

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**IMUNODIAGNÓSTICO DE *Aeromonas hydrophila* EM  
PACUS (*Piaractus mesopotamicus*, HOLMBERG, 1887)  
INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE**

**Dayanne Carla Fernandes**

Médica Veterinária

**2015**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**IMUNODIAGNÓSTICO DE *Aeromonas hydrophila* EM  
PACUS (*Piaractus mesopotamicus*, HOLMBERG, 1887)  
INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE**

**Dayanne Carla Fernandes**

**Orientadora: Profa. Dra. Julieta Rodini Engrácia de Moraes**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, área de Patologia Animal.

**2015**

Fernandes, Dayanne Carla  
F363i Imunodiagnóstico de *Aeromonas hydrophila* em pacus (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) infectados experimentalmente / Dayanne Carla Fernandes. -- Jaboticabal, 2015  
xii, 45 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015  
Orientadora: Julieta Rodini Engrácia de Moraes  
Banca examinadora: Laura Satiko Okada Nakaghi, Rogério  
Salvador  
Bibliografia

1. Imunodiagnóstico. 2. Imunoglobulina Y. 3. *Piaractus mesopotamicus*. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616-022:636.9

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO:** IMUNODIAGNÓSTICO DE *Aeromonas hydrophila* EM PACUS (*Piaractus mesopotamicus*, HOLMBERG, 1887) INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE

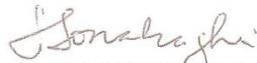
**AUTORA:** DAYANNE CARLA FERNANDES

**ORIENTADORA:** Profa. Dra. JULIETA RODINI ENGRACIA DE MORAES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: PATOLOGIA ANIMAL, pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. JULIETA RODINI ENGRACIA DE MORAES  
Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Profa. Dra. LAURA SATIKO OKADA NAKAGHI  
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Prof. Dr. ROGÉRIO SALVADOR  
Universidade Estadual do Norte do Paraná / Bandeirantes/PR

Data da realização: 26 de outubro de 2015.

---

## DADOS CURRICULARES DA AUTORA

**Dayanne Carla Fernandes** – Natural de Bandeirantes/ PR, nascida em 09 de janeiro de 1998, graduada em Medicina Veterinária em julho de 2013, na Universidade Estadual do Norte do Paraná. Realizou estágio de aperfeiçoamento técnico na área de microbiologia e imunopatologia de peixes no Laboratório de Imunopatologia de Peixes da Uenp – Câmpus Luiz Meneghel na cidade de Bandeirantes/ PR, onde foi bolsista da Fundação Araucária, categoria Iniciação científica em 2011 e 2012 sob a orientação do Prof. Dr. Rogério Salvador. Em agosto de 2013 ingressou no programa de pós-graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp Câmpus de Jaboticabal sob a orientação da Profa. Dra. Julieta Rodini Engrácia de Moraes, tendo como projeto de mestrado o trabalho intitulado “Imunodiagnóstico de *Aeromonas hydrophila* em pacus (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) infectados experimentalmente”.

*“Só há duas maneiras de viver a vida: a primeira é vive-la como se os milagres existissem. A segunda é vive-la como se tudo fosse milagre.”*

**Albert Einstein**

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Luiz Carlos Fernandes e Ione Aparecida Fernandes, pelos ensinamentos, por todas as vezes que se preocuparam comigo, pela educação e amor, e também por todo o exemplo que sempre me deram de como ser ou tentar ser uma pessoa justa que batalha e conquista seus objetivos com muita honestidade.

Ao meu namorado, Silas Fernandes Eto, pelo amor, ensinamentos, compreensão, companheirismo e por todo apoio durante a realização desta pesquisa.

Aos meus irmãos, Fábio Fernandes e Élcio Fernandes, pelas palavras de incentivo e preocupação.

Ao meu sobrinho, Matheus Moreira Fernandes pelos momentos de alegria nas suas vindas a Jaboticabal, a ele todo meu amor.

A minha Cocker Spaniel, Suze Fernandes (*in memoriam*) pelo companheirismo, latidos, pulos e lambidas de amor canino durante toda minha vida acadêmica.

Aos meus avós Julieta Fernandes e Angelim Fernandes (*in memoriam*) pela preocupação e carinho. Saudades eternas das suas ligações vô!

Aos meus tios, José Augusto Fernandes e Ângela Marinho Fernandes por todas as orações e ajuda durante minha mudança para Jaboticabal.

Aos animais, para a realização deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre junto a mim me ajudando a fazer desta vida um palco de felicidades.

À Profa. Dra. Julieta Rodini Engrácia de Moraes pela orientação, oportunidade, confiança, otimismo e fé.

Ao Prof. Dr. Flávio Ruas de Moraes pelos ensinamentos, atenção e por muitos momentos de transmissão de paz e sabedoria.

Ao Prof. Dr. Rogério Salvador que me encaminhou para a oportunidade de poder realizar o mestrado.

Ao Prof. Dr. João Martins Pizauro Junior pela confiança, ajuda nas análises de eletroforese, *western blot*, purificação de proteínas, separação das frações bacterianas.

À responsável técnica Francisca de Assis Ardisson, pela atenção e ajuda nas técnicas de coloração.

Ao auxiliar agropecuário Valdecir Fernandes de Lima, por ajudar com a coleta nos tanques e transporte dos pacus do Caunesp.

Ao colega de pós graduação Msc. Adriano Marques Gonçalves que me ajudou na realização das análises de Hartree, eletroforese e *western blot*.

À colega de pós graduação Msc. Mayara Caroline Rosolem pelas dicas de imuno-histoquímica e pelas conversas e risadas.

Ao colega de pós graduação Dr. Gustavo Claudiano da Silva pela parceria e por ceder os órgãos dos peixes utilizados.

Ao colega de pós graduação Dr. Luiz Flávio José dos Santos que me ajudou na realização da separação das frações bacterianas e purificação de proteínas.

À colega de pós graduação Dra. Marina Tie Shimada, pelos bons conselhos durante o meu mestrado.

Ao colega de pós graduação Dr. Paulo Fernandes Marcusso por todas as vezes que me prestou favores durante o meu mestrado.

Aos membros da comissão examinadora de Exame de Qualificação (Dra. Silvia Patrícia Carraschi e Dr. Rogério Salvador) e membros da Defesa de

Dissertação de mestrado (Dra. Laura Satiko Okada Nakaghi e Dr. Rogério Salvador)  
pelas sugestões ao trabalho.

À CAPES (Probiocobia), pelo apoio financeiro.

À Fapesp (2012/ 10090 - 4), pelo apoio financeiro.

Ao CNpq pela concessão da bolsa, para desenvolver meu projeto de  
pesquisa.

## SUMÁRIO

	Página
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	iii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iv
LISTA DE FIGURAS .....	vi
LISTA DE TABELAS .....	ix
ANEXOS .....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT .....	xii
1. INTRODUÇÃO .....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	02
2.1. Considerações iniciais.....	02
2.2. Complexo <i>Aeromonas</i> móveis .....	03
2.3. <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	04
2.4. Epidemiologia da <i>A. hydrophila</i> .....	05
2.5. Fatores de virulência da <i>A. hydrophila</i> .....	06
2.6. Produção de anticorpos IgY e aplicações nos testes de imunodiagnóstico .....	07
3. OBJETIVOS GERAIS .....	08
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	09
4.1. Local do experimento .....	09
4.2. Isolamento e identificação de cepas de <i>A. hydrophila</i> .....	09
4.3. Purificação das frações citoplasmáticas, frações de membrana e fração total bacteriana de <i>A. hydrophila</i> .....	09
4.4. Dosagem da concentração de proteínas nas amostras .....	10
4.5. Análise eletroforética das frações proteicas microbianas .....	11
4.6. Imunização e coleta de soro e gema das aves .....	12
4.7. Detecção de imunoglobulinas Y específicas para IgY anti- <i>A. hydrophila</i> no soro e na gema (ELISA indireto).....	12

4.8. Avaliação do potencial de afinidade da IgY anti- <i>A. hydrophila</i> (ELISA indireto).....	13
4.9. <i>Western Blot</i> para a análise da especificidade do anticorpo IgY anti- <i>A. hydrophila</i> .....	13
4.10. Purificação dos anticorpos IgY .....	14
4.11. Infecção experimental para a obtenção de órgãos positivos.....	15
4.12. Análise histopatológica dos órgãos .....	16
4.13. Imuno-histoquímica .....	17
4.14. Análise estatística .....	18
5. RESULTADOS .....	18
5.1. Análise da produção e afinidade dos anticorpos IgY anti- <i>A. hydrophila</i> .....	18
5.2. Caracterização da especificidade do anticorpo policlonal IgY anti- <i>A. hydrophila</i> .....	20
5.3. Alterações macroscópicas e microscópicas dos órgãos infectados por <i>A. hydrophila</i> .....	22
5.4. Imuno-histoquímica dos órgãos infectados por <i>A. hydrophila</i> .....	24
6. DISCUSSÃO .....	28
7. CONCLUSÃO .....	31
8. REFERÊNCIAS .....	33



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Jaboticabal



## CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 008577/12 do trabalho de pesquisa intitulado "**Aspectos da fisiopatologia da sepse em *Piaractus mesopotamicus* induzida por *Aeromonas hydrophila***", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Flávio Ruas de Moraes está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião extraordinária de 18 de maio de 2012.

Jaboticabal, 21 de maio de 2012.

  
Prof. Dr. Andrigo Barboza De Nardi  
Coordenador - CEUA

**LISTA DE ABREVIATURAS**

APS – Persulfato de amônia  
BSA – Soroalbumina bovina  
cm – Centímetros  
°C – Graus Celsius  
DAB – Diaminobenzedine  
DL – Dose letal  
EB – Energia bruta  
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético  
ELISA – Imunoensaio enzimático  
g – Grama  
g – Giros  
H&E – Hematoxilina e Eosina  
Ig – Imunoglobulina  
kcal – Quilocaloria  
kDa – Quilodalton  
kg – Quilograma  
L – Litro  
LPS – Lipopolissacarídeo  
mg – Miligrama  
mL – Mililitro  
mM – Milimolar  
nm – Nanômetro  
OMS – Organização Mundial da Saúde  
PB – Proteína bruta  
PGE – Polietilenoglicol  
pH – Potencial hidrogênico  
SDS – Dodecil sulfato de sódio  
TA – Temperatura ambiente  
TEMED – Tetrametil etilenodiamina  
TSA – Ágar trípico de soja

TSB – Caldo trípico de soja  
UFC – Unidade formadora de colônia  
UTI – Unidade de Terapia Intensiva  
 $\mu\text{g}$  – Micrograma  
 $\mu\text{L}$  – Microlitro  
 $\mu\text{m}$  – Micrômetro  
 $\mu\text{S}$  – Micro-Siemens  
V – Volt

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Gel de eletroforese SDS-PAGE (SDS 9%) do extrato purificado da gema contendo imunoglobulinas Y. (P) Padrão Bio-Rad Precision Plus, (1) Amostra de IgY na concentração de 40 µg e (2) 80 µg/mL. As bandas protéicas são compatíveis com a imunoglobulina Y, cadeia pesada (84 kDa) e cadeia leve (24 kDa).. ..... 15
- Figura 2 – Produção de anticorpos IgY, no soro (A) na gema (B) de galinhas poedeiras da linhagem *White Leghorn*, imunizadas com proteínas insolúveis de membrana de *A. hydrophila*. Cada ponto representa a média de sete análises (\*) diferença significativa dos títulos de anticorpos específicos ( $p < 0,05$ ), no 15 dia em relação aos demais tempos..... 19
- Figura 3 – Potencial de afinidade da IgY anti – *A. hydrophila*, galinhas poedeiras inoculados com 100 µg/mL de com proteína insolúveis de membrana de *A. hydrophila*. Cada coluna representa a média de sete análises (\*) diferença significativa dos títulos de anticorpos específicos ( $p < 0,05$ ), entre 90 dias em relação aos demais tempos..... 19
- Figura 4 – *Western blot* para a determinação da especificidade da IgY para proteínas celulares de *A. hydrophila*. (A) Gel de SDS-PAGE (SDS 9%) amostras das frações protéicas, aplicadas no volume de 30 µL por poço, na concentração de 7,7 µg. A distribuição numérica das amostras são similares nas figuras A e B; P: Padrão protéico da Bio-Rad; 1= Fração total (citoplasma e membrana); 2= Fração citoplasmática e 3= Fração de membrana. (B) SDS-PAGE transferidas e incubadas com extrato purificado de IgY anti- *A. hydrophila* do *pool* de ovos 90 dias após a quarta imunização..... 21
- Figura 5 – Fotomicrografia de órgãos de *P. mesopotamicus* controle (A, C e E) e infectados (B, D e F) experimentalmente com *A. hydrophila*. (A) Coração controle. (B) Coração infectado, com resposta inflamatória no miocárdio (setas) e dissociação dos feixes musculares devido ao edema (e). (C) Fígado controle. (D) Fígado infectado com processo degenerativo, necrose (n) e presença de bactéria na luz do vaso

- (setas). (E) Rim controle. (F) Rim infectado com necrose de coagulação (asterisco) e infiltrado leucocitário dentro da cápsula glomerular de Bowman (seta pontilhada) e presença de melanomacrófagos (setas). H&E..... 23
- Figura 6 – Fotomicrografia de órgãos de *P. mesopotamicus* controle (A e C) e infectados (B e D) experimentalmente com *A. hydrophila*. (A) Baço controle. (B) Baço infectado com necrose celular (asterisco) e melanomacrófagos (seta). (C) Encéfalo controle. (D) Encéfalo infectado com células da glia (setas pontilhadas) e presença de neurônios aparentemente normais (setas). H&E..... 24
- Figura 7 – Fotomicrografia de fragmento de coração de *P. mesopotamicus* nove horas após a infecção experimental com *A. hydrophila* com reação imuno-histoquímica positiva para anticorpos IgY anti- *A. hydrophila* (DAB). Coração com invasão bacteriana mostrando a morfologia em bastonete da bactéria. Hematoxilina de Harris. .... 25
- Figura 8 – Fotomicrografia de fragmento de fígado de *P. mesopotamicus* nove horas após a infecção experimental com *A. hydrophila* com reação imuno-histoquímica positiva para anticorpos IgY anti-*A. hydrophila* (DAB). Corte de fígado com colônias bacterianas imunomarcadas (setas), próximas ao vaso (V). Hematoxilina de Harris..... 25
- Figura 9 – Fotomicrografia de fragmento de rim de *P. mesopotamicus* nove horas após a infecção experimental com *A. hydrophila*, com reação imuno-histoquímica positiva para anticorpos IgY anti-*A. hydrophila* (DAB). Presença de colônias bacterianas imunomarcadas (setas) e melanomacrófagos (M). Hematoxilina de Harris..... 26
- Figura 10 – Fotomicrografia de fragmento de baço de *P. mesopotamicus* nove horas após a infecção experimental com *A. hydrophila*. Reação imuno-histoquímica positiva para anticorpos IgY anti-*A. hydrophila* (DAB). Marcação de bactérias e de macrófagos (M) fagocitando o agente (setas). Hematoxilina de Harris. .... 27
- Figura 11 – Fotomicrografia de fragmento de encéfalo de *P. mesopotamicus* nove horas após a infecção experimental com *A. hydrophila*, com

reação imuno-histoquímica positiva para anticorpos IgY anti-A. <i>hydrophila</i> (DAB). Hematoxilina de Harris. ....	27
---	----

