novamente incubadas sob agitação a 30°C por 24h. As culturas bacterianas foram centrifugadas a 4000 xg por 10 min. O sobrenadante, contendo a formalina, foi descartado e o pelete ressuspenso em solução salina estéril a 0,65%. A suspensão bacteriana em solução salina foi semeada em placa de Petri contendo meio de cultura BHI e incubada a 30°C por 24h para verificar a seguridade da vacina.

Vacinação e desafio

Peixes com 255,52±21,16 g e 21,28±1,93 cm foram distribuídos em tanques plásticos de 150 L de água, com aeração contínua e renovação diária de 30%. Dez peixes por unidade experimental litros, aclimatados por 10 dias e alimentados *ad libitum* com ração comercial contendo 28% de proteína bruta duas vezes ao dia. Parâmetros físico-químicos da água foram monitorados diariamente: oxigênio dissolvido 5,43±0,48 mg x L⁻¹; temperatura 26,09±3,13°C; pH 7,02±0,32 e amônia total 0,90±0,67 mg x L⁻¹.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições. As unidades experimentais foram constituídas de animais vacinados injetados intraperitonealmente com 1x10⁴ e 1x10⁸ UFC x mL⁻¹ de bactérias inativadas (divididas em proporções iguais); controle injetados com solução salina estéril e não injetados. Antes das aplicações, os peixes foram anestesiados com solução de benzocaína (50 mg x L⁻¹).

Os peixes permaneceram em jejum por 24h antes da infecção e o desafio realizado 10 dias após a imunização por injeção intraperitoneal de 1 mL contendo a dose de desafio de *A. hydrophila* (1x10⁷ UFC x mL⁻¹).

Hemograma e glicose plasmática

Na primeira coleta (seis dias após a imunização), utilizaram-se três peixes de cada tanque, sendo descartados após a retirada do sangue. Já na segunda coleta (48h após desafio), foi utilizado o restante dos peixes de cada tanque.

Amostras de sangue foram coletadas seis dias após a imunização e 48h após o desafio. Após anestesia com benzocaína, 2 mL de sangue foram retirados por punção do vaso caudal com auxílio de seringas contendo EDTA (10%) e seringas sem anticoagulante para obtenção do soro. Uma alíquota armazenada em capilares de microhematócrito para determinação do percentual de hematócrito (Goldenfarb *et al.*, 1971). Em seguida, foram realizadas duplicatas de extensões sanguíneas

coradas com May-Grunwald/Giemsa (Rosenfeld 1947) para contagem diferencial de leucócitos e contagens totais de trombócitos e leucócitos. A contagem total de eritrócitos foi realizada em hemocítômetro após diluição de 1:200 em solução de cloreto de sódio (0,65%). Os números totais de trombócitos e leucócitos no sangue calculados pelo método indireto a partir das extensões sanguíneas segundo Ishikawa *et al.* (2008).

Uma alíquota do soro foi utilizada para determinação do índice glicêmico em espectrofotômetro (kit Biotécnica®) a 505 nm.

Atividade antimicrobiana do soro sanguíneo dos peixes

O teste de inibição, para cada bactéria patogênica (*A. hydrophila*, *P. aeruginosa*, *E. durans* e *E. coli*) foi realizado segundo Klesius *et al.* (2000). A inibição foi averiguada em microplacas de 96 poços, contendo tampão fosfato salino (PBS; 137mM de Cloreto de Sódio, 10mM de fosfato, 2,7mM de cloreto de potássio em pH 7,4), soro obtido do sangue das tilápias e inóculo das cepas de bactérias patogênicas recém crescidas (após incubação por 24h) em meio de cultura líquido LB (Luria broth) a 1×10^3 UFC x mL⁻¹.

Em cada poço, contendo 150 µL de PBS, foram adicionados 50 µL de soro filtrado em milipore (22 µL) e realizada diluição seriada fator 2 até o 12º poço. Após, foram inoculados 20 µL da bactéria em todos os poços e a microplaca incubada a 25°C por 24 h. Para controle positivo, foram utilizados 100 µL de tampão adicionado de 20 µL de solução bacteriana. As amostras foram avaliadas por leitor de microplaca DO_{550nm}.

Atividade aglutinante do soro

Os testes de aglutinação foram realizados segundo método descrito por Yildirim *et al.* (2003), individualmente para *A. hydrophila*, *P. aeruginosa* e *E. durans*. As bactérias foram cultivadas (1×10^8 UFC x mL⁻¹) e inativadas segundo metodologia descrita para confecção da vacina. Utilizaram-se microplacas de 96 poços de fundo U, onde o soro foi diluído na proporção de 1:1 com a solução tampão PBS no primeiro poço e serialmente em fator 2 para os demais poços até o 12º. Adicionaram-se 50 µL da bactéria inativada em todos os poços e a microplaca foi incubada a 25°C durante 18h em câmara úmida. A aglutinação foi confirmada com a observação de um *bottom* no fundo do poço, sendo o título aglutinante considerado como o recíproco do último poço a apresentar coagulação.

Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste de Bartlett e os parâmetros hematológicos que não apresentaram homogeneidade de variâncias foram transformados em $\ln(x+1)$ antes de serem submetidos para análise de variância ($\alpha < 0,05$). Os dados de aglutinação e atividade antimicrobiana foram transformados em $\log_2(x+1)$ antes das análises. As diferenças entre as médias foram avaliadas pelo teste de Student Newman Keuls (SNK).

Resultados e Discussão

Dose de desafio

As primeiras mortalidades foram observadas 11h após o desafio na concentração bacteriana de 1×10^8 UFC x mL⁻¹ (dose 4) (Tabela 1). Os peixes apresentaram sinais característicos de bacteriose, como vermelhidão na região ventral, perda de escamas e hemorragias na base das nadadeiras e tegumento, alguns até expondo o tecido muscular. Mortalidades foram detectadas 23h após o desafio nos peixes que receberam a concentração bacteriana de 1×10^7 UFC x mL⁻¹ (dose 3) e cerca de 48 horas nos demais tratamentos.

Tabela 1- Taxa de mortalidade em tilápia do nilo 96h após injeção intraperitoneal com solução salina estéril; dose 1 (1×10^5); dose 2 (1×10^6); dose 3 (1×10^7) e dose 4 (1×10^8) UFC de *Aeromonas hydrophila* x mL⁻¹, para a determinação da dose de desafio.

