

TÍTULO DE ANTICORPOS HEMAGLUTINANTES DE PACU, *Piaractus mesopotamicus*, COMO INDICADOR DE IMUNIDADE ADQUIRIDA

*HEMAGGLUTINATION ANTIBODY TITERS IN PACU, *Piaractus mesopotamicus*, AS AN INDICATOR OF ACQUIRED IMMUNITY*

J. D. BILLER-TAKAHASHI^{1*}; L. S. TAKAHASHI²; E. C. URBINATI^{1,3}

RESUMO

A determinação do título de hemaglutinação é uma alternativa para avaliar as respostas do sistema imune adquirido, ou seja, analisar a capacidade de produção de anticorpos circulantes do organismo. O estudo foi realizado a fim de padronizar a titulação de anticorpos produzidos contra hemáceas de coelho em peixes previamente imunizados e submetidos a dietas com diferentes concentrações de levamisol (0, 250 e 500 mg.kg⁻¹ de levamisol). O resultado é um aglomerado celular que pode ser visualizado a olho nu. Peixes do presente estudo alimentados com 250 mg.kg⁻¹ de levamisol apresentaram maiores títulos de anticorpos hemaglutinantes, entretanto os alimentados com 500 mg.kg⁻¹ apresentaram títulos semelhantes ao grupo controle, alimentado com dieta sem levamisol. Este estudo validou a metodologia para determinação do título de hemaglutinação do soro de peixe nativo imunizados, após administração de levamisol e verificou um aumento da concentração de anticorpos hemaglutinantes após administração de 250 mg.kg⁻¹ de levamisol por 10 dias.

PALAVRAS-CHAVE: Sistema imune adquirido. Anticorpo. Imunoestimulante. Metodologia.

SUMMARY

The evaluation of the hemagglutination titer is an option to evaluate the response of acquired immune system in order to assess the immunocompetence for antibodies production. The study was carried out to standardize the antibody titer against rabbit red blood cell in immunized fish and fed diets with levamisole (0; 250 and 500 mg.kg⁻¹ levamisole). As a result, the cell cluster agglutination can be observed by the naked eye. Fish fed 250 mg.kg⁻¹ of levamisole have shown the highest hemagglutination antibodies titer; however, fish fed 500 mg.kg⁻¹ of levamisole have revealed titers equivalent to control group that was fed levamisole-free diet. This study has validated the methodology for determination of hemagglutination antibody titer of immunized fish and has found that antibody titers increased after feeding a diet containing 250 mg.kg⁻¹ of levamisole during 10 days.

KEY-WORDS: Acquired immune system. Antibody. Immunostimulant. Methodology.

¹ Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Universidade Estadual Paulista – UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil. *Autor para correspondência: jaque.biller@yahoo.com.br.

² Faculdade de Zootecnia, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Campus de Dracena, Brasil

³ Centro de Aquicultura da Unesp - CAUNESP. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista - UNESP

INTRODUÇÃO

A determinação do título de hemaglutinação é uma alternativa para avaliar as respostas do sistema imune adquirido, ou seja, analisar a capacidade de produção de anticorpos circulantes do organismo (KUMARI & SAHOO, 2005, 2006).

O sistema imune de peixes é um mecanismo de defesa dividido em inato e adquirido, ambos divididos em defesa mediada por célula e humoral. O sistema inato é considerado a primeira barreira contra agentes invasores, por outro lado, o sistema adquirido necessita da presença do antígeno para desencadear reações que culminarão no aumento de anticorpos circulantes específico, e em consequência memória imune (BAYNE & GERWICK 2001; ELLIS, 2001).

Os anticorpos e os linfócitos compõem os mecanismos da defesa adquirida humoral e mediada por células, respectivamente. Os anticorpos ligam-se aos microrganismos e podem ativar a fagocitose, promover a neutralização, ou a opsonização do agente, bem como a ativação do complemento e da citotoxicidade mediada por células (ELLIS, 2001).

As respostas do sistema imune de peixes podem ser influenciadas por algumas substâncias, tais como o levamisol. Este composto é uma droga anti-helmíntica sintética comumente utilizada em mamíferos, que apresenta uma potente ação sobre os sistemas imune inato e específico de peixes (KIRON, 2012). Este imunostimulante promove aumento de alguns parâmetros, tais como a atividade citotóxica de leucócitos (CUESTA et al., 2002), número de fagócitos (MULERO et al., 1998; FINDLAY & MUNDAY, 2000), atividade respiratória de macrófagos (SIWICKI, 1989; MULERO et al., 1998), e melhora das respostas imune específica (JENEY & ANDERSON, 1993; CUESTA et al., 2004).

