



**POLITÉCNICO  
DE LEIRIA**

ESCOLA SUPERIOR  
DE TURISMO E  
TECNOLOGIA DO MAR

**Avaliação da eficácia de uma vacina oral contra *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* em robalo (*Dicentrarchus labrax*)**

**Maria de Dionísio Martins**

[2021]



**Avaliação da eficácia de uma vacina oral contra *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* em robalo (*Dicentrarchus labrax*)**

**Maria de Dionísio Martins**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura

Dissertação realizada sob a orientação da Professora Especialista Teresa Maria Coelho Baptista

[2021]



Avaliação da eficácia de uma vacina oral contra *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* em robalo (*Dicentrarchus labrax*)

**Copyright** © Maria de Dionísio Martins

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Politécnico de Leiria

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação/relatório de estágio através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



## Resumo

Foi efetuado um ensaio no edifício CETEMARES (Politécnico de Leiria, Peniche, Portugal) que consistiu na administração de uma vacina oral experimental misturada na alimentação, em robalos de peso médio ( $15,2 \pm 3,57$  g). A vacina oral administrada foi de DNA utilizando a proteína pVAX–GFP como plasmídeo, encapsulado em nanopartículas de quitosano. Aleatoriamente, 15 e 30 dias após a vacinação, foram recolhidas amostras de sangue para um teste ELISA indireto com o objetivo de avaliar a presença de anticorpos gerados pela vacina. Após esses 30 dias, foi feita uma infeção com 100  $\mu$ l de bactéria *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* ( $2,4 \cdot 10^6$  UFC  $g^{-1}$ ), o grupo de controlo da infeção foram injetados com PBS. Registou-se a mortalidade observada, e foram recolhidos órgãos (rim, fígado e baço) aos peixes moribundos para detetar a presença da bactéria *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* e comprovar que estes indivíduos morreram da mesma.

Em resultado deste estudo, foram produzidos valores muito baixos de anticorpos durante o tempo de vacinação (34 dias), provocando no ensaio da infeção uma mortalidade de 100% nos peixes vacinados infetados e uma mortalidade de 83% no controlo infetado, apresentando um RPS de 0% nos primeiros. Não houve mortalidade no grupo que foi administrado PBS. Com isto, não existem diferenças estatisticamente significativas quando comparados os valores de anticorpos dos peixes vacinados e do controlo e por consequência existem diferenças estatisticamente significativas quando comparados os valores de mortalidade entre os infetados e não infetados. Um conjunto de falhas e limitações podem ter contribuído para estes resultados como a dose de vacina administrada não ter sido suficiente ou o método utilizado para a incorporação da vacina na ração não ter sido o melhor, falhas durante a realização do teste ELISA indireto como no manuseamento de material ou a escolha do material utilizado para o mesmo ou a dose utilizada de patógeno ter sido demasiado elevada para a infeção.

Palavras-chave: Aquacultura, Vacinação oral, Patologia, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, Resposta imune, RPS.

## Abstract

A trial was carried out at the CETEMARES building (Polytechnic of Leiria, Peniche, Portugal) which consisted in the administration of an experimental oral vaccine mixed in the feed, in sea bass of average weight ( $15.2 \pm 3.57$  g). The oral vaccine administered was a DNA vaccine using the pVAX-GFP protein as plasmid, encapsulated in chitosan nanoparticles. Randomly, 15 and 30 days after vaccination, blood samples were collected for an indirect ELISA test to assess the presence of antibodies generated by the vaccine. After these 30 days, an infection was made with 100  $\mu$ l of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* bacteria ( $2.4 \cdot 10^6$  CFU g<sup>-1</sup>), the infection control group were injected with PBS. The observed mortality was recorded, and organs (kidney, liver and spleen) were collected from the dying fish to detect the presence of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* bacteria and to prove that these individuals died from the bacteria.

As a result of this study, very low values of antibodies were produced during the vaccination time (34 days), causing in the infection test a 100% mortality in the vaccinated infected fish and an 83% mortality in the infected control, showing an RPS of 0% in the former. There was no mortality in the group that was administered PBS. With this, there are no statistically significant differences when comparing the antibody values of the vaccinated fish and the control and consequently there are statistically significant differences when comparing the mortality values between the infected and non-infected fish. A few faults and limitations may have contributed to these results such as the dose of vaccine administered was not sufficient or the method used for the incorporation of the vaccine in the feed was not the best, faults during the performance of the indirect ELISA test such as the handling of material or the choice of material used for the test or the dose of pathogen used was too high for infection.

Keywords: Aquaculture, Oral vaccination, Pathology, *Photobacterium damsela* subsp. *Piscicida*, Immune response, RPS.

## Índice

Índice de Tabelas .....	xii
Índice de Abreviaturas.....	xiii
1. Introdução .....	1
1.1 Doenças no robalo europeu <i>Dicentrarchus labrax</i> (Linnaeus 1758) .....	3
1.2 <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> ( <i>Phdp</i> ) .....	3
1.2.1 Pasteurelose.....	3
1.2.2 Patologia .....	4
1.2.3 Fatores de virulência.....	4
1.2.4 Transmissão .....	4
1.2.5 Características morfológicas, bioquímicas e serológicas.....	5
1.2.6 Diagnóstico e medidas de prevenção .....	5
1.2.7 Sistema imunitário dos peixes.....	6
1.2.8 Vacinação em aquacultura.....	7
1.2.9 Teste ELISA.....	12
2. Materiais e Métodos .....	14
2.1 Desenho experimental .....	14
2.1.1 Composição da Vacina Oral .....	14
2.1.2 Vacinação Oral.....	15
2.1.3 Pesquisa de anticorpos - Teste ELISA indireto .....	16
2.1.4 Preparação da bactéria <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> C4.....	17
2.1.5 Infecção com <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> .....	18
2.2 Cálculo da percentagem relativa de sobrevivência (RPS).....	19
2.3 Confirmação da infecção - Teste PCR.....	20
2.4 Análise estatística .....	20
3. Resultados .....	21
3.1 Vacinação Oral .....	21
3.1.1 Mortalidade.....	21
3.2 Infecção com <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> .....	21
3.2.1 Mortalidade.....	21
3.2.2 Cálculo RPS .....	22
3.3 Pesquisa de anticorpos - Teste ELISA indireto .....	22
3.4 Confirmação da infecção - Teste PCR.....	23
4. Discussão .....	25
5. Considerações finais e trabalhos finais.....	28
6. Referências .....	29



## Índice de Figuras

<b>Figura 1-</b> Capturas e produção de aquacultura a nível mundial (FAO, 2020) .....	2
<b>Figura 2-</b> Imunidade inata e adaptativa em peixes (Fan et al., 2018) .....	7
<b>Figura 3-</b> Representação esquemática do ensaio experimental para testar uma vacina oral de DNA em robalos ( <i>Dicentrarchus labrax</i> ). Aquários utilizados para a vacinação oral. Este procedimento foi feito em triplicado. Controlo (A1; A2; A3); Peixes vacinados com a vacina oral (B1; B2; B3) .....	16
<b>Figura 4-</b> Representação esquemática do ensaio experimental de infeção em robalos ( <i>Dicentrarchus labrax</i> ) com a bactéria <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> . Aquários utilizados para a infeção. Cada aquário de 60L foi dividido em 3 divisórias iguais (3x 20L) para ter triplicados e cada divisória contém 6 peixes, num total de 18 peixes por aquário. Controlo não infetado (A1;A2;A3); Controlo infetado (B1;B2;B3); Vacinados não infetados (C1;C2;C3); vacinados infetados (D1;D2;D3).....	19
<b>Figura 5-</b> Mortalidade cumulativa do ensaio: controlo infetado e vacinados infetados com <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> durante 10 dias em robalos ( <i>Dicentrarchus labrax</i> ).....	21
<b>Figura 6-</b> Imagem de um robalo ( <i>Dicentrarchus labrax</i> ) infetado com <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> com a bexiga hiperinsuflada.....	22
<b>Figura 7-</b> Valores médios de absorvância obtidos dos soros amostrados do ensaio de vacinação dos peixes controlo e vacinados nos tempos T0 T15 e T30, utilizando ELISA indireto .....	23
<b>Figura 8-</b> Detecção de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> em órgãos de peixes moribundos, através da amplificação dos genes Car (269 bp) e Pbp (277 bp). M-marcador molecular (50 bp, ThermoFisher, EUA); (-) -controlo negativo; (+) -controlo positivo; M1-peixe moribundo 1; M2-peixe moribundo 2; M3-peixe moribundo 3; M4-peixe moribundo 4.....	24

## **Índice de Tabelas**

<b>Tabela I-</b> Produção mundial de pescado e a sua utilização (Fonte: FAO, 2020) .....	1
<b>Tabela II-</b> Composição da Vacina oral de DNA.....	14

## Índice de Abreviaturas

**APCs** - Antigen-presenting cells (células apresentadoras de antígenos)

**BSA** - Bovine Serum Albumin

**CTL** - Linfócito T citotóxico

**DNA** - Deoxyribonucleic acid

**FAO** - Food and Agriculture Organization of the United Nations

*E.coli* – *Escherichia coli*

**ECPs**- Produtos extracelulares

**ELISA** - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

**GFP** - Green fluorescent protein (Proteína de Fluorescência Verde)

**HBSS** - Hank's Balanced Salt Solution

**HSWB** - Tampão de bloqueio de elevado teor de sal (High Salt Wash Buffer)

**ISS** - Sequências imunoestimulantes

**LC50**- lethal concentration

**LSWB** - Tampão de bloqueio de baixo teor de sal (Low Salt Wash Buffer)

**NaCl** - Cloreto de sódio

**OMP** - Outer membrane proteins (proteínas da membrana externa)

**Pbp**- *Putative penicillin-binding protein*

**PBS** - Phosphate buffered saline

**pDNA** - DNA de plasmídeo

*Phdp* - *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

**PCR** - Polymerase Chain Reaction

**RPS** - Relative Percentage Survival

**TMB** - Tetramethylbenzidine

**TPP** - Tripolifosfato de quitosano



## 1. Introdução

A aquacultura é uma importante fonte de proteína, sendo descrita como o cultivo de seres aquáticos, é um setor em grande expansão que requer uma pesquisa continua com aperfeiçoamento técnico, científico e de inovação. Os produtos provenientes de aquacultura (peixes, crustáceos, moluscos e plantas aquáticas) atingiram, em 2018, 82,1 milhões de toneladas de produção (FAO, 2020).

A pesca e a aquacultura forneceram cerca de 179 milhões de toneladas de pescado em 2018 e 156,4 desses milhões de toneladas destinaram-se ao consumo humano (Tabela I). Estima-se que em 2030 venha a ser a principal fonte de todo o pescado para consumo humano (Fazio, 2019).

**Tabela I** - Produção mundial de pescado e sua utilização (Fonte: FAO, 2020).

	1986-1995	1996-2005	2006-2015	2016	2017	2018
<b><u>Produção: (milhões de toneladas)</u></b>						
<b><u>Capturas</u></b>						
Interior	6,4	8,3	10,6	11,4	11,9	12,0
Marinha	80,5	83,0	79,3	78,3	81,2	84,4
<b>Total de capturas</b>	<b>86,9</b>	<b>91,4</b>	<b>89,8</b>	<b>89,6</b>	<b>93,1</b>	<b>96,4</b>
<b><u>Aquacultura</u></b>						
Interior	8,6	19,8	36,8	48,0	49,6	51,3
Marinha	6,3	14,4	22,8	28,5	30,0	30,8
<b>Total aquacultura</b>	<b>14,9</b>	<b>34,2</b>	<b>59,7</b>	<b>76,5</b>	<b>79,5</b>	<b>82,1</b>
<b>Total de pescas e aquacultura</b>	<b>101,8</b>	<b>125,6</b>	<b>149,5</b>	<b>166,1</b>	<b>172,7</b>	<b>178,5</b>
<b><u>Consumo humano</u></b>						
Consumo humano	71,8	98,5	129,2	148,2	152,9	156,4
<b>Utilização não alimentar</b>	<b>29,9</b>	<b>27,1</b>	<b>30,3</b>	<b>17,9</b>	<b>19,7</b>	<b>22,2</b>

Nota: Excluindo plantas aquáticas.

Com a necessidade de satisfazer a necessidade de alimento numa população mundial em constante crescimento e um setor de pescas em estagnação desde os anos 80 (Figura 1), a produção aquícola levou um grande incentivo de modo a conseguir corresponder à distinção

entre a procura e o consumo (Ahmed et al, 2019). Uma das vantagens apresentadas para este incentivo foi o facto da aquacultura, mesmo com uma produção elevada, é capaz de reduzir o impacto sobre os *stocks* de peixes selvagens, uma vez que a sobrepesca pode resultar num colapso ecológico (Gómez et al., 2019). Em 2018, a produção em aquacultura foi de 82,1 milhões de toneladas de pescado (peixes, moluscos bivalves e crustáceos), 32,4 milhões de toneladas de algas marinhas e 26 mil de peixes ornamentais (FAO, 2020).