**LISTA DE TABELAS**

- Tabela 1 – Teor de proteína das amostras de fração total, citoplasmática e de membrana extraídos *da A. hydrophila* e extrato purificado da gema..... 11
- Tabela 2 – Massas moleculares e intensidades de bandas detectadas pelo anticorpo IgY anti-*A. hydrophila* específico na análise de *western blot* ..... 21

## **ANEXOS**

Anexo 1 – Imagem Imagem ilustrativa do método de imuno-histoquímica para a detecção do microrganismo em órgãos e no tecido cerebral (ETO; FERNANDES, 2015) .....	32
--	----

## **IMUNODIAGNÓSTICO DE *Aeromonas hydrophila* EM PACUS (*Piaractus mesopotamicus*, HOLMBERG, 1887) INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE**

**RESUMO** - *Aeromonas hydrophila* é patógeno oportunista com potencial de infecção para mamíferos, peixes e humanos, cosmopolita e emergente em infecções hospitalares de humanos. O complexo *Aeromonas hydrophila* formado por várias subespécies apresenta variedade antigênica que dificulta o diagnóstico da infecção pelo uso de anticorpos monoclonais. Pelo exposto, o objetivo deste trabalho foi o de produzir uma imunoglobulina Y policlonal purificada em gema de galinhas poedeiras, imunizadas com proteínas de membrana bacteriana e testar sua eficácia nos ensaios de imuno-histoquímica para identificação de bactérias no fígado e rim de *Piaractus mesopotamicus* infectados experimentalmente. Os resultados mostraram que a técnica foi eficaz uma vez que as aves produziram anticorpos específicos anti-*A. hydrophila* no soro e na gema, com aumento significativo ( $p < 0,05$ ) e progressivo dos títulos até 60 dias, que se mantiveram detectáveis no teste ELISA até 90 dias após a terceira imunização. As análises de imuno-histoquímica foram efetivas para detecção de colônias de *A. hydrophila* no coração, fígado, rim, encéfalo e baço de *P. mesopotamicus* com anticorpos IgY específico. Os resultados permitiram concluir que a imunoglobulina Y produzida em ovos de galinha foi eficaz no diagnóstico de aeromonose na espécie de peixe testada.

**Palavras-chave:** aeromonose, imuno-histoquímica, imunoglobulina Y

***Aeromonas hydrophila* IMMUNODIAGNOSTIC IN PACUS (*Piaractus mesopotamicus*, HOLMBERG, 1887) INFECTED EXPERIMENTALLY**

**ABSTRACT** - Among the aeromonas complex, *Aeromonas hydrophila* has the potential to infect mammals, fish, and humans. It is a cosmopolitan, opportunistic and emerging pathogen in nosocomial infections in humans. This bacteria complex formed by several subspecies also presents antigenic variety, which makes diagnosis difficult to be done with the use of monoclonal antibodies. The aim of this work was to produce polyclonal immunoglobulin Y purified from yolk of laying hens, immunized with bacterial membrane proteins, and to test its effectiveness in immunohistochemistry of *A. hydrophila* cells in the liver and kidney of experimentally infected *Piaractus mesopotamicus*. The results showed that the laying hens produced specific anti-*A. hydrophila* antibodies in serum and yolk, with a significant ( $p < 0,05$ ) and progressive increase of titles at 60 days, which were maintained until 90 days after the third detectable immunization in the ELISA test. The immunohistochemistry was positive for detection of colonies of *A. hydrophila* in liver and *P. mesopotamicus* in heart, liver, kidney, brain and spleen with the use of specific IgY antibodies. Therefore, the immunoglobulin produced in chicken eggs was effective in diagnosing aeromonas in *P. mesopotamicus*.

**Keywords:** aeromonose, immunoglobulin Y, immunohistochemistry

## 1. INTRODUÇÃO

A bactéria *A. hydrophila*, pertence à família *Aeromonadaceae*. Suas características bacteriológicas e morfológicas são: Gram negativa, aeróbia e anaeróbia facultativa, possui cápsula, tem forma de bastonete móvel, possui flagelos polares e não produz esporos (JANDA; ABBOTT, 2010). A bactéria é considerada a mais virulenta dentre o complexo das *Aeromonas* móveis (RHODES et al., 2000) e tem importância como agente etiológico de infecções de peixes pois causam úlceras cutâneas e septicemia hemorrágica. Além disso, está associada às doenças humanas como patógenos veiculados pela água e alimentos contaminados (OMS, 2003), de interesse emergente em saúde pública (HEUZENROEDER; WONG; FLOWER, 1999; HOFER et al., 2006).

A *A. hydrophila* pode ser diagnosticada por meio do isolamento e identificação por técnicas morfológicas, tintoriais e bioquímicas. Todavia, estas técnicas estão sujeitas a equívocos que resultam na classificação desses microrganismos em outras espécies (CHACÓN et al., 2003; SOLER et al., 2003; JANDA; ABBOTT, 2010). A identificação a partir de testes comerciais é limitada, pois tendem a classificar a maioria, como *A. hydrophila* (PARK et al., 2003; SOLER et al., 2003) em decorrência de reações falso positivas, que mascaram a verdadeira incidência de outras espécies (FIGUERAS, 2005). Os métodos moleculares seriam a melhor opção para identificação correta do microrganismo (CASTRO-ESCARPULLI et al., 2002; FIGUERAS, 2005), porém estes ainda não são amplamente executados na rotina dos laboratórios (GHENGHESH et al., 2008).

A produção de anticorpos que possam ser utilizados para o imunodiagnóstico, permite a detecção do agente durante as diferentes fases de evolução da infecção, com vantagens para anticorpos monoclonais ou policlonais na medicina humana e animal (SHIN et al., 2002; GUIMARÃES; CORREIA; GAMA FILHO, 2008).

A principal imunoglobulina encontrada nas aves é a IgY, cujas características estruturais assemelham-se à IgG dos mamíferos. A IgY tem massa molecular de aproximadamente 160 kDa, apresenta ponto isoelétrico que varia entre 5,7 e 7,6 e é constituída por duas cadeias leves e duas pesadas. Cada cadeia leve

apresenta massa molecular de aproximadamente 18 kDa e é formada por uma região variável e outra constante. A cadeia pesada tem massa molecular de 65 kDa e é formada por uma região variável e quatro regiões constantes. A função biológica da cadeia pesada da IgY aviária é semelhante a fração homóloga a da IgG dos mamíferos.

As imunoglobulinas Y podem ser extraídas e purificadas da gema do ovo de galinhas poedeiras. Sua aplicação como biomolécula marcadora em ensaios de imunodiagnóstico representa importante ferramenta para o diagnóstico de enfermidades infecciosas em peixes (GUIMARÃES; CORREIA; GAMA FILHO, 2008).

A IgY apresenta menor fluorescência inespecífica em preparações imunofluorescentes e também pode ser usada na maioria dos testes de aglutinação (CHACANA et al., 2004; MUNHOZ et al., 2014).

Este estudo teve como objetivo a produção de anticorpos policlonais IgY na gema do ovo de galinhas poedeiras estimuladas com proteínas de *A. hydrophila* e sua aplicação no ensaio de imuno-histoquímica, para identificação do microrganismo nos órgãos e tecidos de *P. mesopotamicus* infectados experimentalmente.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Considerações iniciais**

Em 2011, a produção aquícola nacional foi de 628.704,3 t, com incremento de 31,1% em relação à produção de 2010. Dentre os peixes mais criados em águas continentais, as tilápias e os peixes redondos (pacu, tambaqui e tambacu) são os de maior importância, pois juntos somaram 436.415,5 t ou 80,1% da produção nacional de piscicultura no ano de 2011 (BRASIL, 2011). A média de consumo nacional de pescado por habitante alcançou 11,7 kg em 2011, que significaram 23,7% de aumento na demanda em relação aos dois anos anteriores (BRASIL, 2014). Entretanto, a expansão e a intensificação da piscicultura geram problemas sanitários importantes, ocasionando aumento relativo dos níveis de estresse, com depressão dos mecanismos de defesa e aumento da suscetibilidade às doenças infecciosas e às parasitárias (MORAES; MORAES, 2009). A prevalência de enfermidades

bacterianas em peixes leva a perdas significativas nesta atividade. As bactérias Gram negativas do gênero *Aeromonas* se incluem nestas por serem importantes patógenos encontrado na água, solo, alimentos, fezes humanas e animais (HIRSCH et al., 2006).

## 2.2. Complexo *Aeromonas* móveis

A microbiota intestinal de peixes depende da colonização bacteriana durante os estágios iniciais de desenvolvimento, das mudanças na dieta e das condições ambientais podendo ser composta por várias espécies de bactérias, incluindo as do gênero *Aeromonas* e os peixes podem servir como seu reservatório (HOVDA; LUNESTAD; ROSNES, 2007; SILVA, 2015).

As espécies mais comuns de *Aeromonas* móveis são: *A. caviae*, *A. hydrophila*, *A. sóbria*, *A. veronii*, *A. trota*, *A. schubertii* e *A. jandaei* (PENDERS; STOBBERINGH, 2008). Contudo, algumas dúvidas são expressas sobre o papel destas bactérias como patógenos de peixes. Dentre as *Aeromonas* móveis as mais virulentas são as cepas de *A. hydrophila* (WAKABAYASHI et al., 1981; HOLLIMAN, 1993).

No Brasil de dez amostras de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) cultivadas na região de Paulo Afonso na Bahia em três foi confirmada a presença de *A. hydrophila* (GONZALEZ-SERRANO et al., 2001; LEMOS; RODRIGUES; LOPES, 2006). No estado do Rio Grande do Sul, foram analisados jundiás (*Rhamdia quelen*) com lesões sugestivas de aeromonose e confirmada presença de *A. hydrophila* nas lesões por meio de provas bioquímicas (BARCELLOS et al., 2008). No reservatório Três Irmãos, localizado na cidade de Pereira Barreto estado de São Paulo, foi descrito surto com alta mortalidade de tilápias cultivadas em tanques-rede, tratando-se da presença de *A. caviae* nas amostras de fígado e rim (MARTINS; MIYAZAKI; MOURIÑO, 2008).

Nos pesqueiros da região metropolitana de São Paulo, foram avaliadas amostras de água de viveiros e de peixes, sendo que 93% e 87%, respectivamente, estavam contaminados por *Aeromonas* spp., e foram identificadas em 11% das amostras de superfície corpórea de peixes, 19% de água de distribuição e em 70% das amostras de água do viveiro (AZEVEDO, et al., 2003; HIRSCH et al., 2006).

Hatha et al. (2005) identificaram espécies de *Aeromonas* spp. em intestino de várias espécies de peixes revelando que 61% dos isolados foram de *A. hydrophila*, 30% de *A. caviae*, 7% de *A. sobria* e 2% considerados atípicos nas culturas de *Aeromonas* spp. provenientes de carpas (*Cyprinus carpio*) e foram isoladas e identificadas cinco espécies: *A. bestiarum*, *A. salmonicida*, *A. veronii* biotipo *sobria*, *A. sobria*, *A. encheleia*.

Trinta e quatro culturas de *Aeromonas* spp. isoladas de carpas (*Cyprinus carpio* L.) saudáveis e doentes foram identificadas cinco espécies: *A. bestiarum*, *A. salmonicida*, *A. veronii* biotipo *sobria*, *A. sobria*, *A. encheleia* e 76,9% tratavam-se de *A. salmonicida* e 63,6% de *A. veronii*, sendo patogênicas para as carpas estudadas (KOZINSKA et al., 2002).

Estudos que caracterizaram a microbiota dos peixes com potencial patogênico foram realizados no Brasil para espécies como *Rhamdia quelen* (SHAMA et al., 2000; COSTA et al., 2008), *Piaractus mesopotamicus* e *Oreochromis niloticus* (BELÉM-COSTA; CYRINO, 2006), bem como em comunidades de peixes do Rio Congonhas no Paraná (SOUSA; SILVA-SOUZA, 2001).

As septicemias causadas por *Aeromonas* móveis são um problema em peixes de água doce, porque apresentam ampla variação de virulência dentre os diferentes isolados (COSTA, 2003).

### **2.3. *Aeromonas hydrophila***

Segundo Martin-Carnahan e Joseph (2005) a *Aeromonas* significa ar ou gás (“aer”) e unidade (“monas”), ou seja, unidades produtoras de gás. *Aeromonas* é um gênero da família *Aeromonadaceae* e consiste em bactérias Gram negativas que podem aparecer como bacilos ou cocobacilos independentes, aos pares ou em cadeias curtas, anaeróbias facultativas, não-esporuladas, oxidase e catalase positiva. Utilizam a D-glicose como única fonte de carbono e energia e sais amoniacais como fonte de nitrogênio, reduzem nitrato a nitrito (por meio da desnitrificação) e são normalmente resistentes ao agente vibriostático 2,4- diamino-6,7-diisopropilpteridine (O/129) (JANDA; ABBOTT, 2010).

O gênero *Aeromonas* inclui bastonetes Gram-negativos, medindo 0,3-1,0 µm de diâmetro x 1,5-3,5 µm de comprimento. Geralmente movimentam-se por um

flagelo polar, crescem de 35° a 37 °C, e causam várias infecções, como é o caso da espécie *A. hydrophila* (SILVA, 2015).

A taxonomia do gênero *Aeromonas* é bastante complexa e constantemente sofre revisões devido às novas espécies descritas e à introdução de novos critérios de diagnóstico (ALPERI et al., 2008). Apesar do progresso científico, muitas questões relativas a este patógeno permanecem sem resposta, principalmente devido a falta de relação entre as características fenotípicas e genotípicas das espécies (ORMEN et al., 2005; HASAN et al., 2006; BEAZ-HIDALGO et al., 2010)

#### **2.4. Epidemiologia da *A. hydrophila***

As *Aeromonas* são consideradas patógenos emergentes encontrados em grande diversidade de *habitat*, tais como, solo, água, fezes de animais e esgoto. Elas apresentam distribuição em meios aquáticos e fazem parte da microbiota associada aos animais peclotérmicos e, por outros, como patógenos de peixes e dos seres humanos em enfermidades de veiculação hídrica (VIVEKANANDHAN et al., 2002; HIRSCH et al., 2006).

A transmissão do agente acontece de modo horizontal, estando o mesmo presente na água e no fundo dos viveiros, transmitida por descarga do trato intestinal dos peixes e lesões externas na pele (COSTA, 2003). Na aquicultura a alteração de parâmetros de manejo pode levar a predisposição dos peixes às enfermidades sendo elas causadas pelas altas temperaturas e densidades de estocagem, mudanças bruscas de temperatura, traumatismos decorrentes de manejo, transferência de peixes, baixos níveis de oxigênio dissolvido, condições nutricionais deficientes e infecções por fungos ou parasitas que contribuem para as mudanças fisiológicas e aumento a suscetibilidade a infecção (PILARSKI; SAKABE, 2009).