O pacu, *Piaractus mesopotamicus* pertencente a família Characidae e subfamília Myleinae, possui características especiais como rusticidade, fácil adaptação alimentar, crescimento rápido e facilidade de reprodução artificial (OLIVEIRA et al., 2004; QUEIROZ et al., 2005). Entretanto, para esta espécie, há escassos métodos validados visando à avaliação das respostas do sistema imune específico, como a produção de anticorpos (BILLER et al, 2013) além de pouco estudos sobre as respostas imunes moduladas pelo levamisol (SADO et al., 2010). Assim, o objetivo foi padronizar um modelo mais simplificado e que se fundamenta no uso de hemáceas de coelho como antígeno para a indução e mensuração de anticorpos produzidos por pacus submetidos a dietas com diferentes concentrações de levamisol.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais, delineamento experimental e amostragens

Foram utilizados 180 pacus, *Piaractus mesopotamicus*, com peso médio de $218,92 \pm 47,74$ g e comprimento total $21,36 \pm 2,15$ cm, distribuídos em 18 aquários de polietileno com capacidade de 100 litros,

dispostos em sistema de circulação aberta, com renovação contínua de água proveniente de poço artesiano com temperatura constante (aproximadamente 29°C). Os peixes receberam alimento comercial (28% PB, 3% lipídeos, 1% fibra, livre de levamisol) por 20 dias para adaptação às condições laboratoriais, em seguida passaram a receber as rações experimentais até a saciedade aparente, em duas refeições diárias. As rações experimentais foram preparadas com a ração comercial à qual se acrescentou 0, 250 e 500 mg.kg⁻¹ de levamisol. Os parâmetros físico-químicos da água se mantiveram dentro dos valores descritos na criação da espécie (URBINATI & GONÇALVES, 2005): temperatura $28,82 \pm 0,67^\circ\text{C}$; oxigênio dissolvido $5,96 \pm 0,89$ mg.L⁻¹, NH₄ $0,41 \pm 0,22$ mg.L⁻¹ e pH $7,09 \pm 0,11$.

Os peixes de todos os tratamentos receberam as respectivas rações experimentais por dez dias, e após este período, peixes de cada um dos aquários foram inoculados com suspensão de hemáceas de coelhos a 10%, durante este período, os peixes foram alimentados com dieta comercial. Após 15 dias, dois peixes de cada um dos aquários que compõem os tratamentos (12 peixes por tratamento) foram amostrados e anestesiados em benzocaína (0,1 g.L⁻¹), e passaram por coleta de sangue por punção da veia caudal. O soro após coagulação foi submetido à titulação dos anticorpos hemaglutinantes.

Título de Anticorpos Hemaglutinantes

A fim de titular os anticorpos produzidos contra hemáceas de coelho, foi realizada uma reação de soroaglutinação, que são reações de floculação celular, na qual o antígeno é constituído por células estáveis. O resultado é um aglomerado celular que pode ser visualizado a olho nu.

Suspensão de hemáceas de coelhos e inoculação

Uma alíquota de sangue total de coelhos foi misturada a um mesmo volume de solução de Alséver (anticoagulante pH 6,1) e a solução resultante foi filtrada em gaze estéril. No momento do uso, as hemáceas foram ressuspensas, lavadas e centrifugadas (centrifuga refrigerada a 3000g por 3 min) por 3 vezes com o tampão fosfato estéril (PBS, composto por NaCl (0,137M), KCl (2,7 mM), KH₂PO₄ (1,5 mM), Na₂HPO₄ (8,1 mM), CaCl₂ (0,9 mM), MgCl₂ (0,49 mM), em água destilada Milli-Q qsp 1 litro), com pH 7,4. A suspensão foi diluída a 1% (densidade óptica entre 0,8 e 0,9 a 700 nm) para realização do teste nas microplacas e a 10% para inoculação nos peixes.