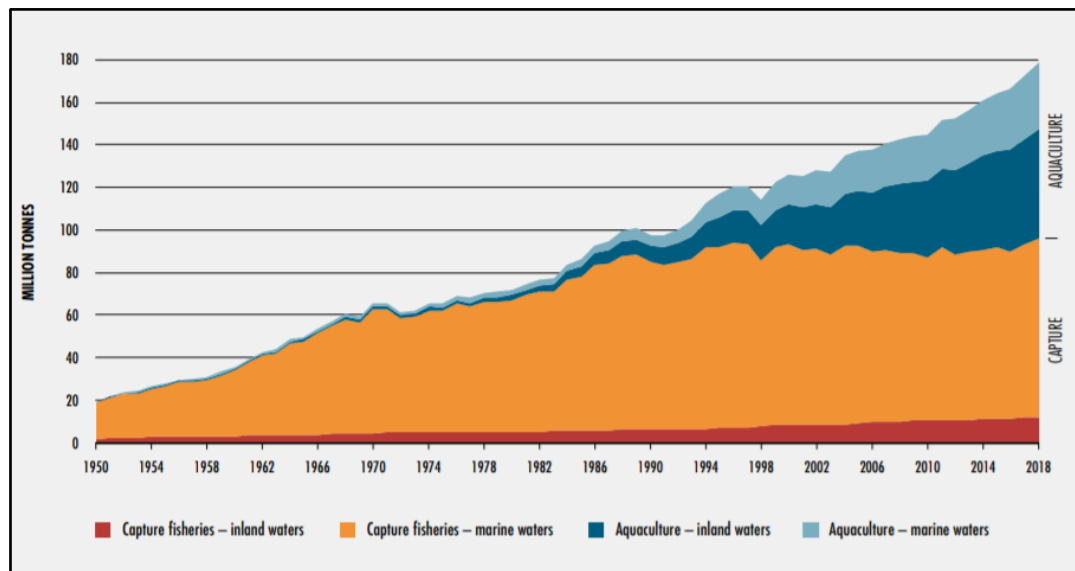


Figura 1 - Capturas e produção de aquacultura a nível mundial (FAO, 2020).

Em Portugal, as espécies de peixes mais produzidas em aquacultura são o pregado (*Scophthalmus maximus*), a dourada (*Sparus aurata*), o robalo (*Dicentrarchus labrax*) e o linguado (*Solea* sp.) (Agência Portuguesa do Ambiente, 2019).

O robalo e a dourada são as espécies de peixes marinhos que apresentam maior consumo, e com isso um elevado interesse comercial, e além disso demonstram vários aspetos biológicos que são favoráveis a uma boa produção (Fazio et al., 2013).

Os surtos patológicos são um dos problemas mais encontrados numa produção aquícola podendo causar perdas económicas significantes (Akayli et al., 2018). Estes podem ter várias origens como origem bacteriana, parasítica, viral ou fúngica (Dadar et al., 2017) diminuindo a proteção imunológica devido a condições stressantes que afetam a fisiologia do animal. Estes surtos podem ocorrer com o aumento da produção e o cultivo intensivo de longo prazo em curtos espaços que consequentemente podem levar à deterioração dos ambientes de aquacultura, contribuindo para o aparecimento e prevalência de doenças nos cultivos (Hwang et al., 2020). Para a ocorrência e desenvolvimento de uma patologia, tem que haver um resultado da interação entre o agente patogénico, o hospedeiro e o ambiente (Snieszko,

1974). Entre a lista de patógenos que afetam e têm grande impacto na produção global, está uma de origem bacteriana chamada *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (*Phdp*).

## **1.1 Doenças no robalo europeu *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus 1758)**

A produção em aquacultura de robalo europeu *Dicentrarchus labrax* tem um enorme peso na economia dos países produtores (Vandeputte, 2019). É uma produção aquícola relevante na bacia do Mediterrâneo (Miccoli, 2019), nomeadamente Turquia, Grécia, Egito e Espanha. A espécie é particularmente suscetível a doenças como micobacteriose, tenacibaculose, vibriose, pasteurelose e necrose nervosa vírica (Muniesa, 2020). Esses patógenos causadores de doenças têm ampla distribuição de gama de hospedeiros, aumentam a suscetibilidade a outros patógenos, causam elevadas taxas de mortalidade e consequentemente enormes perdas.

## **1.2 *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (*Phdp*)**

### **1.2.1 Pasteurelose**

*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (*Phdp*), da família Vibrionaceae, é responsável pela doença denominada de pasteurelose, em peixes. A sua primeira observação, em 1963, foi em populações de *Morone americanus* (robalo-do-norte) na Baía de Chesapeake (Snieszko et al., 1964) e, em Portugal, quando foi isolada em dourada, em 1996 (Baptista et al., 1996). A identificação de casos de pasteurelose é muito importante na medida em que é um agente patogénico causador de inúmeras perdas em todo o mundo, tanto em peixes selvagens como de cultivo. Desde os anos 90 que existem estudos tanto para identificar e conhecer o agente casual como para encontrar métodos para o seu combate, nomeadamente sob a forma de vacinas que proporcionam proteção limitada contra este patógeno, tendo algumas desvantagens como o elevado custo de produção (Eto et al., 2019). Esta doença é reconhecida como sendo uma ameaça para a produção em aquacultura marinha mundial devido à grande variedade de organismos hospedeiros (Bakopoulos et al., 2004) como a dourada (*Sparus aurata*), o robalo (*Dicentrarchus labrax*), o pregado (*Scophthalmus maximus*), a perca-amarela (*Perca flavescens*), a tainha (*Mugil cephalus*), o salmonete (*Mullus surmuletus*), o salmão do Atlântico (*Salmo salar*) e a truta (*Salmo trutta*).

## 1.2.2 Patologia

Trata-se de uma septicemia bacteriana que pode ou não apresentar sinais clínicos externos e pode ocorrer de duas formas: aguda e crônica. A forma aguda é a mais habitual da patologia, os sinais clínicos externos são pouco evidentes podendo ocorrer pequenas hemorragias nos opérculos ou na base das barbatanas e escurecimento da pele (Magariños et al., 1996; Romalde et al., 1999). Também que pode ser observada alteração no comportamento dos animais infetados como falta de equilíbrio, letargia e aumento da taxa respiratória, independentemente da espécie. Internamente, o baço, o pode sofrer aumento de tamanho e apresentar extensas zonas de necrose multifocal, hemorragias, bem como a possibilidade da destruição das lamelas branquiais (Hawke, 2012; Essam et al., 2016; Mladineo et al., 2006). Na forma crônica, os órgãos internos apresentam pontos brancos (0,5 a 3,5 mm de diâmetro) que consistem em acumulações bacterianas (Avci et al., 2013), dependendo da espécie, e se a infecção ocorreu de modo natural ou se foi induzida e se foram ou não utilizados antibióticos para combater a doença (Baptista et al., 1996; Magariños et al., 1996; Nagano, 2009; Noga, 2010).

## 1.2.3 Fatores de virulência

As temperaturas altas, a qualidade da água do cultivo e o stress a que os organismos estão sujeitos influenciam o desenvolvimento da doença. Os peixes podem ser portadores do patógeno (Avci et al., 2013) assintomáticos, por longos períodos infetando os restantes do cultivo.

Quando ocorre uma infecção, o agente patogénico tem como objetivo entrar no hospedeiro, multiplicar-se, resistir ou tentar não ativar mecanismos imunitários e, por fim, causar danos. Nas capacidades de aderência e invasão a *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, é capaz de sobreviver pelo menos seis dias no interior das células e propagarem-se de célula para célula (Magariños et al., 1996).

## 1.2.4 Transmissão

Os patógenos podem contaminar rapidamente populações de peixes cultivados, não apenas devido à densidade elevada, mas também na eficácia da transmissão do patógeno na água. A sua transmissão pode ser feita através do meio aquático envolvente, horizontalmente

de peixe para peixe e verticalmente através dos ovários e dos fluidos seminais (Austin et al., 1989; Magariños et al., 1996; Toranzo et al., 2005). Recorrendo a técnicas de anticorpos fluorescentes demonstrou-se, noutros estudos, que a infeção pode ocorrer através das brânquias ou do trato gastrointestinal através da água ou de alimentos contaminados. A pele também é uma via de entrada. Como por exemplo em dourada (*S. aurata*) e robalo (*D. labrax*) onde a infeção ocorre através da pele, uma vez que a *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* não é sensível ao seu muco, ao contrário do que se verifica para o pregado (*Psetta maximus*) que produz um muco para o qual a *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* é muito sensível (Magariños et al., 1994), ou seja, o modo de transmissão depende da espécie afetada.

### **1.2.5 Características morfológicas, bioquímicas e serológicas**

É uma bactéria gram-negativa com forma de bacilo sem mobilidade, halófila, anaeróbica facultativa, fermentativa que possui uma cápsula constituída por 99,6% de hidratos de carbono e 0,4% de proteína. A temperatura ótima de cultivo desta bactéria é entre 22,5 e 30°C (Romalde., 2002), salinidades que variam entre 20 e 30 ‰, com pH entre 5,5 e 8 (Austin et al., 2016).

### **1.2.6 Diagnóstico e medidas de prevenção**

Para o seu diagnóstico deve proceder-se ao isolamento da bactéria a partir dos órgãos internos, fígado, rim e baço, usando meios de cultura e depois através de ferramentas serológicas e moleculares como *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) e *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Fazio, 2019; Satheeshkumar et al., 2012). Por fim, para a sua prevenção, embora diversas vacinas tenham sido disponibilizadas contra *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, a sua eficácia depende da formulação, via, e estratégia de administração da vacina, da espécie, do tamanho dos indivíduos e da utilização de imunoestimulantes (Toranzo et al., 2009). A maioria dos surtos de pasteurelose ocorrem entre os estados larvares e os juvenis com 10-30g, recomendando-se uma primeira imunização no estado larvar e um reforço quando os indivíduos atingem aproximadamente 2g (Magariños et al., 1992; Toranzo et al., 2009).

### 1.2.7 Sistema imunitário dos peixes

O sistema imunológico dos peixes é constituído por dois sistemas: o inato e o adaptativo (Figura 2). O sistema inato é ativado após uma infeção, logo é uma resposta rápida do corpo do indivíduo, onde inclui as barreiras físicas (como pele, trato gastrointestinal, membranas, mucosas) (Secombes et al., 2012), inibidores de crescimento (como a transferrina e o interferão que interfere no transporte de ferro e impede o aumento do mesmo, respetivamente), inibidores de enzimas, lisinas, fatores celulares inespecíficos como fagócitos (macrófagos, neutrófilos) e moléculas ativadores de fagócitos (citocinas) (Vinay et al., 2017). Em oposição, o sistema adaptativo leva algum tempo a ativar-se (chega a ser dias após a infeção), embora, como vantagem, forneça memória específica ao cérebro do hospedeiro para futuras infeções (Secombes et al., 2012). Os linfócitos intervêm no sistema imune adaptativo através da imunidade humoral que é responsável pela produção de imunoglobulinas (Ig), pelas células B (Hansen et al., 2005). A memória imunológica é um tópico muito importante na resposta imune específica, que compreende a mudança adaptativa nas células linfoides. Isto funciona quando o peixe é exposto mais que uma vez a um certo patógeno, o seu sistema imunológico reconhece e imediatamente o destruirá antes que cause danos ao hospedeiro (Vinay et al., 2017). Esta é a base para a abordagem de uma vacinação bem-sucedida, a ativação do sistema imunológico inato e adaptativo é o principal objetivo quando as vacinas estão a ser desenvolvidas (Secombes et al., 2012).

O conhecimento mais detalhado dos mecanismos do sistema imune e células imunitárias envolvidas nas interações entre hospedeiro e patógeno é fundamental para entender e resolver os problemas da aquacultura presente, como patologias emergentes, o uso contínuo e excessivo de antibióticos, as alterações climáticas e introdução de espécies não nativas (Thompson, 2017). No caso do uso contínuo de antibióticos, tem como consequência o desenvolvimento de bactérias resistentes aos próprios antibióticos, o que reduz a sua eficácia terapêutica, complicando o seu tratamento e exercendo efeitos malignos e substanciais na saúde humana e no meio ambiente. Este cenário forçou a uma mudança de paradigma na gestão de doenças, do tratamento à prevenção, a vacinação, como método eficaz de prevenção de uma ampla gama de doenças bacterianas e virais que contribui para a sustentabilidade ambiental, social e económica na aquacultura global (Hwang et al., 2020).

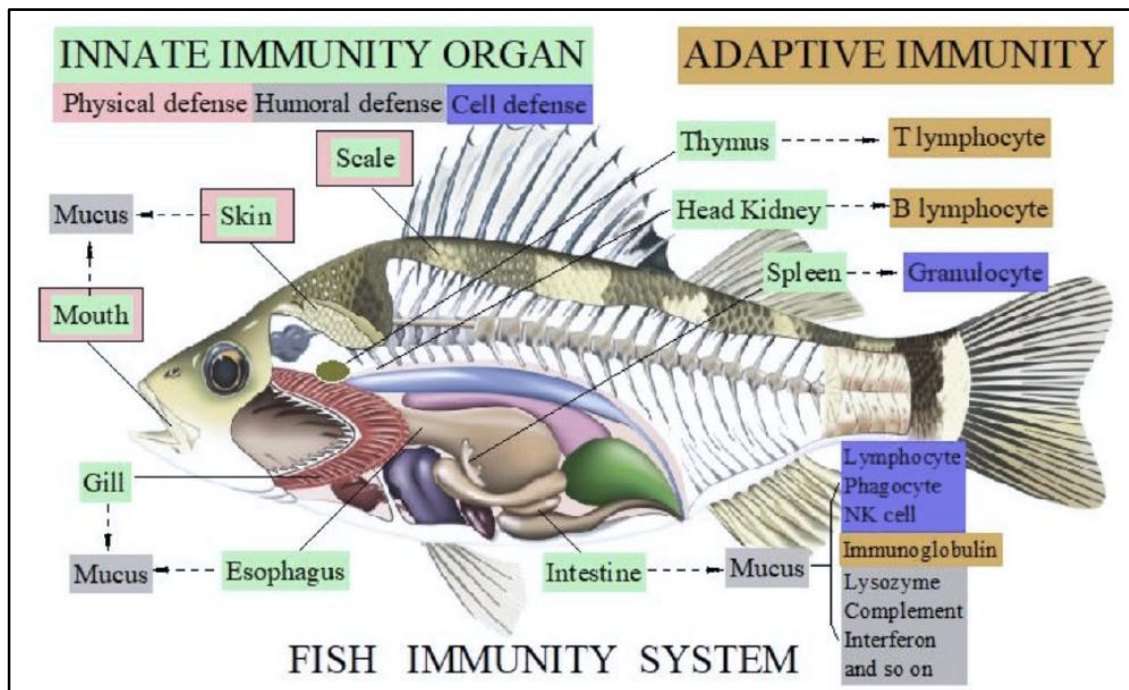


Figura 2- Imunidade inata e adaptativa em peixes (Fan et al., 2018)

### 1.2.8 Vacinação em aquacultura

As vacinas são usadas mundialmente, na aquacultura, no combate de doenças infecciosas (Criscuolo et al., 2019). A administração destas podem ser através de uma injeção intraperitoneal, por imersão ou oralmente (Adams, 2019).