Esta bactéria também pode ser isolada de alimentos como nos vegetais, carnes, pescados e mariscos, além de outras fontes como animais domésticos, pássaros e insetos (FONTES et al., 2011; DI PINTO et al., 2012). No Estado do Paraná, foram isoladas a partir de água de torneira, mineral e de poço artesiano, 19 cepas de *Aeromonas* spp. (SCOARIS et al., 2008). Castro-Escarpulli et al. (2003) avaliaram 82 isolados de *Aeromonas* spp. a partir de 250 amostras de peixes

congelados. Na Índia a *A. hydrophila*, foi isolada em 36,1% de um total de 238 filés de *catfish* (DASKALOV, 2006). Esse alto percentual de contaminação representa perigo à saúde pública, pois os peixes são capturados e podem ser consumidos pela população sem tomar os devidos cuidados no momento da manipulação da carne (AZEVEDO et al., 2003; HIRSCH et al., 2006).

Atualmente, essa bactéria é considerada também como agente etiológico de infecções em humanos e tem relevância epidemiológica nos casos de infecções oportunistas em pacientes imunossuprimidos (JANDA; ABOOTT, 2010; DI PINTO et al., 2012). As manifestações podem ser ocasionadas por infecções intestinais ou extra-intestinais, casos de celulites, fasciites necrotizantes, meningites, síndrome hemolítica urêmica e sepse. Essas infecções assumem papel de destaque especialmente em grupos suscetíveis como crianças, idosos e portadores de doenças crônico-degenerativas (PEREIRA et al., 2008).

*Aeromonas* spp. presentes nos ambientes aquáticos tem potencial de risco à saúde e por isso alguns países têm adotado a contagem de *Aeromonas* como indicador adicional da qualidade da água (BORCHARDT et al., 2003). Devido a expansão urbana invadindo os ambientes rurais, o potencial de infecções por *Aeromonas* de origens zoonóticas aumenta progressivamente (JANDA; ABOOTT, 2010).

## **2.5. Fatores de virulência da *A. hydrophila***

A virulência da *A. hydrophila* é multifatorial e produz vários produtos extracelulares biologicamente ativos, tais como hemolisinas (aerolisinas), citotoxinas, enterotoxinas, proteases, leucocidinas, fosfolipases, elastases, DNases, adesinas e, ainda, colinesterases e endotoxinas (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005). Os efeitos deletérios de bactérias Gram negativas são consequência da liberação de endotoxinas ou LPS, desencadeando a sepse e/ou endotoxemia (RAU et al., 2007). As espécies de *Aeromonas* secretam muitas proteínas, incluindo amilase, quitinase, nuclease, gelatinase, lecitinase (NAN; JOH, 2007).

Os sinais clínicos resultantes dos fatores de virulência da infecção por *A. hydrophila* inicia-se por perda de apetite, apatia, perda de equilíbrio, lesões epidérmicas como despigmentação, necroses da pele, úlceras com exposição da

musculatura. Alterações no comportamento são geralmente observadas como sinais clínicos causados por *A. hydrophila* (CARRASCHI et al., 2013).

A *A. hydrophila* é considerada importante patógeno de peixes e tem capacidade de sobreviver e se multiplicar, produzindo fatores de virulência, em uma variedade de espécies aquáticas. A temperatura de multiplicação bacteriana pode afetar a expressão de vários fatores associados à virulência. Esse fato pode explicar a patogenicidade de isolados de *Aeromonas* (DASKALOV, 2006).

## **2.6. Produção de anticorpos IgY e aplicações nos testes de imunodiagnóstico**

Devido a especificidade dos anticorpos IgY para a ligação e inativação de moléculas tóxicas ou antígenos (KARLSSON; KOLLBERG; LARSSON, 2004), estes podem ser utilizados para diagnóstico, terapia e inativação de substâncias (REILLY; DOMINGO; SANDHU, 1997; TAVARES et al., 2013). Os anticorpos específicos, policlonais ou monoclonais, são obtidos principalmente de mamíferos (NARAT, 2003; TAVARES et al., 2013). De maneira alternativa, os anticorpos purificados da gema de ovos de galinhas imunizadas, a IgY tem propriedades distintas que podem ser exploradas em vários campos de pesquisa, imunodiagnóstico, imunoterapia e estudos de proteômica (KARLSSON; KOLLBERG; LARSSON, 2004; MUNHOZ et al., 2014).

A produção de anticorpos IgY apresenta vantagens em relação a produção de anticorpos em mamíferos: Primeiro, não ocorre a sangria e por isso há a diminuição do estresse ao qual são submetidas as espécies de mamíferos utilizadas na produção de anticorpos; segundo, os anticorpos IgY não apresentam reação com os fatores reumatóides e não ativam o sistema complemento de mamíferos, diminuindo as chances de falso positivo em ensaios biológicos com as amostras de mamíferos (CHACANA et al., 2004; FERNANDES et al., 2013; MUNHOZ et al., 2014).

Outra vantagem seria que devido à distância filogenética entre aves e mamíferos, estas produzem anticorpos com alto grau de afinidade contra antígenos de mamíferos (SPILLNER et al., 2012). A IgY reconhece mais epítomos quando o imunógeno utilizado é uma proteína de mamífero altamente conservada o que pode resultar na amplificação do sinal (CARLANDER, 2002; MUNHOZ et al., 2014).

Outros estudos mostraram que as aves tem anticorpos de 3 a 5 vezes com mais afinidade para anticorpos de suínos do que a IgG de coelho, amplificando o sinal no teste imunológico (OLOVSSON; LARSSON, 1993; MUNHOZ et al., 2014).

Um ovo possui em média 100 mg de IgY na gema e sabendo-se que as galinhas poedeiras produzem mais de 20 ovos por mês, a produção de IgY em um mês pode facilmente chegar a valores superiores de 2 g por animal (CARLANDER, 2002; TAVARES, 2013). Além da alta produtividade, os anticorpos extraídos da gema de galinhas poedeiras apresentam aplicações profiláticas e terapêuticas em doenças crônicas, infecciosas e toxicológicas (CHACANA et al., 2004). Sua aplicação em medicina humana e veterinária cresceu e despertou o interesse de pesquisa (CHACANA et al., 2004; FERNANDES et al., 2013). Atualmente, estudos mostraram que a aplicação de IgY em doenças infecciosas pode favorecer a neutralização da aderência de agentes microbianos aos seus tecidos alvos, como pode ser observado em estudos sobre a profilaxia de diarreia de leitões neonatos causado por *Escherichia coli* (*E. coli*), em úlcera gástrica causada por *Helicobacter pylori*, em fungos como *Candida albicans*, em doenças virais como a Cinomose em cães e contra toxinas de venenos de animais peçonhentos e bactérias (CARLANDER, 2002; CHACANA et al., 2004; FERNANDES et al., 2013).

Todas estas características mostram claramente vantagens substanciais da tecnologia IgY em muitas áreas médicas, especialmente para imunodiagnóstico. Os anticorpos IgY específicos demonstraram serem efetivos contra ampla variedade de antígenos incluindo proteínas, peptídeos, hormônios lipídios e carboidratos componentes de vírus, bactérias, fungos, plantas e animais (SCHADE et al., 1994; MUNHOZ et al., 2014).

### **3. OBJETIVOS GERAIS**

Este estudo teve como objetivo a produção de anticorpos policlonais IgY na gema do ovo de galinhas poedeiras imunizadas com proteínas de *A. hydrophila* e sua aplicação no diagnóstico de imuno-histoquímica, para identificação da bactéria nos órgãos e tecidos de *P. mesopotamicus* infectados experimentalmente.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Local do experimento**

O presente estudo foi desenvolvido entre os anos de 2013 a 2015, para o qual foram adotados os Princípios Éticos na Experimentação Animal propostos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (com utilização dos animais sob aprovação do Comitê de Ética do projeto nº 008577/12) no Laboratório de Ictiopatologia “Prof. Dr. Flávio Ruas de Moraes” e no Laboratório de Patologia Experimental e Comparada do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV/Unesp.

### **4.2. Isolamento e identificação de cepas de *A. hydrophila***

A cepa de *A. hydrophila* utilizada foi isolada de peixes naturalmente infectados e a caracterização genética ocorreu de acordo com os protocolos descritos por Sebastião et al. (2015).

A bactéria foi reativada em pacus (n= 7) e durante a necropsia foram colhidos assepticamente fragmentos de encéfalo, rim, fígado e baço para cultura bacteriológica. Amostras colhidas destes fragmentos foram semeadas em placas de Petri, contendo TSA (Difco®), que foram incubadas por 24 h, a 30 °C. Após a incubação, as colônias foram identificadas por suas características morfológicas e tintoriais, pela prova da oxidase e pelo *kit Bactray 3*. Estes exames revelaram tratar-se de *A. hydrophila*.

### **4.3. Purificação das frações citoplasmáticas, frações de membrana e fração total bacteriana de *A. hydrophila***

O protocolo de purificação das frações bacterianas foi executado conforme descrito por Chart (1994). O microrganismo foi semeado em 500 mL de caldo trípico de soja (TSB-DIFCO®). Após 18 horas de incubação a 29,0°C, em aerofilia, o meio foi centrifugado a 4.000 g (4 °C), durante 20 minutos. O sobrenadante foi desprezado, e a massa bacteriana ressuspensa em 500 mL de PBS (tampão fosfato) e novamente centrifugada. Essa operação foi repetida por mais três vezes, o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspensa no volume de 5 mL de

solução de Tris-HCL 25 mM, pH 7,4, contendo EDTA 1 mM e a amostra sonicada. A suspensão bacteriana foi submetida a três ciclos de 30 segundos na potencia de 150 W em sonicador (Sonifer 250, Branson®).

Após o procedimento, a suspensão foi centrifugada a 10.000 g, por 1 hora, a 4 °C, e o sobrenadante (frações totais) transferido para tubos Falcon (50 mL) e centrifugado na força de 100.000 g, por 2 horas a temperatura de 4 °C. Após o término o sobrenadante (fração citoplasmática) foi armazenado e o precipitado contendo as proteínas de membrana foi ressuspenso em 1,0 mL de Tris-HCL 25 mM, pH 7,4. O mesmo volume ( $1/1$ ) de detergente de sódio (Sarkosyl®) foi adicionado e a reação foi mantida por 30 minutos em agitação contínua, em temperatura ambiente (TA), e após centrifugado a 100.000 g, por 2 horas, a 4 °C. As frações total, citoplasmática e de membrana foram separadas em alíquotas de 1 mL em criotubos, pré-congelados em nitrogênio líquido e armazenados à temperatura de 70 graus negativos.

#### **4.4. Dosagem da concentração de proteínas nas amostras**

A concentração de proteína das frações protéicas bacterianas e do extrato purificado da gema foram determinados de acordo com o método descrito por Hartree (1972), utilizando-se soroalbumina bovina (BSA) fração V como padrão protéico.

Três soluções foram preparadas para a reação, solução (A) 2 g de tartarato de sódio e potássio, 100 g de carbonato de sódio anidro, dissolvido em 1.000 mL de solução de NaOH 0,5 M, solução (B), 2 g de tartarato de sódio e potássio, 4,1 g de sulfato de cobre penta hidratado, dissolvido em 90 mL de H<sub>2</sub>O destilada e adicionado 10 mL de NaOH 1 M, completando o volume final para 100 mL, e a solução (C) composta de Folin-Ciocalteu, 1 volume para 15 volumes de água destilada.

Inicialmente 1 mL da amostra a ser quantificada foi diluída em 0,9 mL da solução (A), e mantida a reação por 10 minutos em banho-maria a 50 °C. Em seguida adicionou-se 1,0 mL da solução (B), a reação mantida por 10 minutos em TA. A seguir foi adicionado 3,0 mL da solução (C) e mantida sob agitação em banho-maria, a 50 °C, por 10 minutos. A leitura da absorbância (D.O) foi realizada a 650

nm, e água destilada usada como padrão de branco. Os resultados foram expressos em miligrama de proteína por mililitro de solução.

Quando submetidas às determinações de proteína por Hartree, a amostra da proteína de membrana da *A. hydrophila* e de IgY apresentaram as concentrações expostas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Teor de proteína das amostras de fração total, citoplasmática e de membrana, extraídos da *A. hydrophila* e extrato purificado da gema.

Amostra	Concentração de proteína (mg mL <sup>-1</sup> )
Fração total	1,59
Fração citoplasmática	0,8
Fração de membrana	0,68
Extrato purificado da gema	14

#### 4.5. Análise eletroforética das frações proteicas microbianas

As proteínas presentes em cada fração foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida, contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) de acordo com o método descrito por Laemmli (1970).

Para tanto, foram adicionados 40 µL de β-mercaptoetanol nas amostras e 90 µL de tampão de amostra concentrado 3X (125 mM Tris-HCl, pH 6,8; 20% de glicerol; 4% de SDS; 0,002% azul de bromofenol, concentração final), foi adicionado e as amostras aquecidas em banho-maria em ebulição, durante 2 minutos. Em seguida foram transferidas para banho de gelo e armazenadas a 70 °C negativos até serem submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida.

As amostras preparadas como descrito anteriormente foram aplicadas no gel de poliacrilamida na concentração de 30 µg de proteína total. Em todos os géis foi aplicado também padrão de referência Bio-Rad. O gel de separação com concentração igual a 9%, foi preparado utilizando-se 2,0 mL de tampão de separação (0,75 M Tris; 0,21% (SDS), pH 8,8), 1,2 mL de acrilamida-bis (30:0,8%), 0,8 mL de água deionizada, 60 µL de persulfato de amônia (APS) 10% e 6 µL de *tetrametil etilenodiamina* (TEMED). O gel de empilhamento (5%) foi preparado com

1,5 mL de tampão de empilhamento (0,13 M Tris, 0,12% SDS, 0,01% NaN<sub>3</sub>, pH 6,8), 0,250 mL de acrilamida-bis (30:0,8%), 40 µL de APS 10% e 4 µL de TEMED.

Foi utilizado o sistema de eletroforese Mini-Protean II (Bio-Rad) conectado a uma fonte à qual foram aplicados 200 V por 40 minutos.

#### **4.6. Imunização e coleta de soro e gema das aves**

Após a purificação e dosagem das proteínas bacterianas, 7 aves da linhagem *White Leghorn*, foram separadas em gaiolas individuais e mantidas em regime de 12 horas de luz e 12 de escuridão, em TA, entre 26 e 29 °C, com umidade relativa do ar entre 63 e 75%, água potável à vontade e ração comercial de postura, na quantidade de 100 g/ave dia.

Após o acondicionamento, as aves foram imunizadas com a fração total (citoplasmática e de membrana) de *A. hydrophila* na concentração de 100 µg e no volume de 200 µL diluído em PBS 0,15 M pH 7,4, conjugado com o mesmo volume de adjuvante incompleto de Freund (Sigma-Aldrich, BR), injetado em dois pontos distintos do músculo peitoral. As aves receberam doses reforço a cada 15 dias, durante 90 dias.

O soro foi coletado 15 dias anteriormente a cada inoculação e os ovos 3 dias antes da coleta do soro. O soro foi desfibrinado e os ovos foram juntados em um *pool* (3 ovos) por ave e 500 µL de gema foram diluídos em microtubos contendo 1,5 mL de PBS 0,15 M, pH 7,4. O restante da gema foi armazenado em sacos plásticos para posterior purificação e ambas as amostras congeladas em freezer -20 °C.

