

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE**  
**JABOTICABAL**

**Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária**

**HEMATOLOGIA E HISTOPATOLOGIA DE TILÁPIAS**  
**(*Oreochromis niloticus*) VACINADAS E DESAFIADAS COM**  
***Aeromonas hydrophila* E *Streptococcus agalactiae***

**Roberto Barbuio**

Médico Veterinário

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

- 2013-

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE**  
**JABOTICABAL**

**Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária**

**HEMATOLOGIA E HISTOPATOLOGIA DE TILÁPIAS**  
**(*Oreochromis niloticus*) VACINADAS E DESAFIADAS COM**  
***Aeromonas hydrophila* E *Streptococcus agalactiae***

**Roberto Barbuio**

Orientador: **Prof. Dr. Oswaldo Durival Rossi Junior**

Co-orientador: **Dr. Claudinei da Cruz**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp – Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva).

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

- Fevereiro de 2013-

Barbuio, Roberto

B241h HEMATOLOGIA E HISTOPATOLOGIA DE TILÁPIAS (*Oreochromis niloticus*) VACINADAS E DESAFIADAS COM *Aeromonas hydrophila* E *Streptococcus agalactiae* / Roberto Barbuio. -- Jaboticabal, 2013  
viii, 46 f. : il.; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011

Orientador: Oswaldo Durival Rossi Junior

Banca examinadora: Claudinei da Cruz, Marco Antonio de  
Andrade Belo, Eduardo Makoto Onaka

Bibliografia

1. Bacteriose. 2. Aeromonose. 3. Streptococose. 4. Reisolamento.  
I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:614.47:639.3

## **Dados Curriculares do Autor**

**Roberto Barbuio** – nasceu em Santa Rita do Passa Quatro, São Paulo, no dia 14 de fevereiro de 1984. Em dezembro de 2001 concluiu o ensino médio na escola Cooperativa de Ensino e cultura de Santa Rita do Passa Quatro. Em 2004 ingressou no Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho – Campus de Jaboticabal. Em 2008 realizou seu Trabalho de Conclusão de Curso na mesma Faculdade. Em dezembro de 2008 recebeu o grau de Médico Veterinário. Registrado no Conselho Regional de Medicina Veterinária de São Paulo sob o número CRMV-SP 25.786. Em março de 2011 iniciou o mestrado em Medicina Veterinária Preventiva, pelo programa de pós-graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho – Campus de Jaboticabal.

## AGRADECIMENTOS

À toda a minha família, Maria Carolina Vercese, José Roberto Barbuio, Marcius Tadeu Morandi, Maria Margarida Barbuio Morandi, Ana Carolina Barbuio e Carla Barbuio que sempre estiveram ao meu lado nas horas mais importantes e decisivas da minha vida e que proporcionam os melhores momentos e as mais importantes lições para a minha vida .

À minha namorada Juliana Olivencia Ramalho Nunes pelo amor, compreensão, ensinamentos, companheirismo e apoio que são fundamentais na minha trajetória.

Ao professor Oswaldo Durival Rossi Júnior por ter me proporcionado a oportunidade de ingressar no mestrado sob sua orientação e por todo o apoio durante este período.

Ao meu grande amigo, Co-orientador e grande incentivador Prof. Dr. Claudinei da Cruz, pelo exemplo de dignidade, dedicação e sabedoria que me proporcionaram um grande crescimento acadêmico e pessoal.

Aos meus amigos e companheiros de trabalho do grupo NEPEAM: Patrícia, Cynthia, Adilson, Alfredo, Antonio Nader Neto, Nayara, Aline, Ana Cristina, Daniela, Taise e aos funcionários: Alessandro e Ronaldo. O meu eterno obrigada, pela incansável ajuda e amizade.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal, especialmente ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal.

À Deus.

## SUMÁRIO

	Página
<b>Índice de Tabelas.....</b>	<b>v</b>
<b>Índice de Figuras.....</b>	<b>vi</b>
<b>1.INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>3</b>
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>4</b>
3.1. <i>Streptococcus</i> sp. ....	4
3.2 . <i>Aeromonas</i> sp. ....	5
3.3. Desenvolvimento de vacinas para peixes.....	6
3.4. Hematologia e imunologia de peixes teleósteos.....	7
3.5. Sistema imunológico inato e adaptativo.....	7
3.6. Células vermelhas.....	9
3.7. Trombócitos.....	9
3.8. Células Brancas.....	10
3.8.1. Leucócitos não granulares.....	10
3.8.2. Leucócitos granulares.....	11
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>12</b>
4.1. Procedimento experimental e vacinação.....	12
4.2. Indução de infecção.....	13
4.3. Reisolamento de <i>Aeromonas</i> sp. ....	14
4.4. Reisolamento de <i>Streptococcus</i> sp. ....	15
4.5. Variáveis Hematológicas e Bioquímicas do Sangue.....	15
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>16</b>
5.1. Série Branca.....	16
5.2. Série Vermelha.....	21
5.3. Variáveis Bioquímicas.....	23
<b>6. HISTOPATOLOGIA.....</b>	<b>26</b>
6.1. Histopatologia da Pele e do Tecido Muscular.....	26
6.2. Histopatologia do Fígado.....	30
6.3. Histopatologia do Baço.....	31
6.4. Histopatologia do Rim Cefálico.....	33
6.5. Histopatologia do Rim Caudal.....	33
<b>7. CONCLUSÕES PARCIAIS.....</b>	<b>35</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>35</b>

**ÍNDICE DE TABELAS**

	<b>Página</b>
<b>Tabela 1.</b> Média $\pm$ desvio padrão da contagem absoluta de Leucócitos de tilápia ( <i>O. niloticus</i> ).....	<b>17</b>
<b>Tabela 2.</b> Média $\pm$ desvio padrão da contagem relativa de Leucócitos. Leucócitos de tilápia ( <i>O. niloticus</i> ).....	<b>18</b>
<b>Tabela 3.</b> Média $\pm$ desvio padrão da série vermelha Leucócitos de tilápia ( <i>O. niloticus</i> ).....	<b>21</b>
<b>Tabela 4.</b> Média $\pm$ desvio padrão das variáveis bioquímicas Leucócitos de tilápia ( <i>O. niloticus</i> ).....	<b>23</b>
<b>Tabela 5.</b> Média $\pm$ desvio padrão das variáveis bioquímicas Leucócitos de tilápia ( <i>O. niloticus</i> ).....	<b>25</b>

**ÍNDICE DE FIGURAS**

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Fotomicrografia da pele e do tecido muscular de tilápia, HE.....	<b>29</b>
<b>Figura 2.</b> Fotomicrografia do fígado de tilápia, HE.....	<b>31</b>
<b>Figura 3.</b> Vista geral do baço de tilápia ( <i>O. niloticus</i> ) do grupo controle com detalhe para o centro melomacrófago (MM) e a polpa vermelha do tecido (V), HE.....	<b>32</b>
<b>Figura 4.</b> Vista geral do baço de tilápia ( <i>O. niloticus</i> ) do grupo controle com detalhe para o centro melomacrófago (MM) e a polpa vermelha do tecido (V), HE.....	<b>33</b>
<b>Figura 5.</b> Fotomicrografia do rim caudal de tilápia, HE.....	<b>34</b>

## HEMATOLOGIA E HISTOPATOLOGIA DE TILÁPIAS (*Oreochromis niloticus*) VACINADAS E DESAFIADAS COM *Aeromonas hydrophila* E *Streptococcus agalactiae*

**RESUMO** – A intensificação dos sistemas aquícolas tem contribuído para o aumento da ocorrência das doenças infecciosas. Assim, o objetivo deste estudo foi analisar as alterações hematológicas e histopatológicas de tilápias (*Oreochromis niloticus*) vacinadas e desafiadas com *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae*. Para tanto, peixes com pelo menos 15 gramas foram vacinados com 0,05 mL por peixe, na cavidade celomática entre as nadadeiras ventrais e foram mantidos por 21 dias para o desenvolvimento da imunidade. A indução da infecção foi realizada em períodos diferentes para cada bactéria, sendo após a vacinação, com 60 dias para *Aeromonas hydrophila* e 90 dias para *Streptococcus agalactiae*, com as respectivas concentrações de DL50. Após sete dias da inoculação foram coletados, de forma asséptica, fígado, rim, baço e cérebro dos peixes, a realização das provas bioquímicas e confirmação da presença das bactérias *Aeromonas* sp. e *Streptococcus* sp. e coleta do sangue para a contagem total dos leucócitos e trombócitos e diferencial dos leucócitos, da série vermelha foram analisados hematócrito, eritrócitos, VCM (Volume Corpuscular Médio), HCM (Hemoglobina Corpuscular Média) e CHCM (Concentração Hemoglobina Corpuscular Média), além dos testes bioquímicos de proteína total (PPT), colesterol, albumina, uréia, triglicérides, lactato e glicose e também foi realizado o reisolamento das bactérias. Ao término do período experimental ocorreram aumento nas variáveis hematológicas e bioquímicos do CHCM, globulinas e colesterol e a diminuição no hematócrito, VCM, leucócitos e lactato de tilápias infectadas por *S. agalactiae* e aumento nos parâmetros de leucócitos, globulinas e a diminuição dos trombócitos e colesterol de tilápias infectadas por *A. hydrophila* além de alterações histopatológicas em pele, fígado e rim das tilápias não vacinadas e infectadas. A vacinação melhorou a resposta histofisiológicas dos animais após a infecção com as duas espécies de bactérias avaliadas.

**Palavras-chave:** Bacteriose, Aeromonose, Streptococose, Reisolamento

**HEMATOLOGY AND HISTOPATHOLOGY TILAPIA (*Oreochromis niloticus*)  
VACCINATED AND CHALLENGED WITH *Aeromonas hydrophila* AND  
*Streptococcus agalactiae***

**ABSTRACT** – The intensification of aquaculture systems has contributed to the increased occurrence of infectious diseases. The objective of this study was to analyze the hematological and histopathological tilapia (*Oreochromis niloticus*) vaccinated and challenged with *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus agalactiae*. To that end, with at least 15 fish were vaccinated with 0.05 grams mL per fish in between the coelomic cavity and ventral fins were maintained for 21 days for development of immunity. Induction of Infection was performed at different times for each bacteria, which after vaccination, 60 days and 90 days *A. hydrophila* to *S. agalactiae*, with respective concentrations of LD50. After seven days of inoculation were collected aseptically, liver, kidney, spleen and brain of fish carrying out the biochemical and confirmation of the presence of the bacteria *Aeromonas* sp. and *Streptococcus* sp. and blood collection for the total count of leukocytes and thrombocytes and differential leukocytes, red series were analyzed hematocrit, erythrocytes, MCV (Mean Corpuscular Volume) , MCH (Mean Corpuscular Hemoglobin) and MCHC (Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration), in addition to biochemical assays of total protein (PPT), cholesterol, albumin, urea, triglycerides, and glucose and lactate was also performed reisolation of bacteria. At the end of the experimental period there was an increase in haematological and biochemical variables of MCHC, globulin and cholesterol and decrease in hematocrit, MCV and lactate tilapia infected with *S. agalactiae* and an increase in leukocyte parameters, globulin and the decrease of platelets and cholesterol tilapia infected with *A. hydrophila* as well as histopathological changes in skin, liver and kidney of tilapia unvaccinated and infected. Vaccination improved the response histophysiological animals after infection with two species of bacteria evaluated.

**Keywords:** Bacteriosis, Aeromonosis, Streptococcosis, Reisolation

## 1. INTRODUÇÃO

A piscicultura brasileira apresentou crescimento de 19,6% entre 2008 e 2009, quando a produção passou de 282.008 para 337.353 t. No balanço do crescimento a contribuição da produção de organismos aquáticos continentais passou a representar 81,2% da produção aquícola nacional no ano de 2009, frente aos 77,2% em 2008 (FAO, 2010). Assim, este é o setor de produção animal que mais cresce no mundo respondendo por quase metade da oferta total dos peixes consumidos (FAO, 2010).

Dentre os principais organismos produzidos, a tilápia é o segundo grupo de peixe mais criado no mundo, com perspectiva de se tornar um dos produtos aquícolas de comércio internacional mais importante do século 21 (DALTON et al., 2005). A tilápia (*Oreochromis* sp.) é a espécie mais produzida no Brasil, exceto nas regiões abrangidas pelas Bacias do Amazonas e Paraguai, onde sua criação não é permitida pela legislação ambiental vigente, com representação de 39% do total de pescado proveniente da piscicultura continental no Brasil em 2009 (FAO, 2010).

A densidade, a oferta de alimento, o manejo com classificações seriadas e pesagens e a degradação da qualidade da água devido ao aumento da quantidade de matéria orgânica, leva a queda do nível de oxigênio dissolvido contribuem para o aumento do estresse e facilita a multiplicação dos microrganismos no ambiente. Isto contribui para uma predisposição a enfermidades infecciosas e parasitárias que trazem grandes prejuízos econômicos aos produtores (RANZANI-PAIVA, 1997; CARRASCHI et al., 2011). Segundo Jin-ha et al. (2009) apenas a presença da bactéria *Edwardsiella tarda* em pisciculturas de bagre coreano (*Silurus asotus*) causa 5% de mortalidade dos peixes por dia em pisciculturas coreanas.

O *Streptococcus* sp. tornou-se um dos patógenos mais relatados na criação de peixes, causando grandes perdas na produção de peixes marinhos e de água doce em regiões quentes. Embora identificado pela primeira vez em 1976, a septicemia causada por *Streptococcus* spp. é um problema sanitário em sistemas de criação intensiva de tilápia (AGNEW; BARNES, 2007).

Outra bactéria importante durante o ciclo produtivo e para a saúde pública é a *Aeromonas hydrophila*, um patógeno oportunista, considerado invasor secundário, que causa infecção em peixes imunossuprimidos e/ou associa-se à infecção por

outros patógenos, como no caso do protozoário ciliado *Epistylis* (VIEIRA, 2003). Segundo Holliman (1993), as aeromonas móveis estão presentes no ambiente aquático e no intestino de peixes. Assim, as septicemias são um problema em todo o mundo e em todas as espécies criadas em água doce.

Além de causar doença nos peixes é uma zoonose e pode trazer graves consequências aos seres humanos que entrarem em contato com essa bactéria, sendo considerada também um problema de saúde pública. O estudo com *Aeromonas hydrophila* conduzido por Rossi Júnior (1998) relata a preocupação com as bactérias do gênero *Aeromonas* sp., por serem capazes de estabelecer diferentes tipos de patogenias que acometem tanto animais como o homem.