Existem 4 tipos de vacinas: vacinas vivas atenuadas, vacinas inativadas, vacinas subunidades purificadas do patógeno ou recombinantes e vacinas de DNA. As vacinas vivas são vacinas em que utilizam, química ou geneticamente, o patógeno enfraquecido, ou seja, utilizam o patógeno vivo para induzir uma resposta imune no hospedeiro por um curto período de tempo (Adams et al., 2014). Este tipo de vacinas é um modelo de simulação de uma infecção possível numa produção em aquacultura, em que o hospedeiro terá de eliminar o patógeno somente com o próprio sistema imunitário, estimulando melhor o mesmo para futuras infecções (Gudding et al., 1999), e conseqüentemente, visto que os peixes vacinados podem ter um papel importante na propagação através do meio envolvente, vai disseminar o antígeno produzido ao resto da população, sendo que este facto que só acontece a longo prazo (Clark et al., 2005). Estas fornecem proteção aceitável a nível industrial e até excelente a nível experimental, mas revelam desvantagem, na medida em que a administração da mesma pode causar virulência residual, contaminando o meio envolvente e espécies não-alvo (Allnutt et al., 2011; Salgado-Miranda et al., 2014); As vacinas inativadas são as mais usadas comercialmente na aquacultura, que utilizam patógenos inativos, produzidos pela

multiplicação ou replicação dos mesmos e, em seguida, submetidos a agentes inativadores, como a formalina, tendo como vantagem a morte de todos os microrganismos sem afetar a indução da imunidade protetora dos patógenos à vacina, em contrapartida fornecerem uma proteção ao hospedeiro relativamente baixa em relação a outros tipos de vacinas (Dadar et al., 2016); As vacinas recombinantes são produzidas usando sistema de expressão de proteínas incluindo bactérias e leveduras, não são muito utilizadas em grande escala tendo limitações como uma proteção muito limitada e há a necessidade de produção de grandes quantidades de vírus vivos por técnicas de cultura de células promovendo perigo e dificuldades na produção mas são consideradas mais seguras do que as vacinas vivas, produzindo uma maior quantidade de antígenos e de uma maior e mais forte resposta imune (Shahin et al., 2020); Por fim, as vacinas de DNA consistem numa vacina com DNA de plasmídeo que resultará na expressão genética de proteínas nos peixes vacinados. Estas têm sido amplamente estudadas porque podem entregar moléculas antigénicas/DNA de forma eficiente e na concentração desejada (Zhu et al., 2015) tendo convenientes como o facto de como só codifica um único gene, pode haver a possibilidade de virulência e colocar a segurança ambiental na aquacultura em risco (Dadar et al., 2016).

As vacinas comercialmente disponíveis para peixes são feitas de bactérias inativadas e são aplicadas por imersão ou injeção com adjuvantes principalmente adjuvantes de óleos (Heppell & Davis, 2000), sendo que existem para a maioria das espécies de peixes de aquacultura, a maioria delas tem como alvo bactérias e alguns vírus (Embregts et al., 2016).

A vacinação de peixes pode prevenir ou mitigar a propagação de doenças com eficácia comprovada contra muitos patógenos relevantes. A vacina contra a doença da boca vermelha entérica (causada por *Yersinia ruckeri*) desenvolvida na década de 70 foi a primeira a tornar-se disponível comercialmente (Gudding, 2013).

A etapa mais crucial no desenvolvimento de uma vacina eficaz é a identificação de antígenos “potencialmente” protetores e a confirmação da sua resposta protetora na espécie hospedeira contra o patógeno de interesse (Adams, 2019). A sua eficácia depende de vários fatores, tais como a espécie de peixe, o seu tamanho e da utilização de imunoestimulantes (Toranzo et al., 2005). Uma vacina típica para peixes contém ou produz uma substância que serve como um antígeno, este componente estimula uma resposta imune dentro dos peixes contra um patógeno particular. A definição de uma vacinação eficiente é a componente chave para combinar requisitos necessários para uma produção piscícola sustentável e saudável. Muitos esforços foram e estão a ser feitos na investigação de peixes na parte da imunobiologia para reunir o conhecimento necessário para uma vacinação eficaz (Adams, 2019). No conhecimento da eficácia de uma vacina são usados vários métodos como, o teste ELISA

para determinar a concentração de anticorpos produzidos pela administração da mesma e a percentagem relativa de sobrevivência (RPS).

### **1.2.8.1 Vacinas orais em aquacultura**

Embora as vacinas injetáveis causem uma diminuição significativa da mortalidade nos surtos de doenças em aquacultura (Tafalla, 2014), o seu custo de mão de obra é elevado, sendo um procedimento mais stressante para o peixe e não sendo viável em peixes pequenos (Gudding et al., 2013). Teoricamente, o uso de vacinas orais seria o método ideal pela sua facilidade prática, pelo facto de o intestino ser uma rota atraente por oferecer uma forma de administrar antígenos mais segura e menos stressante, mas não têm sido muito utilizadas por falta geral de eficácia e curta duração de proteção (Munang'andu, 2015). O ambiente gastrointestinal proporciona condições adversas para a degradação de biomateriais, como o DNA (Farris et al., 2016), isto proporciona respostas fracas e inconsistentes nas vacinas orais. Para ultrapassar têm sido desenvolvidas diferentes abordagens para proteger o antígeno da degradação, mas a falta de informação relevante ao sistema imunológico restringe o desenvolvimento de vacinas orais (Munang'andu, 2015).

Para uma administração bem-sucedida, é importante examinar minimizar a perda de ração, administrar uma dosagem média consoante o peso médio dos peixes através da consulta de uma tabela de alimentação. A administração oral de antígenos através da alimentação aumentará o recrutamento de células imunológicas bem como a produção de anticorpos pois o intestino permite a absorção desses antígenos e causa menos stress ao peixe (Mutoloki et al., 2015). Devido à sua grande área superficial altamente vascularizada e com mucosas, o trato intestinal é um bom órgão alvo para a ingestão e absorção de uma vacina oral (Sharma et al., 2017). A mucosa intestinal é constituída por uma lamina própria que é rica em células apresentadoras de antígenos (APCs) (Farris et al., 2016). Estas incluem as células B, macrófagos e células dendríticas, que são amplamente distribuídas nos tecidos e são as principais células do sistema imunológico. Os macrófagos e as células conseguirão, por exemplo, capturar nanopartículas que encapsulam o DNA no início da resposta imune (Sharma et al., 2017). As APCs fornecem proteção, tanto a resposta inata como a adaptativa interagem com as células T ligando as respostas, estas são essenciais para o sucesso imune na proteção e para uma entrega eficiente das vacinas de DNA (Farris et al., 2016).

No entanto, existem problemas neste método de vacinação como a autoimunidade, a falha em induzir fortes respostas imunológicas, o “DNA estranho” puder causar implicações ao se integrar com o DNA celular e a degradação da própria vacina oral pelo meio gástrico.

Na tentativa de resolução deste problema foram desenvolvidas várias abordagens para proteger o DNA como, por exemplo, encapsular a vacina em nanopartículas (Kumar et al., 2008).

Com a administração oral de antígenos, a regulação dos genes relacionados ao recrutamento de células imunológicas e a produção local de anticorpos aumentarão, sendo mesmo assim uma proteção adquirida variável. Esta variação está ligada à natureza dos antígenos, formulação e a dosagem administrada. Para uma dosagem de vacina oral ótima é importante saber os desperdícios de ração e o ganho de peso dos animais após o período de administração de alimento com vacina (Mutoloki et al., 2015).

A maioria das vacinas disponíveis hoje é administrada por injeção, e há evidências convincentes de que a eficácia imunológica não é significativa na indução de imunidade em superfícies mucosas. Infelizmente, a maioria dos patógenos passa por essas superfícies mucosas para invadir o corpo (Ellis, 1998). A vacinação oral, uma via ideal de imunização, pode induzir imunidade mucosa significativa no trato gastrointestinal quando comparada com outras vias imunológicas. No entanto, um grande desafio enfrentado pela indústria é como construir transportadores adequados para distribuição oral (Tian et al., 2008).

### **1.2.8.2 Vacinas de DNA**

A pesquisa atual de vacinas é orientada para a substituição de vacinas convencionais por vacinas novas mais eficazes e mais seguras, como as vacinas de DNA. A imunização com DNA plasmídeo, que codifica o antígeno, pode desencadear uma forte resposta imune a nível humoral e celular. Esta abordagem também oferece economia, meio ambiente seguro entre outras vantagens que são atrativas na indústria da aquicultura (Kumar et al., 2007).

As vacinas de DNA são constituídas por DNA de plasmídeos que contêm sequências de codificação de antígenos e de proteínas específicas. O DNA plasmídeo (pDNA) é uma molécula de DNA circular de dupla cadeia. A imunização deste que codifica o antígeno pode desencadear respostas imunes humorais (anticorpos) e celulares muito fortes e duradoras (células T) (Schirmbeck et al., 2001). São vacinas eficazes, tecnicamente simples, seguras (vacina não viva) que adicionalmente induzem linfócitos T, fazendo com que o hospedeiro gere imunização sistemática contra a entrada de patógenos sem provocar nenhum risco de infecção e o seu custo baixo. Além disso, é uma molécula muito estável e fácil de transportar e armazenar até ao local de uso sendo altamente específicas (Hasson et al., 2015). Para a entrega eficiente do gene, o DNA do plasmídeo deve ser introduzido nas células-alvo, transcrito e a informação genética, em última análise, traduzida na proteína correspondente

(Guliyeva et al., 2006). Os desafios que podem ocorrer neste tipo de vacinas estão relacionados com a integração do DNA da vacina com o DNA celular e causar implicações, a autoimunidade, a resistência a antibióticos, a baixa imunogenicidade bem como estar limitado a antígenos da proteína e a degradação do DNA (Kutzler et al., 2008; Robinson et al., 2000).

A utilização de proteínas da membrana externa (OMPs) como plasmídeo nas vacinas de DNA mostraram-se ser eficazes contra infecções bacterianas por serem altamente antigénicas (Ninggiu, 2008).

### **1.2.8.3 Nanopartículas usadas nas vacinas**

As nanopartículas são partículas coloidais sólidas com propriedades físicas e químicas únicas devido à sua grande área de superfície e tamanho na nano escala (10nm a 1000nm) bem como a sua reatividade e resistência (Khan et al., 2019).

No desenvolvimento de vacinas, estas nanopartículas abriram oportunidades, podendo ser classificadas de acordo com o sistema de entrega ou como adjuvante. Estes primeiros, podem transportar o antígeno às células imunes direcionadas ao mesmo tempo para a proteção do conteúdo da vacina (Vinay et al., 2017). Podem ajudar na eficiência da vacina protegendo os antígenos da degradação proteolítica, facilitando a captura do antígeno e o seu processamento pelas APCs e sendo transportadoras de substâncias conseguem libertar lentamente e de forma controlada a substância que está a transportar, melhorando-lhe a solubilidade e a estabilidade, aumentando a eficácia e diminuindo a toxicidade. Devido ao seu reduzido tamanho, conseguem atravessar barreiras biológicas *in vivo* para fazerem a entrega do antígeno (Wang et al., 2011). Mas também há desvantagens, sendo a principal a eliminação destas pelo sistema imunológico por serem corpos estranhos (Busatto et al., 2019).

### **1.2.8.4 Nanopartículas de quitosano- tripolifosfato de quitosano (TPP)**

O quitosano é um polissacarídeo biodegradável natural, podendo ser encontrado em no exoesqueleto dos insetos, crustáceos e nas paredes celulares de fungos e algas (Mohammed et al., 2017). Está provado que o quitosano não é tóxico nos animais (Rao et al., 1997) nem nos humanos (Aspden et al., 1997). Foi demonstrado também, que o quitosano se liga efetivamente ao DNA em solução salina ou de ácido acético e protege parcialmente o DNA

da degradação da nuclease (MacLaughlin et al., 1998; Mao et al., 1996; Richardson et al., 1999).

Nanopartículas produzidas por gelificação iônica são dos nanossistemas mais usados e estudados para a entrega de substâncias. Um exemplo é o tripolifosfato de quitosano (TPP). Este é obtido sobre algumas vantagens como condições favoráveis sem envolver altas temperaturas, solventes orgânicos, baixa toxicidade e custos e sem restrições de manuseio e armazenamento proporcionam uma vantagem neste tipo de administração de vacina que demonstra ter alguns obstáculos na sua digestão. Depois de adicionar o TPP, as nanopartículas são formadas por um meio inter e intramolecular criando ligações entre o grupo fosfato (TPP) e o grupo amino (quitosano) (de Pinho Neves et al., 2014). Posteriormente, estas nanopartículas com o TPP são misturadas com o pDNA para o encapsular.