UFC de <i>Aeromonas hydrophila</i> x mL ⁻¹		Mortalidade (%)
Dose 0	Solução salina	6,66
Dose 1	1×10^5	39,96
Dose 2	1×10^6	26,64
Dose 3	1×10^7	53,28
Dose 4	1×10^8	79,92

As taxas de mortalidade após 96h (Tabela 1) foram proporcionais a concentração bacteriana inoculada, com exceção dos peixes que receberam a concentração bacteriana de 1×10^5 UFC x mL⁻¹ (dose 1), que foi superior aquela dos peixes que receberam a concentração de 1×10^6 UFC x mL⁻¹ (dose 2).

A concentração bacteriana de 1×10^7 UFC x mL⁻¹ (dose 3) foi capaz de provocar 55,28% de mortalidade nos peixes em 96h, sendo assim determinada a dose de desafio de *A. hydrophila* a ser utilizada.

Hematologia e glicose plasmática

Devido ao estresse, ocorre quebra da homeostase em peixes infectados (Pickering, 1981). Neste estudo, observou-se que após o desafio com *A. hydrophila*, o número de trombócitos circulantes no sangue das tilápias vacinadas com a concentração bacteriana de 1×10^8 UFC x mL⁻¹ foi superior ao do grupo controle (Tabela 2).

Lewis *et al.* (1979) reportaram a presença de receptores de superfície para eritrócitos nos linfócitos pequenos de bagre do canal (*Ictalurus punctatus*), análogos aos linfócitos T dos mamíferos. Os

linfócitos grandes, por sua vez, apresentavam imunoglobulinas de superfície e aderência a células de *A. hydrophila*, sendo análogos aos linfócitos B. Segundo Siwick *et al.* (1998) imunostimulantes, como vacinas, leveduras, lipopolissacarídeos, e adjuvantes aumentam a resposta proliferativa de linfócitos T e B, bem como a mobilização enzimática e a atividade fagocitária de neutrófilos.

Os resultados demonstraram que o número de leucócitos (Tabela 2) aumentou nos peixes vacinados com a concentração bacteriana de 1×10^8 UFC x mL⁻¹ em relação aos demais tratamentos, sendo que o mesmo ocorreu para os linfócitos (Tabela 3). Em estudo realizado por Harikrishnan *et al.* (2003) com carpa comum (*Cyprinus carpio*) inoculada intraperitonealmente com *A. hydrophila*, também foi detectado aumento do número de leucócitos dos peixes até o 30º dia após infecção, apesar de não ter sido vacinada. Neste período, o número de eritrócitos e níveis de hemoglobina, hematócrito e glicose diminuíram nos peixes infectados.

Outros estudos também observaram redução de outros parâmetros em peixes infectados, como em ciclídeos (*Etilapia suratiensis*) com síndrome de epizootia ulcerativa, cujo número de eritrócitos e concentração de hemoglobina apresentou decréscimo (Pathiratne & Rajapakshe, 1998). Embora não tenha sido observada diferença no número de eritrócitos de tilápias infectadas com *A. hydrophila*, os presentes resultados comprovaram seu aumento após imunização nos peixes que receberam a maior dose, comparados àqueles não imunizados.

Segundo Haney *et al.* (1992), a redução no número de eritrócitos e concentração de hemoglobina pode ser devido à anemia causada pela bactéria. Diminuição no número de eritrócitos, hematócrito e concentração de hemoglobina podem indicar que os eritrócitos foram sendo destruídos pela atividade leucocitária. Por outro lado, o aumento do hematócrito pode ser resultado da deficiência de oxigênio (Kirk, 1974). No presente estudo, contudo, não foram observadas diferenças na porcentagem de hematócrito dos peixes dos tratamentos antes ou após o desafio, demonstrando que nesta situação estes parâmetros não sofreram influência significativa.

Estudando parâmetros hematológicos em tilápias desafiadas com *Enterococcus* sp., Martins *et al.* (2008) observaram aumento no número de trombócitos, linfócitos e porcentagem de hematócrito, assim como ocorreu com o número de trombócitos e linfócitos neste ensaio. Contudo, os níveis de glicose e número de eritrócitos não foram

influenciados, o que foi sugerindo que o inóculo foi insuficiente para provocar alteração desses parâmetros ou da hematopoiese.

Após a imunização das tilápias, o número de monócitos foi significativamente menor ($p < 0,05$) nos peixes não injetados (Tabela 3). Sabe-se que os monócitos têm atividade fagocitária, além de transformarem-se em macrófagos e migrarem para o foco inflamatório, auxiliando no processo de defesa (Griffin, 1984). O fato dos peixes vacinados e injetados com salina terem mostrado maior número destas células confirma sua atuação no sistema de defesa do organismo.

Tabela 2- Concentração de glicose, percentual de hematócrito e contagens totais de eritrócitos, trombócitos e leucócitos no sangue de tilápia do nilo, antes (6 dias após imunização) e 48h após o desafio com *Aeromonas hydrophila*, em peixes não vacinados (controle); injetados com 1 mL de solução salina estéril; vacinados com 1×10^4 e com 1×10^8 UFC de bactérias inativadas $\times \text{mL}^{-1}$. Letras distintas indicam diferença significativa pelo teste SNK de comparação de médias ($p < 0,05$).

Amostragem	Tratamento	Glicose (mg/dL)	Hematócrito (%)	Eritrócito ($10^6/\mu\text{L}$)	Trombócito ($10^3/\mu\text{L}$)	Leucócito ($10^3/\mu\text{L}$)
Após imunização (Antes do desafio)	Controle	85,62 $\pm 45,88$ a	18,83 $\pm 4,19$ a	1,02 $\pm 0,30$ b	35,20 $\pm 5,41$ a	18,19 $\pm 1,50$ b
	Salina	75,56 $\pm 55,00$ a	24,78 $\pm 2,80$ a	1,25 $\pm 0,14$ ab	46,66 $\pm 12,68$ a	21,80 $\pm 5,65$ b
	1×10^4	21,91 $\pm 21,77$ b	26,83 $\pm 2,80$ a	1,34 $\pm 0,28$ ab	46,66 $\pm 6,49$ a	26,35 $\pm 5,20$ b
	1×10^8	42,81 $\pm 18,69$ b	23,33 $\pm 4,93$ a	1,70 $\pm 0,22$ a	49,41 $\pm 10,41$ a	34,72 $\pm 10,09$ a
Após o desafio	Controle	90,79 $\pm 38,75$ a	22,19 $\pm 2,82$ a	1,16 $\pm 0,07$ a	18,13 $\pm 10,77$ b	17,46 $\pm 9,58$ b
	Salina	58,48 $\pm 44,25$ a	22,25 $\pm 3,26$ a	1,12 $\pm 0,08$ a	27,39 $\pm 5,21$ ab	19,12 $\pm 1,12$ b
	1×10^4	34,17 $\pm 25,79$ b	22,33 $\pm 2,04$ a	1,17 $\pm 0,28$ a	30,44 $\pm 8,84$ ab	26,42 $\pm 3,28$ b
	1×10^8	21,05 $\pm 17,24$ b	21,86 $\pm 1,91$ a	1,19 $\pm 0,12$ a	42,46 $\pm 4,21$ a	37,66 $\pm 4,21$ a