Com a ocorrência de grandes surtos em decorrência destes patógenos, o uso de farmoquímicos, principalmente de forma indiscriminada e sem registro, torna-se cada vez mais frequente. O uso de antimicrobianos traz uma preocupação em relação à resistência dos microrganismos patogênicos e para a saúde animal e humana. Saavedra et al. (2004) demonstraram as taxas de resistência de *Aeromonas* sp. para amoxicilina, carbenicilina, ticarcilina e ao imipenem, um antibiótico de uso clínico, sugere que esta resistência pode ser transferida para a população de *Aeromonas* sp. do meio ambiente, sendo necessário buscar novas alternativas, principalmente na prevenção de doenças e neste contexto incluem-se as vacinas (ROMANO; MEJÍA, 2003).

A capacidade dos peixes em desenvolverem imunidade contra determinado microrganismo depende da idade, da temperatura da água, do agente de imunização e do método de vacinação (GUDDING et al., 1999).

As reações cruzadas ocorrem quando dois microrganismos possuem epítomos iguais ou semelhantes em microrganismos não relacionados. Como resultado, os anticorpos direcionados a um antígeno (qualquer substância estranha que possa induzir resposta imune) podem reagir inesperadamente para outro antígeno não relacionado, podendo assim, causar uma resposta imune a outro microrganismo ao qual não se esperava (TIZARD, 2002). Um exemplo de reação cruzada ocorre entre a *Brucella abortus* e a *Yersinia enterocolitica* o que pode levar um animal infectado por *Y. enterocolitica* ser diagnosticado como positivo para brucelose (TIZARD, 2002).

Assim, o objetivo geral do estudo foi verificar se ao vacinar peixes com uma vacina para *Streptococcus* sp. (forma comercial já existente no mercado brasileiro) é possível que essa vacinação traga outros benefícios além da proteção específica para este microrganismo como, por exemplo, um incremento na imunidade de tilápias na infecção por *Aeromonas* sp. Não há demonstração na literatura, porém, é provável que as amostras de *S. agalactiae* e *A. hydrophila* apresentem comportamento similar e tais indícios embasam a necessidade por informações sobre o perfil antigênico dos patógenos isolados no país (FIGUEIREDO; LEAL, 2008).

## 2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram avaliar as alterações hematológicas e histopatológicas em tilápias (*O. niloticus*) vacinadas com vacina comercial e desafiadas com *Streptococcus agalactiae* e *Aeromonas hydrophila*, para tanto:

- i) Verificar a eficácia da vacina de *Streptococcus* sp. para tilápias infectadas experimentalmente com *Streptococcus agalactiae* e *Aeromonas hydrophila*, pela avaliação da taxa de mortalidade;
- ii) Realizar o reisolamento das bactérias *Aeromonas* sp. e *Streptococcus* sp., por meio de testes bioquímicos para comprovação do gênero da bactéria causadora das alterações;
- iii) Avaliar as variáveis hematológicas e histopatológicas (fígado, rins e músculo) em tilápia após a vacinação e infecção, para obtenção do padrão de resposta imunológica e histopatológica.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. *Streptococcus* sp.

Dentre as espécies de estreptococos, o *Streptococcus iniae* e o *Streptococcus agalactiae* são considerados os mais importantes patógenos para a aquicultura (SHOEMAKER; KLESIUS, 1997). A estreptococose é uma doença septicêmica que afeta peixes de água doce e de água salgada, ambos em criação ou livre no ambiente. As principais espécies envolvidas são *S. iniae* e *S. agalactiae*, com sinais clínicos à infecção e espectro de hospedeiros semelhantes (EVANS et al., 2002; SHELBY et al., 2002). O primeiro relato do isolamento de *Streptococcus* sp. em tilápia foi realizado por Wu (1970) e desde então, este gênero tem sido identificado como responsável por elevados prejuízos em vários países.

No Brasil, no norte do Paraná, *Streptococcus* sp. isolados de tilápia criadas em sistema intensivo e com histórico de elevada mortalidade apresentaram características fenotípicas semelhantes ao *S. agalactiae*, sugerindo ser esta uma das espécies envolvidas na limitação da tilapicultura brasileira. O primeiro isolamento deste patógeno foi realizado por Salvador et al., (2005), em tilápia do Nilo (*O. niloticus*) com sinais neurológicos (natação errática e em movimentos circulares), em sistema de criação intensiva.

O *Streptococcus agalactiae* é um patógeno emergente em tilápia em todo o mundo. MIAN (2008) investigou aspectos da epidemiologia, transmissão e virulência das infecções por *S. agalactiae*, em nove surtos de meningoencefalite e septicemia em produções de tilápia no Brasil. Neste estudo foi observado variação de peso dos peixes infectados, elevada taxa de mortalidade e como fator ambiental temperatura acima de 26°C.

O *S. agalactiae* tem sido isolado de animais homeotermos terrestres ou heterotermos aquáticos, o que indica uma ampla diversidade de hospedeiros (EVANS et al., 2002).

Os principais sinais clínicos e lesões macroscópicas nos peixes com isolamento de *Streptococcus* sp. foram hepatomegalia, esplenomegalia, lesão de pele e de base das nadadeiras e exoftalmia com opacidade de córnea. O maior

número de infecções por *Streptococcus* sp. ocorreu nos meses com temperaturas mais elevadas, principalmente no período de transição inverno primavera (SALVADOR et al., 2003). Para Figueiredo et al. (2006), outras características importantes foram escurecimento dos peixes, pequenas lesões de pele com perda de escamas e áreas de petéquias na base das nadadeiras ventrais, natação errática e em movimentos circulares, alta mortalidade e evolução rápida, com morte dois a três dias após o início dos sinais clínicos.

As espécies de estreptococos do grupo B de Lancefield, assim como outras do gênero, são células esféricas ou ovóides Gram-positivas, catalase negativa, que se apresentam aos pares ou em cadeias. São imóveis, não esporuladas e anaeróbicas facultativas. Obtêm energia por meio da fermentação de carboidratos como a glicose, que resulta na maior parte em ácido láctico (KILLIAN, 1998).

Os estreptococos patogênicos possuem várias características que contribuem para sua virulência, como aderência às superfícies epiteliais, invasão de células do epitélio e do endotélio e injúria direta aos tecidos (NIZET; RUBENS, 2000).

Os estreptococos podem sobreviver mesmo em condições ambientais adversas. Kitao et al. (1979) descreveram a presença de elevado número de estreptococos na água e em sedimentos de pisciculturas durante os meses de verão e diminuição durante o outono e inverno. Os peixes doentes e mortos são as principais fontes de infecção (MINAMI et al., 1979; CLARK et al., 2000).

### **3.2. *Aeromonas* sp.**

As bactérias do gênero *Aeromonas* estão presentes naturalmente no ecossistema aquático e fazem parte da microbiota natural dos organismos aquáticos (FRAIRE, 1978). As móveis, dentre elas, são as mais virulentas e pertencem à espécie *A. hydrophila* (HOLLIMAN, 1993).

A doença causada por *A. hydrophila* está associada ao excesso de matéria orgânica na água (POST, 1987) e temperaturas acima de 28 °C.

*A. hydrophila* é um bastonete móvel, com flagelo polar, com motilidade ativa e produz ácido e gás a partir de carboidratos, não produz esporos, Gram-negativa, não capsulada, oxidase positiva e anaeróbia facultativa (STOSKOPF, 1993).

Esta bactéria causa septicemia hemorrágica, caracterizada pela presença de pequenas lesões superficiais e hemorragias locais, como petéquias, nas brânquias e opérculos, exoftalmia e distensão da cavidade celomática com acúmulo de líquido ascítico, anemia e necrose hepática e renal (AUSTIN; AUSTIN, 1987). Também pode determinar perda de apetite, apatia, lesões epidérmicas como despigmentação, necroses e perda da pele com exposição da musculatura e corrosão da nadadeira caudal (CARRASCHI et al., 2011). Internamente, os órgãos podem estar friáveis e esbranquiçados, a cavidade celomática com exsudato, intestino flácido com muco amarelo e sem alimento (PLUMB, 1994). Em necropsia, observam-se órgãos internos congestionados e hemorrágicos e o rim e o baço aumentados (FIGUEIREDO; PLUMB, 1977).

Angka et al. (1995) isolaram várias cepas de *A. hydrophila* de *Ictalurus punctatus* de diversos ambientes na Indonésia, que apresentaram diferentes níveis de virulência. Até cinco dias após a injeção intracelomática da bactéria, os peixes apresentaram lesões musculares, na pele no local da injeção, no fígado e rins.

### **3.3. Desenvolvimento de vacinas para peixes**

A maioria das vacinas bacterianas é utilizada na forma inativada e é administrada por injeção, via oral ou imersão. A aplicação das vacinas pela via intracelomática é o método mais confiável e eficaz, quando comparada à via oral e imersão. As desvantagens desta via incluem estresse intenso para os peixes, custos com o manejo e tempo requerido para administração da vacina (NAKANISHI; OTOTAKE, 1997).

O desenvolvimento de vacinas é um processo baseado na identificação de estruturas únicas presentes nas células de um determinado microrganismo, gerando imunidade se administrada como vacina. As vacinas vivas, inativadas e de DNA (menor frequência) são os principais tipos utilizados (GUDDING et al., 1999). Um antígeno vacinal deve ser obtido de vários isolados, induzir a formação de anticorpos específicos, conferir proteção, segurança e ser eficiente para o hospedeiro imunizado (CHAKRAVARTI et al., 2001).

Na aquicultura, há a descrição do desenvolvimento de vacinas para *Flavobacterium columnare*, *Aeromonas hydrophila* e *S. agalactiae*. A imunização de

*Ictalurus punctatus* via imersão com vacina viva modificada para *F. columnare* foi eficiente na indução de resposta imune, conferindo proteção aos animais quando desafiados experimentalmente (SHOEMAKER et al., 2007). De maneira similar, vacina viva atenuada (VIVAS et al., 2004; VIVAS et al., 2005) e fantasmas bacterianos (envelope celular ausente de conteúdo citoplasmático) (CHU et al., 2008) contra *A. hydrophila* promoveram incremento na imunidade das espécies testadas. As tilápias imunizadas com bacterina mais produto extracelular concentrado de *S. agalactiae* apresentaram proteção significativa à infecção quando comparadas aos grupos controle não vacinados (EVANS et al., 2004; PASNISK et al., 2005a; PASNISK et al., 2005b).

Variabilidade genética e fenotípica tem sido observada quando amostras nacionais são comparadas com amostras de referência e isoladas de outras localidades, principalmente para *F. columnare* (FIGUEIREDO et al., 2005; OLIVARES-FUSTER et al., 2007a) e *S. agalactiae* (OLIVARES-FUSTER et al., 2008). Para *F. columnare* tais variações se refletem na virulência e predileção por hospedeiro (OLIVARES-FUSTER et al., 2007b; SHOEMAKER et al., 2008). É provável que as amostras de *S. agalactiae* e *A. hydrophila* apresentem comportamento similar. Tais indícios embasam a necessidade por informações sobre o perfil antigênico dos patógenos isolados no país (FIGUEIREDO; LEAL, 2008).

#### **3.4. Hematologia e imunologia de peixes teleósteos**

O estudo da composição e da função dos componentes do sangue de peixes teleósteos é de fundamental importância na avaliação das condições fisiológicas, bioquímicas e patológicas dos peixes (TAVARES-DIAS, 2003). Os peixes teleósteos são animais que possuem sistema de defesa inato e adaptativo, envolvendo os leucócitos, trombócitos e os eritrócitos.

#### **3.5. Sistema imunológico inato e adaptativo**

Os processos de defesa não específicos (inato), assim como o específico (adaptativo), podem ser de dois tipos: a imunidade mediada por células e a imunidade humoral. A imunidade celular não específica envolve o monócito e os

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

A imunidade celular específica está relacionada à capacidade dos linfócitos T reconhecerem alguns antígenos que se ligam a epítomos de certas células. Se uma bactéria for fagocitada pelo macrófago, os fragmentos resultantes da fagocitose ligam-se a marcadores superficiais desse macrófago que os apresenta aos linfócitos T, estimulando assim a proliferação desta célula (SWAIN; SAHOO; AYYAPPAN, 2006).

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

Os processos de aglutinação e inibição de patógenos são dois mecanismos importantes na resposta imune de peixes teleósteos, realizados por moléculas presentes no soro sanguíneo. As moléculas responsáveis pela aglutinação são as lectinas e as imunoglobulinas (Ig). As lectinas são proteínas capazes de se ligar a alguns açúcares, principalmente manoses, encontrados na parede de bactérias Gram negativas ou Gram positivas, porém, não possui tanta especificidade quanto as Ig's. Contudo, as moléculas com maior capacidade aglutinante são as Ig, que possuem uma ação mais específica entre os antígenos, sendo produzidas pelos linfócitos B. Silva et al. (2009) e Swain et al. (2007), relataram aumento do título de aglutinação no soro sanguíneo de tilápia do Nilo e carpa indiana (*Labeo rohita*), respectivamente, após vacinarem com antígenos polivalentes.

Na circulação sanguínea de peixes teleósteos é encontrado apenas IgM, possuindo estrutura tetrâmera ou pentâmera, ao contrário dos mamíferos que possuem diversos tipos de Ig (IgA, IgE, IgD, IgM, IgG). Tanto as lectinas como as Ig também possuem função de opsonina (molécula que age como facilitadora de ligação no processo de fagocitose) e estão envolvidas na ativação do sistema complemento, cascata proteolítica responsável por clivar organismos invasores (ELLIS, 1999; SWAIN; SAHOO; AYYAPPAN, 2006).

A atividade antimicrobiana do soro sanguíneo dos peixes teleósteos se deve a diversos tipos de proteínas e enzimas. A lisozima é uma enzima importante no combate de infecções em peixes teleósteos, é produzida por neutrófilos e monócitos, sua ação se dá principalmente, contra as bactérias Gram-positivas, porém também pode ajudar a inibir Gram-negativas (MAGNADÓTTIR, 2006; SAURABH; SAHOO, 2008). Outros tipos de inibidores microbianos do sangue, são a transferrina, a qual instabiliza o ferro disponível, importante nutriente para manutenção das bactérias; peptídeos antimicrobianos, que possuem ação rápida e eficaz, pois atuam diretamente nas membranas dos patógenos provocando sua desestabilização; antiproteases, como a  $\alpha^2$ -macroglobulina que inibe a ação de toxinas proteolíticas produzidas pelas bactérias (ELLIS, 1999; MAGNADÓTTIR, 2006).