#### **4.7. Detecção de imunoglobulinas Y específicas para IgY anti- *A. hydrophila* no soro e na gema (ELISA indireto)**

O ensaio imunoenzimático indireto foi realizado de acordo com Andrade et al. (2013). Inicialmente uma microplaca de 96 poços, fundo chato (Costar®) foi pré-sensibilizada com 100 µL por poço, de poli-L-lisina 0,05% diluída (v/v) em tampão PBS 0,15 M, pH 7,2, e incubada por 60 minutos em TA. Após incubação os poços foram lavados duas vezes com PBS-Tween-20 na concentração de 0,005%. Em seguida, a fração total na concentração de 10 µg/mL foi adsorvida no volume de 100 µL/poço e incubada a 4 °C, durante 18 horas e fixado com 100 µL de glutaraldeído,

0,005% diluído (v/v) em tampão PBS 0,15 M, pH 7,2, e incubada por 20 minutos, a 22 °C.

Após o período de incubação foram lavadas três vezes com PBS-Tween e 250 µL de PBS-leite na concentração de 5% em cada poço e a placa incubada por uma hora em TA e lavada com PBS-Tween. A seguir foi adicionado 100 µL da amostra de soro e gema ambas na diluição de 1:1000 por poço e a placa incubada por uma hora em TA. Em seguida, a placa foi lavada com PBS-Tween 20 a 0,05% e adicionado 100 µL/poço de anti-IgY peroxidase (HRP), seguido de incubação por uma hora em TA. Após lavagens com PBS-Tween 20 a 0,05%, foi adicionado o substrato/cromógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ABST) seguido de incubação em TA por 15 minutos. A reação foi interrompida com solução de SDS na concentração de 5% diluída em água destilada e a leitura realizada em leitor Multiskan a 640 nm.

#### **4.8. Avaliação do potencial de afinidade da IgY anti-*A. hydrophila* (ELISA indireto)**

O procedimento executado foi o mesmo descrito no item anterior após a incubação da amostra do soro e da gema por 2 horas em TA. A placa foi lavada com PBS-Tween e 100 µL/poço de Cloreto de Magnésio 2M foram adsorvidas a placa, e na amostra controle 100 µL de PBS-Tween. Após 5 minutos em TA a placa foi lavada com PBS-Tween e adicionado 100 µL/poço de anti-IgY peroxidase (HRP) e a placa incubada por uma hora, em TA. Após lavagens com PBS-Tween, e 100 µL/poço de substrato/cromógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ABTS), foram adicionados e incubados em TA por 15 minutos. A reação foi interrompida com solução de 5% SDS e a leitura realizada em leitor Multiskan a 640 nm.

#### **4.9. *Western blot* para a análise da especificidade do anticorpo IgY anti- *A. hydrophila***

A técnica de *western blot* foi realizada de acordo com Andrade et al. (2013). O gel foi transferido para membrana de nitrocelulose, na voltagem de 30 V, em temperatura de 4 °C, durante 18 horas. Em seguida a membrana foi corada em solução corante de Ponceau, a 0,1%, para a detecção da transferência das bandas

e a membrana incubada com PBS-leite a 5%, em TA, por uma hora, em agitação contínua.

Na sequência a membrana foi lavada 5 vezes, por 5 minutos, com PBS-Tween 0,1%, e incubada sob agitação por uma hora, com IgY purificada (diluída em PBS-Leite a 1% na proporção de 1:200). Em seguida, a membrana foi novamente lavada 5 vezes, durante 5 minutos, com PBS-Tween 0,1%, e os anticorpos anti-IgY peroxidase (diluída em PBS-Leite a 1% na proporção de 1:2000) adicionados a membrana e incubados por uma hora, sob agitação em TA.

Em seguida, a membrana foi novamente lavada 5 vezes durante 5 minutos e o substrato diaminobenzídina (DAB) adicionado, incubado sob agitação por 15 minutos e a reação bloqueada com adição de água destilada deionizada.

#### **4.10. Purificação dos anticorpos IgY**

Com os resultados obtidos no ensaio de ELISA os *pools* das gemas que obtiveram D.O 640 nm 1.0, foram selecionados e encaminhados para a purificação. A técnica de purificação foi executada conforme descrito por Pauly et al. (2011).

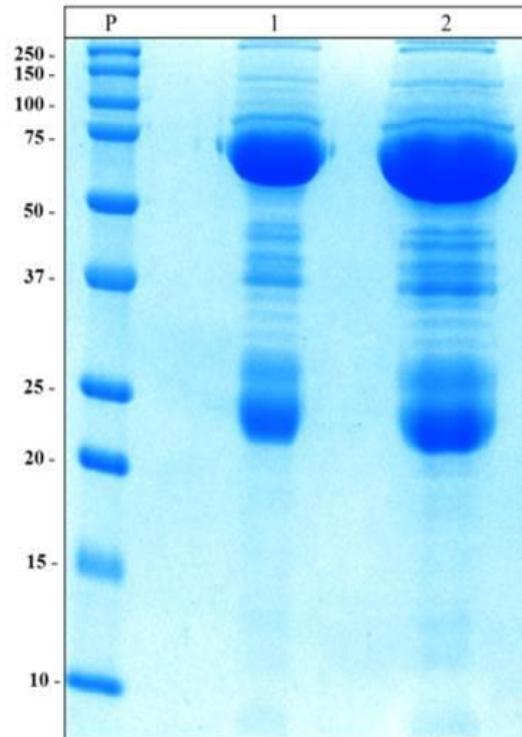
Inicialmente a gema foi separada da clara e da membrana da gema, pesada e o peso convertido na relação 1:1 em mL (1 g= 1 mL), diluídas três vezes o seu volume em polietilenoglicol (PGE) na concentração de 4,66%, adicionado em parcelas contínuas, incubadas por 5 minutos sob agitação e centrifugados a 10.000 g, por 15 minutos à 4 °C.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi filtrado com gaze e diluído em PGE 48% na porção de (3:1) que novamente foi incubado por 5 minutos sob agitação e centrifugado 10.000 g, por 15 minutos à 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 2 mL de PBS 0,15 M, pH 7,2 e dialisado em solução salina 1% durante uma noite na temperatura de 4 °C, sob agitação contínua.

Após o processo de purificação o extrato da gema foi submetido a eletroforese como descrito anteriormente, para a confirmação da presença da imunoglobulina Y no extrato purificado.

O *pool* de 60 dias das aves imunizadas foi purificado e sua concentração de proteína do extrato da gema foi obtida (Tabela 1). Em seguida foi analisado por meio de eletroforese em gel de SDS. Duas bandas foram observadas, a primeira com

massa molecular aproximado de 84 kDa e a segunda com massa de 28 kDa (Figura 1). Estes resultados das massas moleculares, localização e a intensidade da expressão destas duas bandas, foram similares a estrutura molecular encontrada nas imunoglobulinas Y, formadas de uma cadeia pesada e uma cadeia leve, confirmando a presença da imunoglobulina no purificado (CHACANA et al., 2004).



**Figura 1.** Gel de eletroforese SDS-PAGE (SDS 9%) do extrato purificado da gema contendo imunoglobulinas Y. (P) Padrão Bio-Rad Precision Plus, (1) Amostra de IgY na concentração de 40 µg e (2) 80 µg/mL. As bandas protéicas são compatíveis com a imunoglobulina Y, cadeia pesada (84 kDa) e cadeia leve (24 kDa).

#### 4.11. Infecção experimental para a obtenção de órgãos positivos

Foram utilizados 30 pacus, *P. mesopotamicus*, com peso médio de  $180,71 \pm 56,73$  g e comprimento total médio de  $21,27 \pm 6,70$  cm, adquiridos do Centro de Aquicultura da Unesp (Caunesp). Inicialmente os peixes foram acondicionados em tanque escavado (3000 L) para quarentena no Biotério “Prof. Dr. Flávio Ruas de Moraes” localizado no CPPAR. A seguir foram distribuídos aleatoriamente em 3 caixas de fibra (n= 5), com 250 L de água corrente, de poço artesiano, livres de cloro, vazão de 1L/minuto, com aeração suplementar. Os peixes receberam ração

comercial peletizada (28% PB e 4000 kcal/kg-1 EB), pela manhã e tarde, correspondendo a 3% da biomassa. As caixas foram sifonadas semanalmente, e a qualidade da água, determinada diariamente com oxímetro YSI, modelo 55, e o pH e a condutividade elétrica pelo YSI, modelo 63, se mantendo dentro da faixa de conforto para espécie (oxigênio dissolvido= 5,1 mg/L; temperatura= 29,47 °C; pH= 7,66 e a condutividade elétrica= 117,96  $\mu$ S/cm) (BOYD, 1990).

Os pacus receberam por via celomática o inóculo na dose de 0,5 mL de suspensões de *A. hydrophila* ajustadas ao tubo número 6 da escala de McFarland apresentando aproximadamente  $1,8 \times 10^9$  UFC/mL (correspondente a DL50%) por animal (CLAUDIANO et al., 2014). Todos os peixes foram submetidos à anestesia com benzocaína diluída (1g/10mL) (WEDEMEYER, 1970) e mantidos nesta solução até atingir o plano cirúrgico da escala de Ross e Ross (2008). Os peixes foram distribuídos em dois grupos, em delineamento inteiramente casualizado. Um deles recebeu 0,5 mL de solução de cloreto de sódio esterilizada a 0,65% (grupo controle) e outro recebeu o mesmo volume dessa solução contendo o inóculo bacteriano, constituindo-se no grupo infectado.

#### **4.12. Análise histopatológica dos órgãos**

Quando os peixes apresentaram sinais característicos de aeromonose (HARIKRISHNAN; NISHA; BALASUNDARAM, 2003; CARRASCHI et al., 2013) demonstrando a irreversibilidade da doença, foram sacrificados (n= 15) por aprofundamento do plano anestésico com benzocaína (Sigma-Aldrich Laboratory, Steinheim, Alemanha), a 100 mg L<sup>-1</sup> (bem-estar animal e ISO - Organização Internacional para Padronização, 2006) para a avaliação quanto à presença de lesões externas e internas nos diferentes órgãos no momento da necropsia. O grupo controle (n= 15) foi sacrificado no mesmo momento do grupo infectado.

Uma parte dos fragmentos de rim, fígado, baço, encéfalo e coração foram colhidos e fixados em formaldeído 10% em tampão fosfato por 24 horas. Posteriormente, o material foi conservado em álcool 70% e após procedimentos usuais em histotecnologia (LUNA, 1960) incluído em parafina histológica para obtenção de cortes seriados de 5  $\mu$ m, corados com hematoxilina e eosina (H&E). As lesões foram descritas sob microscopia de luz comum (FREITAS-NETO et al., 2003).

#### 4.13. Imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica foi realizada de acordo com a técnica descrita por Manrique et al. (2015).

Os fragmentos de coração, fígado, baço, rim e encéfalo de pacus do grupo infectado e controle foram fixados em formol tamponado (10%), por 24 horas. Depois, emblocados em parafina, cortados em micrótomo (3  $\mu$ m) e depositados em lâminas polarizadas. Os cortes foram desparafinados em estufa a 60 °C, por uma hora e depois hidratados em soluções decrescentes de xilol e álcool, seguido de 10 banhos em água destilada.

A recuperação antigênica foi realizada por calor (panela de pressão) com tampão citrato (pH 6,0), por 15 minutos. Seguiu-se o bloqueio da peroxidase endógena com solução comercial (Dako Dual Endogenous), durante uma hora seguida de um banho em tampão Tris HCL (pH 7,4), por cinco minutos e novo bloqueio da peroxidase foi realizado com água oxigenada (30 volumes) e álcool metílico (10%), por uma hora em câmara escura, seguido de duas lavagens com Tris HCL (pH 7,4) e mais duas lavagens com água destilada. O bloqueio das proteínas inespecíficas foi feito com leite em pó desnatado (Molico<sup>®</sup>, 2 g para cada 25 mL de água destilada) por mais uma hora em câmara úmida e em TA seguido de uma lavagem com Tris HCL (pH 7,4), por cinco minutos.

Neste ensaio, o anticorpo primário utilizado foi o policlonal IgY anti- *A. hydrophila* na concentração de 1 mg/mL, diluído na proporção de 1:1000 e incubado à 4 °C, por 18 horas em câmara úmida. Seguiu-se o uso de solução de Tris HCL (pH 7,4) com pipeta de Pasteur por cinco minutos e aplicação do substrato Reveal Complement (Spring), com incubação do HRP-link, por 10 minutos, seguido da aplicação do anticorpo secundário Goatanti-Chicken IgY- Fc chain (Bethyl Laboratories, Inc. USA) na diluição 1:1000 por 1 hora em TA. Em seguida os cortes foram lavados três vezes com Tris HCL (pH 7,4) por cinco minutos.

Para a visualização da reação utilizou-se o cromógeno DAB (Dako) durante um minuto e meio, seguido da imersão dos cortes em água deionizada e a contra-coloração foi realizada com Hematoxilina de Harris por um minuto e 30 segundos, seguido de lavagem em água corrente, por 10 minutos. Por fim, seguiu-se com a desidratação em álcoois em concentrações crescentes, seguido de xilol e montagem

das lâminas com Permount. As imagens digitais foram capturadas usando uma câmera digital (Olympus DP72, com celular Sens. software de imagem v.1.5).

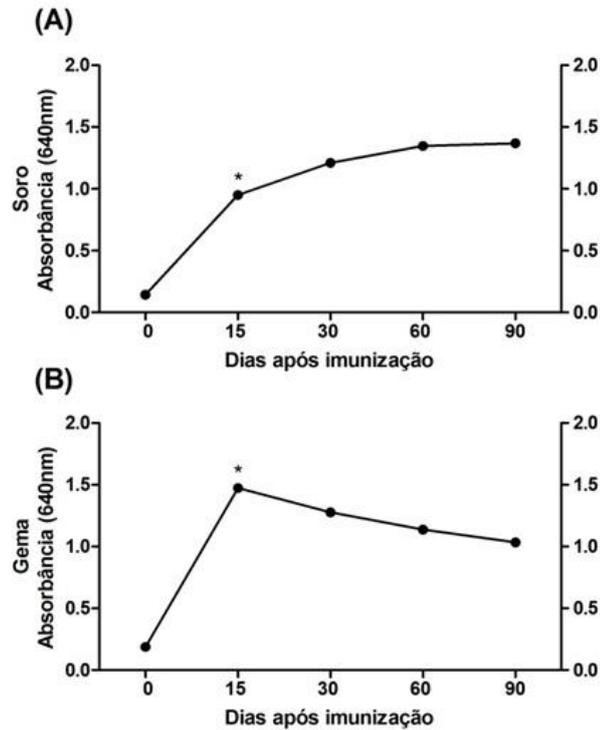
#### **4.14. Análise estatística**

Os resultados foram submetidos à análise de variância e à comparação de médias pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), ao nível de significância de 5% (SNEDECOR; COCHRAN, 1974).