Tabela 3- Contagem diferencial de leucócitos no sangue de tilápia do nilo, antes (6 dias após imunização) e 48h após o desafio com *Aeromonas hydrophila*, em peixes não vacinados (controle), injetados com 1 mL de solução salina estéril; vacinados com 1×10^4 e com 1×10^8 UFC de bactérias inativadas $\times \text{mL}^{-1}$. Letras distintas indicam diferença significativa pelo teste SNK de comparação de médias ($p < 0,05$).

Amostragem	Tratamento	Basófilo ($10^3/\mu\text{L}$)	Neutrófilo ($10^3/\mu\text{L}$)	Linfócito ($10^3/\mu\text{L}$)	Monócito ($10^3/\mu\text{L}$)
Após imunização (Antes do desafio)	Controle	0,58 \pm 0,55 a	7,83 \pm 3,72 a	9,51 \pm 4,46 b	0,27 \pm 0,23 b
	Salina	0,26 \pm 0,13 a	11,08 \pm 0,98 a	9,55 \pm 5,76 b	0,91 \pm 0,06 a
	1×10^4	0,33 \pm 0,13 a	9,50 \pm 1,40 a	14,21 \pm 3,17 b	1,66 \pm 0,88 a
	1×10^8	0,47 \pm 0,20 a	8,51 \pm 6,02 a	22,63 \pm 1,02 a	0,98 \pm 0,35 a
Após o desafio	Controle	0,27 \pm 0,39 a	6,92 \pm 4,38 a	10,11 \pm 5,16 b	0,08 \pm 0,07 a
	Salina	0,05 \pm 0,08 a	10,62 \pm 1,88 a	8,44 \pm 2,93 b	0,00 \pm 0,00 a
	1×10^4	0,00 \pm 0,00 a	9,36 \pm 6,39 a	10,89 \pm 4,39 b	0,19 \pm 0,25 a
	1×10^8	0,17 \pm 0,16 a	9,99 \pm 8,78 a	20,28 \pm 2,70 a	1,08 \pm 1,07 a

A concentração de glicose plasmática pode aumentar por curtos períodos a fim de suprir a maior demanda energética em situações de estresse (Barton, 2000). Contudo, resultados do presente estudo demonstraram que os níveis de glicose não foram alterados após a infecção, sendo menores nos peixes vacinados com ambas as doses (Tabela 2). Por outro lado, em estudo realizado com carpas comuns infectadas e tratadas com extrato herbal, observou-se elevação nos níveis de glicose no 30º dia, os quais ficaram próximos aos valores para os peixes não infectados (Harikrishnan *et al.* 2003).

Título de aglutinação

No presente estudo, a maior dose da vacina (1×10^8 UFC de bactérias inativadas $\times \text{mL}^{-1}$) foi capaz de estimular o título de aglutinação dos peixes à *A. hydrophila*, *P. aeruginosa* e *E. durans* após imunização e desafio com *A. hydrophila* (Tabela 4). O aumento do título de aglutinação após imunização em peixes também foi relatada por outros autores. Estudando a eficiência de vacinação em *Seriola*

quinqueradiata contra *Photobacterium damsela*, Gravningen *et al.* (2008) detectaram aumento nos níveis de anticorpos aglutinantes contra a bactéria testada de três a quatro semanas após a imunização, além da elevação da atividade fagocitária e produção de ânions superóxido pelos leucócitos após 36 e 66 dias de imunização.

Ruangpan *et al.* (1986), após vacinação intraperitoneal de tilápia contra *A. hydrophila*, observaram que até duas semanas após a vacinação os peixes apresentaram maiores níveis de proteção e títulos de anticorpos que aqueles não vacinados, corroborando o presente ensaio. Swain *et al.* (2007), por sua vez, detectaram resposta de anticorpos em ciprinídeo (*Labeo rohita*) imunizado com vacina poli ou monovalente, apresentando pico nos títulos de aglutinação após 4 semanas. Os títulos variaram conforme a bactéria testada, resultado também confirmado no presente estudo.

Tabela 4 - Atividade aglutinante ($\log_2(x+1)$) do soro sanguíneo de tilápia do Nilo contra *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus durans* antes (6 dias após imunização) e 48h após a infecção com *A. hydrophila*, nos peixes não vacinados (controle); injetados com 1 mL de solução salina estéril; vacinados com 1×10^4 e com 1×10^8 UFC de bactérias inativadas $\times \text{mL}^{-1}$. Letras distintas indicam diferença significativa pelo teste SNK de comparação de médias ($p < 0,05$).

Amostragem	Tratamento	Aglutinação		
		<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterococcus durans</i>
Após imunização (Antes do desafio)	Controle	2,64±0,92 b	0,00±0,0 b	3,51±1,39 b
	Salina	2,89±0,49 b	0,00±0,0 b	3,57±1,79 b
	1×10^4	3,17±0,55 b	0,00±0,0 b	5,05±0,97 b
	1×10^8	8,34±0,58 a	5,38±1,12 a	7,01±0,99 a
Após o desafio	Controle	2,08±0,43 c	0,53±0,92 b	4,73±0,55 b
	Salina	3,23±1,57 bc	0,77±1,34 b	4,09±0,00 b
	1×10^4	4,73±0,55 b	1,83±0,43 b	4,41±0,55 b
	1×10^8	11,33±0,58 a	6,04±0,57 a	6,68±0,57 a

Atividade antimicrobiana

Em todos os tratamentos, o soro sanguíneo dos peixes não apresentou atividade antimicrobiana significativa contra *A. hydrophila*, *P. aeruginosa* e *E. durans*, antes ou após o desafio (Tabela 5). Com relação a *E. coli*, os animais não infectados, imunizados com a dose de 1×10^8 UFC x mL⁻¹ e não injetados apresentaram maior atividade antimicrobiana do que os injetados com salina e vacinados com 1×10^4 UFC x mL⁻¹.