### 3.6. Células vermelhas

Os eritrócitos são as células mais numerosas do sangue, que contêm a hemoglobina como pigmento respiratório, que tem por função transportar o oxigênio (O<sub>2</sub>) no sangue, qualquer deficiência no eritrócito poderá prejudicar o aporte de O<sub>2</sub> nos tecidos. As alterações em sua estrutura estão altamente relacionadas à resposta dos organismos frente a processos anemiantes (RANZANI-PAIVA; SILVA-SOUZA, 2004; SATAKE; PADUA; ISHIKAWA, 2009). Segundo Clauss; Dove; Arnold (2008) doenças em peixes causam anomalias em eritrócitos e conseqüentemente anemias, sendo *Aeromonas* spp. a causa mais comum de anemia hemolítica em peixes.

### 3.7. Trombócitos

Em contraste com as plaquetas de mamíferos que são células anucleadas, os

trombócitos de peixes participam do processo de defesa do organismo (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004). Os trombócitos podem possuir formas variadas nos peixes: elípticos, arredondados, ovais, fusiformes; com núcleo grande que acompanha o formato da célula (RANZANI-PAIVA; SILVA-SOUZA, 2004). Além do seu papel de hemostasia, os trombócitos têm relevante participação no mecanismo de defesa orgânica, demonstrado pela sua presença nos processos de coagulação e inflamação, além de alguns autores sugerirem possível atividade fagocitária nos processos de infecção (TAVARES-DIAS, 2003; MARTINS et al., 2004). Tilápia do Nilo desafiada com *A. hydrophila* apresentaram aumento no número de trombócitos circulantes comprovando sua atuação na defesa do organismo (BAILONE et al., 2010).

### **3.8. Células brancas**

Os leucócitos são células sanguíneas que participam dos mecanismos de defesa orgânica em peixes teleósteos, e estão subdivididos em dois grupos: não granulares (linfócitos e monócitos), e leucócitos granulares (neutrófilos, eosinófilos, basófilos e leucócitos granulares PAS positivo), e participam das respostas imunológicas de diferentes formas (FERNANDEZ; DE BLAS; RUIZ, 2002).

#### **3.8.1. Leucócitos não granulares**

Os linfócitos são leucócitos mais comuns e mais variados em teleósteos e elasmobrânquios saudáveis. Estas células são responsáveis pela resposta imune adaptativa humoral e celular, promovendo a produção de anticorpos, aumento da capacidade citotóxica, atuando no processo de memória imunológica e promovendo a liberação de fatores reguladores da função imune, como as linfocinas (YOSHINAGA et al., 1994). Os linfócitos se distinguem em dois grupos de populações chamados linfócitos B e T. Os linfócitos B se diferenciam em plasmócitos (linfócitos B ativados) e células de memória, participando da resposta imune humoral. Enquanto os linfócitos T diferencia-se em linfócitos T auxiliares, que reconhecem antígenos específicos ligados a marcadores e liberam mensageiros químicos que estimulam a atividade de células como os fagócitos; e linfócitos T citotóxicos, que reconhecem e destroem células infectadas.

Os linfócitos B e os diferentes linfócitos T, quando ativos, migram para o local de infecção ou para o timo e segregam substâncias tóxicas que matam as células anormais (TIZARD, 2002; SWAIN; SAHOO; AYYAPPAN, 2006). Segundo Clauss, Dove e Arnold (2008) a linfopenia (diminuição do número de linfócitos no sangue) sugere condição de imunossupressão observada, por exemplo, em uma infecção aguda. Já a linfocitose (aumento do número de linfócitos no sangue) em peixes pode sugerir estímulo imune, causado no início de uma infecção crônica ou após o uso de imunoestimulantes e vacinas. Linfocitose foi observada por Bailone et al. (2010) e por Silva et al. (2009) em tilápia do Nilo vacinada intraperitonealmente com antígeno polivalente.

Os monócitos apresentam um papel importantíssimo na resposta imune, participando da produção de citocinas e da apresentação dos antígenos em teleósteos (VALLEJO; MILLER; CLEM, 1992; SHOEMAKER; KLESIUS; PLUMB, 1997). Dentre as principais características destacam-se a capacidade de fagocitar material estranho ao organismo, inerte e antigênico, assim como restos celulares da resposta inflamatória e de outros processos degenerativos, além de secretarem radicais livres de oxigênio e nitrogênio e destruir diferentes tipos de patógenos (ELLIS, 1999).

### **3.8.2. Leucócitos granulares**

Os neutrófilos são as células mais comuns entre as granulares e as primeiras envolvidas nos estágios iniciais de inflamação nos peixes (MANNING, 1994). Estas células possuem a capacidade de fagocitose (FERNANDEZ; DE BLAS; RUIZ, 2002) e atividade microbicida desencadeada durante o processo denominado "explosão respiratória", que consiste na conversão do oxigênio molecular em compostos e metabólitos derivados do oxigênio, como radicais livres do oxigênio (PLYZYCZ et al., 1989).

Os eosinófilos e basófilos (no tecido chamado de mastócito) se encontram distribuídos pelo tecido conjuntivo, especialmente no trato gastrointestinal e nas brânquias. A função dessas células nos peixes não está totalmente esclarecida, porém sabe-se que elas intervêm nos processos de inflamação crônica e na defesa celular, sendo mais comumente encontradas na corrente sanguínea quando há

infestação por parasitos (HINE, 1992; RANZANI-PAIVA; SILVA-SOUZA, 2004).

Os leucócitos granulares PAS-positivos (LG-PAS), anteriormente chamados de células granulocíticas especiais (CGE), são pouco lembrados nos estudos hematológicos em peixes e não estão presentes em tilápias (*O. niloticus*) (RANZANI-PAIVA; SILVA-SOUZA, 2004).

#### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi realizado no Núcleo de Ensino e Pesquisas Ambientais em Matologia, Nepeam localizado na FCAV/Unesp, Campus de Jaboticabal.

A vacina utilizada foi AQUAVAC<sup>®</sup> STREP Sa. (inativada contra streptococoses) lote 004/10 fornecida pela empresa MSD Animal Health<sup>®</sup>.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com cinco tratamentos e três repetições. Os resultados obtidos foram analisados pela análise de variância (ANOVA) e suas médias comparadas pelo teste de Tukey 5%.

##### **4.1. Procedimento experimental e vacinação**

Os peixes (n = 500 da linhagem Gift) foram adquiridos de pisciculturas da região de Jaboticabal – SP e foram mantidos em quarentena por 30 dias em mesocosmos de 400 litros. Neste período, os animais foram alimentados com ração comercial (FRI-Aqua ALEVINOS de 2-3 mm: Proteína Bruta (MIN) 400 g/Kg, Extrato Etéreo (MIN) 75 g/Kg, Matéria Mineral (MAX) 130g/Kg, Matéria Fibrosa (MAX) 50g/Kg), até a saciedade duas vezes ao dia.

Para a realização do experimento, foi utilizada vacina comercial para *Streptococcus* sp., administrada aos animais seguindo a metodologia recomendada pela empresa. Os peixes com pelo menos 15 gramas foram vacinados com 0,05 mL por peixe, na cavidade celomática entre as nadadeiras ventrais e foram mantidos por 21 dias para o desenvolvimento da imunidade.

Para a realização do experimento foram utilizados exemplares de tilápia (*O. niloticus*) com peso entre 25 e 50 gramas. Os animais foram distribuídos em 18

mesocosmos de 400 litros em cinco grupos em delineamento inteiramente casualizado (DIC), sendo estes: i) vacinado infectado com *Aeromonas hydrophila* (VIA); ii) vacinado infectado com *Streptococcus agalactiae* (VIS); iii) não vacinado infectado com *Aeromonas hydrophila* (NVIA); iv) não vacinado infectado com *Streptococcus agalactiae* (NVIS) e v) não vacinado não infectado (NVNI). Cada grupo com três réplicas com 20 peixes cada, totalizando 60 animais por grupo.

Os critérios de inclusão dos peixes para o experimento foram: peixes com aparência saudável e se alimentando normalmente, dentro da faixa de peso desejada e que não foram submetidos a tratamentos e/ou profilaxias com antibióticos ou qualquer tipo de medicamento.

Previamente foi realizado um ensaio para verificar a DL50 das cepas das bactérias *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae* que foram utilizadas posteriormente nas induções das infecções realizadas 60 e 90 dias respectivamente após a vacinação.

#### **4.2. Indução de infecção**

A indução da infecção foi realizada em períodos diferentes para cada bactéria, sendo após a vacinação, com 60 dias para *Aeromonas hydrophila* e 90 dias para *Streptococcus agalactiae*, com as respectivas concentrações de DL50.

Para tanto, os grupos VI e NVI foram inoculados com 1,0 mL de um concentrado de  $2 \cdot 10^{11}$  UFC de *Aeromonas hydrophila* e de  $1 \cdot 10^8$  UFC de *Streptococcus agalactiae*, sendo 0,5 mL intracelomático e 0,5 mL intramuscular e subcutâneo.

As bactérias foram multiplicadas em meio de enriquecimento específico caldo soja triptona (TSB) para *Aeromonas hydrophila* e BHI para o *Streptococcus agalactiae*. Após a centrifugação das culturas, o sobrenadante foi descartado e o pellet diluído em solução salina a 0,85% para ser inoculado. Após este procedimento as culturas foram diluídas de forma seriada em solução salina até dez vezes então foi adicionado 0,1 mL da última diluição em placa de ágar vermelho de fenol-amido-ampicilina para a *Aeromonas hydrophila* e em ágar sangue para o *Streptococcus agalactiae* permitindo, desta maneira, fazer a contagem e conversão do número de UFC por mililitro de inóculo. O grupo VNI foi inoculado com solução

salina a 0,85% da mesma forma. Este processo foi realizado no Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da FCAV/Unesp, Campus de Jaboticabal.

Para a indução de infecção, os mesocosmos foram mantidos com renovação de água e os peixes foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial à vontade.

Os sinais clínicos macroscópicos (corrosão de nadadeiras, lesões superficiais e hemorragias locais como petéquias, exoftalmia e distensão da cavidade celomática e a mortalidade) e a ocorrência de mortalidade foram avaliados duas vezes ao dia.

Após sete dias da inoculação foram coletados, de forma asséptica, fígado, rim, baço e cérebro dos peixes. Cada amostra foi transferida para meio de enriquecimento para a realização das provas bioquímicas e confirmação da presença das bactérias *Aeromonas* sp. e *Streptococcus* sp.

#### **4.3. Reisolamento de *Aeromonas* sp.**

As amostras de fígado, rim, baço e cérebro dos peixes foram incubadas em caldo soja triptona (TSB) e incubadas por 24 horas a 28 °C.

Das culturas obtidas foram repicadas em ágar vermelho de fenol-amido-ampicilina e selecionadas as colônias sugestivas de *Aeromonas* sp. As colônias amareladas, com halo transparente devido à hidrólise do amido, foram selecionadas para as etapas seguintes.

Das colônias características, foram realizados esfregaços que foram corados pela técnica de Gram; e as culturas que apresentarem bastonetes retos e curtos, aos pares, isolados ou em cadeias curtas e Gram negativas, foram repicadas em ágar tríplice-açúcar-ferro (TSI) (SAAD et al., 1995). Após incubação a 28 °C por 24 horas, as culturas que apresentaram reação ácida, tanto na base como no bisel, com coloração amarelada e com ou sem formação de gás foram novamente repicadas em ágar tripticase-soja (TSA).

Em seguida, foram submetidas às provas de motilidade e oxidase seguindo esquema de caracterização adotado por POPOFF (1984). Para a prova de motilidade as culturas de bactérias foram inoculadas em tubos contendo ágar semi-sólido e

incubados a 28 °C por 24 horas e, as que apresentaram crescimento em toda a extensão do tubo foram consideradas positivas (MAC FADDIN, 1976).

Para a realização da prova da oxidase foram realizados esfregaços das culturas de bactérias, com a utilização de alça de platina, em fitas para prova da oxidase adquiridas prontas para uso. Foram consideradas positivas as culturas cujos esfregaços tornaram-se de coloração púrpura em alguns segundos.

Os cultivos que apresentaram as características de motilidade e oxidase positiva foram considerados como de *Aeromonas* sp.

#### **4.4. Reisolamento de *Streptococcus* sp.**

Foram coletados de forma asséptica fragmentos de rins, fígado, baço e cérebro, que foram semeados em ágar sangue, seguindo-se a incubação a 27 °C por 24 a 48 horas. As colônias obtidas foram caracterizadas presuntivamente pelos testes de Gram, catalase, oxidase e crescimento em ágar Mac Conkey.

#### **4.5. Variáveis Hematológicas e Bioquímicas do Sangue**

As análises hematológicas e bioquímicas do sangue foram realizadas no sétimo dia após a infecção, para avaliar as alterações provocadas pelos patógenos sendo realizada com os animais do controle e dos tratamentos.

Para tanto, sete peixes de cada tratamento foram amostrados com auxílio de uma seringa de 3,0 mL com agulha (25 mm x 0,6 mm) heparinizada coletando-se cerca de 1,0 ml de sangue por meio de venopunção caudal.

As análises hematológicas e bioquímicas do sangue foram realizadas no momento da coleta, para verificar as possíveis alterações em cada tratamento.

Foi determinado o número de eritrócitos (Er), contados em câmara de Neubauer utilizando-se salina (0,7%) como diluente, hematócrito (Ht), pela técnica de microhematócrito, segundo Goldenfarb et al. (1971), taxa de hemoglobina (Hb) pelo método de cianometahemoglobina e leitura em espectrofotômetro, segundo Collier (1944) e calculados os índices hematimétricos VCM (volume corpuscular médio), HCM (hemoglobina corpuscular média) e CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média), segundo Wintrobe (1934).

Foram confeccionadas lâminas de extensão sanguínea que, após a coloração pelo método de ROSENFELD (1947), foram utilizadas para a contagem diferencial e total de leucócitos (Lc) e contagem total de trombócitos (Tr), pelo método indireto segundo a metodologia recomendada por Hruby e Smith (1998).

A análise bioquímica de proteínas totais foi realizada por refratômetro.

A leitura de glicose e lactato foi realizada pela leitura em Lactímetro YSI 2300 no Laboratório de Farmacologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UNESP de Jaboticabal (SP).

Os testes bioquímicos: colesterol, albumina, uréia e triglicerídeos foram realizados na Universidade Camilo Castelo Branco – Descalvado.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

No presente estudo não ocorreu mortalidade, isso pode ter ocorrido devido à baixa densidade dos peixes nos mesocosmos e da falta de outros estímulos estressores.

### **5.1. Série Branca**

Para o número de leucócitos totais, na contagem absoluta, ocorreu diferença significativa entre os três grupos avaliados. O grupo Infectado *Aeromonas hydrophila* (IA) apresentou um aumento significativo do número médio de leucócitos em relação ao grupo não Infectado (Controle). O grupo Infectado *Streptococcus agalactiae* (IS) apresentou o menor valor médio de leucócitos, também diferindo significativamente do grupo controle (Tabela 1).