#### **1.2.8.5 Vacinação comercial contra o patógeno *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida***

O desenvolvimento de vacinas contra a pasteurelose tem sido objeto de numerosas investigações e estudos desde o século XX (Kitao et al., 1981; Salati et al., 1987; Magariños et al., 1994). As técnicas bacterianas específicas permitem a preparação de antígeno de boa qualidade para a produção de uma vacina convencional (Le Breton, 2009).

No controlo da pasteurelose, inicialmente, começou-se a administrar antibióticos nas rações após o aparecimento dos sintomas clínicos entre as fases larvares e juvenis com peixes de 10 a 30 g. Atualmente encontra-se disponíveis variadas vacinas que previnem a infeção por *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* como a da empresa HIPRA com uma vacina chamada *ICTHIOVAC® VR / PD*, que consiste numa vacina inativada contra a vibriose e pasteurelose em emulsão injetável (RPS ≥ 60%); *AQUAVAC Photobac Prime™*, que é uma vacina de imersão inativada para robalo e dourada; *AQUAVAC® Vibrio Pasteurella*, vacina injetável para a prevenção da pasteurelose no robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*).

#### **1.2.9 Teste ELISA**

ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) é um teste imunoenzimático que permite a deteção de anticorpos específicos, por exemplo, no plasma sanguíneo, ou seja, teste sorológico imunoenzimático cuja metodologia se baseia em reações antígeno-anticorpo

detetáveis através de reações enzimáticas. O teste é realizado começando por ligar um reagente a uma fase sólida (por exemplo, placas de ELISA com 96 poços), de seguida há a adição de um reagente (soro específico) e é nesta fase que ocorre o reconhecimento de antígeno-anticorpo, caso haja especificidade. O anticorpo adicionado é ligado a uma enzima. Após um período de incubação, através de lavagens, vai ocorrer a separação dos reagentes não específicos. Posteriormente, adiciona-se um substrato específico para a enzima utilizada para produzir uma cor e quantificar a reação, esta mudança de cor vai ocorrer se houver uma ligação antígeno-anticorpo, configurando um resultado positivo (Paulie et al., 2006).

Existem vários tipos de ELISA; ELISA direto é um procedimento básico do ELISA, um anticorpo alvo é imobilizado numa superfície sólida (microplacas) e detetado com um anticorpo específico para o antígeno. Para a deteção, o anticorpo é conjugado diretamente com moléculas de deteção (por exemplo, HRP) (Kolossova et al., 2005); ELISA indireto, é uma técnica que usa um processo de duas etapas para deteção, em que um anticorpo primário específico para o antígeno se liga ao alvo e um anticorpo secundário marcado contra a espécie hospedeira do anticorpo primário se liga ao anticorpo primário para deteção. O antígeno é imobilizado na superfície da microplaca. O método também pode ser usado para detetar anticorpos específicos numa amostra de soro, substituindo o anticorpo primário pelo soro (Shoemaker et al., 2008); ELISA sanduíche, é o mais usado e este método requer dois anticorpos específicos para diferentes porções do antígeno. Esses dois anticorpos são normalmente chamados de pares de anticorpos combinados. Um dos anticorpos é revestido na superfície da microplaca e usado como um anticorpo de captura para facilitar a imobilização do antígeno, o outro anticorpo é conjugado e facilita a deteção do antígeno (Fæste et al., 2008); ELISA competitivo, este método mede a concentração de um antígeno por deteção de interferência de sinal. Cada um dos métodos de ELISA anteriores pode ser adaptado ao método competitivo. Consiste numa competição entre o antígeno de mostra e o antígeno de referência na ligação a uma quantidade específica de anticorpo marcado. Este antígeno de referência é pré-revestido em uma microplaca e a amostra usada é pré-incubada com o anticorpo marcado e adicionada aos respetivos poços. Os anticorpos livres disponíveis para se ligar ao antígeno de referência dependem da quantidade de antígeno presente na amostra, ou seja, quanto mais antígeno houver na amostra obtida, menos antígeno de referência será detetado e mais fraco será o sinal obtido (Li et al., 2021).

Esta dissertação tem como objetivo avaliar a eficácia de uma vacina de DNA utilizando a sequência do fragmento 6 da proteína pVAX–GFP como plasmídeo, encapsulado em nanopartículas de quitosano administrada na ração de robalo (*Dicentrarchus labrax*).

## 2. Materiais e Métodos

O presente estudo foi realizado sob a supervisão de uma especialista credenciada, em ciência de animais de laboratório, pela Autoridade Veterinária Portuguesa (seguindo as recomendações da categoria C da FELASA), de acordo com as diretrizes sobre proteção de animais utilizados para fins científicos pela Diretiva Europeia 2010/63/UE e ao abrigo da autorização de projeto 0421/000/000/2019.

### 2.1 Desenho experimental

#### 2.1.1 Composição da Vacina Oral

A vacina foi desenvolvida no Instituto Superior Técnico, em Lisboa. Na produção do pDNA, foi utilizada uma estirpe DH5 $\alpha$  da bactéria *Escherichia coli* que foi cultivada e purificada. O plasmídeo utilizado foi um plasmídeo comercial pVAX1lacZ sendo modificado por substituição do gene  $\beta$ -galactosidase pelo gene aprimorado da proteína fluorescente verde (GFP). Este foi expresso, extraído e purificado. Para encapsular o pDNA, este foi pré-aquecido a 55°C, centrifugado a 2500rpm durante 30 minutos à temperatura ambiente. Depois juntaram-se as nanopartículas de quitosano (Sigma), o tripolifosfato (TPP 85% puro) (Acros Organics), água, ácido acético glacial (Acros Organics) e o pDNA num *speed-vac*<sup>TM</sup> (Thermo Scientific<sup>TM</sup>). Na Tabela II apresenta-se a composição da vacina oral de DNA utilizando a sequência do fragmento 6 da proteína pVAX–GFP, encapsulado em nanopartículas de quitosano.

**Tabela II-** Composição da vacina oral de DNA

Nanopartículas de quitosano - TPP	pVAX – GFP (fragmento 6)	pDNA
5ml de quitosano (3mg/ml) pH3,5; 2ml TPP (0,75mg/ml); 0,5% ácido acético glacial	Concentração 526ng/ $\mu$ l com um volume final de 200 $\mu$ l e uma massa total 105,3 $\mu$ g	731,25 $\mu$ g de pDNA

##### 2.1.1.1 Preparação da vacina oral

A quantidade de vacina produzida foram 35ml, sendo que a concentração de DNA a administrar foi de 9,375  $\mu$ g por peixe.

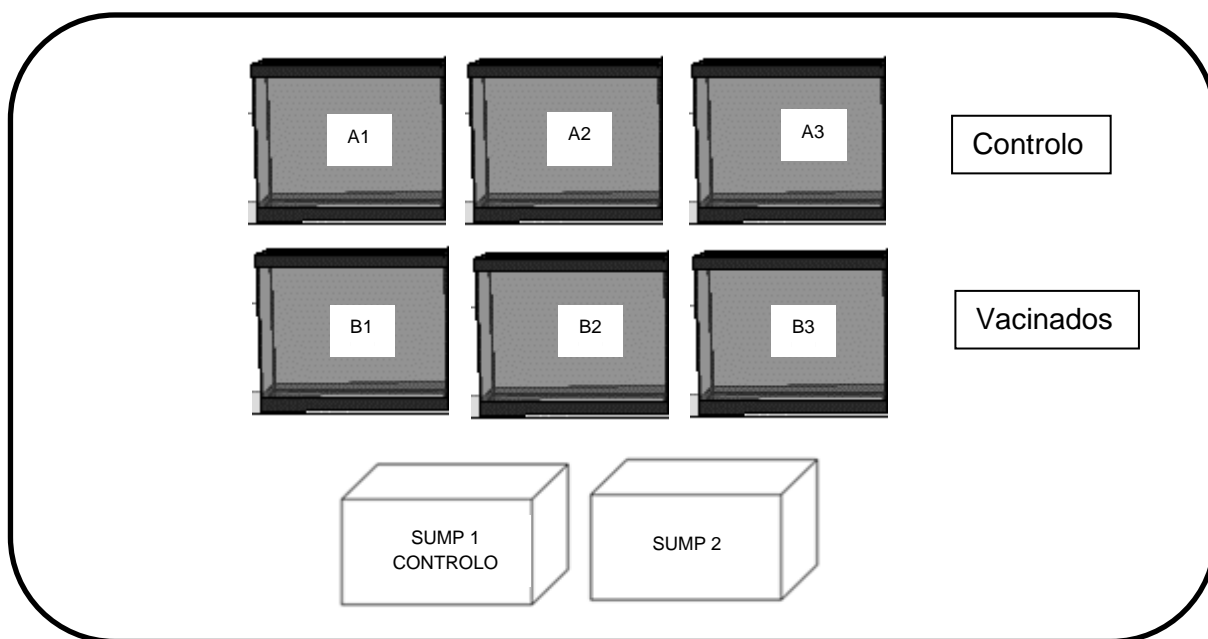
Na preparação da ração com a vacina oral, foi determinada a quantidade de alimento a fornecer com base numa tabela de alimentação, de acordo com o número de peixes e peso (biomassa) assim como a temperatura da água, tendo-se calculado que a quantidade de ração a administrar diariamente seria equivalente a 1,6% da biomassa. Assim sendo, foi preparada uma quantidade total de ração a fornecer durante os 5 dias (Kumar et al., 2008) de 6,24g por dia.

A quantidade de ração foi borrifada com o volume de 35 ml da vacina oral, humedecendo-se a ração que depois se deixou a secar ao ar durante 48 horas à temperatura ambiente (24°C) da sala.

### **2.1.2 Vacinação Oral**

Para a realização do ensaio da vacinação utilizaram-se 156 juvenis de robalo (*D. labrax*) adquiridos à empresa Nasharyba. Aquando da sua chegada, fizeram quarentena e depois foram transferidos para o sistema RAS de 2000 litros tendo ocorrido um período de aclimação. Durante este período foram alimentados à saciedade, registada a mortalidade e medidos diariamente parâmetros de qualidade da água, como temperatura, oxigénio dissolvido, amónia e nitritos.

O sistema experimental utilizado é composto por seis aquários (de 60 litros), três tanques para o tratamento controlo (aquários A1, A2, A3) e três tanques para os peixes vacinados (aquários B1, B2, B3) (figura 3). Os robalos foram distribuídos aleatoriamente, sendo colocados 26 peixes por aquário. No dia em que se iniciou a vacinação, os robalos foram pesados individualmente, apresentando um peso médio de  $15,2 \pm 3,57$  g. Cada sistema possuía um sistema de recirculação de água, composto por um filtro mecânico (lã de vidro), filtro biológico (biobolas) e bombas de circulação de água. Os indivíduos foram alimentados diariamente de acordo com a tabela de alimentação. A mortalidade foi registada e foi observado o comportamento dos peixes. Foram efetuadas rotinas diárias de limpeza (sifonagem dos tanques, limpeza das lãs de vidro), medições dos parâmetros da qualidade da água (Professional Plus, YSI) nomeadamente a temperatura da água ( $18,88 \pm 0,48$  °C), oxigénio dissolvido ( $7,04 \pm 0,27$  mg L<sup>-1</sup>), pH ( $8,3 \pm 0,1$ ) e salinidade ( $32,4 \pm 0,21$ ) e efetuadas trocas de água dos sistemas quando necessário.



**Figura 3** – Representação esquemática do ensaio experimental para testar uma vacina oral de DNA em robalos (*Dicentrarchus labrax*). Aquários utilizados para a vacinação oral. Este procedimento foi feito em triplicado. Controlo (A1; A2; A3); Peixes vacinados com a vacina oral (B1; B2; B3)

Este ensaio decorreu em simultâneo com o de outra estudante do Politécnico de Leiria, numa dissertação para avaliar o efeito de uma vacina de DNA injetável, sendo que o tratamento controlo foi comum aos dois ensaios. Assim sendo, antes da administração da vacina, os peixes fizeram um jejum de 24 horas (Paolini et al., 2005). No tratamento controlo, os peixes foram injetados intraperitonealmente com 120 µl de PBS (*Phosphate buffered saline*) estéril por peixe. Nos tanques do tratamento, a vacina foi administrada tendo em conta 1,6% da biomassa de cada tanque. O período do ensaio foi de 34 dias, desde o início da administração da vacina oral, correspondendo a 539 graus dia.

### 2.1.3 Pesquisa de anticorpos - Teste ELISA indireto

Foram efetuadas amostragens nos dias 0 (T0) antes da vacinação e 15 (T15), 30 (T30) após a vacinação em dois indivíduos de cada aquário, para pesquisa de anticorpos. Individualmente, os indivíduos foram transportados dos aquários para uma tina com 2-fenoxietanol (0,5 mL L<sup>-1</sup>), com arejamento para os anestésiar. Depois de anestesiados, foram recolhidas amostras de sangue da veia caudal com uma seringa não heparinizada (Acofar, Norm-ject 25gx5/8 0,5x16mm de 1ml), colocadas em microtubos de 1,5 mL, que foram mantidos durante a noite a 4°C. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas durante 7 minutos a 3000g numa centrífuga (Eppendorf 5810R). De seguida recolheu-se o soro

(sobrenadante) para novos microtubos de 1,5mL que foram armazenados a -80°C até serem usados para as análises.