Tabela 5 - Atividade antimicrobiana ($\log_2(x+1)$) do soro sanguíneo de tilápia do nilo contra *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus. durans* e *Escherichia coli*, antes (6 dias após imunização) e 48h após a infecção com *A. hydrophila*, nos peixes não vacinados (controle); injetados com 1 mL de solução salina estéril; vacinados com 1×10^4 e com 1×10^8 UFC de bactérias inativadas x mL⁻¹. Letras distintas indicam diferença significativa pelo teste SNK de comparação de médias ($p < 0,05$).

Amostragem	Tratamento	Antimicrobiano			
		<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterococcus durans</i>	<i>Escherichia coli</i>
Após imunização (Antes do desafio)	Controle	0,00±0,0 a	5,34±4,73 a	0,00±0,00 a	5,09±2,72 a
	Salina	0,00±0,0 a	0,00±0,00 a	1,83±1,64 a	1,55±1,34 b
	1×10^4	0,00±0,0 a	4,12±1,65 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 b
	1×10^8	0,00±0,0 a	7,35±2,06 a	0,00±0,00 a	4,73±0,55 a
Após o desafio	Controle	0,00±0,0 a	6,01±6,55 a	2,67±4,62 a	4,73±0,55 a
	Salina	0,00±0,0 a	2,01±3,48 a	0,00±0,00 a	5,05±0,97 a
	1×10^4	0,77±1,34 a	3,06±3,01 a	0,77±1,34 a	0,00±0,00 b
	1×10^8	0,00±0,0 a	5,70±0,56 a	1,06±1,83 a	2,42±2,14 ab

A partir dos resultados obtidos, pode-se supor que *A. hydrophila*, *P. aeruginosa* e *E. durans* não sejam sensíveis aos compostos antimicrobianos presentes no soro após 24h de incubação, necessitando-se talvez de um aprimoramento na metodologia de detecção da atividade quanto ao tempo de incubação das microplacas. Outra hipótese é que a

produção destes compostos seja realmente inexpressiva frente às bactérias utilizadas nas condições testadas.

Por outro lado, o soro dos peixes inibiu o crescimento de *E. coli*, que apesar de não ter sido incluída na vacina, é considerada bactéria padrão para testes de atividade antimicrobiana devido a maior sensibilidade as substâncias microbicidas. Para próximos estudos, sugere-se testar a eficiência da vacinação avaliando-se mais análises imunológicas, como atividade fagocitária (Ellis, 1999; Martins *et al.*, 2008), da lisozima (Saurabh & Sahoo, 2008) e quantificação de anticorpos (Lin *et al.*, 2006). Segundo Saurabh & Sahoo (2008), a imunização de peixes com antígenos incrementa os títulos de lisozima e anticorpos, estando altamente correlacionados.

As análises realizadas no presente ensaio demonstraram que após o desafio, os peixes não injetados e injetados com solução salina apresentaram maiores valores para atividade antimicrobiana frente a *E. coli*, seguidos dos vacinados com 1×10^8 UFC x mL⁻¹ (Tabela 5). A redução da inibição bacteriana dos peixes vacinados observada não era esperada, já que outros trabalhos demonstraram a estimulação da atividade antimicrobiana em tilápias vacinadas (Silva et al., 2008).

Conclusões

A vacina polivalente na concentração de 1×10^8 UFC x mL⁻¹ foi capaz de estimular, após seis dias, a produção de eritrócitos e células responsáveis pela defesa da tilápia (leucócitos totais, além de monócitos e linfócitos), importantes no processo imunológico específico e não específico.

Este estudo mostrou que após seis dias da imunização e também dois dias após o desafio, a vacina polivalente na concentração de 1×10^8 UFC x mL⁻¹ reduziu os níveis de glicose do sangue dos peixes vacinados, concluindo que estes estavam mais preparados para enfrentar estresses, intrínsecos e/ou extrínsecos.

O aumento da aglutinação do soro das tilápias contra *A. hydrophila*, *P. aeruginosa* e *E. durans* foi observada no tratamento de 1×10^8 UFC x mL⁻¹ logo após a imunização dos peixes, mantendo-se significativo neste grupo também após o desafio contra *A. hydrophila*.

Referências

- ABDEL-TAWWAB, M.; ABDEL-RAHMAN, A.M.; ISMAEL, N.E.M. Evaluation of commercial live bakers yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a growth and immunity promoter for Fry Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) challenged in situ with *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture**, v.280, p.185–189, 2008.
- ARASON, G.J. Lectins as defence molecules in vertebrates and invertebrates. **Fish and Shellfish Immunology** v.6, p.277-289, 1996.
- BARTON, B. A. Salmonid fishes differ in their cortisol and glucose responses to handling and transport stress. **North America Journal of Aquaculture**, v.62, p.12–18, 2000.
- BLY, J.E.; QUINIOU, S.M.A.; CLEM, L.W. Environmental effects in fish immune mechanisms. **Developments in Biological Standardization**. v.90, p. 33-43, 1997.
- CASTRO, N.; TORANZO, A.E.; NUÑEZ, S.; MAGARIÑOS, B. Development of an effective *Edwardsiella tarda* vaccine for cultured turbot (*Scophthalmus maximus*). **Fish and Shellfish Immunology**, v.25, p.208-212, 2008.
- COSTA, A.B. Estratégias para o estudo de bactérias potencialmente patogênicas na piscicultura. **In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALOSI, D.M. CASTAGNOLLI, N. (Eds). Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**, 1. ed. São Paulo: TecArt, 2004, cap.13, p.387-404.
- ELLIS, A.E. General principles of fish vaccination. **In: ELLIS, A.E. (ed) Fish Vaccination**. London: Academic Press; 1988. p. 1–19.
- ELLIS, A.E. Immunity to bacteria in fish. **Fish and Shellfish Immunology**, v.9, p.291–308, 1999.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) - Fisheries and Aquaculture Department, Statistical Collections. Online Query Panels. FAO-FIGIS. Global Aquaculture Production, disponível em:
<http://www.fao.org/figis/servlet/SQServlet?file=/usr/local/tomcat/FI/5.5>.

23/figis/webapps/figis/temp/hqp_66412.xml&outtype=html acesso em 08/11/2008, 2008.

FITZSIMMONS, K. Tilapia: The most important aquaculture species of the 21st Century. In: **Symposium on tilapia aquaculture**, 5. Rio de Janeiro, 2000. Anais. Rio de Janeiro: SRG Gráfica & Editora LTDA, 2000. p.3-8.