**Tabela 1.** Média  $\pm$  desvio padrão da contagem absoluta de Leucócitos de tilápia (*O. niloticus*).

Tratamentos	Leucócitos ( $\mu\text{L}$ )					
	Leucócitos totais	Trombócitos totais	Monócitos	Linfócitos	Eosinófilos	Neutrófilos
Controle	17635 $\pm$ 9286	27186 $\pm$ 11917	176 $\pm$ 121	9793 $\pm$ 2549	31 $\pm$ 63	282 $\pm$ 214
<i>A. hydrophila</i>	37485 $\pm$ 8067	9015 $\pm$ 3581	164 $\pm$ 226	9187 $\pm$ 8125	16 $\pm$ 39	360 $\pm$ 383
<i>S. agalactiae</i>	8547 $\pm$ 3282	28248 $\pm$ 6083	68 $\pm$ 79	7972 $\pm$ 3120	34 $\pm$ 46	357 $\pm$ 252
<i>A. hydrophila</i> + Vacina	28206 $\pm$ 7449	18492 $\pm$ 5996	78 $\pm$ 83	6526 $\pm$ 3381	77 $\pm$ 102	258 $\pm$ 22
<i>S. agalactiae</i> + Vacina	7872 $\pm$ 3169	23213 $\pm$ 4999	33 $\pm$ 43	7449 $\pm$ 3068	51 $\pm$ 73	181 $\pm$ 144
Vacina	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Infecção	**	**	*	NS	NS	NS
Vacina X Infecção	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Valor de F	14,55	5,85	2,04	0,88	0,69	0,52
CV	40,89	35,6	101,57	46,5	170,75	84,76

CV = Coeficiente de variação; NS = não significativo; \* = significativo ( $P < 0,05$ ); \*\* = Significativo ( $P < 0,001$ ).

**Tabela 2.** Média  $\pm$  desvio padrão da contagem relativa Leucócitos de tilápia (*O. niloticus*).

Tratamentos <sup>1</sup>	Contagem relativa de leucócitos (%)			
	Monócitos	Linfócitos	Eosinófilos	Neutrófilos
Controle	1,56 $\pm$ 0,88	91,33 $\pm$ 2,83	0,22 $\pm$ 0,44	2,67 $\pm$ 2,00
<i>A. hydrophila</i>	1,83 $\pm$ 2,32	91,83 $\pm$ 3,76	0,17 $\pm$ 0,41	3,67 $\pm$ 3,33
<i>S. agalactiae</i>	0,86 $\pm$ 0,90	93,00 $\pm$ 2,94	0,57 $\pm$ 0,79	4,00 $\pm$ 2,00
<i>A. hydrophila</i> + Vacinado	1,00 $\pm$ 1,00	90,57 $\pm$ 3,60	1,00 $\pm$ 1,41	3,71 $\pm$ 2,21
<i>S. agalactiae</i> + Vacinado	0,71 $\pm$ 1,11	94,43 $\pm$ 2,15	0,57 $\pm$ 0,79	2,29 $\pm$ 1,98
Vacina	NS	NS	NS	NS
Infecção	NS	*	NS	NS
Vacina X Infecção	NS	NS	NS	NS
Valor de F	0,98	1,55	1,25	0,73
CV	95,91	3,28	174,18	72,09

CV = Coeficiente de variação; NS = não significativo; \* = significativo (P<0,05); \*\* = Significativo (P<0,001).

Na análise do desdobramento estatístico, o grupo não vacinado infectado *Aeromonas hydrophila* (NVIA) apresentou maior número médio de leucócitos, diferindo significativamente de todos os outros grupos (Tabela 1), o grupo Vacinado Infectado *Aeromonas hydrophila* (VIA) apresentou a segunda maior média diferindo de todos os outros grupos, o grupo Não Vacinado Não Infectado (Controle) apresentou a terceira maior média, os grupos Não Vacinado Infectado *Streptococcus agalactiae* (NVIS) e Vacinado Infectado *Streptococcus agalactiae* (VIS) tiveram as menores médias de leucócitos e não diferiram entre si, porém diferiram do restante dos grupos (Tabela 1).

Os leucócitos desempenham um papel importante na resposta imune dos peixes durante o processo inflamatório. O aumento no número de leucócitos pós-desafio em juvenis de *Labeo rohita* indica um possível aumento da resposta inflamatória mediada por leucócitos contra a infecção bacteriana por *Aeromonas hydrophila*. (Chun-Yao Chen et al., 2004). Este padrão de resposta também ocorreu no presente estudo ocorrendo um maior número médio de leucócitos no tratamento NVIA.

Para Kollner et al. (2002), a ocorrência de microrganismos, ativa o sistema imune iniciando a proliferação de leucócitos e trombócitos. Estas últimas também envolvidas na defesa do organismo (JORGENSEN et al., 1993; HILL; ROWLEY 1996; BOZZO et al., 2007). No presente estudo as principais proliferações de leucócitos ocorreram nos tratamentos NVIA e VIA (Tabela 1).

Para Harikrishnan et al (2003) em carpas (*Cyprinus carpio*) infectado com *A. hydrophila*, o número de leucócitos aumentou até 30 dias após a infecção. No presente estudo os peixes NVIA apresentaram altos valores de leucócitos em relação ao Controle após sete dias da infecção (Tabela 1).

Para Bailone et al. (2010) também ocorreu um aumento do número do total de leucócitos em peixes vacinados em relação a outros tratamentos ou após desafio. No presente experimento nos tratamentos desafiados com *Aeromonas hydrophila* também ocorreram este comportamento tanto para os vacinados quanto para os não vacinados, porém para os tratamentos desafiados com *Streptococcus agalactiae* ocorreu uma diminuição dos leucócitos (Tabela 1).

A capacidade de alguns isolados de *Streptococcus iniae* de sobreviver dentro de fagócitos e de promover a apoptose de células infectadas é considerada uma vantagem para o estabelecimento da doença, uma vez que, provoca a morte destas células, sem a liberação de componentes celulares, reduzindo ou suprimindo a inflamação além de conferir uma vantagem na instalação de uma meningite (Zlotkin et al., 2003).

Além da capacidade de evadir a resposta imune, o que confere uma vantagem para a manutenção de uma bacteremia. Para entrar no sistema nervoso central (SNC) a partir da corrente sanguínea, bactérias livres podem fazer o seu caminho através da barreira hematoencefálica ou em associação com monócitos ou fagócitos (Zlotkin et al., 2003).

Como citado anteriormente o *S. iniae* e *S. agalactiae* possuem características fenotípicas e genotípicas semelhantes e apesar de ainda não ter sido estudado se o mesmo ocorre com o *S. agalactiae* essa é uma hipótese para explicar a diminuição no número de leucócitos observada neste estudo.

Para os monócitos na análise dos grupos ocorreu diminuição significativa do grupo IS em relação ao controle (Tabela 1).

Os monócitos têm uma atividade fagocítica, de modo a migrar para a região inflamatória como uma resposta de defesa (GRIFFIN 1984, MARTINS et al 2009a). O presente trabalho apresenta resultado semelhante ao exibir uma diminuição significativa do número de monócitos no grupo IS em relação ao controle (Tabela 1).

Além disso, os monócitos produzem citocinas e são células primárias na apresentação do antígeno em teleósteos (VALLEJO et al., 1992). Porém como citado acima os *Streptococcus* sp. podem causar uma destruição destas células o que pode justificar a diminuição destes nos peixes infectados.

Para o número médio de trombócitos ocorreu uma diminuição significativa no tratamento IA. O Controle e o IS não diferiram entre si e também não exibiram diminuição nos valores médios destas células (Tabela 1).

Na análise do desdobramento o número total de trombócitos dos grupos Controle, NVIS e VIS apresentam os maiores valores destas células e não diferiram significativamente entre si e apresentaram diferença significativa em relação aos demais grupos avaliados (Tabela 1).

O menor valor para trombócitos ocorreu no grupo NVIA que diferiu do restante dos tratamentos (Tabela 1).

Para Bailone et al. (2010), a vacina em tilápias e desafio com *A. hydrophila* promoveu aumento no número de trombócitos, sendo esta uma característica em tilápias vacinadas em relação as não vacinadas. Este padrão de resposta também foi encontrado no presente estudo, com maior número médio de trombócitos no tratamento VIA em comparação com o NVIA (Tabela 1). No entanto o número de trombócitos dos tratamentos NVIA, VNI e VIA foram significativamente menores do que o Controle (Tabela 1).

Um resultado semelhante foi observado por Matushima e Mariano (1996) em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e por Martins et al., 2006 e Bozzo et al., 2007 em pacu (*P. mesopotamicus*), em que 50-70% de as células presentes no local da lesão foram trombócitos. Comprovando assim a migração destas células para o local da lesão, diminuindo sua quantidade no sangue circulante.

Na contagem relativa dos leucócitos ocorreu aumento significativo apenas no número de linfócitos no grupo IS em relação ao controle (Tabela 2). Na análise do

desdobramento os tratamento NVIS e VIS apresentaram diferença no número de linfócitos porém não de forma significativa (Tabela 2).

A porcentagem de linfócitos circulantes em relação à infecção por *S. agalactiae*, neste estudo, seguiu o padrão sugerido por Clauss et al. (2008) o qual infere que a linfocitose em peixes pode sugerir um estímulo imune. Isto é comprovado pelo aumento no número destas células em tilápia do Nilo após vacinação polivalente, conforme observado por Bailone et al. (2010). Estes autores verificaram que 48 horas após o desafio o número de linfócitos em peixes vacinados se manteve maior do que os peixes não vacinados. O aumento de linfócitos em peixes vacinados também é notado neste estudo, porém não de forma significativa (Tabela 2).

## 5.2. Série Vermelha

**Tabela 3.** Média  $\pm$  desvio padrão da série vermelha de tilápia (*O. niloticus*).

Tratamentos	Eritrócitos ( $10^6/\mu\text{L}$ )	Hematócrito (%)	VCM (fL)	Hemoglobina (g/dL)	CHCM (g/dL)
Controle	1,69 $\pm$ 0,24	28 $\pm$ 2,53	170 $\pm$ 33	8,57 $\pm$ 0,73	31 $\pm$ 4,39
<i>A. hydrophila</i>	1,62 $\pm$ 0,24	27 $\pm$ 2,38	167 $\pm$ 21	7,51 $\pm$ 0,78	27 $\pm$ 1,30
<i>S. agalactiae</i>	1,71 $\pm$ 0,24	19 $\pm$ 2,27	113 $\pm$ 15	8,65 $\pm$ 1,05	45 $\pm$ 3,43
<i>A. hydrophila</i> + Vacinado	1,75 $\pm$ 0,20	29 $\pm$ 0,98	171 $\pm$ 22	7,99 $\pm$ 0,43	27 $\pm$ 0,93
<i>S. agalactiae</i> + Vacinado	1,78 $\pm$ 0,32	19 $\pm$ 3,31	106 $\pm$ 27	9,72 $\pm$ 2,77	53 $\pm$ 21,42
Vacina	NS	NS	NS	NS	NS
Infecção	NS	**	**	*	**
Vacina X Infecção	NS	NS	NS	NS	NS
Valor de F	0,34	26,77	8,54	2,35	9,88
CV <sup>2</sup>	14,51	9,62	17,73	15,1	25,39

<sup>2</sup> CV = Coeficiente de variação; NS = não significativo; \* = significativo (P<0,05); \*\* = Significativo (P<0,001).

Para o hematócrito ocorreu diferença significativa entre o IS e os demais grupos (Tabela 3). O IA apresentou o maior número de hematócrito, seguido pelo controle, porém não ocorreu diferença significativa entre estes dois grupos,

enquanto o IS apresentou o menor valor médio de hematócrito, diferindo significativamente dos demais grupos (Tabela 3).

Para o VCM ocorreu diferença significativa entre o IS e os demais grupos. O Controle apresentou o maior número de VCM, seguido pelo grupo IA, porém não ocorreu diferença significativa entre estes dois grupos (Tabela 3). O IS apresentou o menor valor médio de VCM, diferindo significativamente dos demais grupos (Tabela 3).

Para o CHCM ocorreu diferença significativa entre o IS e os demais grupos. O IS apresentou o maior número de CHCM, seguido pelos grupos NI e IA, porém não ocorreu diferença significativa entre estes dois grupos (Tabela 3).

A diminuição do hematócrito ocorreu em co-infecção por *Aeromonas* e *Streptococcus* em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (Barham et al., 1980). No presente estudo o IS também exibiu uma diminuição no hematócrito em relação aos demais grupos (Tabela 3).

Os processos anemiantes são atribuídos a distúrbios na produção de eritrócitos ou perda dessas células por hemólise (JAIN, 1986). Diversos autores (YOSHINAGA et al., 1996; RANZANI-PAIVA et al., 2000; TAVARES-DIAS et al., 2002) relacionam a anemia normocítica-hipocrômica às infecções por patógenos e parasitos.

O fígado, baço e o rim de tilápia (*O. niloticus*) doente após infecção grave, sugerem que a hematopoiese foi afetada, diminuindo volume eritrocitário em tilápia (*O. niloticus*) (ISHIKAWA, 1998). No presente estudo o grupo IS apresentou uma redução significativa do VCM em relação aos demais grupos não diferindo entre os peixes vacinados e não vacinados quando infectados com *Streptococcus agalactiae* (Tabela 3).

A redução da concentração hemoglobina foi relatada em ciclídeos (*Etroplus suratensis*) infectado pela síndrome epizoótica ulcerativa (PATHIRATN e RAJAPAKSHE, 1998). No presente estudo ao contrário do citado por estes autores, ocorreu um aumento significativo dos valores de CHCM dos peixes IS sendo eles vacinados ou não vacinados e os valores dos tratamentos IA permaneceram semelhantes aos do controle (Tabela 3).

Os parâmetros sanguíneos de peixes teleósteos podem ser afetados pelo estresse agudo e/ou crônico, como revisado por Barton e Iwama (1991) e Bonga Wendelaar (1997). A este respeito, os parâmetros de RBC de jundiá não foram alterados após estresse agudo, mas no estresse crônico por adensamento durante 10 dias ocorreu alteração deste parâmetro. Os aumentos de duas vezes no RBC pode ter ocorrido pela libertação a partir do conjunto de armazenamento no baço (Vijayan, Leatherland, 1989; Pulsford et al., 1994).

Barcellos et al. (2004) encontraram além da contagem de RBC aumentada, hematócrito diminuiu significativamente após manutenção de peixes adensados por 10 dias.