O método utilizado para a pesquisa de anticorpos consistiu no ensaio de imunoabsorção enzimática também conhecido por ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) indireto, utilizando as amostras de soro obtidas nos três tempos de amostragem. As placas de ELISA (Greiner bio-one) foram revestidas com 100µl da bactéria *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* ( $1 \times 10^8$  UFC ml<sup>-1</sup>) e incubadas a 4°C durante a noite. No dia seguinte, usando um tampão de baixo teor de sal LSWB (*Low Salt Wash Buffer*): 0,002M Trizma (Sigma T1503); 0,38M NaCl (VWR Chemical 27810295); 0,05% Tween-20 (Fisher T/4206/60); pH 7,3), as placas foram lavadas três vezes, adicionando posteriormente 250µL poço<sup>-1</sup> do tampão de bloqueio (3% de caseína - leite desnatado (Marvel) com água destilada) e incubadas durante 2h à temperatura ambiente. Ao fim deste tempo, foram lavadas novamente com o LSWB. Após a lavagem, foi adicionado 100µL poço<sup>-1</sup>, de soro dos peixes (diluições de 1:32; 1:64; 1:128; 1:256; 1:512; 1:1024; 1:2048) e para o controlo negativo adicionou-se 100µL poço<sup>-1</sup> de PBS, ficando a placa a incubar durante a noite a 4°C. No dia seguinte, lavou-se a placa cinco vezes com um tampão de elevado teor de sal chamado HSWB (*High Salt Wash Buffer*: 0,02M Trizma; 0,5M NaCl; 0,1% Tween-20; pH 7,7) e na última lavagem deixou-se repousar durante 5 minutos adicionando-se posteriormente 100µL poço<sup>-1</sup> de *anti-European seabass IgM Mab* (Aquatic Diagnostic, Lda) diluído 1:100 (v/v), deixando-se incubar por 1h à temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas cinco vezes com HSWB, como descrito anteriormente, e deixou-se a incubar durante 1h com 100µL poço<sup>-1</sup> de *anti-mouse IgG-HRP* (Sigma A4416) diluído 1:1000 (v/v). As placas foram novamente lavadas com HSWB cinco vezes, adicionando-se depois 100µL poço<sup>-1</sup> de substrato (0,1M de ácido cítrico (Sigma C1909); 0,1M acetato de sódio (Sigma S7545) pH 5,4; 42mM 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (Sigma T8768); 5µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) deixando a incubar no escuro durante 10 minutos à temperatura ambiente. Para parar a reação, depois desse tempo, foi adicionado 50µL poço<sup>-1</sup> de ácido sulfúrico (2M; Sigma-Aldrich 320501). Posteriormente, leu-se a absorvância no leitor de microplacas (Epoch™, Biotek® Instruments, Inc., EUA) a 450nm. Na análise dos dados, fez-se a média do controlo negativo e de todas as absorvâncias de cada diluição feita. Os valores negativos não foram considerados e os positivos são considerados valores correspondentes às diluições mais elevadas. Por fim, foram transformados em valores logarítmicos de base 2.

#### **2.1.4 Preparação da bactéria *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* C4**

Para o crescimento da bactéria *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* estirpe C4, gentilmente cedida pela Doutora Florbela Soares (EPPO, IPMA). Esta foi descongelada,

semeada em meio de cultura Marine Agar (DIFCO) e mantida numa estufa (Memmert ICO 105) a uma temperatura de  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$  por 24/48 horas. Seguidamente, na câmara de fluxo laminar (*Laminar flow chamber Telstar*, Bio II Advance 4), as colónias obtidas com uma zaragatoa foram transferidas para o meio líquido meio Marine Broth (Panreac Applichem), em *falcons* de 50ml, ficando em estufa de incubação (IKA <sup>TM</sup> 0003510000 KS 4000) com agitação contínua num período 48-72 horas a  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, os *falcons* foram centrifugados durante 30 minutos a 3500rpm a  $4^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, rejeitou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em PBS e agitou-se no vortéx. Depois colocou-se 1 mL desta suspensão numa cuvette para ler a absorvância no espectrofotómetro (Epoch<sup>TM</sup>, Biotek® Instruments, Inc., EUA) a 600 nm e 1 mL de PSB (branco). A absorvância pretendida tinha de estar entre 0,75-0,83 que corresponde a uma concentração de  $10^8$ .

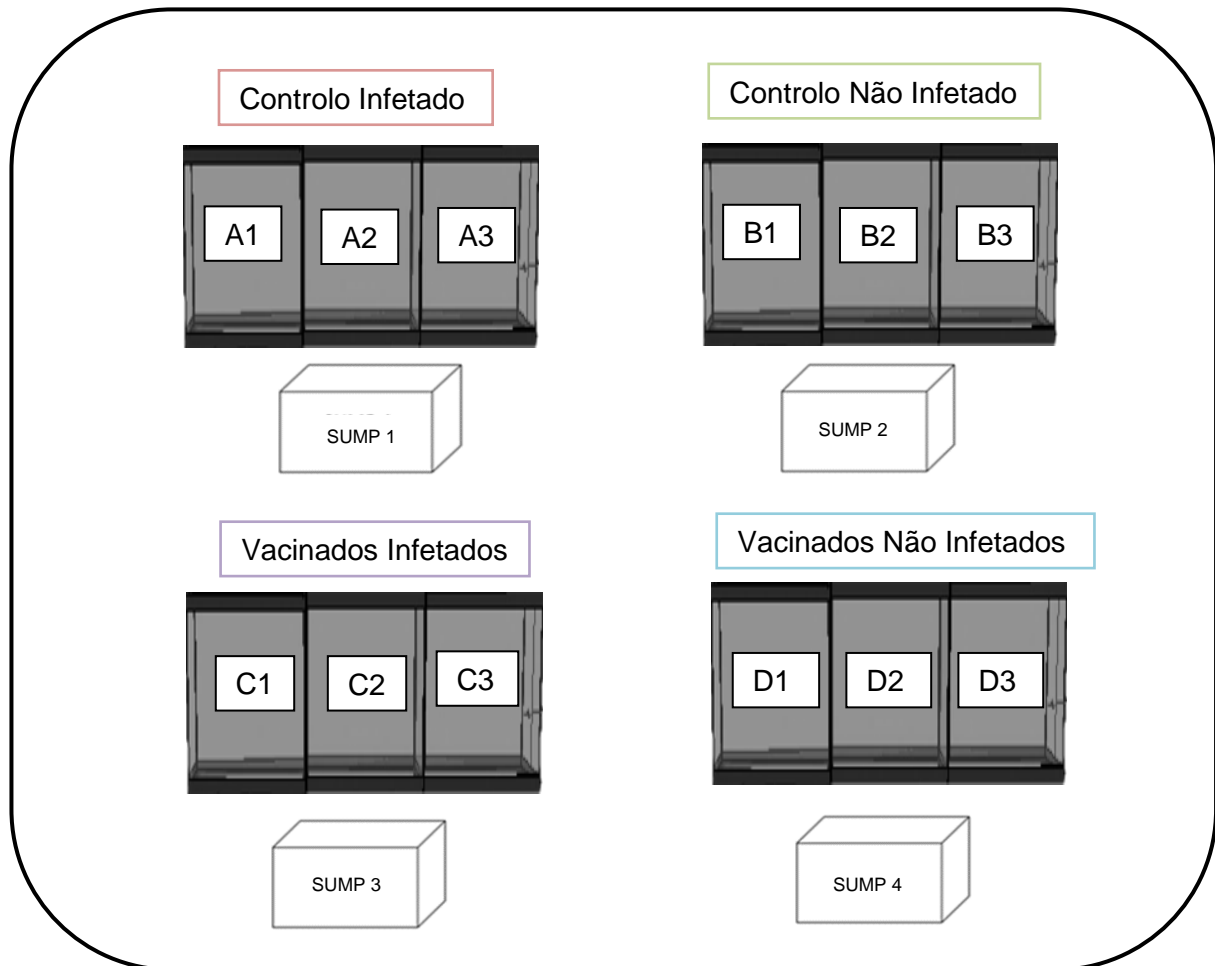
### **2.1.5 Infeção com *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida***

O sistema experimental era composto por quatro aquários (de 60 litros) divididos em três divisórias iguais (20L\*3), para fazer triplicados (Figura 4). Cada aquário continha 18 peixes, 6 por divisória, sendo divididos da seguinte forma: controlo não infetado (A1; A2; A3); controlo infetado (B1; B2; B3); vacinados não infetados (C1; C2; C3); vacinados infetados (D1; D2; D3) (Figura 5). Cada aquário possuía um sistema de recirculação de água, composto por um filtro mecânico (lã de vidro), filtro biológico (biobolas) e bombas de circulação de água.

Os peixes fizeram jejum durante 24 horas antes da infeção. Os peixes foram individualmente anestesiados. Nos peixes dos tratamentos controlo não infetados e vacinados não infetados foi-lhes injetado, na zona intraperitoneal, utilizando uma seringa (Acofar, Normject 25gx5/8 0,5x16mm de 1ml), 100µl de PBS estéril. Nos peixes dos tratamentos controlo infetados e vacinados infetados foi-lhes injetado 100 µl de bactéria *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* ( $2,4\times 10^6$  UFC g<sup>-1</sup>). Todos os peixes foram colocados nos respetivos aquários e o ensaio teve uma duração de 10 dias.

Durante todo o período de infeção, os indivíduos foram alimentados diariamente. A mortalidade foi registada e observado o comportamento dos indivíduos. Foram efetuadas rotinas diárias de limpeza (sifonagem dos tanques, limpeza das lãs de vidro), medições dos parâmetros da qualidade da água temperatura ( $22,5\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ), salinidade ( $32,5\pm 0,2$ ) e oxigénio dissolvido ( $6,94 \pm 0,2$  mg L<sup>-1</sup>) e efetuadas trocas de água dos sistemas quando necessário. A quatro peixes que apresentavam sinais clínicos da doença, efetuou-se a eutanásia por sobredosagem de anestésico e fez-se uma amostragem retirando-se rim, fígado e baço para avaliar a presença do patógeno. Para esta amostragem, preparou-se um tabuleiro de

dissecação para a colocação dos peixes eutanasiados, e com o auxílio de uma tesoura e um bisturi estéreis, abriu-se a cavidade abdominal do ânus até ao opérculo e fez-se um corte para retirar os órgãos pretendidos. Estes, foram colocados num eppendorff de 2mL estéril, e armazenou-se a -80°C até serem usados para o teste de PCR.



**Figura 4** - Representação esquemática do ensaio experimental de infecção em robalos (*Dicentrarchus labrax*) com a bactéria *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Aquários utilizados para a infecção. Cada aquário de 60L foi dividido em 3 divisórias iguais (3x 20L) para ter triplicados e cada divisória contém 6 peixes, num total de 18 peixes por aquário. Controlo não infetado (A1;A2;A3); Controlo infetado (B1;B2;B3); Vacinados não infetados (C1;C2;C3); Vacinados infetados (D1;D2;D3).

## 2.2 Cálculo da percentagem relativa de sobrevivência (RPS)

A eficácia da vacina oral administrada foi avaliada pelo cálculo da percentagem relativa de sobrevivência (RPS) usando a seguinte fórmula (Amend 1981).

$$RPS = \left[ 1 - \frac{\% \text{ DE MORTALIDADE DOS PEIXES IMUNES}}{\% \text{ DE MORTALIDADE DOS PEIXES NÃO IMUNES}} \right] * 100$$

## 2.3 Confirmação da infecção - Teste PCR

Para detetar a presença da bactéria *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, foram recolhidos órgãos internos (rim, fígado e baço) de 4 peixes moribundos recolhidos no ensaio. Nesta análise foram utilizados dois genes, o RNA ribossomal 16S (16S rRNA) e o *Putative penicillin-binding protein 1A* (Pbp). Para amplificar os respetivos fragmentos foram utilizados dois pares de *primers* descritos por Osório (1999) e Amagliani (2009), modificados para aumentar a estabilidade do emparelhamento dos *primers*. Para o 16S foram utilizados o *primer* FW 5'-GCTTGAAGAGATTCGAGTGTGCCT-3' e o *primer* REV-CCACCTCGCGGTCTTGCT) (Osório, 1999), para o gene *Pbp* foram utilizados o *primer* FW-CGACTCAACTACAGATCACCCAGTCA e o *primer* REV-GTGCGGCCTAAATTTTCGACGA) (Amagliani, 2009), gerando fragmentos com 269 pares de base (bp) e 277 bp, respetivamente.

Extraíu-se e purificou-se DNA dos órgãos, utilizando o kit *DNeasy Blood & Tissues* (Qiagen, Alemanha) seguindo as instruções do protocolo "*Purification of total DNA from Animal Tissues (Spin-Column protocol)*". A extração de DNA da bactéria foi feita através do método clássico "*boiling*". Após a extração do DNA, realizou-se um PCR para detetar a presença da bactéria nos órgãos dos peixes. Cada reação consistiu em 1x de *NZYTaq II Green Master Mix* (Nzytech, Portugal), 0,5 µM de cada *primer*, 1 µl de DNA e água MiliQ até perfazer 20 µl de reação. As condições de PCR foram 4 min a 95°C, seguindo-se 35 ciclos de 30s a 95°C, 30s a 55°C e 20s a 72°C, e uma extensão final de 5 min a 72°C. Os resultados obtidos foram visualizados através de gel de agarose (1,5%), corado com *RedSafe 1x* (Intron, EUA).

## 2.4 Análise estatística

O tratamento estatístico dos dados obtidos foi realizado com recurso ao programa IBM SPSS Statistics 27. Na análise dos valores, foram comparadas as mortalidades obtidas durante os 10 dias de infecção entre os peixes vacinados não infetados, o controlo não infetado, controlo infetado e vacinados infetados.

A estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) com dois fatores (vacinação e infecção). Todos os pressupostos inerentes à realização da ANOVA (neste caso, a normalidade dos dados e homogeneidade de variâncias) foram validados através do teste de Levene. Para ambos os casos, foi utilizado um nível de significância de  $p < 0,05$ .

### 3. Resultados

#### 3.1 Vacinação Oral

##### 3.1.1 Mortalidade

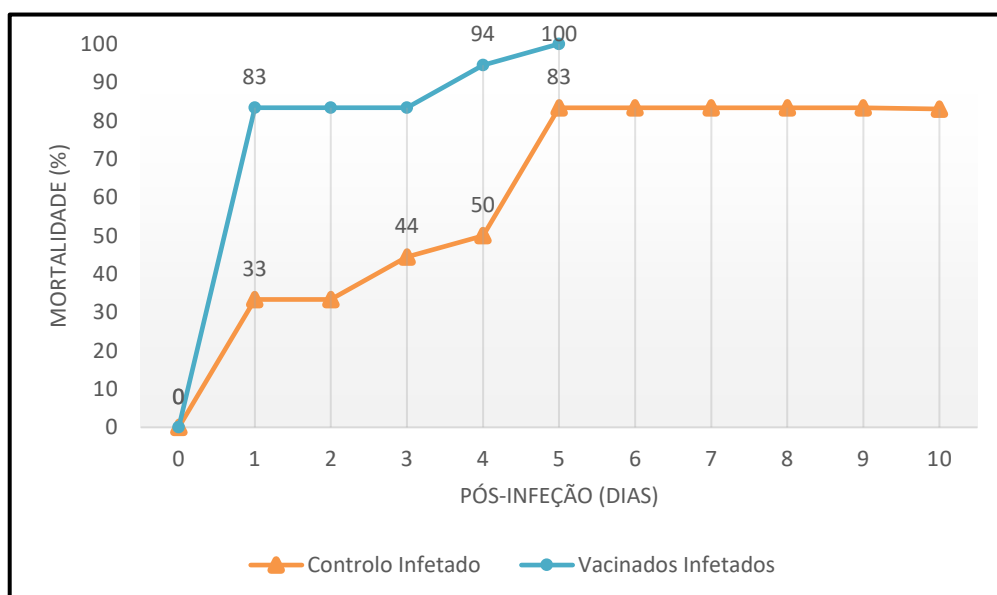
Não ocorreu mortalidade durante o período de vacinação oral (34 dias).

#### 3.2 Infecção com *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida*

##### 3.2.1 Mortalidade

Na Figura 5, encontram-se representados os resultados da mortalidade cumulativa do ensaio pós-infecção. A mortalidade para ambos o tratamento teve início 24 horas após a infecção, atingindo 83% nos peixes vacinados infetados e 33% no controlo infetado. Ao longo dos dias, a mortalidade continuou a ser ascendente em ambos os tratamentos infetados, atingindo a mortalidade total nos vacinados infetados ao fim de 6 dias de infecção, sendo 83% a mortalidade no controlo infetado, nesse mesmo dia. No resto dos dias de ensaio de infecção até ao final, não ocorreu mais mortalidades, sobrevivendo 3 peixes no controlo infetado.

Em suma, a mortalidade após a exposição à bactéria *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* foi superior em peixes vacinados por via oral com a vacina de DNA em comparação com o do grupo de controlo. Relativamente aos peixes dos tratamentos controlo e vacinados, não infetados, não foi registada mortalidade durante o período de infecção.



**Figura 5-** Mortalidade cumulativa do ensaio: controlo infetado e vacinados infetados com *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* durante 10 dias em robalos (*Dicentrarchus labrax*).

Alguns sinais clínicos específicos foram observados nos peixes moribundos, após 48 horas da infecção, falta de apetite e equilíbrio na natação, uma bexiga natatória hiperinsuflada e um abdômen distendido (Figura 6). Ambos os grupos infectados mostraram mortalidade ao longo do ensaio de dez dias.

Nos resultados obtidos, existem diferenças estatisticamente significativas quando comparados os valores de mortalidade entre os infectados e não infectados, com um nível de significância de  $p < 0,05$ .



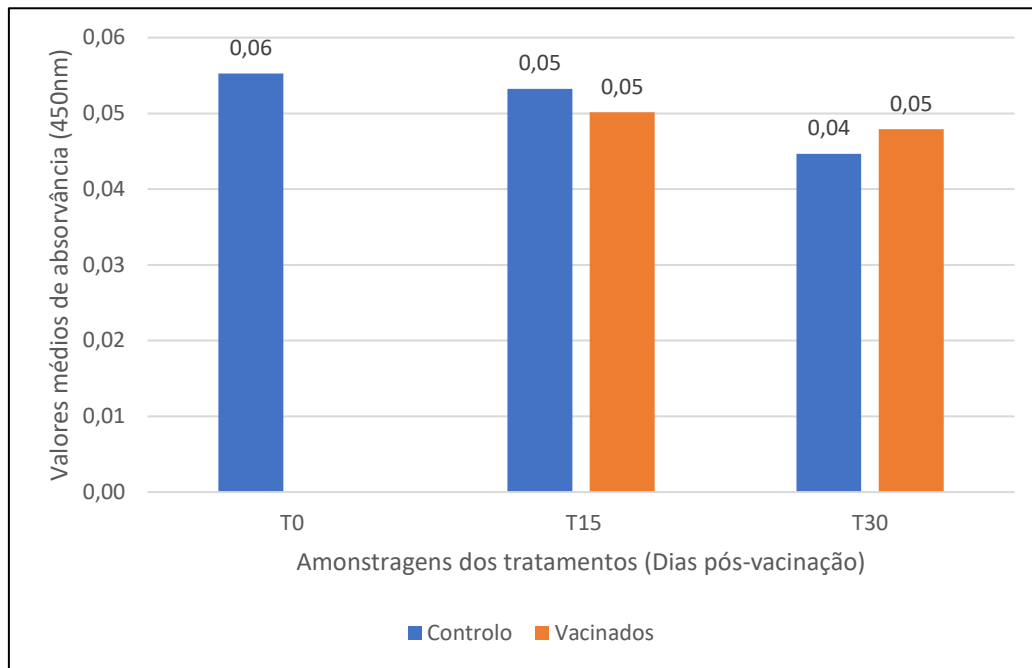
**Figura 6-** Imagem de um robalo (*Dicentrarchus labrax*) infectado com *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* com a bexiga hiperinsuflada.

### 3.2.2 Cálculo RPS

O valor de RPS dos peixes vacinados infectados foi de 0%.

### 3.3 Pesquisa de anticorpos - Teste ELISA indireto

Num total de 6 amostras de soro, recolhidas, por cada tempo de amostragem (antes de administrar a vacina, 15 e 30 dias depois da vacinação), de robalos vacinados com a vacina oral de DNA, foram testadas num teste ELISA indireto. Os resultados deste estudo mostraram que foram produzidos valores muito baixos de anticorpos durante o tempo de vacinação (34 dias). Os valores foram muito reduzidos, tanto no T15 como T30 após a vacinação (Tabela III). A diluição do soro não influenciou a relação valores da ausência de anticorpos.

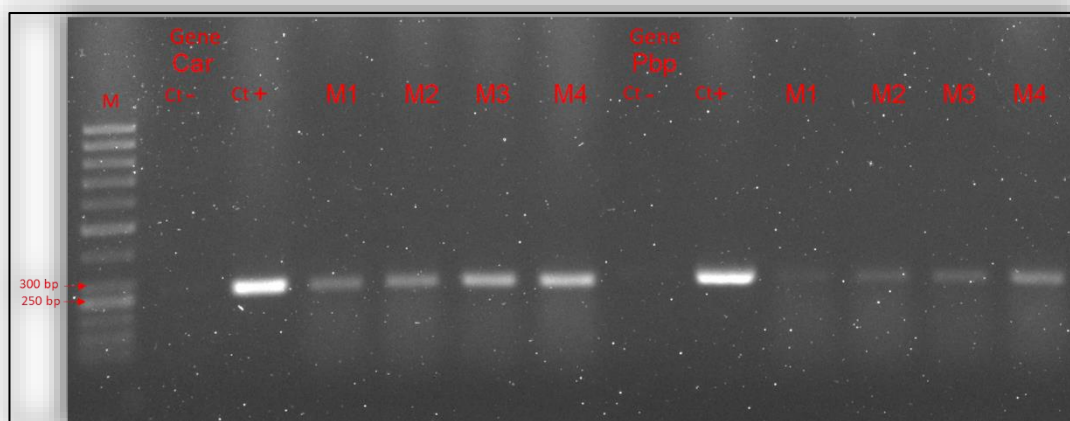


**Figura 7-** Valores médios de absorvância obtidos dos soros amostrados do ensaio de vacinação dos peixes controlo e vacinados nos tempos T0 T15 e T30, utilizando ELISA indireto

Em resultado, não existem diferenças estatisticamente significativas quando comparados os valores de anticorpos dos peixes vacinados e do controlo. Foi utilizado um nível de significância de  $p < 0,05$ .

### 3.4 Confirmação da infeção - Teste PCR

Os resultados de PCR observados (Figura 7) demonstraram, através da amplificação de genes específicos (Car e Pb com o peso tamanho molecular correto), que *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* foi detetada nos órgãos amostrados de peixes moribundos durante a infeção, indicando a presença da bactéria nos órgãos. Isto sugere que a bactéria terá sido a responsável pela mortalidade dos peixes no ensaio de infeção com a própria bactéria.



**Figura 8** - Detecção de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* em órgãos de peixes moribundos, através da amplificação dos genes Car (269 bp) e Pbp (277 bp). M-marcador molecular (50 bp, ThermoFisher, EUA); (-) -controlo negativo; (+) -controlo positivo; M1-peixe moribundo 1; M2-peixe moribundo 2; M3-peixe moribundo 3; M4-peixe moribundo 4.

## 4. Discussão

No presente estudo, foi testada, em robalos, a eficácia de uma vacina de DNA utilizando a proteína pVAX–GFP como plasmídeo, encapsulado em nanopartículas de quitosano contra *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida*. O objetivo foi investigar a eficácia desta vacina considerando as respostas imunes com a produção de anticorpos através de um teste ELISA indireto e observando a imunidade adquirida pela mesma através da mortalidade dos diferentes grupos após uma infeção.

Na parte de vacinação dos peixes, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de anticorpos em relação ao grupo controlo, sendo que várias circunstâncias puderam influenciar estes resultados. A dose de vacina utilizada foi de 9,375 µg por peixe, este valor não é suficiente para uma administração eficaz para uma resposta imune contra a bactéria usada pois em vários estudos feitos, a quantidade por peixe administrada foi bastante superior (Kumar et al., 2008; Zheng et al., 2016; Vimal et al., 2012; Vimal et al., 2014). Outros autores, mostram que volumes maiores geralmente estão associados a uma redução da atividade do gene repórter, mas menos variação entre os peixes individuais, e uma dose excessivamente alta de DNA pode resultar em um nível de expressão mais baixo do gene estranho (Rahman et al., 1992; Gomez-Chiarri et al., 1996). No entanto, descobriu-se que doses muito mais baixas são também eficazes (Heppell et al., 1998). Com isto, dose ótima de DNA varia de acordo com a espécie e o tamanho do animal, mas não aumenta proporcionalmente ao peso do peixe. Além disso, foi relatado que a condição fisiológica do animal também influencia o nível de expressão (Heppell et al., 2000). A adição da vacina oral com a ração comercial, o método utilizado pode não ter sido o melhor, a vacina foi borrifada na ração e colocado ao ar para secar sendo que não ficou incorporado no interior da mesma, mas sim envolvido exteriormente nos grãos da ração. Isto fez com que no momento da alimentação dos peixes, estes grãos ao entrar em contacto com a água do meio, a vacina envolvida se tenha dispersado na água e com isso não ter sido ingerido de forma eficaz pelos indivíduos. Para combater esse desperdício, a vacina devia ter sido incorporada no fabrico da ração para esta não se dispersar e ser digerida pelos peixes na totalidade ou uma solução mais diferenciada de administração de uma vacina oral, a utilização de seringas estéreis por via oral, através da cavidade bucal, para uma administração direta, e assim ter a certeza da quantidade de vacina digerida por cada indivíduo e que esta fosse igual para todos os vacinados (Tian et al., 2011).

Na produção da vacina, muitas desvantagens nos produtos utilizados foram confirmadas noutros artigos, nomeadamente nas desvantagens de utilização de uma proteína para plasmídeo na medida em que o alto peso molecular, fragilidade estrutural, afinidade à água e complexidade pode ter contribuído para uma fraca imunidade pois podem sofrer

desnaturação, degradação e, eventualmente, inativação (física, química e enzimática) durante a formulação, armazenamento e entrega. Outro problema encontrado foi o ambiente gastrointestinal, este proporciona condições adversas para a degradação de biomateriais, como o DNA (Farris et al., 2016) e se este não tiver devidamente protegido, a probabilidade de se degradar é muito elevada. A falta de adjuvante usado na vacina também foi uma desvantagem, visto que estes são agentes imunológicos que proporcionam um aceleração de uma resposta imune robusta, aumentando a imunogenicidade, proporcionando a necessidade de menor dose de antígeno, reduzir os requisitos de imunização de reforço, oferecer prolongada e proteção aprimorada (Mohan et al., 2013; Delany et al., 2014). Em relação à produção de anticorpos adquiridos pela administração da vacina oral, os resultados foram muito baixos nas duas amostragens feitas (T15 e T30) aos peixes vacinados sendo que foi considerado que não houve produção. Estes resultados podem ter ocorrido devido a uma falha no teste ELISA indireto, em que este é constituído por muitas etapas para a sua realização e um manuseamento pouco preciso nos materiais utilizados (uso da pipeta de multicanal é muito frequente erros de pipetagem) ou um erro numa das etapas pode contribuir para resultados pouco favoráveis. Outro fator que pode ter influenciado a pouca ou quase nula produção de anticorpos foi a quantidade de ração com vacina oral que cada peixe amostrado digeriu, não ter sido o suficiente para essa mesma produção, visto que, muita vacina foi desperdiçada no meio e pelas trocas de água efetuadas.