GOLDENFARB, P.B.; BOWYER, F.P.; HALL, E.; BROSIOUS, E. Reproductibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 56, p. 35-39, 1971.

GRAVNINGEN, K.; SAKAI, M.; MISHIBA, C.; FUJIMOTO, T. The efficacy and safety of an oil-based vaccine against *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*): A field study. **Fish and Shellfish Immunology**, v.24, p.523-529, 2008.

GRIFFIN, R.B. Randon and directed migration of trout (*Salmo gairdneri*) leukocytes: activation by antibody, complement, and normal serum components. **Developmental and Comparative Immunology**, v.8, p.589-597, 1984.

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

GUDMUNSDOTTIR, B.K.; BJÖRNSDÓTTIR, B. Review - Vaccination against atypical furunculosis and winter ulcer disease of fish. **Vaccine**, v.25, p.5512-5523, 2007.

HANEY, D.C.; HURSH, D.A.; MIX, M.C.; WINTON, J.R. Physiological and hematological changes in chum salmon artificially infected with erythrocytic necrosis virus. **Journal of Aquatic Animal Health**, v.4, p.48- 57, 1992.

HARIKRISHNAN, R.; RANI, M.N.; BALASUNDARAM, C. Hematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. **Aquaculture**, v.221, p.41-50, 2003.

ISHIKAWA, N.M.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; LOMBARDI, J.V. Metodologia para quantificação de leucócitos totais em peixe, *Oreochromis niloticus*. **Archives of Veterinary Science**, v. 13, p. 54-63, 2008.

KIRK, W.L. The effects of hypoxia on certain blood and tissue electrolytes of channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). **Transactions of American Fisheries Society**, v.103, p.593-600, 1974.

KLESIUS, P.H.; SHOEMAKER, C.A.; EVANS, J.J. Efficacy of single and combined *Streptococcus iniae* isolate vaccine administered by intraperitoneal and intramuscular routes in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v.188, p.237-246, 2000.

LEWIS, D.H.; EURELL, T.E.; CANNON, M.S.; GRUMBLES, L.C. T and C cells analogues from peripheral blood of immune channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **Journal of Fish Biology**, v.14, p.31-37, 1979.

LILLEHAUG, A.; RAMSTAD, A.; BAEKKEN, K.; REITAN, L.J. Protective immunity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) vaccinated at different water temperatures. **Fish and Shellfish Immunology**. v.3,p.143-56, 1993.

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

MARTINS, M.L.; MOURIÑO, J.L.P.; AMARAL, G.V.; VIEIRA, F.N.; DOTTA, G.; BEZERRA, A.J.M.; PEDROTTI, F.S.; JERÔNIMO, G.T.; BUGLIONE-NETO, C.C.; PEREIRA-JR, G. Haematological changes in Nile tilapia experimentally infected with *Enterococcus sp.* **Brazilian Journal of Biology**, v.68, n.3, p.631-637, 2008.

NAKANISHI, T.; OTOTAKE, M. Antigen uptake and immune responses after immersion vaccination. In: GUDDING, R.; LILLEHAUG, A.; MIDTLYNG, P.J.; BROWN, F. (editors). **Developments in Biological Standardization**. Basel: Karger; 1997. p. 59-68.

PATHIRATNE, A.; RAJAPAKSHE, W. Hematological changes associated with epizootic ulcerative syndrome in the Asian cichlid fish *Etroplus suratensis*. **Asian Fisheries Science**, v.11, p.203-211, 1998.

PICKERING, A.D. Introduction: the concept of biological stress. **In:** Pickering, A.D. (Ed.), *Stress and Fish*. Academic Press, New York, 1981, pp. 1-10.

RAHMAN, M.H.; KAWAI, K.; KUSUDA, R. Virulence of starved *Aeromonas hydrophila* to cyprinid fish. **Fish Pathology** v.32, n.3, p.163-168, 1997.

ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May-Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 20, p. 329-334, 1947.

RUANGPAN, L.; KITAO, T.; YOSHIDA, T. Protective efficacy of *Aeromonas hydrophila*: vaccines in Nile tilapia. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.12, n.1-4, p.345-350, 1986.

SALEK-ARDAKANI, S.; CROFT, M. Regulation of CD4 T cell memory by OX40 (CD134). **Vaccine**, v.24, p.872-883, 2006.

SALERNO-GONÇALVES, R.; SZTEIN, M.B. Cell-mediated immunity and the challenges for vaccine development. **Trends in Microbiology**., v.14, p.536-542, 2006.

SARDER, M.R.I.; THMPSON, K.D.; PENMAN, D.J.; McANDREW, B.J. Immune responses of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) clones: I. Non-specific responses. **Developmental and Comparative Immunology**, v.25, p.37-46, 2001.

SAURABH, S; SAHOO, P.K. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. **Aquaculture Research**, v.39, p.223-239, 2008.

SCHRECK, C.B. Immunomodulation: endogenous factors. **In:** IWANA, G.; NAKANISHI, T. (Eds). **The fish immune system, organism, pathogen and environment**. London: Academic Press, 1996, pp.311-337.

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

SILVA, B.C.; MOURIÑO, J.L.P.; JATOBÁ, A.; BUGLIONE, C.C.; VIEIRA, F.N.; PEREIRA, G.V.; JERÔNIMO, G.T.; SEIFFERT, W.Q.; MARTINS, M.L. Hematological and immunological responses of Nile tilapia after polyvalent vaccine administration for different routes. **Submetido para Pesquisa Veterinária Brasileira**, 2008.

SIWICK, A.K.; MORAND, M.; KLEIN, P.; STUDNICKA, M.; TERECH-MAJEWSKA, E. Modulation of nonspecific defense mechanisms and protection against diseases in fish. **Acta Vet BRNO**, v.67, p.323-328, 1998.

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

TATNER, M.F.; MANNING, M.J. The ontogeny of cellular immunity in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, in relation to the stage of development of the lymphoid organs. **Developmental and Comparative Immunology**, v.7, n.1, p.69-75, 1983.

TATNER, M.F. The quantitative relationship between vaccine dilution, length of immersion time and antigen uptake, using a radiolabelled *Aeromonas salmonicida* bath in direct immersion experiments with rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **Aquaculture**, v.62, p.173-185, 1987.

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

VADSTEIN, O. The use of immunostimulation in marine larviculture: possibilities and challenges. **Aquaculture**, v.155, p.401-417, 1997.

VAN MUISWINKEL, W.B.; ANDERSON, D.P.; LAMERS, C.H.J.; EGBERTS, E.; VAN LOON, J.J.A.; IJSSEL, J.P. Fish immunology and fish health. **In:** MANNING, M.J.; TATNER, M.F. (Eds). **Fish Immunology**. London: Academic Press, 1985, pp.1-8.