No presente estudo ocorreu diminuição do hematócrito, diminuição do VCM e aumento do CHCM (Tabela 3), mas não ocorreu diminuição do número de eritrócitos descartando assim a hipótese de anemia, porém a infecção causou uma diminuição no volume dos eritrócitos provavelmente por um desequilíbrio hidroeletrólítico.

A análise dos desdobramentos não indicou nenhuma diferença significativa entre os tratamentos além dos já expressos (Tabela 3).

### 5.3. Variáveis Bioquímicas

**Tabela 4.** Média  $\pm$  desvio padrão das variáveis bioquímicas de tilápia (*O. niloticus*).

Tratamentos <sup>1</sup>	Testes Bioquímicos			
	PPT	Colesterol	Albumina	Pt/Alb
Controle	2,29 $\pm$ 0,47	202,30 $\pm$ 60,78	0,37 $\pm$ 0,30	1,91 $\pm$ 0,72
<i>A. hydrophila</i>	2,74 $\pm$ 0,40	169,43 $\pm$ 33,20	0,26 $\pm$ 0,15	2,40 $\pm$ 0,24
<i>S. agalactiae</i>	2,46 $\pm$ 0,36	245,00 $\pm$ 84,88	0,17 $\pm$ 0,07	2,29 $\pm$ 0,39
<i>A. hydrophila</i> + Vacinado	2,70 $\pm$ 0,42	170,71 $\pm$ 37,87	0,19 $\pm$ 0,06	2,51 $\pm$ 0,45
<i>S. agalactiae</i> + Vacinado	2,46 $\pm$ 0,17	260,57 $\pm$ 145,80	0,24 $\pm$ 0,11	2,21 $\pm$ 0,23
Vacina	NS	NS	NS	NS
Infecção	*	*	*	*
Vacina X Infecção	NS	NS	NS	NS
Valor de F	1,64	1,65	1,44	1,69
CV <sup>2</sup>	16,15	37,34	75,59	24,02

<sup>2</sup> CV = Coeficiente de variação; NS = não significativo; \* = significativo (P<0,05); \*\* = Significativo (P<0,001).

Para o PPT ocorreu diferença significativa entre IA e o controle, mas não diferiu de IS (Tabela 4). O IA apresentou o maior valor de PPT, seguido pelo IS, enquanto que, o controle exibiu o menor valor médio de PPT diferindo significativamente do IA e não apresentou diferença significativa em relação ao IS (Tabela 4).

Na análise dos desdobramentos o tratamento controle apresentou o menor valor médio de PPT, diferindo significativamente dos tratamentos NVIA e VIA que exibiram os maiores valores de PPT e não exibiram diferença significativa entre si, com relação aos outros tratamentos não ocorreram diferenças significativas (Tabela 4).

Na relação proteína total/albumina (diferença significa quantidade de globulina), ocorreu diferença significativa para o grupo IA em relação ao controle, na comparação do grupo IS com o controle ocorreu um aumento porém não significativo (Tabela 4).

Os níveis de PPT no plasma podem ser modificados poucas horas após o início da reação inflamatória por vários dias, dependendo da intensidade do estímulo (WHITE et al., 1981; QUINTANA, 2002). O aumento do estresse e inflamação causa um aumento na produção de globulinas, alterando a concentração de proteína plasmática total (THOMAS, 2000). O aumento das globulinas no soro possui grande importância para o mecanismo de defesa, com conseqüente redução da proporção albumina-globulina (SAHOO, MUKHERJEE, 2001).

Resultados da literatura demonstram que peixes acometidos tanto por bactérias como por parasitos apresentaram redução nos níveis de proteínas do sangue (BOON et al., 1990). Porém no presente estudo ocorreu um aumento nos níveis de proteína plasmática no grupo IA, corroborando com Post (1966) que relatou aumentos na proteína total em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) infectadas com *Aeromonas*. Enquanto que uma co-infecção por *Aeromonas* e *Streptococcus* na mesma espécie resultou em diminuição da proteína total (Barham et al., 1980).

Os resultados do presente trabalho sugerem que o aumento na concentração de PPT seria uma resposta das proteínas de fase aguda própria do fenômeno inflamatório em peixes teleósteos, conforme descrito por (TAVARES-DIAS, MORAES, 2004). Além disso, poderia estar relacionado com o aumento de atividade

de linfócitos, em resposta à administração da vacina, que pode aumentar a resposta proliferativa desta célula (SIWICKI et al., 1994).

**Tabela 5.** Média  $\pm$  desvio padrão das variáveis bioquímicas de tilápia (*O. niloticus*).

Tratamentos <sup>1</sup>	Testes Bioquímicos			
	Uréia	Triglicérides	Lactato	Glicose
Controle	4,89 $\pm$ 2,15	138 $\pm$ 56	0,95 $\pm$ 0,45	2,03 $\pm$ 0,66
<i>A. hydrophila</i>	1,67 $\pm$ 1,37	99 $\pm$ 46	1,13 $\pm$ 0,45	1,82 $\pm$ 0,29
<i>S. agalactiae</i>	3,14 $\pm$ 3,18	135 $\pm$ 92	0,57 $\pm$ 0,36	2,03 $\pm$ 0,53
<i>A. hydrophila</i> + Vacinado	4,00 $\pm$ 5,54	141 $\pm$ 92	1,29 $\pm$ 0,39	1,70 $\pm$ 0,45
<i>S. agalactiae</i> + Vacinado	7,50 $\pm$ 8,41	170 $\pm$ 93	0,55 $\pm$ 0,29	1,71 $\pm$ 0,54
Vacina	NS	NS	NS	NS
Infecção	NS	NS	**	NS
Vacina X Infecção	NS	NS	NS	NS
Valor de F	1,33	0,56	3,57	0,65
CV <sup>2</sup>	96,54	53,87	45,06	29,3

<sup>2</sup> CV = Coeficiente de variação; NS = não significativo; \* = significativo (P<0,05); \*\* = Significativo (P<0,001).

Para o lactato ocorreu diminuição significativa grupo IS em relação ao controle e o grupo IA apresentou aumento do lactato em relação ao controle, porém não foi significativo (Tabela 5).

O lactato apresentou diferença significativa ao longo do tempo de amostragem em pirarucu (*Arapaima gigas*) quando comparados ao controle. Ocorreu uma diminuição do lactato ao longo das amostragens, sendo notória a diminuição do ritmo natação dos peixes, indicando uma resposta terciária de estresse, com a mudança do comportamento dos animais (BRANDÃO, GOMES, CHAGAS, 2006). Isso sustenta o resultado obtido com tilápias no presente estudo.

## 6. HISTOPATOLOGIA

### 6.1. Histopatologia da Pele e do Tecido Muscular

No grupo controle os peixes apresentaram a pele composta por duas camadas: a epiderme e a derme. A epiderme revestida por um epitélio pavimentoso simples composto basicamente por células de revestimento, células mucosas e cromatóforos. Abaixo da epiderme localiza-se a derme composta basicamente por tecido conjuntivo frouxo levemente modelado (Figura 1A) similar ao descrito para o pacu, *Piaractus mesopotamicus* (CARRASCHI et al., 2012). Abaixo da pele ocorre uma camada de tecido muscular estriado com as fibras apresentando orientação longitudinal no sentido crânio-caudal.

No grupo vacinado infectado *A. hydrophila*, a pele apresentou características similares ao controle, porém neste grupo ocorreram rupturas dos feixes de tecido muscular. No grupo não vacinado infectado *A. hydrophila* ocorreu aumento no número de cromatóforos e rupturas dos feixes da camada muscular (Figura 1B). A ruptura de feixes de tecido muscular também ocorreu em paulistinha (*Danio rerio*) após a injeção celomática da bactéria *S. iniae* na concentração de  $10^3$  UFC (MILLER e NEELY, 2004); e em pacu infectado com *A. hydrophila* na concentração de  $2,4 \times 10^7$  bacteria.mL<sup>-1</sup> (CARRASCHI et al., 2012).

O aumento no número de cromatóforos também ocorreu em embrião de *D. rerio* infectado com *Edwardsiella tarda* na concentração de  $10^8$  UFC (PRESSLEY et al., 2005) e em infecção com *A. hydrophila* e tratados com os antibióticos oxitetraciclina (110.0,140.0,170.0 mg kg<sup>-1</sup>) e florfenicol (5,0 mg.kg<sup>-1</sup>) (CARRASCHI et al., 2012).

De uma forma geral o gênero *Aeromonas* possui alguns fatores que definem a virulência como hemolisinas, proteases e lípases (BEAZ-HIDALGO e FIGUERAS, 2013), estas características podem definir os possíveis efeitos teciduais dos peixes do grupo infectado não vacinado.

Para DAS et al. (2011) a presença de  $2,24 \times 10^7$  UFC de *A. hydrophila* injetada na cavidade intra celomática causou necrose das fibras do tecido muscular de *Pintius sarana*, diferindo dos resultados obtidos em tilápia. Esta diferença pode ser

atribuída, a concentração de bactérias utilizadas ou ao tempo de coleta após a infecção, pois estes autores realizaram a coleta 14 dias após a infecção, enquanto que, para o estudo com a tilápia a coleta foi realizada 7 dias após a infecção.

Os sinais clínicos das tilápias infectados com *A. hydrophila* na determinação da DL50 foram escurecimento, corrosão de nadadeiras e hemorragias cutâneas e alguns peixes tiveram morte súbita, sem apresentar sinais clínicos. Na necropsia apresentaram congestão de brânquias, fígado e rins, além do fígado estar aumentado de volume e com regiões esbranquiçadas.

As tilápias infectadas com *S. agalactiae* na determinação da DL50 apresentaram escurecimento, corrosão de nadadeiras, hemorragia cutânea, aumento do volume da cavidade celomática e, em alguns casos, natação errática. Na necropsia as tilápias apresentaram acúmulo de líquido intra-celomático, aumento da vesícula biliar, regiões do fígado escurecidas, congestão de brânquias e rins.

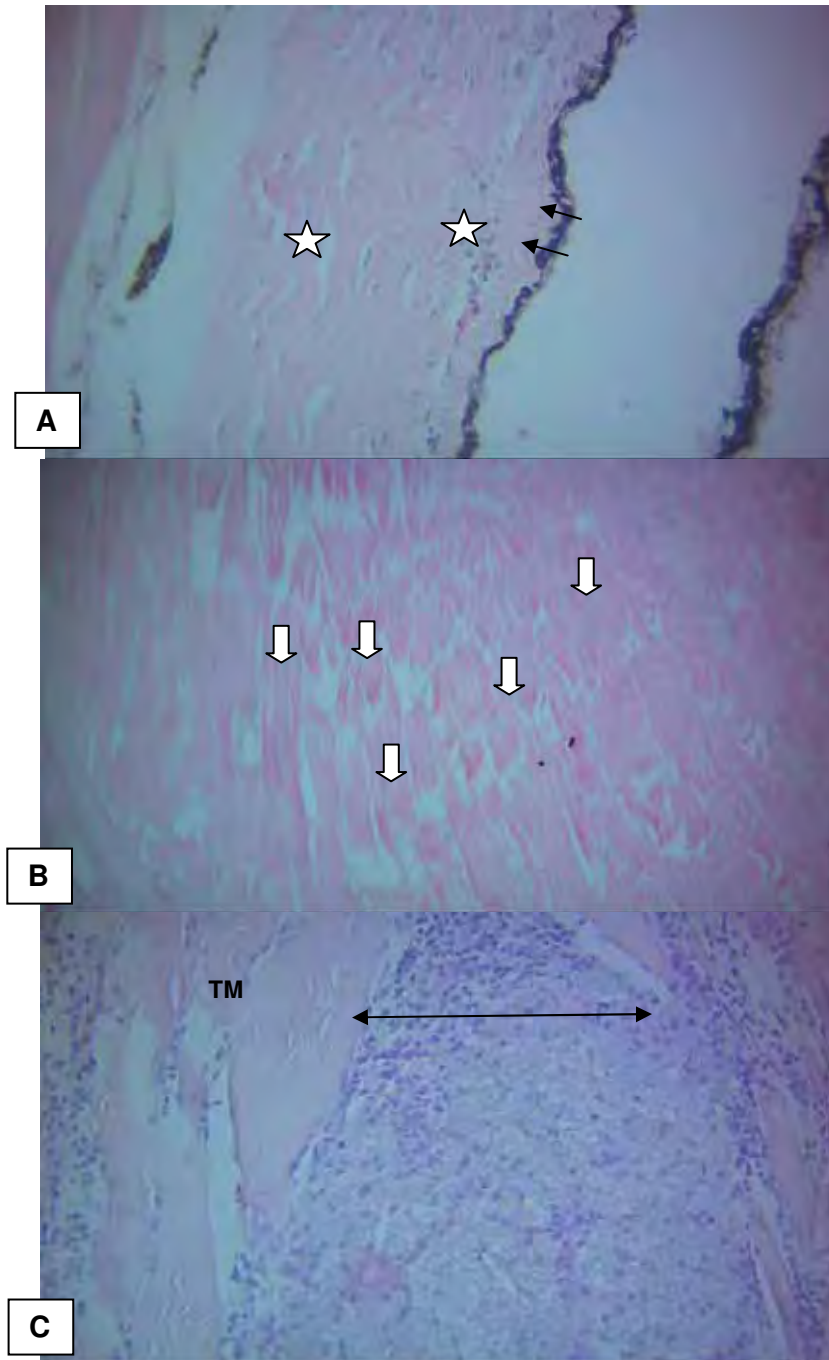
Para Secombes (1996) o escurecimento da derme de peixes doentes está associada ao maior número de células e pigmentos no local, associado ao aumento de melanóforos, na tentativa de regeneração de tecidos danificados.

O escurecimento da derme de peixes pode estar relacionado à determinação da hierarquia social e condição de estresse. Os peixes subordinados apresentam coloração mais escura que os dominantes (BEECHING, 1995) e a situação de enfermidade também pode ser um estímulo estressor.

O grupo não vacinado infectado por *S. agalactiae* apresentou aumento do número de melanóforos e infiltrado de células de defesa no músculo (Figura 1C). O paulistinha (*Danio rerio*), após a injeção celomática da bactéria *S. iniae* na concentração de  $10^3$  UFC, também apresentou infiltrado de células de defesa no tecido muscular (MILLER e NEELY, 2004). Segundo estes autores a presença da bactéria também causou necrose dos miócitos dos feixes musculares, esta alteração não ocorreu na tilápia após a infecção com *S. agalactiae*. A degeneração tecidual muscular também pode ocorrer por infestação de parasitos. O rhabdovirus hemorrágico (VHSV) também causou este tipo de alteração tecidual em *D. rerio* (NOVOA et al., 2006) e o parasito ciliado *Philasterides dicentrarchi* em linguado, *Paralichthys olivaceus* (HARIKRISHNAN et al., 2012).