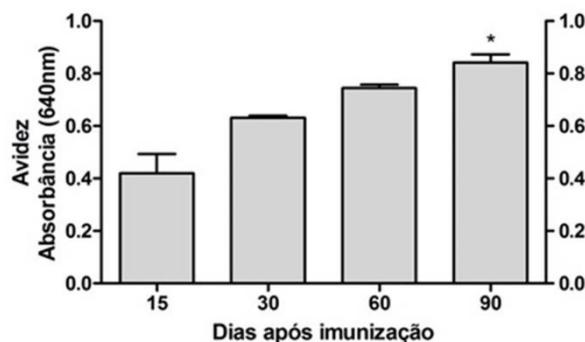
### **5. RESULTADOS**

#### **5.1. Análise da produção e afinidade dos anticorpos IgY anti- *A. hydrophila***

O aumento dos níveis de anticorpos séricos foram observados no 15º dia após a primeira imunização e permaneceu aumentado até ao final do experimento, que durou 90 dias (Figura 2 A). A taxa de transferência da IgY anti- *A. hydrophila* para a gema teve seu início no 15º dia e nos demais períodos experimentais os títulos foram flutuantes, apresentando leve queda no 90º dia (Figura 2 B). Além disso, a avidéz do soro aumentou significativamente no 90º dia comparado ao 15º dia (Figura 3 A).



**Figura 2.** Produção de anticorpos IgY, no soro (A) na gema (B) de galinhas poedeiras da linhagem *White Leghorn*, imunizadas com proteínas insolúveis de membrana de *A. hydrophila*. Cada ponto representa a média de sete análises (\*) diferença significativa dos títulos de anticorpos específicos ( $p < 0,05$ ), no 15 dia em relação aos demais tempos.



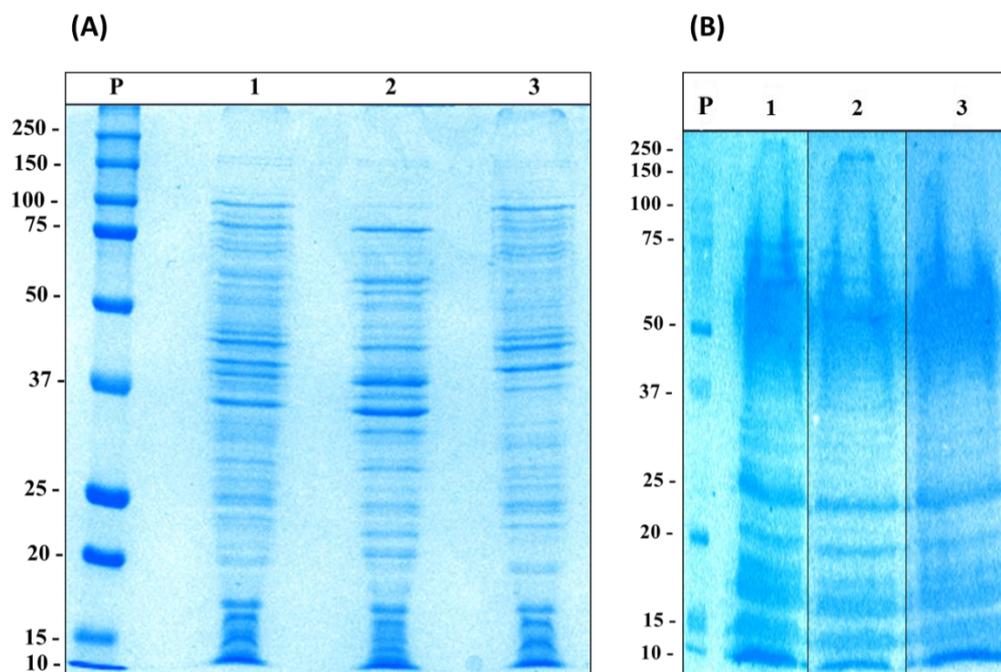
**Figura 3.** Potencial de afinidade da IgY anti – *A. hydrophila*, galinhas poedeiras inoculados com 100 µg/mL de com proteína insolúveis de membrana de *A. hydrophila*. Cada coluna representa a média de sete análises (\*) diferença significativa dos títulos de anticorpos específicos ( $p < 0,05$ ), entre 90 dias em relação aos demais tempos.

## 5.2. Caracterização da especificidade do anticorpo policlonal IgY anti- *A. hydrophila*

Ao analisar os resultados obtidos por SDS-PAGE de *A. hydrophila* (Figura 4 A) foram observadas 27 bandas da fração total de proteínas reagentes. As bandas de massa molecular de 80, 43, 40, 38, 34, 16, 15 e 10 kDa, foram as mais evidentes em toda a fração da bactéria. Para a fração citoplasmática foram observadas 23 bandas e as de maior evidência de massa molecular foram de 77, 57, 37, 33, 15, 12 e 10 kDa totalizando sete bandas de maior intensidade. Por final na fração de membrana o total de bandas foram 22 e as de massa molecular mais evidentes foram de 42, 39, 16, 15, 13, 10 kDa, para seis bandas.

O resultado do *western blot* para a fração citoplasmática total e de membrana foram similares para reatividade das bandas com massas moleculares de 37, 25, 20 e 15 kDa (Figura 4 B). Entretanto a fração total e citoplasmática apresentaram a banda 10, diferentemente da fração de membrana que não foi reativa. A intensidade e massa molecular de cada banda está exposta na Tabela 2.

As massas moleculares do *western blot* foram compatíveis com o observado no gel de eletroforese, para as proteínas de 37, 15 e 10 kDa entre as de maior intensidade e diferem nas de 20 e 25 kDa na de baixa intensidade. Todavia estas correspondem as massas moleculares de menor intensidade no gel de eletroforese.



**Figura 4.** *Western blot* para a determinação da especificidade da IgY para proteínas celulares de *A. hydrophila*. (A) Gel de SDS-PAGE (SDS 9%) amostras das frações protéicas, aplicadas no volume de 30  $\mu$ L por poço, na concentração de 7,7  $\mu$ g. A distribuição numérica das amostras são similares nas figuras A e B; P: Padrão protéico da Bio-Rad; 1= Fração total (citoplasma e membrana); 2= Fração citoplasmática e 3= Fração de membrana. (B) SDS-PAGE transferidas e incubadas com extrato purificado de IgY anti- *A. hydrophila* do *pool* de ovos 90 dias após a quarta imunização.

**Tabela 2.** Massas moleculares e intensidades de bandas detectadas pelo anticorpo IgY anti- *A. hydrophila* específico na análise de *western blot*.

Nb	Fração total		Fração citoplasmática		Fração de membrana	
	mM (kDa)	V (Int)	mM (kDa)	V (Int)	mM (kDa)	V (Int)
1	37	538	37	526	37	440
2	25	573	25	264	25	481
3	20	594	20	557	20	369
4	15	637	15	561	15	878
5	10	666	10	523		

Nb = Número de bandas

mM = Massa molecular

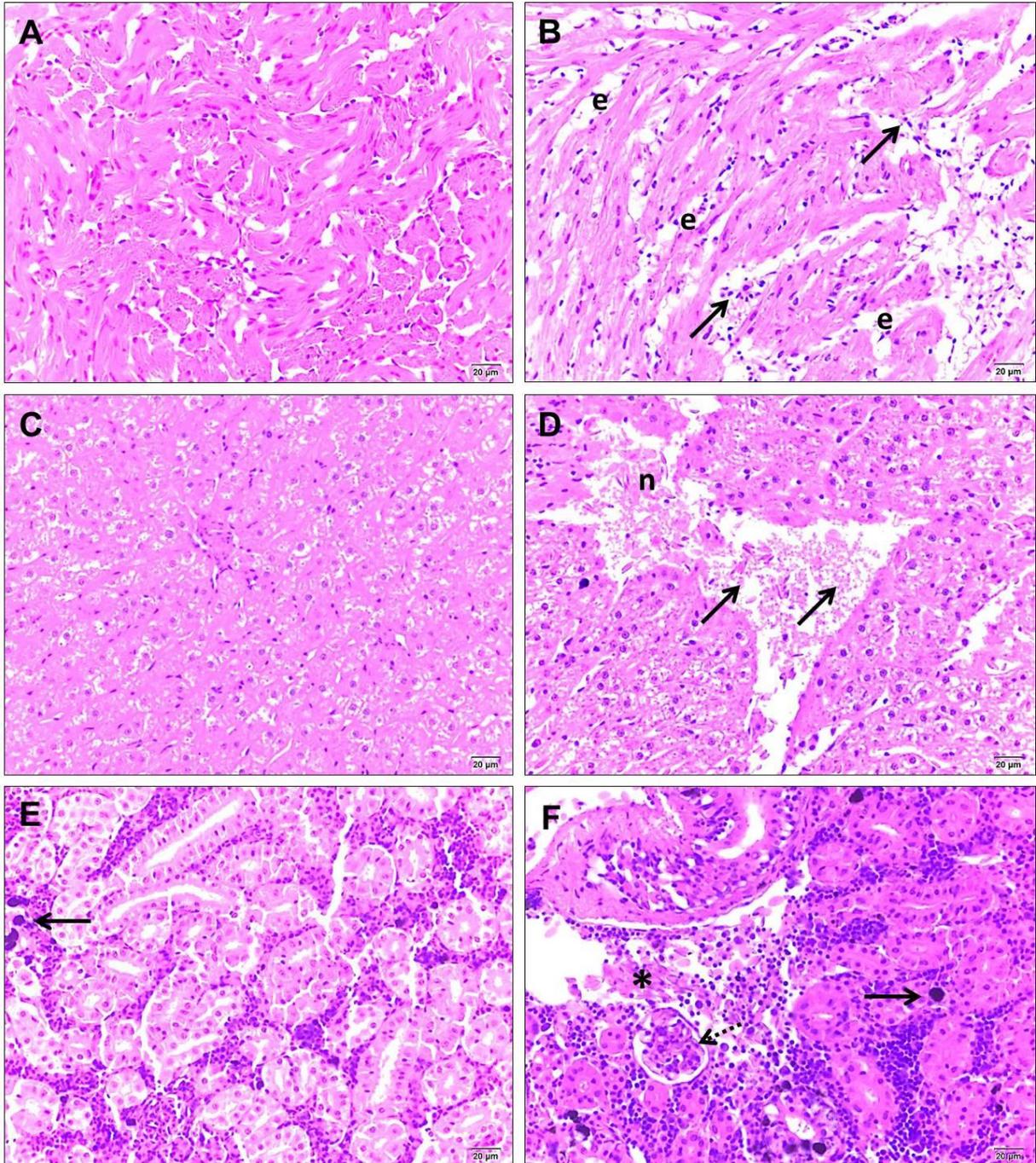
V (Int) = Volume (Intensidade)

### **5.3. Alterações macroscópicas e microscópicas dos órgãos infectados por *A. hydrophila***

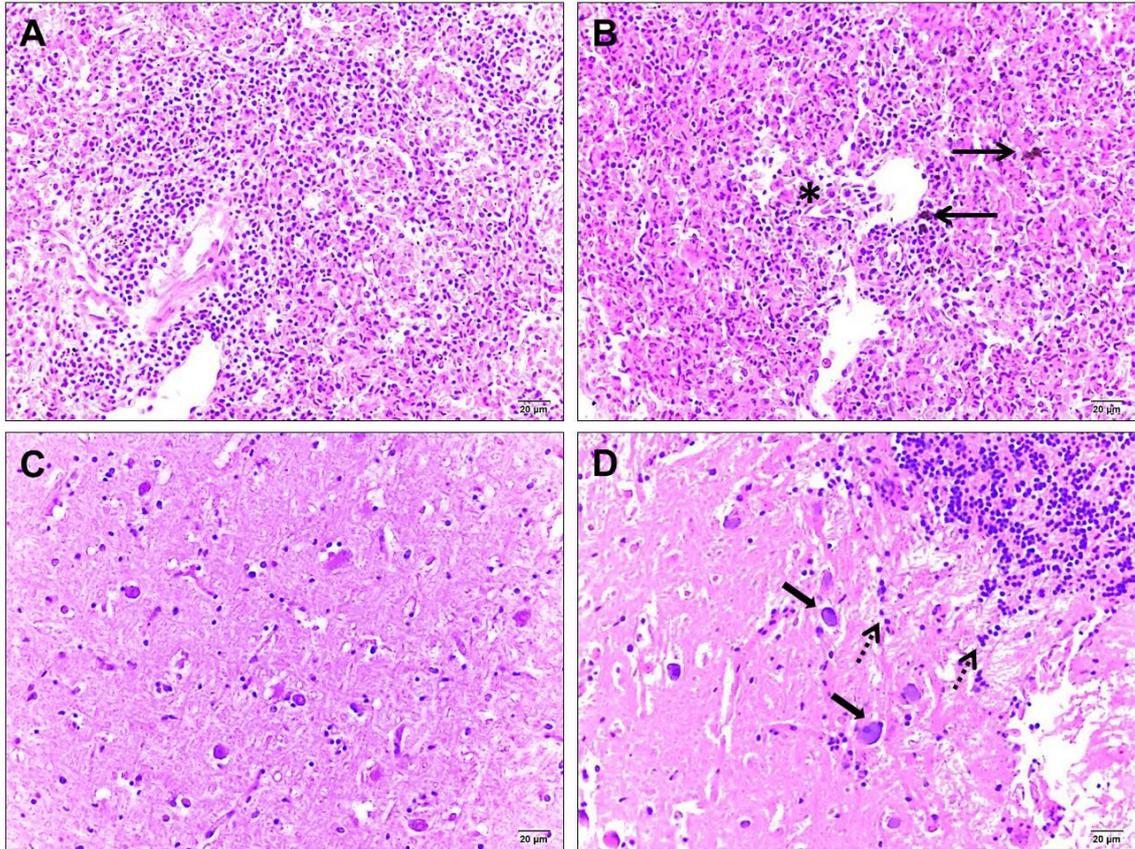
As alterações nos órgãos e tecidos foram observadas a partir da uma até nove horas, após a infecção experimental com *A. hydrophila*.

As alterações macroscópicas mostraram aumento do acúmulo de líquido no celoma, petéquias, despigmentação do tegumento, fígado aumentado de volume, amarelado e de consistência macia e friável. O rim mostrou-se aumentado e hemorrágico. Nos demais órgãos, coração, encéfalo e baço não foram constatadas alterações macroscópicas significativas.

À microscopia de luz as principais alterações observadas foram infiltrados leucocitários associados a extensas áreas de necrose coagulativa em todos os órgãos examinados, com exceção do tecido cerebral, que apresentou infiltrado leucocitário (linfócitos) sem a presença de bastonetes. As lesões se diferenciaram entre os órgãos, em relação à localização e tropismo pelas estruturas morfológicas distintas entre os órgãos (Figura 5). No coração, as áreas necróticas foram observadas entre as fibras do miocárdio, no fígado entre os cordões hepatocitários. No rim caudal havia degeneração da cápsula glomerular de Bowman. No baço necrose coagulativa difusa na polpa branca e vermelha e no tecido cerebral células da glia foram observadas na região cortical com presença normal de neurônios (Figura 6 D).



**Figura 5.** Fotomicrografia de órgãos de *P. mesopotamicus* controle (A, C e E) e infectados (B, D e F) experimentalmente com *A. hydrophila*. (A) Coração controle. (B) Coração infectado com resposta inflamatória no miocárdio (setas) e dissociação dos feixes musculares devido ao edema (e). (C) Fígado controle. (D) Fígado infectado com processo degenerativo, necrose (n) e presença de bactéria na luz do vaso (setas). (E) Rim controle. (F) Rim infectado com necrose de coagulação (asterisco) e infiltrado leucocitário dentro da cápsula glomerular de Bowman (seta pontilhada) e presença de melanomacrófagos (setas). H&E.