WALTERS, G.R.; PLUMB, J.A. Environmental stress and bacterial infection in channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. **Journal of Fish Biology**, v.17, p.177-185, 1980.

WANG, W.S.; WANG, D.H. Enhancement of the resistance of tilapia and grass carp to experimental *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella tarda* infections by several polysaccharides. **Comparative Immunology, Microbiology and Infection Diseases**. v. 20, n. 3, p. 261-270, 1997.

WASSOM, D.L.; KELLY, E.A.B. The role of the major histocompatibility complex in resistance to parasite infections. **Crit Review Immunology**., v.10; p.31-52, 1990.

YILDIRIM, M.; LIM, C.; WAN, P.; KLESIUS, P.H. Growth performance and immune response of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fed diets containing graded levels of gossypol-acetic acid. **Aquaculture**, v.219, p.751-768, 2003.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Mais estudos aplicados na área são necessários para esclarecimento da estimulação do sistema de defesa dos peixes por meio de vacinação, assim como a realização de análises imunológicas mais específicas para avaliação da eficiência da própria vacina, como, por exemplo, a detecção de anticorpos específicos. Estudos com vacinas polivalentes também devem ser conduzidos por períodos mais longos e com mais de uma dose, assim como a verificação do comportamento e da mortalidade dos animais, a fim de otimizar o poder imunológico dos peixes frente as infecções bacterianas.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

ABDEL-TAWWAB, M.; ABDEL-RAHMAN, A.M.; ISMAEL, N.E.M. Evaluation of commercial live bakers yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a growth and immunity promoter for Fry Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) challenged in situ with *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture**, v.280, p.185–189, 2008.

ADAMS, A.; AUCHINACHIE, N.; BUNDY, A.; TATNER, M.; HORNE, M. The potency of adjuvanted injected vaccines in Rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) and bath vaccines in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against furunculosis. **Aquaculture**, v.69, p.15-26, 1988.

ANDERSON, D. P. (1992) *In vitro* immunization offish spleen sections and NBT, Pathocytic, PFC and antibody assays for monitoring the immune response. In **Techniques in Fish Immunology** (eds J. S. Stolen, T. C. Fletcher, D. P. Anderson, B. S. Roberson and W. B. van Muiswinkel), pp. 113 136. SOS Publ., Fair Haven, N J, U.S.A.

ANDERSON, D. P.; MORITOMO, T.; DE GROOTH, R. Neutrophil, glass-adherent, nitroblue tetrazolium assay gives early indication of immunization effectiveness in rainbow trout. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.30, p.419-429, 1992.

ARASON, G. J. Lectins as defence molecules in vertebrates and invertebrates. **Fish and Shellfish Immunology**, v.6, p.277-289, 1996.

AUSTIN, B.; AUSTIN, D.A. **Bacterial Fish Pathogens**. Ellis Horwood Ltda., Chichester, United Kingdom, p.111⁻¹95, 1987.

BORGES, A. M. **Noções de Piscicultura – A Criação de Peixes**. São Paulo-SP, 1996.

CARNEIRO, P.C.F.; URBINATI, E.C. Salt as a response mitigator of matrinxã, *Brycon cephalus* (Gunther), during transport. **Aquaculture Research**, v.32, n.4, p.297-304, 2001.

COSTA, A.B. Estratégias para o estudo de bactérias potencialmente patogênicas na piscicultura. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALOSI, D.M. CASTAGNOLLI, N. (Eds). **Tópicos especiais**

em piscicultura de água doce tropical intensiva, 1. ed. São Paulo: TecArt, 2004, cap.13, p.387-404.

DEGANI, G.; REVACH, A. Digestive capabilities of three commensal fish species: carp, *Cyprinus carpio* L., tilapia, *Oreochromis aureus* X *O. niloticus*, and African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchel 1822). **Aquac. Fish Management**, v.22, p.397-403, 1991.

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

FACKLAN, R. R.; SAHM, D. F.; TEIXEIRA, L. M. *Enterococcus*. In: MURRAY, P.R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C. and YOLKEN, R. H. **Manual of Clinical Microbiology**. 7th ed. Washington: ASM PRESS, 1999. p. 297-305.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) - Fisheries and Aquaculture Department, Statistical Collections. Online Query Panels. FAO-FIGIS. Global Aquaculture Production, disponível em:
http://www.fao.org/figis/servlet/SQServlet?file=/usr/local/tomcat/FI/5.5.23/figis/webapps/figis/temp/hqp_66412.xml&outtype=html acesso em 08/11/2008, 2008.

FDA (FOOD & DRUG ADMINISTRATION). Center for Food Safety & Applied Nutrition (CFSAN). **Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook**. www.fda.gov/homepage. p.1-3, 1999.

FISCHER, U.; OTOTAKE, M.; NAKANISHI, T. Life span of circulating blood cells in ginbuna crucian carp (*Carassius auratus langsdorfii*). **Fish and Shellfish Immunology**., v.8, p.589-606, 1998.

FITZSIMMONS, K. Tilapia: The most important aquaculture species of the 21st Century. In: **Symposium on tilapia aquaculture**, 5., Rio de Janeiro, 2000. Anais. Rio de Janeiro: SRG Gráfica & Editora LTDA, 2000. p.3-8.

FRERICHS, G.N. Bacterial diseases of marine fish. **Veterinary Record**, v.125, p.315-318, 1989.

GRAVNINGEN, K. SAKAI, M.; MISHIBA, C.; FUJIMOTO, T. The efficacy and safety of an oil-based vaccine against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*): A field study. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 24, p.523-529, 2008.

GRIFFIN, R.B. Random and directed migration of trout (*Salmo gairdneri*) leukocytes: activation by antibody, complement, and normal serum components. **Developmental and Comparative Immunology**, v.8, p.589-597, 1984.

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

GUDMUNDSDOTTIR, B.K; BJÖRNSDÓTTIR, B. Review - Vaccination against atypical furunculosis and winter ulcer disease of fish. **Vaccine**, v.25, p.5512-5523, 2007.

HANSEN, G.H.; OLAFSEN, J.A. Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish, **Microbiology Ecology**, v.38, p.1-26, 1999.

HASTEIN, Y.; GUDDING, R.; EVENSEN, O. Bacterial vaccines for fish – an update of the current situation worldwide. **Developments in Biological (Basel)**, v.121, p.55-74, 2005.