Para PRESSLEY et al., (2005) também ocorreu infiltrado de células de defesa (linfócitos, monócitos, macrófagos e granulócitos) na cavidade celomática de *D. rerio* após o contato com *E. tarda* na concentração de  $10^5$  UFC por cinco horas.

Na coleta de 7 dias, os grupos controle e vacinado infectado apresentaram características histopatológicas similares ao descrito para a primeira coleta.



**Figura 1.** Fotomicrografia da pele e do tecido muscular de tilápia, HE **Em A)** Grupo controle destaque dos cromatóforos (seta) e camada de tecido conjuntivo (estrela) na epiderme, 400x. **Em B)** Grupo não vacinado infectado *A. hydrophila*, com ruptura feixes musculares (seta cheia) 100x. **Em C)** Grupo não vacinado e infectado por *S. agalactiae*, com a presença de infiltrado de células de defesa (seta dupla) no tecido muscular (TM), 400x.

## 6.2. Histopatologia do Fígado

Histopatologicamente, o parênquima do tecido hepático da tilápia, no controle é composto por hepatócitos, veias centrais, capilares sinusóides e hepatopâncreas exócrino. A partir das veias centrais partem os capilares sinusóides que apresentam um arranjo cordonal com uma pequena desorganização na região terminal de cada capilar. Os hepatócitos apresentam citoplasma claro, levemente arredondado com núcleo levemente deslocado para a periferia da célula e com nucléolo evidente (Figura 2A) similar a descrição histológica para o pacu *P. mesopotamicus* (SOUZA et al., 2001; MATAQUEIRO et al., 2009).

Nos peixes do grupo vacinado infectado com *A. hydrophila*, também ocorreu hipertrofia dos hepatócitos e desarranjo dos capilares sinusóides e em algumas regiões o núcleo está deslocado para a periferia da célula, em algumas regiões ocorre também vacuolização, o restante permanece semelhante ao controle.

O fígado dos peixes do grupo não vacinado infectado *Aeromonas hydrophila* apresentou desarranjo cordonal dos capilares sinusóides, vacuolização citoplasmática, deslocamento do núcleo para a periferia da célula.

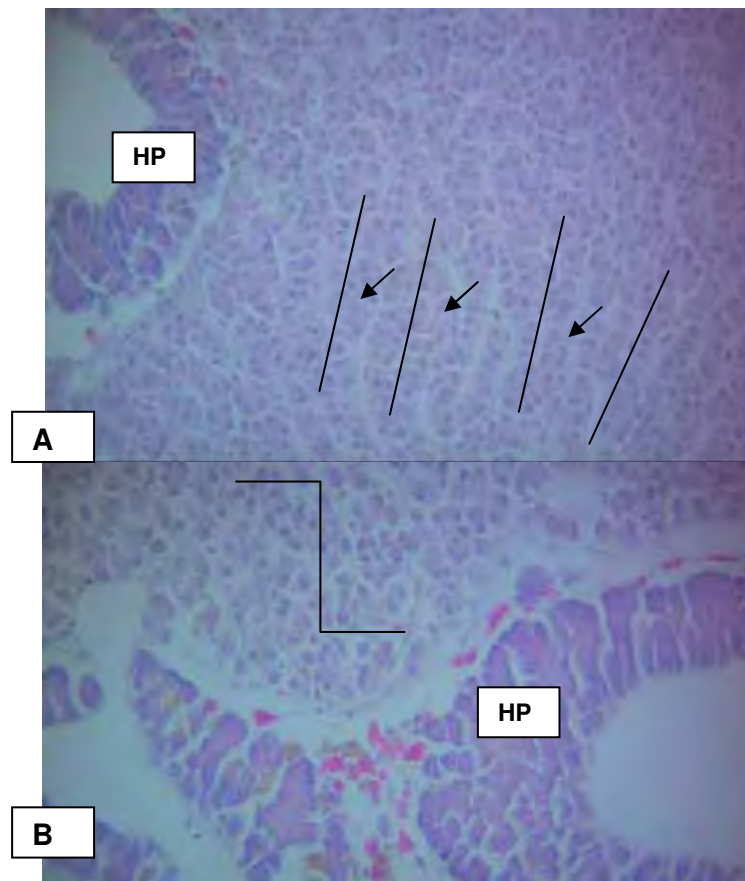
Estas características histofisiológicas podem indicar aumento da maquinaria enzimática do fígado, especialmente do retículo endoplasmático liso e do complexo de golgi responsáveis pelo metabolismo de toxinas da bactéria (SIMONATO et al., 2007; CARRASCHI et al., 2012).

Na segunda coleta (coleta 90 dias após a vacinação e sete dias após a infecção), o grupo controle permaneceu com as mesmas características da primeira coleta.

Para DAS et al. (2011) a presença de *A. hydrophila*, causou no fígado o aumento dos centro melanomacrófagos, especialmente, em peixes moribundos, porém esta alteração tecidual não ocorreu em tilápia.

No grupo vacinado infectado *Streptococcus agalactiae*, ocorreu apenas uma leve hipertrofia dos hepatócitos (Figura 2C) em relação ao controle, enquanto que, no não vacinado infectado por *Streptococcus agalactiae*, ocorreu pequeno desarranjo cordonal dos capilares sinusóides e as demais características foram similares ao controle.

Em exemplares *Lota lota* infectado naturalmente com *Micobacterium salmoniphilum* e em locais poluídos com produtos orgânicos a base de diclorodifenil-tricloroetano (DDT) e bifelina policlorodas (PCB), o fígado também apresentou hipertrofia dos hepatócitos, além de aumento de células inflamatórias no tecido hepático (BERG et al. 2013).



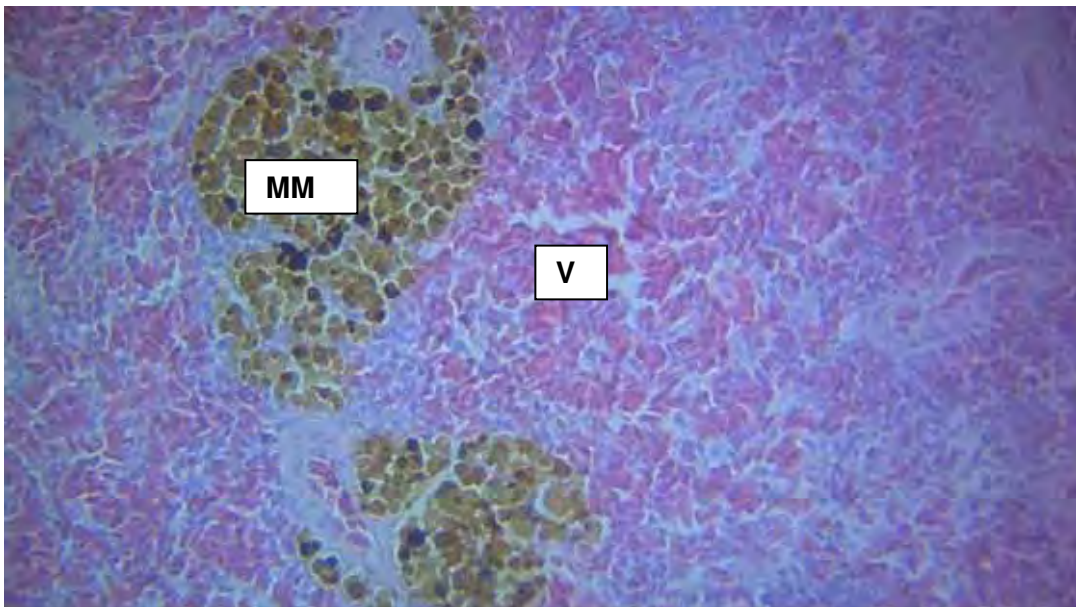
**Figura 2.** Fotomicrografia do fígado de tilápia, HE, 400x. **Em A)** Grupo controle com detalhe para a organização cordonal (traço) dos capilares sinusóides, dos hepatócitos (seta) e do hepatopâncreas(HP). **Em B)** Grupo vacinado e infectado por *S. agalactiae* com desarranjo da organização cordonal dos hepatócitos (conector).

### 6.3. Histopatologia do Baço

O baço em tilápia (*O. niloticus*) do controle apresentou organização similar a trabéculas que se formam na cápsula do tecido e formam uma estrutura septada

dividindo o baço histologicamente em polpa branca (menor porção) e polpa vermelha (predominante). A polpa vermelha por estrutura alongada (similar a septos incompletos) com a presença de grande quantidade de células sanguíneas e os centros de melanomacrófagos. A polpa branca é formada basicamente por vasos sanguíneos e linfócitos. Na polpa vermelha ainda ocorrem os canais sinusóides que contém células de defesa (Figura 3A).

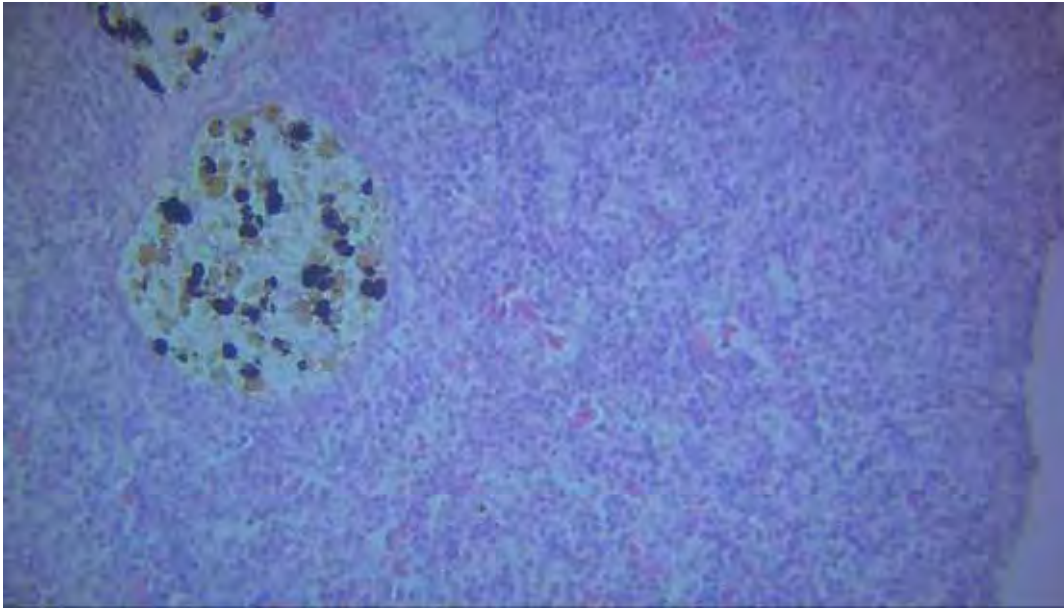
Os tratamentos não vacinado infectado *Aeromonas hydrophila*, grupo vacinado infectado com *A. hydrophila* e vacinado infectado *Streptococcus agalactiae* não exibiram alterações histológicas nos períodos de coleta, durante o experimento, porém os grupos vacinados apresentaram maior número de melanomacrófagos livres no interior do tecido. Para PRESSLEY et al. (2005), em *D. rerio* ocorreu a resposta rápida de macrófagos em diferentes tecidos com o objetivo de fagocitar a bactéria *Edwardsiella tarda*, esta resposta também pode ter ocorrido em tilápias infectadas com *A. hydrophila*.



**Figura 3.** Vista geral do baço de tilápia (*O. niloticus*) do grupo controle com detalhe para o centro melanomacróforo (MM) e a polpa vermelha do tecido (V), HE, 400x.

#### 6.4. Histopatologia do Rim Cefálico

O rim cefálico do controle de tilápia apresenta disperso pelo parênquima centros de melanomacrófagos, melanomacrófagos livres, vasos sanguíneos e células da série branca (Figura 4). Os demais grupos avaliados não exibiram resposta ou alterações histopatológicas.

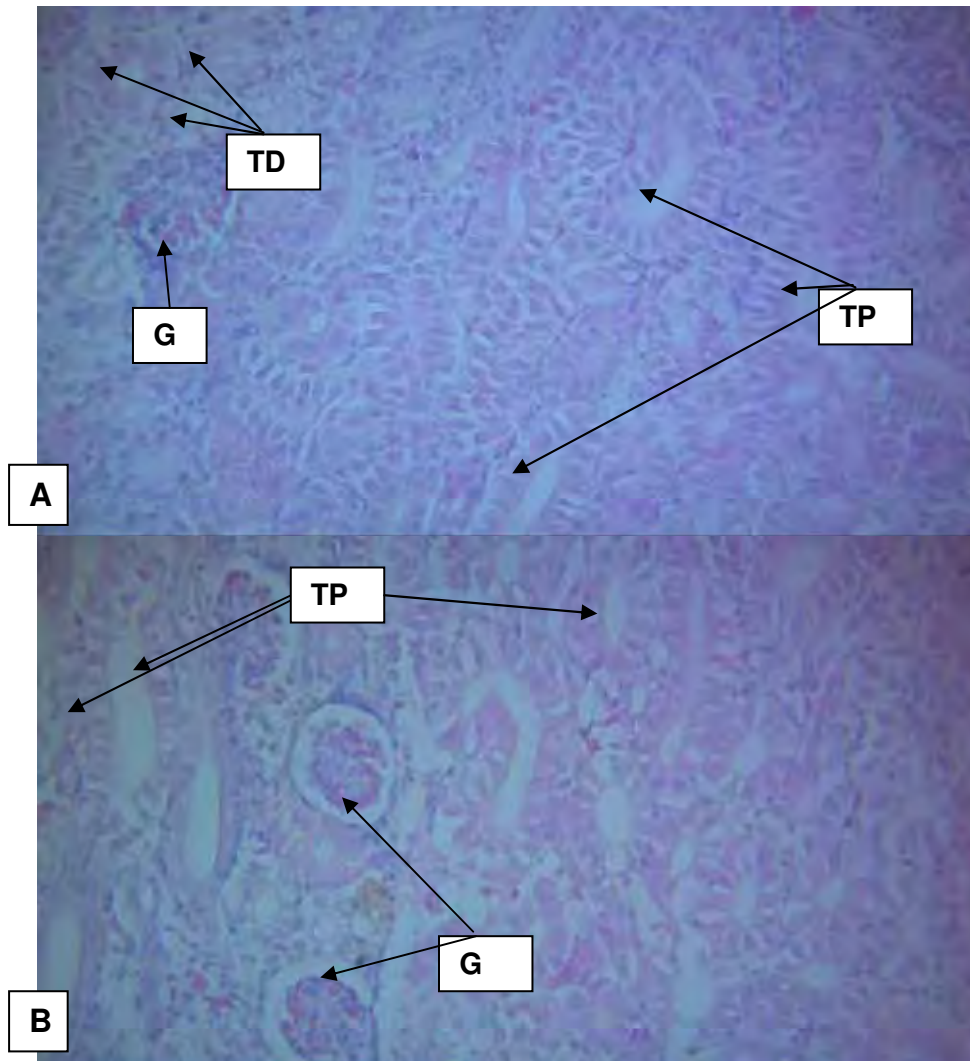


**Figura 4.** Vista geral do rim cefálico de tilápia (*O. niloticus*) do grupo controle com detalhe para o centro melomacrófono (MM) e a polpa vermelha do tecido (V), HE, 400x.