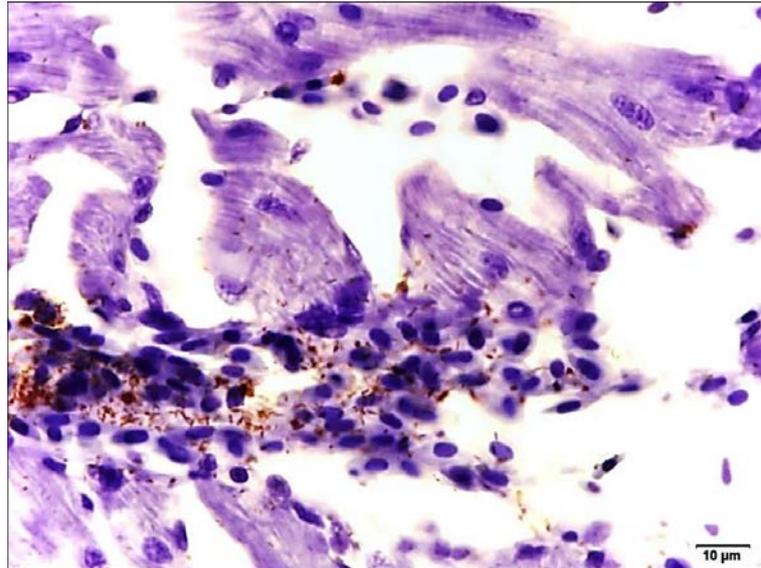
**Figura 6.** Fotomicrografia de órgãos de *P. mesopotamicus* controle (A e C) e infectados (B e D) experimentalmente com *A. hydrophila*. (A) Baço controle. (B) Baço infectado com necrose celular (asterisco) e melanomacrófagos (seta). (C) Encéfalo controle. (D) Encéfalo infectado com células da glia (setas pontilhadas) e presença de neurônios aparentemente normais (setas). H&E.

#### 5.4. Imuno-histoquímica dos órgãos infectados por *A. hydrophila*

Os anticorpos policlonais IgY anti- *A. hydrophila* produzidos neste estudo, apresentaram potencial de especificidade para o reconhecimento de células e exotoxinas bacterianas nos órgãos e tecidos estudados.

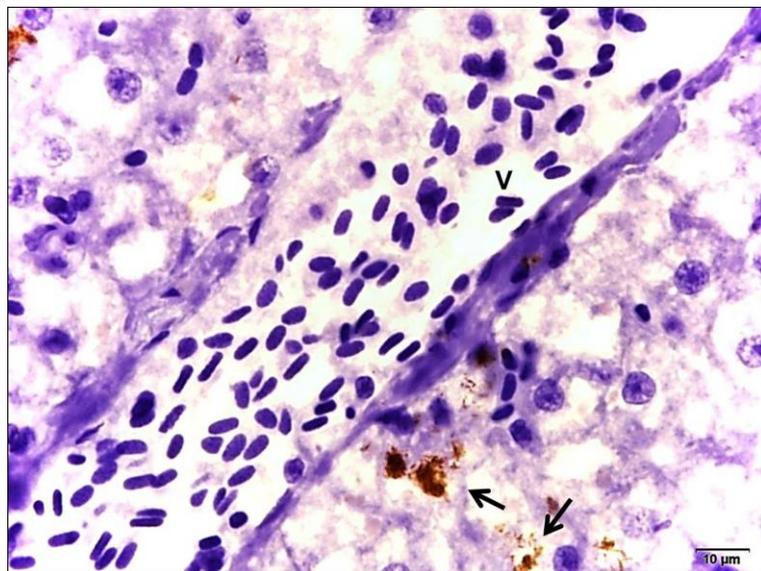
Todos os órgãos do controle foram negativos para imunomarcção do anticorpo IgY anti- *A. hydrophila*.

A imunomarcção de pequenas e grandes colônias bacterianas foi observada no coração, fígado, rim e baço e a morfologia dos bastonetes foi facilmente observada somente no tecido cardíaco (Figura 7). A localização morfológica dos agregados de bastonetes imunomarcados foi coincidente com as descritas nos achados histopatológicos.



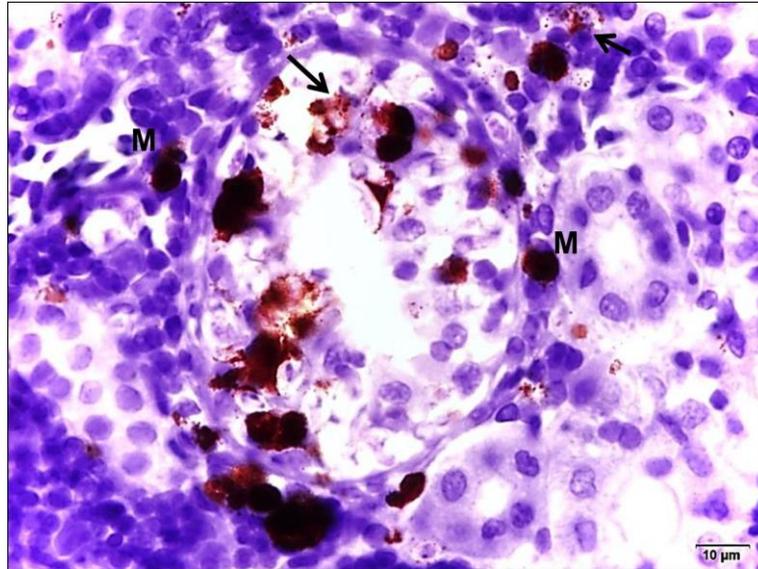
**Figura 7.** Fotomicrografia de fragmento de coração de *P. mesopotamicus* nove horas após a infecção experimental com *A. hydrophila* com reação imunohistoquímica positiva para anticorpos IgY anti- *A. hydrophila* (DAB). Coração com invasão bacteriana mostrando morfologia em bastonete da bactéria. Hematoxilina de Harris.

No fígado foi possível observar a evolução do quadro infeccioso com presença do microrganismo na corrente sanguínea e a sua evasão através do endotélio vascular para o interstício do órgão (Figura 8).



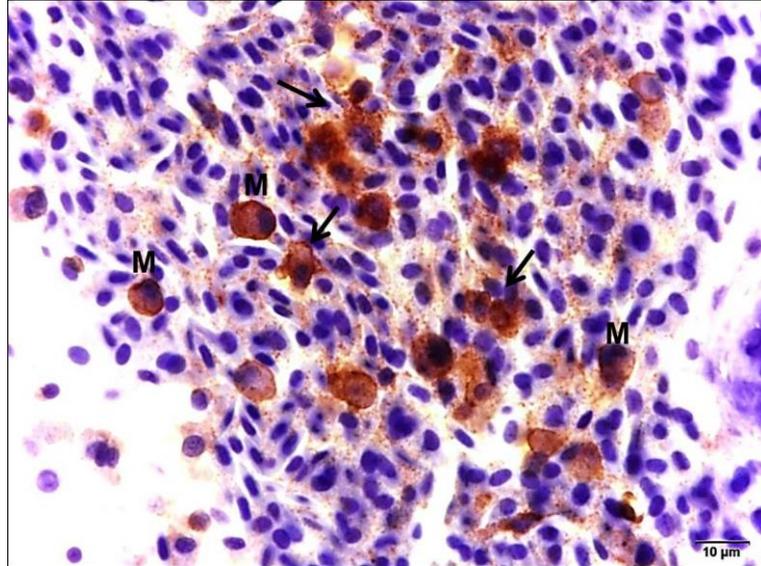
**Figura 8.** Fotomicrografia de fragmento de fígado de *P. mesopotamicus* nove horas após a infecção experimental com *A. hydrophila* com reação imunohistoquímica positiva para anticorpos IgY anti-*A. hydrophila* (DAB). Corte de fígado com colônias bacterianas imunomarcadas (setas) próximas ao vaso (V). Hematoxilina de Harris.

A aderência das células bacterianas na cápsula glomerular de Bowman no rim foi compatível com os resultados da histopatologia, em que foram observados melanomacrófagos na periferia da cápsula e pequenos agregados de bastonetes imunomarcados (Figura 9).

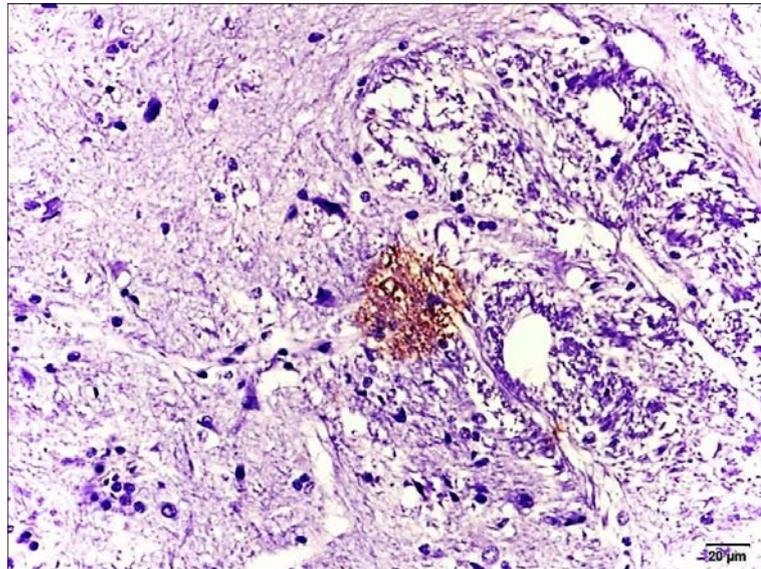


**Figura 9.** Fotomicrografia de fragmento de rim de *P. mesopotamicus* nove horas após a infecção experimental com *A. hydrophila*, com reação imunohistoquímica positiva para anticorpos IgY anti-*A. hydrophila* (DAB). Presença de colônias bacterianas imunomarcadas (setas) e melanomacrófagos (M). Hematoxilina de Harris.

No baço foi possível observar bactérias agregadas difusas no tecido e também englobadas por melanomacrófagos (Figura 10). A ausência de bastonetes foi confirmada no tecido cerebral, entretanto áreas imunomarcadas associadas a células da micróglia foram observadas na região cortical do encéfalo (Figura 11).



**Figura 10.** Fotomicrografia de fragmento de baço de *P. mesopotamicus* nove horas após a infecção experimental com *A. hydrophila*. Reação imuno-histoquímica positiva para anticorpos IgY anti-*A. hydrophila* (DAB). Marcação de bactérias e de macrófagos (M) fagocitando o agente (setas). Hematoxilina de Harris.



**Figura 11.** Fotomicrografia de fragmento de encéfalo de *P. mesopotamicus* nove horas após a infecção experimental com *A. hydrophila*, com reação imuno-histoquímica positiva para anticorpos IgY anti-*A. hydrophila* (DAB). Hematoxilina de Harris.

## 6. DISCUSSÃO

Os resultados encontrados nesta pesquisa permitiram aferir que o sistema imune humoral das aves apresentou potencial de produzir anticorpos específicos para proteínas presentes na parede celular, para o citoplasma e para as exotoxinas de *A. hydrophila*. Esta produção sistêmica iniciou-se no soro no 15º dia e foi identificada na gema por transferência passiva.

Jin et al. (2013) detectaram títulos da IgY na gema de galinhas imunizadas com *A. hydrophila* inativada. Identificou aumento desses títulos duas semanas após a primeira inoculação, que foi aumentando atingindo o máximo na 6ª semana. Estes dados assemelham-se parcialmente aos encontrados neste estudo com a diferença na preparação do inóculo, uma vez que os autores utilizaram a bactéria inativada e neste estudo foi utilizada a fração total contendo proteínas de membrana e citoplasmática da *A. hydrophila* sonicada na imunização das aves.

Neste estudo, constatou-se que além da produção de anticorpos reativos, o potencial de afinidade e avidéz foi aumentando progressivamente durante as inoculações sucessivas com potencial máximo no 90º dia após a última inoculação. Este resultado era esperado, uma vez que houve aumento progressivo na avidéz após as imunizações subsequentes. Andrade et al. (2013) observaram aumento da avidéz dos anticorpos IgY anti-veneno crotálico e botrópico 367 dias após a última inoculação. Neste protocolo foi utilizado um período de observação mais longo que o proposto por este trabalho, porém o padrão progressivo no potencial de avidéz foi semelhante.

Tavarez et al. (2013) demonstraram que os anticorpos IgY produzidos em galinhas anti-*Leptospira* tiveram afinidade às proteínas de membrana externa de *Leptospira interrogans* sorovar Hardjo. Os autores sugeriram que este anticorpo poderia ser utilizado para o diagnóstico da infecção. Do mesmo modo em nosso trabalho, o anticorpo IgY mostrou afinidade para proteínas de membrana de *A. hydrophila*. Assim, podemos aferir que anticorpos IgY anti-*A. hydrophila* foi efetivo na imunomarcagem da bactéria em tecidos e o será no diagnóstico da doença.

Os anticorpos IgY produzidos foram específicos para as bandas protéicas presentes na frações de membrana e citoplasmática no ensaio de *western blot*,

mostrando assim sua especificidade. O inóculo continha ambas as frações bacterianas e o sistema imune das aves foi capaz de reconhecer epítomos antigênicos distintos entre as duas frações. Quando os anticorpos foram avaliados no ensaio de imuno-histoquímica, a multi especificidade foi observada na capacidade de imunomarcas células bacterianas e seus produtos extracelulares como as exotoxinas. Entretanto, a imunomarcasção de exotoxinas foi potencializada no tecido cerebral, que apresentou reatividade positiva.

Os anticorpos IgY apresentaram especificidade às três proteínas de membrana interna e externa, com massa molecular aproximada de 10, 25 e 37 kDa e duas proteínas citoplasmáticas de massa molecular de 15 e 20 kDa. A massa molecular de 10 kDa encontrada neste estudo, foi compatível com a mesma descrita por Longyante et al. (2010), que o caracterizaram como LPS. Entretanto, este anticorpo monoclonal foi produzido para detectar *A. hydrophila* e *Aeromonas* spp. Neste ensaio de imuno-histoquímica o anticorpo não foi capaz de reconhecer a célula bacteriana nos órgãos. Os autores concluíram que o epítomo antigênico não foi exposto pela falha na recuperação antigênica durante o processo. Este resultado aponta para a limitação empregada no uso de anticorpos monoclonais no diagnóstico e tratamento de doenças bacterianas, uma vez que o microrganismo pode expressar vários fatores de virulência em tempos distintos durante o percurso da infecção. Pelo exposto, o uso do anticorpo policlonal como neste estudo é vantajoso, pois tem o potencial de imunomarcas diversos fatores de virulência nos órgãos infectados.

As proteínas de 25 e 37 kDa encontradas no *western blot* foram descritas como componentes interno e externo da membrana bacteriana, purificados a partir de isolados virulentos de *A. hydrophila* corroborando com os resultados obtidos por Poobalane et al. (2008). Khushiramani et al. (2007) produziram proteína recombinante com massa molecular de 37 kDa purificada e sequenciada de cepas de *A. hydrophila* e clonadas em *Escherichia coli* e observaram seu efeito na produção de anticorpos em ratos, coelhos e peixes, mostrando-se como imunógeno vacinal. Em contra partida, o papel desta proteína na patogenia de *A. hydrophila* é desconhecida sugerindo os autores tratar-se de uma proteína de adesão celular.