Na infeção dos robalos, os resultados foram contraditórios na medida em que os peixes vacinados infetados atingiram uma mortalidade de 100% após 5 dias de infeção sendo que os peixes controlo infetados, nos mesmos dias, atingiram uma mortalidade de 83. Várias causas podem justificar esses resultados de mortalidade nos peixes vacinados infetados que podem ter contribuído para uma baixa imunogenicidade, expressão de antígeno insuficiente (Rohan et al., 2008). Um dos fatores terá sido a pouca ou nenhuma digestão da ração revestida com a vacina de DNA, no início do ensaio, e com isso nenhuns anticorpos produzidos, ou então a existência de uma resistência por parte dos próprios peixes vacinados aos antígenos (Ingram, 1980) usados na vacina pode ter contribuído para essa fraca resposta imune à infeção. No caso dos sobreviventes do grupo controlo infetado, estes podem ter produzido anticorpos autonomamente através do seu próprio sistema imunitário fornecendo resistência à bactéria (Thompson, 2017).

A bactéria utilizada para a infeção tem várias características, uma delas a capacidade de virulência da mesma podendo esta sobreviver pelo menos 6 dias dentro das células hospedeiras e de se espalhar de uma célula para a outra (Romalde., 2014). A presença de um material capsular de natureza polissacarídea, que desempenha um papel fundamental na virulência induzindo à sua resistência e à ação imunológica do hospedeiro resultando num

LD<sub>50</sub> mais baixo. Os produtos extracelulares (ECPs) secretados pelo patógeno ajuda na neutralização da defesa do hospedeiro, já que estes produtos são letais pela sua natureza tóxica (Romalde, 2014). Com isto tudo, a dose utilizada para a infeção, foi muito elevada, esta afirmação tem por base a elevada mortalidade observada, assim como o facto de apenas 24 horas após a infeção já haver indivíduos doentes. Certamente a dose utilizada foi superior ao valor LD<sub>50</sub>, que geralmente é a dose utilizada neste tipo de ensaios. Deveria ter sido feito um pré-*challenge* para obter o valor de LD<sub>50</sub> para estes indivíduos com esta estirpe de *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida*.

Em conclusão, os resultados aqui apresentados demonstram que a vacinação oral com a vacina de DNA nos robalos não induziu uma resposta imune contra a bactéria *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida*.

## 5. Considerações finais e trabalhos finais

Em suma, a implementação de uma estratégia de vacinação deve ter como objetivo alcançar um benefício económico, uma solução capaz para ajudar a indústria da aquacultura. Doenças e surtos de doenças causados por doenças específicas e agentes infecciosos geram despesas e perdas económicas. Para a não utilização de antibióticos, o desenvolvimento de vacinas tem sido um desafio para o controlo e prevenção de doenças. A bactéria *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* tem sido uma das causas de muitos surtos a nível mundial e com isso vacinas para o seu combate têm sido criadas e melhoradas em diferentes métodos de administração. Uma vacina oral tem a vantagem da sua administração ser segura e não stressante para o hospedeiro, mas as suas desvantagens sobressaem, podendo não causar efeitos sem ajuda de um reforço ou de um componente como um adjuvante para aumentar a sua eficácia no combate a surtos.

Futuramente, propõe-se o melhoramento da vacina oral de DNA, testando novas doses da mesma, o método de incorporação da mesma na ração, na medida em que o método utilizado proporcionava melhores resultados se esta fosse ingerida na própria constituição da ração e não ficar só superficialmente, bem como a quantidade utilizada que não foi suficiente para uma proteção eficaz. Na quantidade de bactéria utilizada, um pré-challenge deverá ser feito para se obter um valor de LD50 adequado para estes indivíduos e com esta estirpe de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

## 6. Referências

- Adams, A. (2019). *Progress, challenges and opportunities in fish vaccine development*. Fish and Shellfish Immunology. 90: 210–214.
- Agência Portuguesa do Ambiente (2019). *Relatório do Estado do Ambiente Portugal 2019*.
- Ahmed, N., Thompson, S. (2019). *The blue dimensions of aquaculture: A global synthesis*. Sci. Total Environ. 652, 851–861.
- Akayli, T., Aydin, B., Urku, C., Kayalar, O. (2018). *Diagnosis of Vibrio anguillarum in Cultured Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss) by Different Methods*. Eur. J. Biol. 77, 26–31.
- Austin, B., Austin, D. A. (1989). *Bacterial fish pathogen: disease in farmed and wild fish*. Ellis Horwood, Ltd., U.K.: 363
- Adams, A., Aoki, T., Karunasagar, I. (2014). *Recent technological advancements on aquatic animal health and their contributions toward reducing disease risks-a review* *Characterisation of the outer membrane proteome of Francisella noatunensis subsp. orientalis* View project *Streptococcus dysgalactiae* View project.
- Allnutt, T., Gomez-Casado, E., Dhar, A., Sci, J. M. (2011). *Challenges and Opportunities in Developing Oral Vaccines against Viral Diseases of Fish Related papers Dhar 2013 viral vaccines for farmed fish review F C T homas Allnut t A comparat ive review on European-farmed finfish RNA viruses and t heir vaccines Marine Science Research & Development. Res Development, 7.*
- Aspden, T. J., Mason, J. D. T., Jones, N. S., Lowe, J., Skaugrud, Ø., Illum, L. (1997). *Chitosan as a Nasal Delivery System: The Effect of Chitosan Solutions on in Vitro and in Vivo Mucociliary Transport Rates in Human Turbinates and Volunteers*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 86(4), 509–513.
- Austin, B., Austin, D. A. (1989). *Bacterial fish pathogen: disease in farmed and wild fish*. Ellis Horwood, Ltd., U.K.: 363
- Austin, B., Austin, D. A. (2016). *Bacterial fish pathogens: Disease of farmed and wild fish*, sixth edition. Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish, Sixth Edition, 1–732.
- Avci, H., Birincioğlu, S., Epikmen, E. T., Dereli, M. (2013). *Comparative histopathological and immunohistochemical evaluations in juvenile sea bass (Dicentrarchus labrax) and gilthead sea bream (Sparus aurata) naturally infected with Photobacterium damsela subsp. piscicida*. Rev. Med. Vet. (Toulouse). 164, 72–79.

- Bakopoulos, V., Hanif, A., Poulos, K., Galeotti, M., Adams, A., Dimitriadis, G. J. (2004). *The effect of in vivo growth on the cellular and extracellular components of the marine bacterial pathogen Photobacterium damsela subsp. piscicida*. J. Fish Dis. 27, 1–13.
- Baptista, T., Romalde, J. L., Toranzo, A. E. (1996). *First occurrence of Pasteurellosis in Portugal Affecting Cultured Gilthead Seabream (Sparus aurata)*. Fish Pathol., 16 (3): 92-95.
- Busatto, S., Pham, A., Suh, A., Shapiro, S., Wolfram, J. (2019). *Organotropic drug delivery: Synthetic nanoparticles and extracellular vesicles*. Biomedical Microdevices 2019 21:2, 21(2), 1–17.
- Clark, T. G., Cassidy-Hanley, D. (2005). *Recombinant subunit vaccines: potentials and constraints*. Developments in Biologicals, 121, 153–163.
- Criscuolo, E., Caputo, V., Diotti, R. A., Sautto, G. A., Kirchenbaum, G. A., Clementi, N. (2019). *Alternative methods of vaccine delivery: An overview of edible and intradermal vaccines*. In Journal of Immunology Research (Vol. 2019). Hindawi Limited.
- Dadar, M., Dhama, K., Vakharia, V. N., Hoseinifar, S. H., Karthik, K., Tiwari, R., Khandia, R., Munjal, A., Salgado-Miranda, C., Joshi, S. K. (2016). *Advances in Aquaculture Vaccines Against Fish Pathogens: Global Status and Current Trends*.
- Dadar, M., Dhama, K., Vakharia, V. N., Hoseinifar, S. H., Karthik, K., Tiwari, R., Khandia, R., Munjal, A., Salgado-Miranda, C., Joshi, S. K. (2017). *Advances in Aquaculture Vaccines Against Fish Pathogens: Global Status and Current Trends*. Rev. Fish. Sci. Aquac. 25, 184–217
- Delany, I., Rappuoli, R., Gregorio, E. (2014). *Vaccines for the 21st century*. EMBO Molecular Medicine, 6(6), 708–720.
- de Pinho Neves, A. L., Milioli, C. C., Müller, L., Riella, H. G., Kuhnen, N. C., Stulzer, H. K. (2014). *Factorial design as tool in chitosan nanoparticles development by ionic gelation technique*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 445, 34–39.
- Ellis, A. E. (1998). *Meeting the requirements for delayed release of oral vaccines for fish*. J. Appl. Ichthyol, 14, 149–152.
- Embregts, C. W. E., Forlenza, M. (2016). *Oral vaccination of fish: Lessons from humans and veterinary species*. Developmental and Comparative Immunology, 64, 118–137.
- Essam, H. M., Abdellrazeq, G. S., Tayel, S. I., Torky, H. A., Fadel, A. H. (2016). *Pathogenesis of Photobacterium damsela subsp. piscicida infections in sea bass and sea bream*. Microb.

- Pathog. 99, 41–50.
- Eto, S. F., Fernandes, D. C., Yunis-Aguinaga, J., Claudiano, G. S., Shimada, M. T., Salvador, R., de Moraes, F.R., de Moraes, J.R.E. (2019). *Characterization and production of IgY antibodies anti-Photobacterium damsela subsp. piscicida: Therapeutic and prophylactic use in Rachycentron canadum*. Aquaculture 513, 734424.
- Fæste, C. K., Plassen, C. (2008). *Quantitative sandwich ELISA for the determination of fish in foods*. Journal of Immunological Methods, 329(1–2), 45–55.
- Fan, G., Chen, J., Jin, T., Shi, C., Du, X., Zhang, H., ... Liu, X. (2018). *The Report of Marine Life Genomic Research*.
- FAO, 2020. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2020*. Sustainability in action.
- Farris, E., Brown, D. M., Ramer-Tait, A. E., Pannier, A. K. (2016). *Micro- and nanoparticulates for DNA vaccine delivery*
- Fazio, F., Marafioti, S., Filiciotto, F., Buscaino, G., Panzera, M., Faggio, C. (2013). *Blood Hemogram Profiles of Farmed Onshore and Offshore Gilthead Sea Bream (Sparus aurata) from Sicily, Italy*. Turkish J. Fish. Aquat. Sci. 13, 415–422.
- Fazio, F. (2019). *Fish hematology analysis as an important tool of aquaculture: A review*. Aquaculture 500, 237–242.
- Gomez-Chiarri, M., Livingston, S. K., Muro-Cacho, C., Sanders, S., Levine, R. P. (1996). *Introduction of foreign genes into the tissue of live fish by direct injection and particle bombardment*. Diseases of Aquatic Organisms, 27(1), 5–12.
- Gómez, B., Munekata, P. E. S., Zhu, Z., Barba, F. J., Toldrá, F., Putnik, P., Bursać Kovačević, D., Lorenzo, J. M. (2019). *Challenges and opportunities regarding the use of alternative protein sources: Aquaculture and insects*. In Advances in Food and Nutrition Research (Vol. 89, pp. 259–295). Academic Press Inc.
- Gudding, R., Lillehaug, A., Evensen. (1999). *Recent developments in fish vaccinology*. Veterinary Immunology and Immunopathology, 72(1–2), 203–212.
- Gudding, R., Van Muiswinkel, W. B. (2013). *A history of fish vaccination: Science-based disease prevention in aquaculture*. Fish & Shellfish Immunology, 35(6), 1683–1688.
- Guliyeva, Ü., Öner, F., Özsoy, Ş., Haziroğlu, R. (2006). *Chitosan microparticles containing plasmid DNA as potential oral gene delivery system*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 62(1), 17–25.

- Hansen, J. D., Landis, E. D., Phillips, R. B. (2005). *Discovery of a unique Ig heavy-chain (IgT) in rainbow trout: Implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102(19), 6919–6924.
- Hasson, S. S. A. A., Al-Busaidi, J. K. Z., Sallam, T. A. (2015). *The past, current and future trends in DNA vaccine immunisations*. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 5(5), 344–353.
- Hawke, J.P. (2012). *Photobacteriosis, in: FHS Blue Book: Suggested Procedures for the Detection and Identification of Certain Finfish and Shellfish Pathogens*. AFS-FHS (American Fisheries Society-Fish Health Section), pp. 1–15.
- Heppell, J., Davis, H. L. (2000). *Application of DNA vaccine technology to aquaculture*. Advanced Drug Delivery Reviews, 43(1), 29–43.
- Heppell, J., Lorenzen, N., Armstrong, N. K., Wu, T., Lorenzen, E., Einer-Jensen, K., Schorr, J., Davis, H. L. (1998). *Development of DNA vaccines for fish: vector design, intramuscular injection and antigen expression using viral haemorrhagic septicaemia virus genes as model*. Fish & Shellfish Immunology, 8(4), 271–286.
- Hwang, J. Y., Kwon, M. G., Seo, J. S., Hwang, S. D., Jeong, J. M., Lee, J. H., Jeong, A. R., Jee, B. Y. (2020). *Current use and management of commercial fish vaccines in Korea*. Fish and Shellfish Immunology, 102(April): 20–27.
- Ingram, G. A. (1980). *Substances involved in the natural resistance of fish to infection—A review*. Journal of Fish Biology, 16(1), 23–60.
- Khan, I., Saeed, K., Khan, I. (2019). *Nanoparticles: Properties, applications and toxicities*. Arabian Journal of Chemistry, 12(7), 908–931.
- Kitao, T., T., Kawano, K. (1981). *Changes in drug resistance of Vibrio anguillarum in cultured ayu, Plecoglossus altivelis Temminck and Schlegel, in Japan*. Journal of Fish Diseases, 4(3), 223–230.
- Kolosova, A. Y., Shim, W.-B., Yang, Z.-Y., Eremin, S. A., & Chung, D.-H. (2005). *Direct competitive ELISA based on a monoclonal antibody for detection of aflatoxin B1. Stabilization of ELISA kit components and application to grain samples*. Analytical and Bioanalytical Chemistry 2005 384:1, 384(1), 286–294.
- Kumar, R. S., Ishaq Ahmed, V. P., Parameswaran, V., Sudhakaran, R., Sarath Babu, V., Sahul Hameed, A. S. (2008). *Potential use of chitosan nanoparticles for oral delivery of DNA vaccine in Asian sea bass (Lates calcarifer) to protect from Vibrio (Listonella) anguillarum*.