Reação de soroaglutinação

Inicialmente, o soro hiperimune de peixe, obtido após 15 dias da inoculação de hemáceas a 10%, foi inativado a 56°C por 20 minutos para desnaturação de proteínas do sistema complemento, que são termo sensíveis e apresentam grande capacidade de lisar hemáceas. Foram utilizadas microplacas de acrílico estéril, na qual foram distribuídos com pipetador multicanal, 50 µL de tampão PBS nas 96 cavidades da placa. Em seguida 50 µL do soro inativado foi

depositado na primeira coluna, e a partir desta solução o soro foi seriadamente diluído em razão 2 no tampão PBS das cavidades seguintes até a penúltima cavidade, a última cavidade foi utilizada como controle negativo, onde havia apenas 50 µL tampão PBS, mantendo um volume final de 50 µL por cavidade, e ao fim as seguintes diluições dos soros: 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512, 1/1024, 1/2048. Em seguida foram adicionados 50 µL de suspensão de hemácias de coelho a 1% em todas as cavidades utilizando pipetador multicanal, e a reação foi recoberta com filme plástico e incubada por 16-18 horas a temperatura ambiente. O título de anticorpos hemaglutinantes foi definido como a última diluição do soro apresentando aglutinação visível, e os valores expressos em Log10 do recíproco da diluição.

Delineamento e análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo Teste de Tukey (5%). Diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0.05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Peixes alimentados com 250 mg.kg^{-1} de levamisol apresentaram maiores títulos de anticorpos hemaglutinantes, entretanto os alimentados com 500 mg.kg^{-1} não apresentaram títulos diferentes do grupo controle, alimentado com dieta sem levamisol (Figura 1). A ação do levamisol já foi avaliada em outras espécies e Cuesta et al. (2004) encontraram em *Sparus aurata* concentrações elevadas de IgM após duas semanas de administração de levamisol e o efeito persistiu por mais de seis semanas. Bem como Hung et al. (1997) que relataram que em enguia japonesa, as

concentrações de imunoglobulinas apresentaram picos após três a quatro semanas de imunização.

A melhora da resistência contra diversos agentes etiológicos após administração de levamisol foi observada em peixes desafiados com *Vibrio anguillarum* (KAJITA et al., 1990), *A. hydrophila* (BABA et al., 1993), *Paramoeba sp.* (FINDLAY et al., 2000; MUNDAY & ZILBERG, 2003), *Edwardsiella tarda* (SAHOO & MUKHERJEE, 2002), *Photobacterium damsela* (LEANO et al., 2003) além de nematóides como *Anguillicola crassus* (GEETS et al., 1992), entretanto as respostas imunomoduladoras do levamisol sobre a produção de anticorpos são dependentes da dose e do tempo de administração, sendo necessário investigar melhor esses dois parâmetros em futuros estudos para avaliar profundamente a ação desde composto sobre as respostas do sistema imune (KIRON, 2012).

A hemaglutinação é uma reação entre antígenos particulados, como uma suspensão celular homogênea de bactérias ou hemácias de coelho e o soro de peixe previamente imunizado (TIZARD, 2002; KUMARI & SAHOO, 2005, 2006). A produção de anticorpos pelos peixes imunizados decorre do reconhecimento do antígeno particulado, inicialmente pelo sistema inato, pelas células apresentadoras de antígenos (macrófagos ou células dendríticas), que processam os antígenos em partículas, e irão num primeiro momento desencadear respostas imunes e de proliferação, e num segundo momento, conjuntamente com os compostos específicos de defesa, desencadear resposta de memória (ABBAS & LICHMAN, 2004). Fatores celulares e humorais dos sistemas adquirido e inato atuam conjuntamente para induzir o aumento de anticorpos circulantes (IWANA & NAKANISHI, 1996; MAGNADOTTIR et al., 2011).