Neste estudo, na fração citoplasmática analisada, observou-se massa molecular de 20 kDa que foi semelhante à descrita como metaloprotease de 19 kDa purificada através do sobrenadante do meio de cultivo de uma cepa de *A. hydrophila* isolada do intestino de *Hirudo medicinalis* (LOEWY et al., 1993). Inúmeras proteases e metaloproteases, foram purificadas e caracterizadas a partir de produtos extracelulares e intracelulares de *A. hydrophila* (LOEWY et al., 1993). A diferença entre a massa molecular entre as bandas encontradas e descritas pelos autores supracitados é justificável, uma vez que foram obtidas e purificadas de compartimentos celulares distintos, podendo apresentar diferenças estruturais na isoforma molecular. Estas proteínas citoplasmáticas foram purificadas em um estágio vesicular (dentro do citoplasma) e não em sua forma secretada (sobrenadante da cultura) como descrevem Esteve e Birbeck (2004).

Resultados do *western blot* do presente estudo, mostrou que a banda de 15 kDa foi detectada apresentando maior intensidade entre as bandas da fração citoplasmática e de membrana analisadas. Este resultado justifica a imunomarcação positiva no tecido cerebral confirmando a capacidade de especificidade do anticorpo IgY para a neurotoxina de 15 kDa. Uma exotoxina letal com a atividade enzimática semelhante a acetilcolinesterase, com massa molecular de 15 kDa, foi isolada de produtos extracelulares do sobrenadante do cultivo microbiológico de *A. hydrophila* (NIETO et al., 1991). Esta neurotoxina, quando injetada por via celomática em truta arco-íris, causou sinais como perda da sua reação de alarme, desequilíbrio, acompanhado por movimentos respiratórios irregulares, reações de natação espasmódicas e obito após 9 horas do desafio, sendo classificada como uma ictiotoxina por apresentar efeitos toxicogênicos em organismos aquáticos. O mecanismo fisiopatológico destas colinesterases no tecido cerebral inicia-se pela hidrólise pré-matura da acetilcolina, resultando no bloqueio da transmissão sináptica e nervosa (RODRIGUEZ et al., 1993). Este fato justifica nossos resultados de imunohistoquímica positiva no encéfalo, pois possivelmente trata-se da expressão dessa proteína agindo como um fator de virulência no peixe infectado.

A fisiopatologia da doença causada pela *A. hydrophila* é pouco definida devido aos diversos mecanismos de virulência utilizados pela bactéria, tais como as diferentes formas de pili, cápsula, lipases e outras proteínas (MARTINS; MARQUEZ;

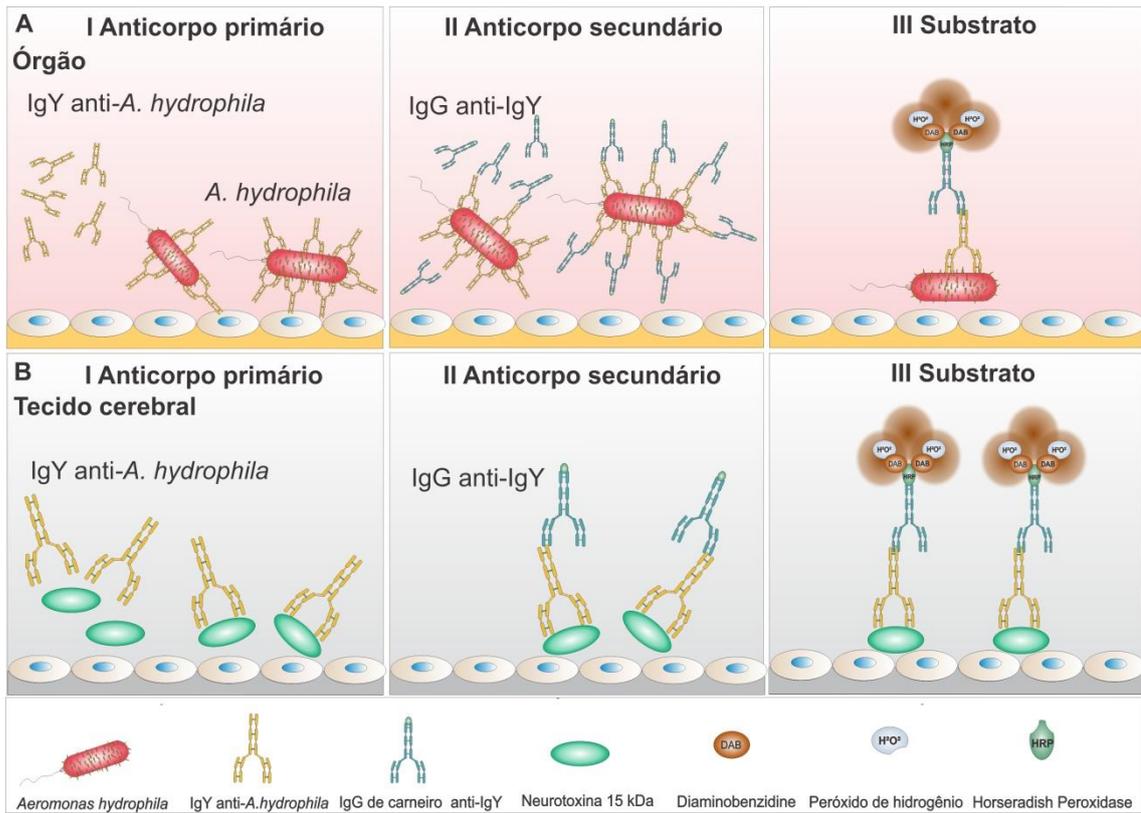
YANO, 2002; JANGID et al., 2007). Esta diversidade de mecanismos de virulência é um inconveniente para aquicultura, porque dificulta o diagnóstico desta enfermidade (MAJI; MALI; JOARDAR 2006).

Pelo exposto de nossos resultados, pode-se afirmar que a imunoglobulina Y das aves é ferramenta biotecnológica de potencial para métodos de imunodiagnóstico, de imunofluorescência, ELISA, técnicas de imunoeletoforese, *western blot*, imuno-histoquímica, entre outros, como afirmado por Tini et al. 2002.

Assim, conclui-se que a tecnologia IgY traz benefícios, pelo seu alto potencial de especificidade a epítomos antigênicos presentes na parede celular, citoplasma e exotoxinas secretadas de células bacterianas de *A. hydrophila*, ampliando a capacidade de diagnosticar a infecção bacteriana em diferentes estágios, como também os seus mecanismos moleculares de virulência. Isto evidencia o uso destes anticorpos como alternativa promissora para diagnosticar e possivelmente tratar esta enfermidade microbiana em peixes.

## **7. CONCLUSÃO**

O sistema imune das aves foi capaz de reconhecer e produzir anticorpos específicos para antígenos bacterianos da fração solúvel e insolúvel de *A. hydrophila* permitindo diagnosticar o agente microbiano, como também os seus produtos secretados, nos órgãos e tecidos de peixes infectados (Anexo 1).



**Anexo 1.** Imagem ilustrativa do método de imuno-histoquímica para a detecção do microrganismo em órgãos e no tecido cerebral. (ETO; FERNANDES, 2015).

## 8. REFERÊNCIAS

ALPERI, A.; FIGUERAS, M. J.; INZA, I.; MARTINEZ-MURCIA, A. J. Analysis of 16S rRNA gene mutations in a subset of *Aeromonas* strains and their impact in species delineation. **International Microbiology**, v. 11, p. 185-194, 2008.

ANDRADE, F. G.; ETO, S. F.; FERRARO, A. C. N. S.; MARIOTO, D. T. G.; VIEIRA, N. J.; CHEIRUBIM, A. P.; RAMOS, A. P.; VENÂNCIO, E. J. The production and characterization of anti-bovithropic and anti-crotalic IgY antibodies in laying hens: A long term experiment. **Toxicon**, Amsterdam, v. 66, p. 18-24, 2013.

AZEVEDO, V. M.; MORITA, M.; DROPA, M.; CABIANCA, M. A. A.; ESTEVES, K. E.; MATTÉ, G. R.; MATTÉ, M. H. Ocorrência de *Aeromonas* sp. e *Vibrio cholerae* em pesque-pagues da Região Metropolitana de São Paulo. **Revista Eletrônica de Epidemiologia das Doenças Transmitidas por Alimentos**, São Paulo, v. 3, n. 4, p. 114-119, 2003.

BARCELLOS, L. J. G.; KREUTZ, L. C.; RODRIGUES, L. B.; SANTOS, L. R.; MOTTA, A. C.; RITTER, F.; BEDIN, A. C.; SILVA, L. B. *Aeromonas hydrophila* em *Rhamdia quelen*: aspectos macro e microscópico das lesões e perfil de resistência a antimicrobianos. **Boletim Instituto Pesca**, São Paulo, v. 34, n. 3, p. 355 - 363, 2008.

BEAZ-HIDALGO, R.; ALPERI, A.; BUJÁN, N.; ROMALDE, J. L.; FIGUERAS, M. J. Comparison of phenotypical and genetic identification of *Aeromonas* strains isolated from diseased fish. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 33, p. 149-153, 2010.

BELÉM-COSTA, A.; CYRINO, J. E. P. Antibiotic Resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) and *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). **Scientia Agricola**, v. 63, n. 3, p. 281-284, 2006.

BORCHARDT, M. A.; STEMPER, M. E.; STANDRIDGE, J. H. *Aeromonas* isolates from human diarrheic stool and ground water compared by pulsed-field gel electrophoresis. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, p. 224-228, 2003.

BOYD, C. E. **Water quality in ponds for aquaculture**. Birmingham: Publishing Company, 1990.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2011**. Brasília: MPA, 2011. p. 60.

BRASIL. Ministério de Pesca e Aquicultura. **Boletim estatístico de pesca e aquicultura**. Brasília: MPA, 2014.

CARLANDER, D. **Avian IgY antibody**: in vitro and in vivo. Uppsala: Tryck & Medier, 2002.

CARRASCHI, S. P.; CRUZ, C.; MACHADO NETO, J. G.; MORAES, F. R.; ROSSI JÚNIOR, O. D.; NADER NETO, A.; BORTOLUZZI, N. L. Evaluation of experimental infection with *Aeromonas hydrophila* in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (Holmberg, 1887). **African Journal of Water Conservation and Sustainability**, Brooklyn, v. 1, p. 66-68, 2013.

CASTRO-ESCARPULLI, G.; AGUILERA-ARREOLA, M. G.; CEREZO, S. G.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. H.; CHACÓN, M. R.; FALGÁZ, L. S.; OZORES, G. A.; SALVAT, M. J. F. El gênero *Aeromonas*. ¿Un patógeno importante en México? **Enfermedades Infecciosas y Microbiología**, Mexico, v. 22, p. 206-216, 2002.

CASTRO-ESCARPULLI, G.; FIGUERAS, M. J.; AGUILERA-ARREOLA, G.; SOLER, L.; FERNÁNDEZ-RENDÓN, E.; APARICIO, G. O.; GUARRO, J.; CHACÓN, M. R. Characterization of *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish intended for consumption in México. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 84, p.41-49, 2003.

CHACANA, P. A.; TERZOLO, H. R.; GUTIÉRREZ, C. E.; SCHADE, R. Tecnología IgY o aplicaciones de los anticuerpos de yema de huevo de gallina. **Revista de Medicina Veterinaria**, Buenos Aires, v. 85, p. 179-189, 2004.

CHACÓN, M. R.; FIGUERAS, M. J.; CASTRO-ESCARPULLI, G.; SOLER, L.; GUARRO, J. Distribution of virulence genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 84, p. 269-278, 2003.

CHART, H. Bacterial fractionation and membrane protein characterization. In: CHART, H. (Ed.). **Methods in practical laboratory bacteriology**. Boca Raton: CRC Press, 1994.

CLAUDIANO, G. S.; FERNANDES, D. C.; ETO, E. F.; SHIMADA M. T.; MANRIQUE W. G.; AGUINAGA J. F.; SALVADOR R.; MORAES, J. R. E.; MORAES F. R. Evaluation LD50 (LD (i) (50-96h)) and first report of neuropathological in *Piaractus mesopotamicus* inoculated with different concentration of *Aeromonas hydrophila*. In: **Anais World Aquaculture Society meetings**, 2014, Adelaide.

CLAUDIANO, G. S.; PETRILLO, T. R.; MANRIQUE, W. G.; MARCUSSO, P. F.; CASTRO, M. P.; LOUREIRO, B. A.; BELO, M. A. A.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R. Acute aerocystitis in *Piaractus mesopotamicus*: participation of eicosanoids and pro-inflammatory cytokines. **Fish and Shellfish Immunology**, Tokyo, v. 4, p.1-6, 2013.

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

COSTA, M. M.; PEIXOTO, R. M.; BOIJINK, C. L.; CASTAGNA, L.; MEURER, F.; VARGAS, A. C. Sensibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de Jundiá (*Rhamdia quelen*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 10, p. 477-480, 2008.

DASKALOV, H. The importance of *Aeromonas hydrophila* in food safety. **Food Control**, v. 17, p. 474-483, 2006.

DI PINTO, A.; TERIO, V.; DI PINTO, P.; TANTILLO, G. Detection of potentially pathogenic *Aeromonas* isolates from ready-to-eat seafood products by PCR analysis. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, p. 269-273, 2012.

ESTEVE, C.; BIRKBECK T. H. Secretion of haemolysins and proteases by *Aeromonas hydrophila* EO63: separation and characterization of the serine protease (caseinase) and the metalloprotease (Elastase). **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 96, p. 994-1001, 2004.

ETO, S. F.; FERNANDES, D. C. **Imagem ilustrativa dos dois métodos de imunohistoquímica (IHC) para a detecção de *Aeromonas hydrophila* em tecidos infectados de *Piaractus mesopotamicus* (A) e (B) aplicado para a detecção de exotoxinas no tecido cerebral.** Instituição de registro: HoodID Registros Online Ltda, n. 5780415. Brasil, 2015.

FERNANDES, D. C.; ETO, S. F.; CLAUDIANO, G. S.; MARCUSSO, P. F.; LOUREIRO, B. A. Biologia do Sistema Imune das Aves: Revisão. **Ensaio e Ciência**, v. 17, p. 131-140, 2013.

FIGUERAS, M. J. Clinical relevance of *Aeromonas*. **Reviews in Medical Microbiology**, Edinburgh, v.6, p.145-153, 2005.

FONTES, M. C.; SAAVEDRA, M. J.; MARTINS, C.; MARTÍNEZ-MURCIA, A. J. Phylogenetic identification of *Aeromonas* from pigs slaughtered for consumption in slaughterhouses at the North of Portugal. **Internacional Journal of Food Microbiology**, v. 146, p. 118-122, 2011.

FREITAS-NETO, A. G.; RODRIGUES, C. J.; TOLOSA, E. M. C.; BEHMER, O. A. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica.** 2. ed. São Paulo: Manole. 2003. p. 239.

GHENGHESH, K. S.; AHMED, S. F.; EL-KHALEK, R. A. AL-GENDY, A.; KLENA, J. *Aeromonas* - associated infections in developing countries. **Journal of Infection in Developing Countries**, Sassari, v. 2, p. 81-98, 2008.