- Fish and Shellfish Immunology, 25(1–2), 47–56.
- Kumar, S. R., Parameswaran, V., Ahmed, V. P. I., Musthaq, S. S., Hameed, A. S. S. (2007). *Protective efficiency of DNA vaccination in Asian seabass (Lates calcarifer) against Vibrio anguillarum*. Fish and Shellfish Immunology, 23(2), 316–326.
- Kutzler, M. A., Weiner, D. B. (2008). *DNA vaccines: ready for prime time?* Nature Reviews Genetics 2008 9:10, 9(10), 776–788.
- Le Breton, A. D. (2009). *Vaccines in Mediterranean aquaculture: Practice and needs*. 86.
- Li, Y. F., Lin, Z. Z., Hong, C. Y., Huang, Z. Y. (2021). *Histamine detection in fish samples based on indirect competitive ELISA method using iron-cobalt co-doped carbon dots labeled histamine antibody*. Food Chemistry, 345, 128812.
- MacLaughlin, F. C., Mumper, R. J., Wang, J., Tagliaferri, J. M., Gill, I., Hinchcliffe, M., Rolland, A. P. (1998). *Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery*. Journal of Controlled Release, 56(1–3), 259–272.
- Magarinos, B., Santos, Y., Romalde, J. L., Rivas, C., Barja, J. L., Toranzo, A. E. (1992). *Pathogenic activities of live cells and extracellular products of the fish pathogen Pasteurella piscicida*. Journal of General Microbiology, 138(12), 2491–2498.
- Magariños, B., Romalde, J.L., Lemos, M.L., Barja, J.L., Toranzo, A.E. (1994). *Iron uptake by Pasteurella piscicida and its role in pathogenicity for fish*. Appl. Environ. Microbiol. 60, 2990–2998.
- Magariños, B., Toranzo, A. E., Romalde, J. L. (1996). *Phenotypic and pathobiological characteristics of Pasteurella piscicida*. Annu. Rev. Fish Dis., 6: 41-64.
- Mao, H. Q., Roy, K., Walsh, S. M., August, J. T., Leong, K. W. (1996). *DNA-Chitosan nanospheres for gene delivery*. Proceedings of the Controlled Release Society, 23, 401–402.
- Mladineo, I., Miletić, I., Bočina, I. (2006). *Photobacterium damsela subsp. piscicida outbreak in cage-reared Atlantic bluefin tuna Thunnus thynnus*. J. Aquat. Anim. Health 18, 51–54.
- Miccoli, A.; Saraceni, PR; Scapigliati, G. (2019). *Vacinas e proteção imunológica das principais espécies de peixes marinhos do Mediterrâneo*. Fish Shellfish Immunol. 94, 800–809
- Mohan, T., Verma, P., Rao, D. N. (2013). *Novel adjuvants & delivery vehicles for vaccines development: A road ahead*. The Indian Journal of Medical Research, 138(5), 779. /pmc/articles/PMC3928709/
- Mohammed, M. A., Syeda, J. T. M., Wasan, K. M., Wasan, E. K. (2017). *An Overview of*

*Chitosan Nanoparticles and Its Application in Non-Parenteral Drug Delivery.* Pharmaceutics 2017, Vol. 9, Page 53, 9(4), 53.

- Munang'andu, HM; Mutoloki, S.; Evensen, O. (2015). *An Overview of Challenges Limiting the Design of Protective Mucosal Vaccines for Finfish.* *Frente. Immunol.*
- Muniesa, A., Basurco, B., Aguilera, C., Furones, D., Reverté, C., Sanjuan-Vilaplana, A., Jansen, MD., Brun, E., Tavorpanich, S. (2020). *Mapeamento do conhecimento das principais doenças que afetam o robalo e a dourada no Mediterrâneo.* *Transbound. Emerg. Dis.* 67, 1089–1100.
- Mutoloki, S., Munang'andu, H. M., Evensen, Ø. (2015). *Oral Vaccination of Fish – Antigen Preparations, Uptake, and Immune Induction.* *Frontiers in Immunology*, 519.
- Nagano, I., Inoue, S., Kawai, K., Oshima, S. (2009). *Repeatable immersion infection with Photobacterium damsela subsp. piscicida reproducing clinical signs and moderate mortality.* *Fish Sci.* 75:707-714.
- Ningqiu, L., Junjie, B., Shuqin, W., Xiaozhe, F., Haihua, L., Xing, Y., Cunbin, S. (2008). *An outer membrane protein, OmpK, is an effective vaccine candidate for Vibrio harveyi in Orange-spotted grouper (Epinephelus coioides).* *Fish & Shellfish Immunology*, 25(6), 829–833.
- Noga, E. J. (2010). *Fish Disease: Diagnosis and Treatment.* (2nd edition). Wiley-Blackwell. Iowa (EUA).
- Paolini, A., Ridolfi, V., Zezza, D., Cocchietto, M., Musa, M., Pavone, A., Conte, A., Giorgetti, G. (2005). *Vaccination trials of sea bass (Dicentrarchus labrax) against pasteurellosis using oral, intraperitoneal and immersion methods.* *Veterinaria Italiana*, 41(2), 137–144.
- Paulie, S., Perlmann, P., Perlmann, H. (2006). *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.* *Cell Biology, Four-Volume Set*, 1, 533–538.
- Rahman, A., Maclean, N. (1992). *Fish transgene expression by direct injection into fish muscle.* *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1(4–5), 286–289.
- Rao, S. B., Sharma, C. P. (1997). *Use of chitosan as a biomaterial: Studies on its safety and hemostatic potential.*
- Richardson, S. C. W., Kolbe, H. V. J., Duncan, R. (1999). *Potential of low molecular mass chitosan as a DNA delivery system: Biocompatibility, body distribution and ability to complex and protect DNA.* *International Journal of Pharmaceutics*, 178(2), 231–243.
- Robinson, H. L., Pertmer, T. M. (2000). *DNA vaccines for viral infections: Basic studies and*

- applications*. *Advances in Virus Research*, 55, 1–74.
- Rohan, D., Mahesh, K., Manoj, R., Sekhar, M. (2008). *Inhibition of bfl-1/A1 by siRNA inhibits mycobacterial growth in THP-1 cells by enhancing phagosomal acidification*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1780(4), 733–742.
- Romalde, J. L., Magariños, B., Toranzo, A. E. (1999). *Pasteurellosis*. ICES Leaf et n° 54. International Council for the Exploration of the sea.
- Romalde, J.L. (2002). *Photobacterium damsela subsp. piscicida: An integrated view of a bacterial fish pathogen*. *Int. Microbiol.* 5, 3–9.
- Romalde, J. L. (2014). *Vaccination against Photobacteriosis*. *Fish Vaccination*, 9780470674, 200–210.
- Salati, F., Hamaguchi, M., Kusuda, R. (1987). *Immune Response of Red Sea Bream to Edwardsiella tarda Antigens*. *Fish Pathology*, 22(2), 93–98.
- Salgado-Miranda, C., Loza-Rubio, E., Rojas-Anaya, E., García-Espinosa, G. (2014). *Viral vaccines for bony fish: past, present and future*.
- Satheeshkumar, P., Ananthan, G., Senthilkumar, D., Khan, A.B., Jeevanantham, K. (2012). *Comparative investigation on haematological and biochemical studies on wild marine teleost fishes from Vellar estuary, southeast coast of India*. *Comp. Clin. Path.* 21, 275–281.
- Schirmbeck, R., Reimann, J. (2001). *Revealing the Potential of DNA-Based Vaccination: Lessons Learned from the Hepatitis B Virus Surface Antigen*. 382(4), 543–552.
- Secombes, C. J., Ellis, A. E. (2012). *The Immunology of Teleosts*. In *Fish Pathology: Fourth Edition* (pp. 144–166). Wiley-Blackwell.
- Shahin, K., Pirezan, F., Rogge, M., LaFrentz, B. R., Shrestha, R. P., Hildebrand, M., Lu, F., HogenEsch, H., Soto, E. (2020). *Development of IgIC and GroEL recombinant vaccines for francisellosis in Nile tilapia, Oreochromis niloticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 105, 341–349.
- Sharma, R., Mody, N., Dubey, S., Vyas, S. P. (2017). *Nanoparticulate carrier(s): an emerging paradigm in new generation vaccine development*. In *Nanostructures for Drug Delivery* (pp. 523–550). Elsevier.
- Shoemaker, C. A., Shelby, R. A., Klesius, P. H. (2008). *Development of an Indirect ELISA to Detect Humoral Response to Flavobacterium columnare Infection of Channel Catfish, Ictalurus punctatus*.

- Snieszko, S.F. (1974). *The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes*. J. Fish Biol. 6, 197–208.
- Snieszko, S.F., Bullock, G.L., Hollis, E., Boone, J.G. (1964). *Pasteurella Sp. From an Epizootic of White Perch (Roccus americanus)* in. J. Bacteriol. 88, 1814–1815.
- Tafalla, C., Bøgwald, J., Dalmo, R. A., Munangandu, H. M., Evensen, Ø. (2014). *Adjuvants in vaccines for fish*. In *Fish Vaccination*; Wiley Blackwell: West Sussex, Reino Unido: pp. 68–84.
- Thompson, K. D. (2017). *Immunology: Improvement of Innate and Adaptive Immunity*. Fish Diseases: Prevention and Control Strategies, 1–17.
- Tian, J., Yu, J. (2011). *Poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles as candidate DNA vaccine carrier for oral immunization of Japanese flounder (Paralichthys olivaceus) against lymphocystis disease virus*. Fish and Shellfish Immunology, 30(1), 109–117.
- Tian, J., Yu, J., Sun, X. (2008). *Chitosan microspheres as candidate plasmid vaccine carrier for oral immunisation of Japanese flounder (Paralichthys olivaceus)*. Veterinary Immunology and Immunopathology, 126(3–4), 220–229.
- Toranzo, A. E., Magariños, B., Romalde, L. (2005). *A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems*. Aquaculture. 246: 37-61.
- Toranzo, A. E., Romalde, J. L., Magariños, B., Barja, J. L. (2009). *Present and future aquaculture vaccines against bacterial fish diseases*, in: *The Use of Veterinary Drugs and Vaccines in Mediterranean Aquaculture*. pp. 155–176.
- Vandeputte, M., Gagnaire, P. A., Allal, F. (2019). *European sea bass: A key model of marine fish in the wild and in aquaculture*. Anim. Genet. 50, 195–206.
- Vimal, S., Majeed, S. A., Nambi, K. S. N., Madan, N., Farook, M. A., Venkatesan, C., Taju, G., Venu, S., Subburaj, R., Thirunavukkarasu, A. R., Hameed, A. S. S. (2014). *Delivery of DNA vaccine using chitosan – tripolyphosphate ( CS / TPP ) nanoparticles in Asian sea bass , Lates calcarifer ( Bloch , 1790 ) for protection against nodavirus infection*. Aquaculture, 420–421, 240–246.
- Vimal, S., Taju, G., Nambi, K. S. N., Abdul Majeed, S., Sarath Babu, V., Ravi, M., Sahul Hameed, A. S. (2012). *Synthesis and characterization of CS/TPP nanoparticles for oral delivery of gene in fish*. Aquaculture, 358–359, 14–22.
- Vinay, T. N., Bhat, S., Choudhury, T. G., Paria, A., Jung, M. H., Kallappa, G. S., Jung, S. J. (2017). *Recent Advances in Application of Nanoparticles in Fish Vaccine Delivery*.

- Wang, J. J., Zeng, Z. W., Xiao, R. Z., Xie, T., Zhou, G. L., Zhan, X. R., Wang, S. L. (2011). *Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers*. International Journal of Nanomedicine, 6, 765.
- Zheng, F., Liu, H., Sun, X., Zhang, Y., Zhang, B., Teng, Z., Hou, Y., Wang, B. (2016). *Development of oral DNA vaccine based on chitosan nanoparticles for the immunization against reddish body iridovirus in turbot (Scophthalmus maximus)*. Aquaculture, 452, 263–271.
- Zhu, B., Liu, G. L., Gong, Y. X., Ling, F., Wang, G. X. (2015). *Protective immunity of grass carp immunized with DNA vaccine encoding the vp7 gene of grass carp reovirus using carbon nanotubes as a carrier molecule*. Fish and Shellfish Immunology, 42(2), 325–334.