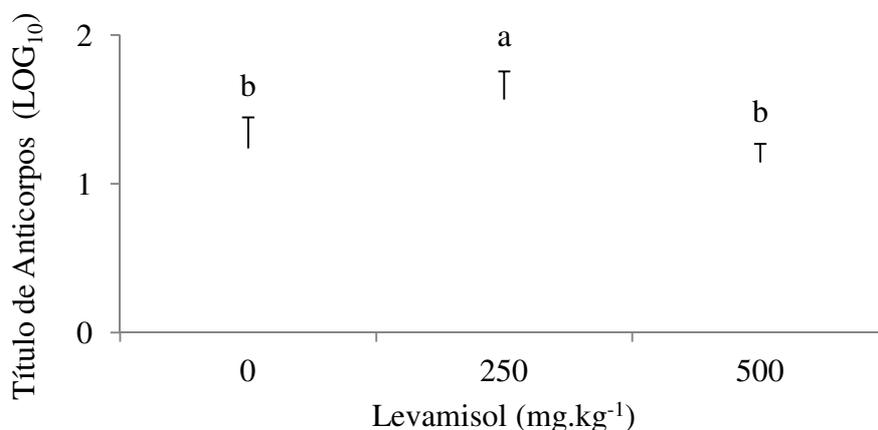


Figura 1 - Título de anticorpos hemaglutinantes de pacu, *Piaracus mesopotamicus*, previamente imunizados contra hemáceas de coelhos (média ± desvio padrão). Diferenças significativas são indicadas por diferentes letras ($P < 0.05$).

A avaliação da produção de anticorpos é muito importante, pois este fator humoral do sistema adquirido é fundamental para reconhecimento de patógenos e deflagração de respostas que culminarão em destruição do agente, bem como memória imune. O aparecimento de doenças, apesar das defesas do organismo, pode ocorrer principalmente em situações de excesso de matéria orgânica na água, em situações de estresse ou presença de parasitos (POST, 1987). Em pisciculturas brasileiras, grandes perdas econômicas ocorrem devido à surtos causados por microrganismos, dentre eles bactérias, fungos e parasitos, sendo ainda que o uso indiscriminado de antibióticos em doses sub-terapêuticas nas rações dos peixes resultam em aumento da resistência das bactérias aos antibióticos em todo o mundo (SUHET et al., 2011; BELÉM-COSTA & CYRINO, 2006; VIVEKANANDHAN et al., 2002).

Atualmente, a defesa contra microrganismos podem ser estimulada através de imunização e uso de imunostimulantes, com conseqüente aumento da concentração de anticorpos circulantes, melhoras na sobrevivência e no desempenho produtivo (POUEY et al., 2011; SUHET et al., 2011; TIZARD, 2002). Na aquicultura, a imunização pode ser uma alternativa para o uso de antibióticos, uma vez que a prevenção de doenças é fundamental para o desenvolvimento da atividade (ROMANO & MEJÍA, 2003; PLANT & LAPATRA, 2011).

Neste sentido, métodos para avaliar a competência imunológica são muito úteis em estudos comparativos, principalmente os que utilizam amostras diminutas, adicionalmente, o método de determinação do título de anticorpos hemaglutinantes validado para pacus neste trabalho é um método simples que analisa a capacidade de produção de anticorpos por peixes imunizados. Entretanto, a fim de evitar prejuízos na determinação do título de hemaglutinação, a desnaturação de proteínas do sistema complemento é um passo importante, uma vez que estas proteínas apresentam afinidade natural por hemáceas e como conseqüência promovem lise celular (BILLER et al., 2012).

A hemaglutinação é uma reação com antígenos particulados e tal reação se verifica somente com antígenos situados na superfície celular, e muitas vezes a identificação destes antígenos pode ocorrer de forma natural, sem a necessidade de imunização prévia, como verificado por Kumari & Sahoo (2005), Sahoo et al. (2005) e Dash et al. (1993). Os anticorpos que realizam a hemaglutinação são normalmente multivalentes, sendo que a classe isotípica – Ig M tem maior atividade aglutinante. Como peixes apresentam maior concentração de IgM, a reação de hemaglutinação pode ser observada de forma muito efetiva (BILLER et al., 2014; DASH et al., 1993).

CONCLUSÃO

A padronização de técnicas para avaliar indicadores do sistema imune para peixes nativos é de grande importância para pesquisa nacional. Este estudo