HILL, D.J.; ROWLEY, A.F. The thromboxane mimetic, U-46619, induces the aggregation of fish thrombocytes. **British Journal of Haematology**., v.92, p.200-211, 1996.

HRUBEC, T.C.; CARDINALE, J.L.; SMITH, S.A. Hematology and Plasma Chemistry Reference Intervals for Cultured Tilapia (*Oreochromis Hybrid*). **Veterinary Clinical Pathology**, v.29, n.1, pp.7¹2, 2000.

INGILAE, M.; ARNESEN, J. A.; LUND, V.; EGGSET, G. Vaccination of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* L., and spotted wolffish *Anarhichas minor* L., against atypical *Aeromonas salmonicida*. **Aquaculture**, v. 183, p.31-44, 2000.

- IWAMA, G.K.; MORGAN, J.D.; BARTON, B.A. Simple field methods for monitoring stress and general condition of fish. **Aquaculture Research**, v.26, p.273-282, 1995.
- JOHNSON, K.A.; AMEND, D.F. Efficacy of *Vibrio anguillarum* *Yersinia ruckery* bacterin applied by oral and anal intubation of salmonids. **Journal of Fish Diseases**, v.6, p.473-476, 1983.
- JOOSTEN, P.H.M.; TIEMERSMA, E.; THREELS, A.; CAUMARTIN-DHIEUX, C.; ROMBOUT, J.H.W.M. Oral vaccination of fish against *Vibrio anguillarum* using alginate microparticles. **Fish and Shellfish Immunology**, v.7, p.471-485, 1997.
- KOZINSKA, A.; ANTYCHOWICZ, J. KOSTRZEMA, P. Relationship between the thrombocyte activity and the susceptibility of the carp (*Cyprinus carpio* L.) to *Aeromonas hydrophila* infection in different seasons. **Bull. Vet. Inst. Pulawy**, v.43, p.63-69, 1999.
- KOZINSKA, A.; GUZ, L. The effect of various *Aeromonas bestiarum* vaccines on non-specific immune parameters and protection of carp (*Cyprinus carpio* L.). **Fish and Shellfish Immunology**, v.16, p.437-445, 2004.
- LAMAS, J.; SANTOS, Y.; BRUNO, D.W.; TORANZO, A.E.; ANADÓN, R. Non-specific cellular responses of rainbow trout to *Vibrio anguillarum* and its extracellular products (ECP's). **Journal of Fish Biology**, v.45, n.5, p.839-845, 1994.
- LEWIS, D.H.; EURELL, T.E.; CANNON, M.S.; GRUMBLES, L.C. T and C cells analogues from peripheral blood of immune channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **Journal of Fish Biology**, v.14, p.31-37, 1979.
- LUND, V.; ARNESEN, J.A.; EGGSET, G. Vaccine development for atypical furunculosis in spotted wolffish *Anarhichas minor* O.: Comparison of efficacy of vaccines containing different strains of atypical *Aeromonas salmonicida*. **Aquaculture**, v. 204, p. 33-44, 2002.
- LUSKOVÁ, V. Factors affecting haematological indices in free-farming fish populations. **Acta Veterinária Brno**, v.67, p.249-255, 1998.
- MARKESTAD, A.; GRAVE, K. **Reduction of antibacterial drug use**

in Norwegian fish farming due to vaccination. Fish Vaccinology (eds R. Gudding, A. Lillehaug, P.J. Midtlyng & F. Brown), v.90, p. 365-369, 1997.

MARTINS, M.L.; MORAES, F.R.; MORAES, J.R.E.; MALHEIROS, E.B. Falha na resposta do cortisol estresse por captura e por carragenina em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae). **Acta Scientiarum**, v.22, n.2, p.545-522, 2000.

MARTINS, M.L.; MORAES, F.R.; FUJIMOTO, R.Y.; ONAKA, E.M.; BOZZO, F.R.; MORAES, J.R.E. Carrageenin induced inflammation in *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae) cultured in Brazil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.32, n.1, p.31-39, 2006.

MARTINS, M.L.; MOURIÑO, J.L.P.; AMARAL, G.V.; VIEIRA, F.N.; DOTTA, G.; BEZERRA, A.J.M.; PEDROTTI, F.S.; JERÔNIMO, G.T.; BUGLIONE-NETO, C.C.; PEREIRA-JR, G. Haematological changes in Nile tilapia experimentally infected with *Enterococcus* sp. **Brazilian Journal of Biology**, v.68, n.3; p.631-637, 2008.

MESEGUER, J.; LÓPEZ-RUIZ, A.; ESTEBAN, M.A. Cytochemical characterization of leucocytes from the seawater teleost, gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). **Histochemistry**, v.102, p.37-44, 1994.

MICHEL, C. Furunculosis of salmonids: Vaccination attempts in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) by formalin killed germs. **Veterinary Record**, v.10, p. 33-40, 1979.

MIDTLYNG, P.J.; REITAN, L.J.; LILLEHAUG, A.; RAMSTAD, A. Protection, immune responses and side effects in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) vaccinated against furunculosis by different procedures. **Fish and Shellfish Immunology**, v.6, p.599-613, 1996.

MOMMSEN, T. P.; E. M. PLISETSKAYA. Insulin in fishes and agnathans: History, structure, and metabolic regulation. **Rev. Aquat. Sci.** v.4, p.225-259, 1991.

MORAES, F.R.; MARTINS, M.L. Condições predisponentes e principais enfermidades de teleósteos em piscicultura intensiva. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALOSSO, D.M.;

CASTAGNOLLI, N. (Ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, p.343-383, 2004.

NELSON, J.S.; ROHOVEC, J.S.; FRYER, J.L. Tissue location of vibrio bacterin delivered by intraperitoneal injection, immersion and oral routes to *Salmo gairdneri*. **Fish Pathology**, v.19, p.263-269, 1985.

OURTH, D.D. Secretory IgM, lysozyme and lymphocytes in the skin and mucus of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **Developmental and Comparative Immunology**, v.4, p.65-74, 1980.

PALLERONI, N.J. Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894, In : BRENNER (D.J.), KRIEG (N.R.), STALEY (J.T.) et GARRITY (G.M.) (Eds), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, second edition, vol. 2 (The Proteobacteria), part B (The Gammaproteobacteria), Springer-Verlag, New York, p. 323-379, 2005.

PALMER, R.; SMITH, P.R. **Studies on vaccination of Atlantic salmon against furunculosis**. Fish Diseases; third COPRAQ-session (W. Ahne, ed.), Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, p. 107-112, 1980.