#### 6.5. Histopatologia do Rim Caudal

O rim caudal dos peixes do grupo controle e dos vacinados infectados são formados por glomérulos que são envoltos pela cápsula similar a cápsula de Bowman. No estroma renal ocorre a presença de células hematopoiéticas e linfocitárias. Os túbulos proximais são constituídos por um epitélio cúbico simples, com núcleo variando da posição mediana a basal da célula. As células epiteliais apresentam cílios formando a borda em escova e a luz tubular central é reduzida, os túbulos distais apresentam também epitélio cúbico, porém mais baixo que dos túbulos proximais e núcleos arredondados mais evidentes e basais. Entre as células deste epitélio são mais visíveis os espaços intercelulares laterais (Figura 5A).

O grupo não vacinado infectado *A. hydrophila* as características histológicas foram similares ao controle, porém ocorreu desprendimento dos capilares dos glomérulos da cápsula renal e aumento dos espaços intercelulares laterais do epitélio dos túbulos proximais (Figura 5B).



**Figura 5.** Fotomicrografia do rim caudal de tilápia, HE, 400x. **Em A)** Grupo controle com detalhe para glomérulo (G), túbulos proximais (TP) e túbulos distais (TD). **Em B)** Grupo não vacinado infectado com *A. hydrophila* com desprendimento da glomérulo da cápsula glomerular e aumento dos espaços intercelulares nos túbulos proximais (TP). **Em C)** Grupo vacinado e infectado por *S. agalactiae* com desarranjo da organização cordonal dos hepatócitos (conector).

## 7. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos conclui-se que:

O reisolamento foi realizado com sucesso, comprovando que as bactérias causadoras das alterações pertencem ao gênero *Aeromonas* e *Streptococcus*.

As tilápias infectadas por *S. agalactiae* demonstraram aumento nos parâmetros hematológicos e bioquímicos do CHCM, globulinas e colesterol e a diminuição no hematócrito, VCM e leucócitos. As tilápias infectadas por *A. hydrophila* apresentaram aumento nos parâmetros de leucócitos, justificado pelo aumento das globulinas e a diminuição dos trombócitos e colesterol, além de alterações histopatológicas em pele, fígado e rim das tilápias não vacinadas e infectadas.

A presença da bactéria *A. hydrophila* causou alterações histopatológicas em pele, fígado e rim das tilápias não vacinadas e infectadas. A vacinação melhorou a resposta histofisiológicas dos animais após a infecção com as duas espécies de bactérias avaliadas.

## 8. REFERÊNCIAS

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

ANGKA, S. L.; LAM, T. J.; SIN, Y. M. Some virulence characteristics of *Aeromonas hydrophila* in walking catfish (*Clarias gariepinus*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 130, n. 2-3, p. 103-112, 1995.

AUSTIN, B.; AUSTIN, D. A. **Bacterial fish pathogens**: disease in farmed and wild fish. [Chilchester]: Ellis Horwood Limited, p. 171-173, 1987.

BAILONE, R. L.; MARTINS, M. L.; MOURIÑO, J. L. P.; VIEIRA, F. N.; PEDROTTI, F. S.; NUNES, G. C.; SILVA, B. C. Hematology and agglutination titer after polyvalent immunization and subsequent challenge with *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Archivos de Medicina Veterinaria**, Valdivia, v. 42, n. 3, p. 221-227, 2010.

BARHAM, W. T.; SMIT, G. L.; SCHOONBEE, H. J. The effect of bacterial infection on erythrocyte fragility and sedimentation rate of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. **Journal of Fish Biology**, West Sussex, v. 16, p. 177-180, 1980.

BERG, V.; ZERIHUM, M. A.; JORGERSEN, A.; LIE, E.; DALE, O. B.; SKAARE, J. U.; LYCHE, J. L. High prevalence of infections and pathological changes in burbot (*Lota lota*) from a polluted lake (Lake Mjosa, Norway). **Chemosphere**, Kidlington, v. 90, p. 1711-1718, 2013.

BOON, J. H.; CANNAETS, V. M. H.; AUGUSTIJN, H.; MACHIELS, M. A. M.; CHARLEROY, D.; OLLEVIER, F. The effect of different infection levels with infective Larvae of *Anguillicola crassus* on haematological parameters of European Eel (*Anguilla anguilla*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 87, n. 3, p. 243-253, 1990.

BOZZO, F. R.; MORAES, J. E.; MORAES, F. R.; PEREIRA, G. T.; TAVARES-DIAS, M.; ONAKA, E. M. Kinetics of cellular component in inflammatory response induced by different stimuli in the swim bladder of pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887 (Characidae). **Journal of the World Aquaculture Society**, Hoboken, v. 38, n. 2, p. 302-308, 2007.

BRUNO, D. W.; MUNRO, L. S. Haematological assessment of rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson, and Atlantic salmon, *Salmo salar* L., infected with *Renibacterium salmoninarum*. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 9, n. 1, p. 195-204, 1986.

CARNAHAN, A. M.; BEHRAM, S.; JOSEPH, S. W. Aerokey II: a flexible key for identifying clinical aeromonas species. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 29, p. 2843-2849, 1991.

CARRASCHI, S. P.; CRUZ, C.; MACHADO NETO, J. G.; CASTRO, M. P.; BORTOLUZZI, N. L.; GÍRIO A. C. F.; Eficácia do florfenicol e da oxitetraciclina no controle de *Aeromonas hydrophila* em pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 63, n. 3, p. 579-583, 2011.

CARRASCHI, S. P.; CRUZ, C.; MACHADO NETO, J. G.; IGNÁCIO, N. F.; BARBUIO, R.; MACHADO, M. R. F. Histopathological biomarkers in pacu (*Piaractus mesopotamis*) infected with *Aeromonas hydrophila* and treated with antibiotics. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Maryland Heightsv. 83, p. 115-120, 2012.

CHAKRAVARTI, D. N.; FISKE, M. J.; FLETCHER, L. D.; ZAGURSKY, R. J. Application of genomics and proteomics for identification of bacterial gene products as potential vaccine candidates. **Vaccine**, London, v. 19, p. 601-612, 2001.

CHEN, C. Y.; WOOSTER, G. A.; GETCHELL, R. G.; BOWSER, P. R. Comparative blood chemistry and histopathology of tilapia infected with *Vibrio vulnificus* or *Streptococcus iniae* or exposed to carbon tetrachloride, gentamicin, or copper sulfate. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 239, p. 421-443, 2004.

CHU, W.; ZHUANG, X.; LU, C. Generation of *Aeromonas hydrophila* ghosts and their evaluation as oral vaccine candidates in *Carassius auratus gibelio*. **Wei Sheng Wu Xue Bao**, Beijing, v. 48, p. 202-6, 2008.

CLARK, J. S.; PALLER, B.; SMITH, P. D. Prevention of streptococcosis in tilapia by vaccination: the Philippine experience. In: **INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TILAPIA AQUACULTURE**, [5]., 2000, Rio de Janeiro. Anais... [Arlington: American Tilapia Association], 2000. v. 2, p. 545-551.

CLAUSS, T. M.; DOVE, A. D. M.; ARNOLD, J. E. Hematologic disorders of fish. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, Maryland Heights, v. 11, p. 445-462, 2008.

COLLIER, H. B. The standardization of blood haemoglobin determinations. **Canadian Medical Association Journal**, Ottawa, v. 50, p. 550- 552, 1944.

DALTON, S. S.; CASEIRO, A.; FIRETTI, R.; WAKATSUKI, A. O desenvolvimento recente da aquicultura brasileira. **Anuário da Pecuária Brasileira**, São Paulo, p. 252-256, 2005.

DAS, A.; SAHOO, P. K.; MOHANTY, B. R.; JENA, J. K. Pathophysiology of experimental *Aeromonas hydrophila* infection in *Puntius sarana*; Early changes in blood and aspects of the innate immune-related gene expression in survivors. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 142, p. 207-218, 2011.

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

EVANS, J. J.; KLESIOUS, P. H.; GLIBERT, P. M.; SHOEMAKER, C. A.; AL SARAWI, M. A.; LANDSBERG, J. Characterization of beta-haemolytic Group B *Streptococcus agalactiae* in cultured seabream, *Sparus auratus* (L.) and wild mullet, *Liza klunzingeri* (Day), in Kuwait. **Journal of Fish Disease**, Oxford, v. 25, p. 505 - 513, 2002.

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

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION). **The State of World Fisheries and Aquaculture 2010**. Rome, 2010.

FERNANDEZ, A. B.; DE BLAS, I.; RUIZ, I. El sistema inmune de los teleósteos (I): células y órganos. **Revista Acuática**, Zaragoza, n. 16, abr. 2002.

FIGUEIREDO, H.C.P. CARNEIRO, D.O. FARIA, F.C. COSTA, G.M. *Streptococcus agalactiae* associado à meningoencefalite e infecção sistêmica em tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 4, p. 678-680, 2006.

FIGUEIREDO, H. C. P.; KLESIUS, P. H.; ARIAS, C. R.; EVANS, J.; SHOEMAKER, C. A.; PEREIRA, D. J. JUNIOR; PEIXOTO, M. T. D. Isolation and characterization of strains of *Flavobacterium columnare* from Brazil. **Journal of Fish Disease**, Oxford, v. 28, p. 199-204, 2005.

FIGUEIREDO, J.; PLUMB, J. A. Virulence of different isolates of *Aeromonas hydrophila* in channel catfish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 11, p. 349-354, 1977.

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

FRAIRE, A. E. *Aeromonas hydrophila* infection. **The Journal of the American Medicine Association**, Chicago, v. 239, p. 192, 1978.

FRERICHS, G. N.; MILLAR, S. D. **Manual of the isolation and identification of fish bacterial pathogens**. Stirling: Pisces Press, 1993. p. 60.

GOLDENFARB, P. B.; BOWYER, F. P.; HALL, E.; BROUSIUS, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. **American Journal of Clinical Pathology**, Birmingham, v. 56, n. 1, p. 50-59, 1971.

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

GUDDING, R.; LILLEHAUGA, A.; EVENSEN, O. Recent developments in fish vaccinology. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 72, p. 203-12, 1999.

HARIKRISHNAN, R.; JIN, C. N.; KIM, J. S.; BALASUNDARAM, C.; HEO, M. S. *Philasterides dicentrarchi*, a histophagous ciliate causing scuticociliatosis in olive flounder – histopathology investigations. **Experimental Parasitology**, Maryland Heights, v. 130, p. 239-245, 2012.

HARIKRISHNAN, R.; RANI, M. N.; 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.

HARRIGAN, W. F. **Laboratory methods in food microbiology**. 3. ed. San Diego: Academic, 1998.

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

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

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

HRUBE, T. C.; SMITH, S. Hematology of fish. In: FELDMAN, B. V.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. 5. ed. [S.l.: s.n.], 1998. p. 1120-1125.

ISHIKAWA, C. M. **Quantificação bacteriana e avaliação das lesões em peixes da espécie *Oreochromis niloticus* (Tilápia do Nilo) inoculados experimentalmente com *Mycobacterium marinum* ATCC 927**. 1998. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. 4th ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 1986.

JORGENSEN, J. B.; LUNDE, H.; ROBERTSEN, B. Peritoneal and head kidney cell response to intraperitoneally injected yeast glucan in Atlantic salmon, *Salmo Salar*, L. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 16, p. 313-325, 1993.

KAATTARI, S. L.; PIGANELLI, J. D. The specific immune system: humoral defense. In: Iwama, G.; Nakanishi, T. (Ed.). **The fish immune system**. San Diego: Academic Press, 1996. p. 207-243.

KILLIAN, M. Streptococcus and lactobacillus. In: COLLIER, L. et al. (Ed.). **Topley e Wilson's microbiology and microbial infections, volume 2: systematic bacteriology**. [London: Hodder Education Publishers], 1998. p. 635-658.

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

KITAO, T.; AOKI, T.; IWATA, K. Epidemiological study on streptococcosis of cultured yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). Distribution of *Streptococcus* sp. in seawater and muds round yellowtail farms. **Bulletin of the Japanese Society of Fisheries**, [S.l.], v. 45, n. 5, p. 67-572, 1979.

KITAO, T.; AOKI, T.; SAKOH, R. Epizootic caused by beta-haemolytic Streptococcus species in cultured freshwater fish. **Fish Pathology**, [Tokyo], v. 15, n. 3-4, p. 301-307, 1981.

KLESIOUS, P. H.; EVANS, J. J.; SHOEMAKER, C. A. Warmwater fish vaccinology in catfish production. **Animal Health Research Reviews**, Cambridge, v. 5, n. 2, p. 305-311, 2004.

KOLLNER, B.; WASSERRAB, B.; KOTTERBA, G.; FISHER, U. Evaluation of immune functions of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) – how can environmental influences be detected? **Toxicology Letters**, Shannon, v. 131, p. 83-95, 2002.

LAMAS, J.; SANTOS, Y.; BRUNO, D. W.; TORANZO, A. E.; ANADON, R. Non-specific cellular responses of rainbow trout to *Vibrio anguillarum* and its extracellular products (ECPs). **Journal of Fish Biology**, West Sussex, v. 45, n. 5, p. 839-854, 1994.

MACFADDIN, J. F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. Baltimore: The Williams & Wilkins Co, 1976. p. 312.

MAGNADÓTTIR, B. Innate immunity of fish (overview). **Fish & Shellfish Immunology**, London, v. 20, p. 137-151, 2006.

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

MARTINS, M. L. et al. Hematologia e resposta inflamatória aguda em *Oreochromis niloticus* (*Osteichthyes: Cichlidae*) submetida aos estímulos único e consecutivo de estresse de captura. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 30, p. 71- 80, 2004.