validou a metodologia para determinação do título de hemaglutinação do soro de peixe nativo imunizado como um indicador de imunidade adquirida, após administração de levamisol e verificou um aumento da concentração de anticorpos hemaglutinantes após administração de 250 mg.kg⁻¹ de levamisol por 10 dias.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHMAN, A. H. **Basic Immunology**. Functions and disorders of the immune system. Philadelphia: W. B. Saunders, Elsevier Press. Second Edition, 2004.
- BABA, T.; WATASE, Y.; YOSHINAGA, Y. Activation of mononuclear phagocyte function by levamisole immersion in carp. **Nippon Suisan Gakkaishi**, v.59, n.1, p.301-307, 1993.
- BAYNE, C. J.; GERWICK, L. The acute phase response and innate immunity of fish. **Developmental Comparative Immunology**, v.25, n.8-9, p.725-743, 2001.
- BELÉM-COSTA, A.; CYRINO, J. E. P. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) and *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). **Scientia Agricola**, v.63, n.3, p.281-284, 2006.
- BILLER-TAKAHASHI, J. D.; TAKAHASHI, L. S.; MARZOCCHI-MACHADO, C. M.; ZANUZZO, F. S.; SABIONI, R. E.; URBINATI, E. C. Hemolytic activity of alternative complement pathway as an indicator of innate immunity in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Brazilian Journal of Animal Science**, v.41, n.2, p.237-241, 2012.
- BILLER-TAKAHASHI, J. D.; TAKAHASHI, L. S.; SAITA, M. V.; GIMBO, R. Y.; URBINATI, E. C. Leukocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*. **Brazilian Journal of Biology**, v.73, n.2, 2013 (in press).
- BILLER-TAKAHASHI, J. D.; MONTASSIER, H. J.; TAKAHASHI, L. S.; URBINATI, E. C. Proposed method for agglutinating antibody titer analysis and its use as indicator of acquired immunity in pacu, *Piaractus mesopotamicus*. **Brazilian Journal of Biology**, v.74, n.1, 2014 (in press).
- CUESTA, A.; MESEGUER, J.; ESTEBAN, M. A. Levamisole is a potent enhancer of gilthead sea bream

- natural cytotoxic activity. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.89, n.3-4, p.169-174, 2002.
- CUESTA, A.; MESEGUER, J.; ESTEBAN, M. A. Total serum immunoglobulin M are affected by immunomodulators in sea bream (*Sparus aurata* L.). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.101, n.3-4, p.203-210, 2004.
- DASH, K.; SAHA, K.; SAHU, A.; GANGAL, S. V. Natural serum haemagglutinins (lectins) in fish: Physicochemical characterization. **Fish and Shellfish Immunology**, v.3, n.5, p.345-360, 1993.
- ELLIS, A. E. Innate host defense mechanism of fish against virus and bacteria. **Developmental Comparative Immunology**, v.25, n.8-9, p.827-839, 2001.
- FINDLAY, V. L.; MUNDAY, B. L. The immunomodulatory effects of levamisole on the non-specific immune system of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. **Journal of Fish Disease**, v.23, n.6, p.369-378, 2000.
- FINDLAY, V. L.; ZILBERG, D.; MUNDAY, B. L. Evaluation of levamisole as a treatment for amoebic gill disease of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. **Journal of Fish Disease**, v.23, n.3, p.193-198, 2000.
- GEETS, A.; LIEWES, E. W.; OLLEVIER, F. Efficacy of some antihelmintics against the swimbladder nematode *Anguillicola crassus* of eel *Anguilla anguilla* under saltwater conditions. **Disease of Aquatic Organism**, v.13, n.1, p.123-128, 1992.
- HUNG, H. W.; LO, C. F.; TSENG, C. C.; KOU, G. H. Antibody production in Japanese eels (*Anguilla japonica* Temminck & Schlegel). **Journal of Fish Disease**, v.20, n.3, p.195-200, 1997.
- IWAMA, G.; NAKANISHI, T. **The fish Immune System**. Fish Physiology. Canada: Elsevier Press. First Edition, v.15, 1996.
- JENEY, G.; ANDERSON, D. P. Glucan injection or bath exposure given alone or in combination with a bacterin enhance the non-specific defense mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v.116, n.4, p.315-329, 1993.
- KAJITA, Y.; SAKAI, M.; ATSUTA, S.; KOBAYASHI, M. The immunomodulatory effects of levamisole on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Fish Pathology**, v.25, n.2, p.93-98, 1990.
- KIRON, V. Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. **Animal Feed Science and Technology**, v.173, n.1, p.111-133, 2012.
- KUMARI, J.; SAHOO, P. K. Effects of cyclophosphamide on the immune system and disease resistance of Asian catfish *Clarias batrachus*. **Fish and Shellfish Immunology**, v.19, n.4, p.307-316, 2006.
- KUMARI, J.; SAHOO, P. K. Non-specific immune response of healthy and immunocompromised Asian catfish (*Clarias batrachus*) to several immunostimulants. **Aquaculture**, v.255, n.1-4, p.133-141, 2005.
- LEANO, E. M.; GUO, J.; CHANG, S.; LIAO, I. C. Levamisole enhances non-specific immune response of cobia (*Rachycentron canadum*) fingerlings. **Journal of Fish Society of Taiwan**, v.30, n.4, p.321-30, 2003.
- MULERO, V.; ESTEBAN, M. A.; MUNOZ, J.; MESEGUER, J. Dietary intake of levamisole enhances the immune response and disease resistance of the marine teleost gilthead seabream (*Sparus auratus* L.). **Fish and Shellfish Immunology**, v.8, n.1, p.49-62, 1998.
- MUNDAY, B.; ZILBERG, D. Efficacy of, and toxicity associated with, the use of levamisole in seawater to treat amoebic gill disease. **Bulletin of European Association of Fish Pathology**, v.23, n.1, p.3-6, 2003.
- OLIVEIRA, A. M. B. M. S.; CONTE, L.; POSSEBON, J. E. Produção de Characiformes autóctones. In: Cyrino, J. E. P.; Urbinati, E. C.; Fracalossi, D. M.; Castagnolli, N. (Ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt; Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, 2004, p.217-238.
- PLANT, K. P.; LAPATRA, S. E. Advances in fish vaccine delivery. **Developmental and Comparative Immunology**, v.35, n.12, p.1256-1262, 2011.
- POST, G. **Textbook of fish health**. New York: T.F.H. Publications, 1987, 288p.
- POUEY, J. L. O. F.; PIEDRAS, S. R. N.; ROCHA, C. B.; TAVARES, R. A.; SANTOS, J. D. M.; BRITTO, A. C. P. Productive performance of silver catfish, *Rhamdia quelen*, juveniles stocked at different densities. **Ars Veterinaria**, v.27, n.4, p.241-245, 2011.
- QUEIROZ, J. F.; LOURENÇO, J. N. P.; KITAMURA, P. C.; SCORVO FILHO, J. D.; CYRINO, J. E. P.; CASTAGNOLLI, N.; VALENTI, W. C.; BERNARDINO, G. Aquaculture in Brazil: research priorities and potential for further international collaboration. **World Aquaculture Magazine**, v.36, p.45-50, 2005.
- ROMANO, L. A.; MEJÍA, J. Infección por *Streptococcus iniae*: Una enfermedad emergente que afecta a peces de cultivo y a humanos. **Revista Aquatica**, v.18, p.25-32, 2003.
- SADO, R.Y.; BICUDO, A. J. A.; CYRINO, J. E. P. Dietary levamisole influenced hematological parameters of juvenile pacu, *Piaractus mesopotamicus*