GONZALEZ-SERRANO, C. J.; SANTOS, J. A.; GARCIA-LOPEZ, M. L. GONZALEZ, N.; OTERO, A. Mesophilic aeromonads in wild and aquacultured freshwater fish. **Journal of Food Protection**, v. 64, n.5, p. 687-691, 2001.

GUIMARÃES, M. C. C.; CORREIA, V. G.; GAMA FILHO, R. V. Produção de anticorpos em galinhas. **Perspectivas**, São Paulo, v.2, n. 7, 2008.

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

HARTREE, E. E. Determination of protein; A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 48, p. 422-427, 1972.

HASAN, J.; BERGER, P.; STELMA, G.; SINCLAIR, J.; SEM, K. *Aeromonas*: Human Health Criteria Document. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water. **Office of Science and Technology**, Washington, p. 184, 2006.

HATHA, A. A. M.; VIVEKANANDHAN, A. A.; JOICE, G. J.; CHISTOL. Antibiotic resistance pattern of motile aeromonads from farm raised freshwater fish. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.98, p. 131-134, 2005.

HEUZENROEDER, M. W.; WONG, C. Y. F.; FLOWER, R. L. P. Distribution of two hemolytic toxin genes in clinical and environmental isolates from *Aeromonas* spp.: correlation with virulence in a suckling mouse model. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 174, p. 131-136, 1999.

HIRSCH, D.; PEREIRA JÚNIOR, D. J.; PICCOLI, R. H.; LOGATO, P. V. R.; FIGUEIREDO, H. C. P. Identificação e resistência a antimicrobianos de espécies de *Aeromonas* móveis isoladas de peixes e ambientes aquáticos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 6, p. 1211-1217, 2006.

HOFER, E.; REIS, C. M. F.; THEOPHILO, G. N. D.; CAVALCANTI, V. O.; LIMA, N. V.; HENRIQUES, M. F. C. M. Envolvimento de *Aeromonas* em surto de doença diarréica aguda em São Bento do Una, Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 39, p. 217-219, 2006.

HOLLIMAN, A. The veterinary approach to trout. In: BROWN, L. (Ed.). **Aquaculture Veterinarians: fish husbandry and medicine**. Oxford: Pergamon Press, 1993. cap. 14, p. 223-247.

HOVDA, M. B.; LUNESTAD, B. T.; ROSNES, R. F. J. T. A Molecular characterization of the intestinal microbiota of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). **Aquaculture**, n. 272, p. 581-588, 2007.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 23, p. 35-73, 2010.

JANGID, K.; KONG, R.; PATOLE, M. S.; SHOUCHE, Y. S. LuxRI homologs are universally present in the genus *Aeromonas*. **BMC Microbiology**, London, v. 7, p. 1-11, 2007.

JIN, L.; LI, X.; ZOU, D.; LI, S.; SONG, W.; XU, Y. Protection of crucian carp (*Carassius auratus Gibelio*) against septicaemia caused by *Aeromonas hydrophila* using specific egg yolk immunoglobulins. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 44, n.6, p. 928-936, 2013.

KARLSSON, M.; KOLLBERG, H.; LARSSON, A. Chicken IgY: utilizing the evolutionary advantage. **World's Poultry Science Journal**, v. 60, p. 341-348, 2004.

KHUSHIRAMANI, R.; GIRISHA, S.K.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. Cloning and expression of an outer membrane protein mpTS of *Aeromonas hydrophila* and study of immunogenicity in Wsh. **Protein Expression and Purification**, Orlando, v. 51, p. 303-307, 2007.

KOZINSKA, A.; FIGUERAS, M. J.; CHACON, M. R.; SOLER, L. Phenotypic characteristics and pathogenicity of *Aeromonas* genomospecies isolated from common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Journal of Applied Microbiology**, Amsterdam, n. 93, 1034-1041, 2002.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacterio phage T<sub>4</sub>. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEMOS, J. B.; RODRIGUES, M. E. B.; LOPES, J. P. Diagnóstico de ectoparasitas e bactérias em tilápias (*Oreochromis niloticus*), cultivadas na região de Paulo Afonso, Bahia. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, São Luís, v.1. n.1, p. 75-89, 2006.

LOEWY, A. G.; SANTER, U. V.; WIECZOREK, M.; BLODGETT, J. K.; JONES, S. W.; CHERONIS, J. C. Purification and characterization of a novel zinc proteinase of *Aeromonas hydrophila*. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 268, p. 9071-9078, 1993.

LONGYANT, S.; CHAIYASITTRAKUL, K.; RUKPRATANPORN, S.; CHAIVISUTHANGKURA, P.; SITHIGORNGUL, P. Simple and direct detection of *Aeromonas hydrophila* infection in the gold fish, *Carassius auratus* (L.), by dot blotting using specific monoclonal antibodies. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, n. 12, v. 33, p. 973-84, 2010.

LUNA, L. G. **Histologics taining methods of the Armed Forces**. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Mc-GrawHill, 1960.

MAJI, S.; MALI, P.; JOARDAR, S. N. Immuno reactive antigens of outer membrane protein of *Aeromonas hydrophila*, isolated from goldfish, *Carassius auratus* (Linn.). **Fish and Shellfish Immunology**, Wageningen, v. 20, p. 462-473, 2006.

MANRIQUE, W. G.; CLAUDIANO, G. S.; CASTRO, M. P.; PETRILLO, T. R.; FIGUEIREDO, M. A. P.; BELO, M. A. A.; BERDEAL, M. I. Q.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R. M. Expression of Cellular Components in Granulomatous Inflammatory Response in *Piaractus mesopotamicus* Model. **Plos One**, v. 10, 2015.

MARTIN-CARNAHAN, A.; JOSEPH, S. W. Order XII. *Aeromonadales* ord. nov. In **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2<sup>nd</sup> ed. Edited by BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T.; GARRITY, G. M. New York: Springer. v. 2, part B, 2005. p. 556.

MARTINS, L. M.; MARQUEZ, R. F.; YANO, T. Incidence of toxic *Aeromonas* isolated from food and human infection. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Oxford, v. 32, p. 237-242, 2002.

MARTINS, M. L. MIYAZAKI, D. M. Y.; MOURIÑO, J. L. P. *Aeromonas caviae* Durante surto de mortalidade em tilápia do Nilo e suplementação com vitamina C na dieta. **Boletim Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 34, n.4: p. 585-590, 2008.

MORAES, F. R.; MORAES, J. R. E. Nutracêuticos na inflamação e cicatrização de peixes de interesse zootécnico. In: TAVARES-DIAS, M. (Ed.). **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. Macapá: Embrapa Amapá, 2009. p. 625-723.

MUNHOZ, L. S.; VARGAS, G. D. A.; FISCHER, G.; LIMA, M.; ESTEVES, P. A.; HÜBNER, S. O. Avian IgY antibodies: characteristics and applications in immunodiagnostic. **Ciência Rural**, v. 44, n. 1, p. 153-160, 2014.

NAN, I. Y.; JOH, K. Rapid detection of virulence factors of *Aeromonas* isolated from a trout farm by hexaplex-PCR. **Journal of Microbiology**, Sepul, n. 45, v. 4, p. 297-304, 2007.

NARAT, M. Production of antibodies in chickens. **Food Technology Biotechnology**, v. 41, p. 259-267, 2003.

NIETO, T. P.; SANTOS, Y.; RODRIGUEZ, L. A.; ELLIS, A. E. An extracellular acetyl cholinesterase produced by *Aeromonas hydrophila* is a major lethal toxin for fish. **Microbial Pathogenesis**, London, v. 11, p. 101-110, 1991.

OLOVSSON, M.; LARSSON, A. Biotin labelling of chicken antibodies and their subsequent use in ELISA and immunohistochemistry. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.16, n.2, p.145-152, 1993.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Guidelines for drinking water quality**. 3rd ed. 2003. Disponível em:  
<[http://www.who.int/docstore/watersanitation\\_health/GDWQ/Updating/draftguidel/draftchap7.htm](http://www.who.int/docstore/watersanitation_health/GDWQ/Updating/draftguidel/draftchap7.htm)>. Acesso em: 11 maio 2004.

ORMEN, O.; GRANUM, P. E.; LASSEN, J.; FIGUERAS, M. J. Lack of agreement between biochemical and genetic identification of *Aeromonas* spp. **Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica**, v. 113, p. 203-207, 2005.

PARK, T. S.; OH, S. H.; LEE, E. Y.; LEE, T. K.; PARK, K. H.; FIGUERAS, M. J.; CHANG, C. L. Misidentification of *Aeromonas veronii* biovar *sobria* as *Vibrio alginolyticus* by the Vitek system. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 37, p. 349-353. 2003.

PAULY, D.; CHACANA, P. A.; CALZADO, E. G.; BREMBS, B.; SCHADE, R. IgY technology: extraction of chickens antibodies from egg yolk by polyethylene glycol (PEG) precipitation. **Journal of Visualized Experiments**, Cambridge, n. 51, p. 3084, 2011.

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

PEREIRA, C. S.; AMORIM, S. D.; SANTOS, A. F. M.; REIS, C. M. F.; THEOPHILO, G. N. D.; RODRIGUES, D. P. Caracterização de *Aeromonas* spp. isoladas de neonatos hospitalizados. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 41, p. 179-182, 2008.

PILARSKI, F.; SAKABE, R. Principais enfermidades diagnosticadas no Estado de São Paulo: Profilaxia ou Tratamento? In: PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M.; FURUYA, W. M.; CYRINO, J. E. P.; FERNANDES JÚNIOR, A. C. (Ed). **Anais do 3º Simpósio Internacional de Nutrição e Saúde de Peixes**, Botucatu, 2009, p.101-130.

POOBALANE, S.; THOMPSON, K. D.; DIAB, A.; ARDÓ, L.; JENEY, G.; ADAMS, A. Protein expression by *Aeromonas hydrophila* during growth in vitro and in vivo. **Microbial Pathogenesis**, London, v. 45, p. 60-69, 2008.

RAU, S.; KOHN, B.; RICHTER, C.; FENSKE, N.; KÜCHENHOFF, H.; HARTMANN, K.; HÄRTLE, S.; KASPERS, B.; HIRSCHBERGER, J. Plasma interleukin-6 response is predictive for severity and mortality in canine systemic inflammatory response syndrome and sepsis. **Veterinary Clinical Pathology**, Santa Barbara, v. 36, p. 253-260, 2007.

REILLY, M. R.; DOMINGO, R. SANDHU, J. Oral delivery of antibodies: future pharmacokinetic trends. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 32, p. 313-323, 1997.

RHODES, G.; HUYS, G.; SWINGS, J.; MCGANN, P.; HINEY, M.; SMITH, P.; PICKUP, R. W. Distribution of Oxytetracycline resistente Plasmids between *Aeromonas* in hospital and aquaculture environments: implication of Tet A. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n.9, p.3883-3890, 2000.

RODRIGUEZ, L. A.; FERNANDEZ, A. I. G.; NIETO, T. P. Production of the lethal acetylcholinesterase toxin by different *Aeromonas hydrophila* strains. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 16, p. 73-78, 1993.

ROSS, L. G.; ROSS, B. **Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals**. 3<sup>o</sup>.ed. Oxford: Blackwell Science, 1999, p. 240.

SCHADE, R. BÜRGER, W.; SCHÖNEBERG, T.; SCHNIERING, A.; SCHWARZKOPF, C.; HLINAK, A.; KOBILKE, H. Avian egg yolk antibodies. The egg laying capacity of hens following immunization with antigens of different kind and origin and the efficiency of egg yolk antibodies in comparison to mammalian antibodies. **Alternativen zu Tierexperimenten**, v. 11, p. 75-84, 1994.

SCOARIS, D. O.; BIZERRA, F. C.; YAMADA-OGATTA, S. F.; ABREU FILHO, B. A.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. The occurrence of *Aeromonas* spp. in bottled mineral water, well water and tap water from the municipal supplies. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n.5, p. 1049-1055, 2008.

SEBASTIÃO, F. A.; FURLAN, L. R.; HASHIMOTO, D. T.; PILARSKI, F. Identification of Bacterial Fish Pathogens in Brazil by Direct Colony PCR and 16S rRNA Gene Sequencing. **Advances in Microbiology**, v. 5, p. 409-424, 2015.

SHAMA, S.; BRANDÃO, D. A.; VARGAS, A. C.; COSTA, M. M.; PEDROZO, A. F. Bactérias com potencial patogênico nos rins e lesões externas de jundiás (*Rhamdia quelen*) cultivados em sistema semi-intensivo. **Ciências Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 2, p. 293-298, 2000.

SHIN, J. H.; YANG, M.; NAM, S. W.; KIRO, J. T.; MYUNG, N. H.; BANG, W. G.; ROE, I. H. Use of egg yolk derived immunoglobulin as an alternative to antibiotic treatment for control of *Helicobacter pylori* infection. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 9, p. 1061-1066, 2002.

SILVA, L. C. A. **Caracterização molecular de isolados clínicos e ambientais de *Aeromonas* spp. obtidos no estado de Pernambuco**. 2015. Tese (Doutorado em Genética) - Universidade Federal de Pernambuco. 2015.

SNEDECOR, G. W.; COCHRAN, G. **Statistical methods**. Ames: Iowa State University Press, 1974.

SOLER, L.; MARCO, F.; VILA, J.; CHACÓN, M. R.; GUARRO, J.; FIGUERAS, M. J. Evaluation of two miniaturized systems, MicroScan W/A and BBL Crystal E/NF, for identification of clinical isolates of *Aeromonas* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, p. 5732-5734, 2003.

SOUSA, J. A.; SILVA-SOUZA, A. T. Bacterial Community Associated with Fish and Water from Congonhas River, Sertaneja, Paraná, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, vol. 44, n. 4, p. 373-381, 2001.

SPILLNER, E.; BRAREN, I.; GREUNKE, K.; SEISMANN, H.; BLANK, S.; PLESSIS, D. Avian IgY antibodies and their recombinant equivalents in research, diagnostics and therapy. **Biologicals**, v. 40, n. 5, p. 313-322, 2012.

TAVARES, T. C. F.; SOARES, P. M.; NEVES, J. H. F.; SOARES, M. M; JUNIOR, A. F.; SOUZA, D. L. N.; ÁVILA, V. M. R.; LIMA-RIBEIRO, A. M. C. Produção e purificação de imunoglobulinas Y policlonais anti-*Leptospira* spp. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 9, p. 097-1102, 2013.

TINI, M.; JEWELL, U. R.; CAMENISCH, G.; CHILOV, D.; GASSMANN, M. Generation and application of chicken egg-yolk antibodies Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. **Physiology of Comparative Biochemistry**, v. 131, p. 569-574, 2002.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4<sup>a</sup> Ed. São Paulo: Atheneu, 2005, p. 718.

VIVEKANANDHAN, G.; SAVITHAMANI, K.; HATHA, A. A. M.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from marketed fish and prawns of South India. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 76, p. 165-168, 2002.

WAKABAYASHI, H.; KANAI, T.K.; HSU, O.; EGUSA, S. Pathogenic activities of *Aeromonas hydrophila* bio var *hydrophila* (Chester) Popoff and Veron, 1876, to fishes. **Fish Pathology**, Tokyo, v. 15, p. 319-325, 1981.

WEDEMEYER, G. Stress of anesthesia with M.S-222 and benzocaine in rain bow trout (*Salmo gairdneri*). **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, Toronto, v. 27, p. 909-914, 1970.