



Estudo da infeção de corvina (*Argyrosomus regius* Asso, 1801) por *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

Fábio André Fernandes Galhano

2015



Estudo da infeção de corvina (*Argyrosomus regius* Asso, 1801) por *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

Fábio André Fernandes Galhano

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia dos Recursos
Marinhos

Dissertação realizada sob a orientação da Especialista Teresa Baptista, Doutora Maria
Manuel Sampaio e Doutor Benjamín Costas

2015

Título: Estudo da infeção de corvina (*Argyrosomus regius* Asso, 1801) por *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

Copyright © Fábio André Fernandes Galhano

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

2015

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação/trabalho de projeto/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.

Agradecimentos

Queria agradecer antes de mais, aos meus pais e avós por todo o apoio que me deram em todos os momentos que passei e pelo esforço financeiro que sei que tiveram comigo ao longo destes anos de estudo.

A elaboração deste trabalho só foi possível com a ajuda de um grupo de pessoas que ao longo de todo este ano esteve envolvida nas mais variadas etapas pelas quais passei para conseguir apresentar este resultado final. A este grupo **gigante** eu tenho de agradecer por tudo!!!

À professora Teresa por ter tornado possível este trabalho e por ter sido uma excelente voz de orientação ao longo de todo o tempo e acima de tudo, por nunca ter desistido apesar das inúmeras dificuldades por que passamos para obtermos este resultado.

À professora Mané por me ter apoiado horas atrás de horas naquele laboratório de biotecnologia de volta dos eppendorfs e géis e por ter tido sempre uma palavra amiga e de coragem quando as coisas não corriam da melhor forma.

Ao Dr. Benjamim, à Marina, Rita e Carolina pela excelente receção e acompanhamento durante o tempo que passei no CIIMAR e também pela ajuda na realização do ensaio. Agradeço especialmente à Marina por todo o acompanhamento durante a escrita deste documento. Sei que fui bem chato com os vários mails que te mandei!

Ao Hugo por toda a ajuda que me deu, desde o transporte dos peixes, a ajuda no laboratório de aquacultura e na realização dos ensaios.

À Marcela, Catarina e Daniela por terem dispensado horas de trabalho para ajudarem naquele ensaio que parecia não ter fim à vista.

Aos técnicos, Cristina, Pedro e Vera pelo auxílio que deram!

Aos meus colegas de casa, Marco e Zé pela vossa ajuda, paciência e amizade demonstrada ao longo do ano.

Um obrigado também a todos os meus amigos que me acompanharam em todos os momentos durante esta ano.

Este trabalho é de todos **Nós!!!**

Resumo

As práticas intensivas que são utilizadas em aquacultura implicam que exista um contacto extremo entre indivíduos promovendo o *stress*, que atuando conjuntamente com diversos outros fatores, como é o caso de bactérias, são passíveis de induzir nos peixes um estado de doença. *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (*Phdp*) é uma bactéria gram-negativa reconhecida por causar surtos graves de doença em diversas espécies de peixes. É considerada mundialmente como uma das maiores enfermidades para as práticas aquícolas, plausível de causar danos irreversíveis nestas populações.

Neste trabalho pretendeu-se elaborar um protocolo de infeção com *Phdp* em *Argyrosomus regius* estabelecendo num primeiro ensaio a dose que causa mortalidade a 50% de uma população (LD_{50}), estudando posteriormente num segundo ensaio, a infeção, o destino que a bactéria teria no peixe através de análise PCR, as consequências da infeção a nível hematológico e nos parâmetros imunitários, utilizando um modelo de coabitação, expondo indivíduos saudáveis a indivíduos doentes.

Foi comprovada a virulência da estirpe AQP 17.1 de *Phdp* sobre indivíduos da espécie *A. regius* com um peso médio de $28,3 \pm 10,9$ g, situando-se o LD_{50} em $2,29 \times 10^5$ UFC ml^{-1} , apresentando os peixes alguns sintomas típicos da doença crónica.