(Holmberg 1887). **Journal of World Aquaculture Society**, v.41, n.1, p.66-75. 2010.

SAHOO, P. K.; MUKHERJEE, S. C. The effect of dietary immunomodulation upon *Edwardsiella tarda* vaccination in healthy and immunocompromised Indian major carp (*Labeo rohita*). **Fish and Shellfish Immunology**, v.12, n.1, p.1-16, 2002.

SAHOO, P. K.; KUMARI, J.; MISHRA, B. K. Non-specific immune responses in juveniles of Indian major carps. **Journal of Applied Ichthyology**, v.21, n.2, p.151-155, 2005.

SIWICKI, A. K. Immunostimulating influence of levamisole on nonspecific immunity in carp (*Cyprinus carpio*). **Developmental and Comparative Immunology**, v.13, n.1, p.87-91, 1989.

SUHET, M. I.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; AMARAL, L. A. Hemolytic activity and resistance to antimicrobials by *Aeromonas* species isolated from intensive rearing of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Ars Veterinaria**, v.27, n.1, p.36-44, 2011.

TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária**. Uma introdução. São Paulo: Ed. Roca, 532p., 2002.

URBINATI, E. C.; GONÇALVES, F. D.; TAKAHASHI, L. S. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: Baldisseroto, B.; Gomes, L. C. (Eds.) **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. 2ed. Santa Maria: Editora UFSM, p.205-244, 2010.

VIVEKANANDHAN, G.; SAVITHAMANI, K.; HATHA, A. A. M.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from marked fish and prawn of South India. **International Journal of Food Microbiology**, v.76, n.1, p.165-168, 2002.