PIER, G., RAMPHAL, R. **Pseudomonas aeruginosa**. In: Mandell G, Bennett J, Dolin R, eds, Principles and practice of infectious diseases. Philadelphia, PA: Elsevier Churchill Livingstone, 2005; 2587-2615.

PLUMB, J.A. **Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes**. 2nd ed. Ames: Iowa State University, 1999. 328p.

POST, G. Response of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to antigens of *Aeromonas hydrophila*. **J. Fish. Res. Board Canada**, v.23, p.1487-1494, 1966.

RAHMAN, M.H., KAWAI, K., KUSUDA, R. Virulence of starved *Aeromonas hydrophila* to cyprinid fish. **Fish Pathology**. v.32, n3, p.163-168, 1997.

RALL, V.L.M., ARIA, S.T., HEIDTMANN, S., et al. *Aeromonas* species isolated from pintado fish (*Pseudoplatystoma* sp): Virulence factors and drug susceptibility. **Review Microbiology**, São Paulo, v.29, p.222-227, 1998.

ROBERTS, R.J. **Patología de Los Peces**. In: Madrid: Mundi-Prensa, Patología de Los Peces. 1981, 366 p.

ROBERTS, R.J. Motile aeromonad septicaemia. In: INGLIS, V.; ROBERTS, R.J.; BROMAGE, N.R. (Eds). **Bacterial Diseases of Fish**, Blackwell Science, Oxford, England, 1993, p.143-155.

RODGERS, C.J. Immersion vaccination for control of fish furunculosis. **Diseases of Aquatic Organisms.**, v.8, p.69-72, 1990.

ROMBOUT, W.H.M.; BLOK, L.J.; LAMERS, C.H.J.; EGBERTS. Immunization of carp (*Cyprinus carpio* L.) with a bacterin: Indications for a common mucosal immune system. **Developmental and Comparative Immunology**, v.10, p.341-351, 1986.

RUANGPAN, L.; KITAO, T.; YOSHIDA, T. Protective efficacy of *Aeromonas hydrophila* vaccines in Nile tilapia. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v.12, p. 345-350, 1986.

RUIZ, I.; FERNÁNDEZ, A.B.; BLAS, I. El sistema inmune de los teleósteos (III): respuesta inmune específica. **Revista Aquatic**, v.18, p.33-38, 2003.

SCHACHTE, J.H. Immunization of channel catfish, *Ictalurus punctatus* against two bacterial diseases. **Marine Fisheries Review.**, v.40, p.18-24, 1978.

SCHRECK, C.B. Immunomodulation: endogenous factors. In: IWANA, G.; NAKANISHI, T. (Eds). **The fish immune system, organism, pathogen and environment**. London: Academic Press, 1996. p.311-337.

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

SHANKAR, V.; BAGHDAYAN, A. S.; HUYCKE, M. M.; LINDAHL, G. AND GILMORE, M. Infection derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a oval surface protein. **Infection and Immunity**. v.67, p.193-200, 1999.

SILBERGELD, E.K. Blood Glucose: A Sensitive Indicator of Environmental Stress in Fish. **Bull. Environm. Contam. Toxicol.**, v.11, n.1, 1974.

SIWICK, A.K.; MORAND, M.; KLEIN, P.; STUDNICKA, M.; TERECH-MAJEWSKA, E. Modulation of nonspecific defense mechanisms and protection against diseases in fish. **Acta Vet Brno**, v.67, p.323-328, 1998.

SKJERMO, J.; VADSTEIN, O. Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. **Aquaculture**, v.177, p.333-343, 1999.

SMITH, P.D.; MCCARTHY, D.H.; PATERSON, W.D. Further studies on furunculosis vaccination. In: **Fish Diseases**; third COPRAQ-session (W. Ahne, ed.), Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, p. 113-119, 1980.

STOVER, C.K.; PHAM, X.Q.; ERWIN, A.L. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. **Nature**, v.406, p. 959–964, 2000.

TAVARES-DIAS, M.; SCHALCH, S.H.C.; MARTINS, M.L.; SILVA, E.D.; MORAES, F.R.; PERECIN, D. Hematologia de teleósteos brasileiros com infecção parasitária. I. Variáveis do *Leporinus macrocephalus* Garavello & Britski, 1988 (Anostomidae) e *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1987 (Characidae). **Acta Scientiarum**, v.21, p.337-342, 1999a.

TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M.L.; KRONKA, S.N. Evaluation of the haematological parameters in *Piaractus mesopotamicus* Holmberg (Osteichthyes, Characidae) with *Argulus* sp. (Crustacea: Branchiura) infestation and treatment with organophosphate. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.16, p.553-555, 1999b.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. In: **Hematologia de peixes teleósteos**, Ed. Riberão Preto, 2004, 144p.

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

VADSTEIN, O. The use of immunostimulation in marine larviculture: possibilities and challenges. **Aquaculture**, v.155, p.401-417, 1997.

VALE, A.; AFONSO, A.; SILVA, M.T. The Professional phagocytes of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): cytochemical characterisation of neutrophils and macrophages in the normal and inflamed peritoneal cavity. **Fish Shellfish and Immunology**, v.13, p.183-198, 2002.

VAN MUISWINKEL, W.B.; ANDERSON, D.P.; LAMERS, C.H.J.; EGBERTS, E.; VAN LOON, J.J.A.; IJSSEL, J.P. Fish immunology and fish health. In: MANNING, M.J.; TATNER, M.F. (Eds). **Fish Immunology**. London: Academic Press, 1985. p.1-8.

WALSH, C.J.; LUER, C.A. Comparative phagocytic and pinocytic of leucocytes from peripheral blood and lymphomyeloid tissues of the nurse shark (*Ginglymostoma cirratum* Bonaterre) and the clarnose skate (*Raja eglanteria* Bosc). **Fish and Shellfish Immunology**, v.8, p.197-215, 1998.

WALTERS, G.R.; PLUMB, J.A. Environmental stress and bacterial infection in channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. **Journal of Fish Biology**, v.17, p.177-185, 1980.

WIKLUND, T.; DALSGAARD, I. Occurrence and significance of atypical *Aeromonas salmonicida* in non-salmonid and salmonid fish species: a review. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.32, n.1, p.49-69, 1998.

WRIGHT, J.R.Jr.; BONEN, A.; CONLON, J.M.; POHAJDAK, B. Glucose Homeostasis in the Teleost Fish Tilapia: Insights from Brockmann Body Xenotransplantation Studies. **American Zoologist**, v.40, p.234-245, 2000.