MARTINS, M. L.; PILARSKY, F.; ONAKA, E. M.; NOMURA, D. T.; FENERICK, Jr. J.; RIBEIRO, K.; MYIAZAKI, D. M. Y.; CASTRO, M. P.; MALHEIROS, E. B. Haematological changes in Nile tilapia experimentally infected with *Enterococcus* sp. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 68, n. 3, p. 657-661, 2008.

MARTINS, M.L.; VIEIRA, F.N.; JERONIMO, G.T.; MOURINO, J.L.P.; DOTTA, G.; SPECK, G.M.; JATOBA, A.M.B.; PEDROTTI, F.S.; BUGLIONE-NETO, C.C.; PEREIRA Jr, G. Leukocyte response and phagocytic activity in Nile tilapia experimentally infected with *Enterococcus* sp. **Fish Physiology and Biochemistry**, Dordrecht, v. 35, p. 219-222, 2009.

MIAN, G. F.; GODOY, D. T.; LEAL, C. A. G.; YUHARA, T. Y.; COSTA, G. M.; FIGUEIREDO, H. C. P. AQUAVET, **Laboratory of Aquatic Animal Diseases**, Lavras, MG, 2008.

MILLER, J. D.; NEELY, M. N. Zebrafish as a model host streptococcal pathogenesis. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 91, p. 53-68, 2004.

MINAMI, T.; NAKAMURA, M.; IKEDA, Y.; OZAKI, H. A beta-hemolytic *Streptococcus* isolated from cultured yellowtail. **Fish Pathology**, [Tokyo], v. 14, n. 1, p. 15-19, 1979.

NAKANISH, T.; OTOTAKE, M. Antigen uptake and immune responses after immersion vaccination. In: GUDDING, R. et al. (Ed.). **Fish vaccinology**. [S.l.: S. Karger Ag], 1997. p. 59-68.

NIZET, V.; RUBENS, C. Pathogenic mechanisms and virulence factors of Group B Streptococci. In: [FISCHETTI, V. A.]. **Gram-positive pathogens**. Washington: American Society for Microbiology, 2000. p. 125-135.

OLIVARES-FUSTER, O.; BAKER, J. L.; TERHUNE, J. S.; SHOEMAKER, C. A.; KLESIUS, P. H.; ARIAS, C. R. Host-specific association between *Flavobacterium columnare* genomovars and fish species. **Systematic and Applied Microbiology**, Jenna, v. 30, p. 624-33, 2007b.

OLIVARES-FUSTER, O.; SHOEMAKER, C.A.; KLESIUS, P.H.; ARIAS, C.R. Molecular typing of isolates of the fish pathogen, *Flavobacterium columnare*, by single-strand conformation polymorphism analysis. **FEMS Microbiology Letters**, West Sussex, v. 269, p. 63-69, 2007a.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Guidelines for drinking water quality**. 3. ed. Genova, 2003.

PASNIK, D. J.; EVANS, J. J.; KLESIUS, P. H. Duration of protective antibodies and correlation with survival in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* following *Streptococcus agalactiae* vaccination. **Diseases of Aquatic Organisms**, Oldendorf, v. 66, p. 129-34, 2005b.

PASNIK, D. J.; EVANS, J. J.; PANANGALA, V. S.; KLESIUS, P. H.; SHELBY, R. A.; SHOEMAKER, C. A. Antigenicity of *Streptococcus agalactiae* extracellular products and vaccine efficacy. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 28, p. 205-12, 2005a.

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

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

PERERA, R. P.; JOHNSON, S. K.; LEWIS, D. H. Epizootiological aspects of *Streptococcus iniae* affecting tilapia in Texas. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 152, p. 25-33, 1997.

PILARSKI, F. **Imunização de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com antígeno obtido de *Flavobacterium columnare* e suplementação alimentar com vitamina C**. 2006. 118 f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2006.

PLUMB, J. A. Infections diseases of tilapia. In: BARRY, A.; RAKOCY, C.-P.; RAKOCY, J. E. (Ed.). **Tilapia aquaculture in the Americas**. Baton Rouge, LA: World Aquaculture Society, 1997. v. 1, p. 212-218.

PLUMB, J. A. **Health maintenance of cultured fishs**: principal microbial diseases. Boca Raton: CRC, 1994. p. 254.

PLYZYCZ, B.; FLORY, C. M.; GALVAN, I.; BAYNE, C. J. Leucocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) pronephros: cell types producing superoxide anion. **Developmental and Comparative Immunology**, Oxford, v. 13, n. 3, p. 217-224, 1989.

POPOFF, M. Genus III. *Aeromonas* Kluyer and Van Niel. In: DRIEG, N. R. (Ed). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Willians and Wilkins, 1984. v. 1, p. 545-584.

POST, G. **Fish health**. [S.l.]: T.F.H. Publications, 1987. p. 37-41.

POST, G. Serum proteins and antibody production in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, v. 23, n. 12, 1957-1963, 1966

PRESSLEY, M. E.; PHELAN III, P. E.; WITTEN, P.E.; MELLON, M. T.; KIM, C. H. Pathogenesis and inflammatory response to *Edwardsiella tarda* infection in the zebrafish. **Developmental and Comparative Immunology**, Oxford, v. 29, p. 501-513, 2005.

QUINTANA, C. F. **Respostas locais e sistêmicas induzidas por endotoxina em *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) tratados com cromo**. 2002. 67 f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2002.

RANZANI-PAIVA, M. J. T.; SILVA-SOUZA, A. T.; PAVANELLI, G. C.; TAKEMOTO, R. M. Hematological characteristics and relative condition factor (Kn) associated with parasitism in *Schizodon borellii* (*Osteichthyes, Anostomidae*) and *Prochilodus lineatus* (*Osteichthyes, Prochilodontidae*) from Paraná river, Paraná, Brazil. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, Ann Arbor, v. 22, n. 2, p. 515- 521, 2000.

RANZANI-PAIVA, M. J. T.; SILVA-SOUZA, A. T. Hematologia de peixes brasileiros. In: RANZANI-PAIVA, M. J. T.; TAKEMOTO, R. M.; PEREZ LIZAMA, M. de los. (Org.). **Sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo: Editora Varela, 2004.

ROBERTS, R. J. **Patologia de los peces**. Madrid: Ed. Mundi-Prensa, 1989.

ROMALDE, J. L.; LUZARDO-ALVAREZ, A.; RAVELOA, C.; TORANZO, A. E.; BLANCO-MENDEZ, J. Oral immunization using alginate microparticles as a useful strategy for booster vaccination against fish lactococcosis. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 236, p. 119-129, 2004.

ROMANO, L. A.; MEJÍA, J. Infección por *Streptococcus iniae*: una enfermedad emergente que afecta a peces de cultivo y a humanos. **Revista Aquatic**, [Zaragoza], n. 18, Enero-Junio, 2003.

ROSENFELD, G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue. Noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudo de diversos fatores. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 20, p. 315-28, 1947.

ROSSI JUNIOR, O. D. **Fontes de contaminação da carne bovina por bactérias do gênero *Aeromonas* e formas de disseminação destes microrganismos nas diferentes fases do fluxograma de abate: comportamento frente a antimicrobianos e capacidade enteroxigênciã das cepas isoladas**. 1998. 154 p. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 1998.

SAAD, S. M. I.; IARIA, S. T.; FURLANETTO, S. M. P. Motile *Aeromonas* spp. in retail vegetables from São Paulo, Brazil. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 22-27, 1995.

SAAVEDRA, M. J.; GUEDES-NOVAIS, S.; ALVES, A.; REMA, P.; TACÃO, M.; CORREIA, A.; MARTÍNEZ-MURCIA, A. Resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics in *Aeromonas hydrophila* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **International Microbiology**, Madrid, v. 7, n. 3, p. 207-211, 2004.

SAHOO, P. K.; MUKHERJEE, S. C. Effect of dietary 1,3  $\beta$ -glucan on immune responses and disease resistance of healthy and aflatoxin B1-induced immunocompromised rohu *Labeo rohita* Hamilton. **Fish and Shellfish Immunology**, London, v. 11, p. 683-695, 2001.

SALVADOR, R.; MÜLLER, E. E.; LEONHARDT, J. H.; GIORDANO, L. G. P.; DIAS, J. A.; FREITAS, J. C.; MORENO, A. M. Isolamento de *Streptococcus* spp de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*) e qualidade da água de tanques rede na Região Norte do Estado do Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 1, p. 35-42, 2003.

SALVADOR, R.; MULLER, E. E.; FREITAS, J. C.; LEONHARDT, J. H.; PRETTO-GIORDANO, L. G.; DIAS, J. A. Isolation and characterization of group B *Streptococcus* spp from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) breeding in hapas nets and in earth nurseries in the north region of Parana State, Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 6, p. 1374-1378, 2005.

SATAKE, F.; PÁDUA, S. B.; ISHIKAWA, M. M. Distúrbios morfológicos em células sanguíneas de peixes em cultivo: uma ferramenta prognóstica. In: TAVARES-DIAS, M. (Org.). **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. Macapá: EMBRAPA, 2009.

SAURABH, S.; SAHOO, P. K. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. **Aquaculture Research**, Amsterdam, v. 39, p. 233-239, 2008.

SECOMBES, C. J. The nonspecific immune system: celular defensas. In: IWAMA, G.; NAKANISHI, T. **The fish immune system**. London: Academic Press, 1996. p. 63-105.

SHELBY, R. A.; KLESIUS, P. H.; SHOEMAKER, C. A.; EVANS, J. J. Passive immunization of tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), with anti-Streptococcus iniae whole sera. **Journal of Fish Disease**, Oxford, v. 25, p. 1-6, 2002.

SHOEMAKER, C. A.; OLIVARES-FUSTER, O.; ARIAS, C. R.; KLESIUS, P. H. Flavobacterium columnare genomovar influences, mortality in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 127, p. 353-9, 2008.

SHOEMAKER, C.; KLESIUS, P. Streptococcal disease problems and control: a review. **Tilapia Aquaculture**, [S.l.], v. 2, p. 671-680, 1997.

SHOEMAKER, C. A.; KLESIUS, P. H.; EVANS, J. J. Immunization of eyed channel catfish, *Ictalurus punctatus*, eggs with monovalent *Flavobacterium columnare* vaccine and bivalent *F. columnare* and *Edwardsiella ictaluri* vaccine. **Vaccine**, London, v. 25, p. 1126-31, 2007.

SILVA, B. C. et al. Hematological and immunological responses of Nile tilapia after polyvalent vaccine administration by different routes. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seratopedica, v. 29, n. 11, p. 874-880, 2009.

SIMONATO, J. D.; GUEDES, C. L. B.; MARTINEZ, C. B. R. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish, *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Maryland Heights, v. 68-79, 2007.

SIWICKI, A. K.; ANDERSON, D. P.; RUMSEY, G. L. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 41, p. 123-139, 1994.

SOUZA, V. L.; LUNARDI, L. O.; VASQUES, L. H.; CASALETTI, L.; NAKAGHI, L. S. O.; URBINATI, E. C. Morphometric alterations in hepatocytes and ultrastructural distribution of liver glycogen in pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887) during food restriction and refeeding. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, Campinas, v. 18, n. 1, p. 1-10, 2001.

STOSKOPF, M. K. **Fish medicine**. Philadelphia: Saunders, 1993. p. 269-277.

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

SWAIN, P.; SAHOO, P. K.; AYYAPPAN, S. **Fish and shellfish immunology: an introduction**. Delhi, India: Narendra Publishing House, 2006. p. 296.

TAVARES-DIAS, M. **Variáveis hematológicas de teleósteos brasileiros de importância zootécnica**. 2003. 209 f. Tese (Doutorado em Aqüicultura) - Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2003.

TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M. L.; MORAES, F. R. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. V. Variáveis do piaçu *Leporinus macrocephalus* Garavello and Britski, 1988 (*Anostomidae*). **Naturalia**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 39-52, 2002.

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

THOMAS, J. S. Overview of plasma proteins. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 891-989.

VALLEJO, A. N.; MILLER, N. W.; CLEM, L. W. Antigen processing and presentation in teleost immune responses. **Annual Review of Fish Diseases**, Oxford, v. 2, p. 73-89, 1992.

VANDENBERG, G. W. Oral vaccines for finfish: academic theory or commercial reality? **Animal Health**, London, v. 5, p. 301-304, 2004.

VIEIRA, R. H. S. F. **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado**. São Paulo: Livraria Varela, p. 380, 2003.

VIJAYAN, M. M.; LEATHERLAND, J. F. Cortisol-induced changes in plasma glucose, protein, and thyroid hormone levels, and liver glycogen content of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch* Walbaum). **Canadian Journal of Zoology**, Ottawa, v. 67, p. 2746-2750, 1989.

VIVAS, J.; CARRACEDO, B.; RIAÑO, J.; RAZQUIN, B. E.; LÓPEZ-FIERRO, P.; ACOSTA, F.; NAHARRO, G.; VILLENA, A. J. Behavior of an *Aeromonas hydrophila* aroA live vaccine in water microcosms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 70, p. 2702-8, 2004.

VIVAS, J.; RAZQUIN, B.; LÓPEZ-FIERRO, P.; VILLENA, A. J. Modulation of the immune response to an *Aeromonas hydrophila* aroA live vaccine in rainbow trout: effect of culture media on the humoral immune response and complement consumption. **Fish and Shellfish Immunology**, London, v. 18, p. 223-33, 2005.

WHITE, A.; FLETCHER, T.; PEPYS, M.; BALDO, B. The effect of inflammatory agents on C reactive protein and serum amyloid P component levels in plaice (*Pleuronectes platessa* L.) serum. **Comparative biochemistry and physiology**, Philadelphia, v. 69, p. 325-329, 1981.

WINTROBE, M. M. Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. **Folia Haematologica**, Stuttgart, v. 51, p. 32-49, 1934.

WU, S. Y. New bacterial disease of tilapia. **FAO Fish Culture Bulletin**, v. 23, p. 3-40. 1970.

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

YOSHINAGA T.; SEGAWA, I.; YAMANO, K.; IKEDA, H.; SORIMACHI, M. Anemia caused by challenges with the monogenean *Neoheterobothrium hirane* in the Japanese flounder. **Fish Pathology**, Tokyo, v. 31, n. 1, p. 19-23, 1996.

YOSHINAGA, K. et al. Individual variations of Natural Killer activity of rainbow trout leucocytes against IPN virus-infected and uninfected RTG-2 cells. **Fish Pathology**, Tokyo, v. 29, p. 1-4, 1994.

ZLOTKIN, A.; CHILMONCZYK, S.; EYNGOR, M.; HURVITZ, A.; GHITTINO, C. Trojan horse effect: phagocytomediated *Streptococcus iniae* infection of fish. **Infection and Immunity**, Washington, DC, v. 71, p. 2318-2325, 2003.