O modelo de coabitação utilizado no segundo ensaio, permitiu-nos confirmar que *Phdp* infetou por coabitação indivíduos da espécie *A. regius* com peso médio de $23,4 \pm 8,6$ g. Os resultados sugerem que as brânquias podem ter sido um dos locais de entrada da bactéria no corpo do peixe, disseminando-se após 24 horas para o rim e intestino anterior.

Phdp induziu em *A. regius* uma resposta imune inata que se avaliou ao longo do tempo quando comparados os indivíduos coabitantes do controlo (vetores injetados com tampão salino de Hanks) com os indivíduos coabitantes infetados (vetores injetados com suspensão de *Phdp* a uma concentração igual ao LD_{50}). Esta resposta inflamatória ficou visível não só no aumento do número de leucócitos no sangue, mas também no aumento de atividade dos parâmetros humorais imunes.

Os resultados sugerem que a maior atividade da resposta imunitária se deu após as 24 horas de coabitação, momento que determina também a invasão do patógeno em órgãos como o intestino anterior e o rim.

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que *Phdp* pode induzir um estado de infecção em *A. regius* através de um modelo de coabitação, invadindo num curto espaço de tempo os órgãos do hospedeiro, desencadeando a atividade do sistema imune inato como resposta à infecção.

Palavras-chave: LD₅₀, Modelo de coabitação, Hematologia, Parâmetros humorais imunes, Corvina.

Abstract

The intensive practices commonly used in aquaculture require an extreme contact between individuals, promoting stress, that acting in combination with other factors, such as bacteria, are likely to induce a disease state in fish. *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (*Phdp*) is a gram-negative bacterium known to cause serious disease outbreaks in several fish species. It is considered as one of the most threatening pathogen for aquaculture, likely to cause irreversible damage in the populations.

This work aimed to develop a *Phdp* infection protocol in *Argyrosomus regius*. Therefore, the dose which causes death to 50% of the population (LD₅₀), was established in a first trial. In a second trial, the development of the disease, including the fate that bacteria would have had in the fish by PCR analysis, as well as the consequences of the infection in both the fish hematological levels and immune parameters. A model of cohabitation was used by exposing healthy subjects with infected ones.

It was confirmed the virulence of the *Phdp* strain AQP 17.1 on *A. regius* individuals with an average weight of $28.3 \pm 10,9$ g, being the LD₅₀ 2.29×10^5 CFU ml⁻¹, presenting infected fish, typical symptoms of the disease in the chronic state.

The cohabitation model used in the second trial, allowed us to confirm that *Phdp* was able to infect individuals with an average weight of 23.4 ± 8.6 g by cohabitation. Those results suggest that the gills may have been one of the pathogen's main entry sites in the fish, spreading after 24 hours to the kidney and intestine.

Phdp induced an innate immune response in *A. regius* that was evaluated in a time course basis when comparing control cohabitants (vectors injected with Hanks balanced saline solution) with infected individuals (vectors injected with a suspension of *Phdp* in a concentration equal to LD₅₀). This inflammatory response was visible not only in the increasing number of blood leukocytes, but also in the increased activity of the humoral immune parameters.

The results suggest that the increased activity of the immune response occurred after 24 hours of cohabitation. At this time the invasion of the pathogen into organs such as the anterior intestine and the kidney was also verified.

The results of this study suggest that *Phdp* can induce a state of infection in *A. regius* through a cohabitation model, invading the organs of the host in a short time, thus triggering the activity of the innate immune system in response to the infection.

Keywords: LD₅₀, Cohabitation model, Hematology, Humoral immune parameters, Meagre.

Índice de matérias

1 Introdução.....	1
1.1 Aquacultura.....	2
1.2 Patógenos e aquacultura	3
1.3 <i>Argyrosomus regius</i>	4
1.4 Pasteurelose.....	5
1.5 Características culturais, morfológicas e formas de transmissão.....	6
1.6 Infecção por coabitação	9
1.7 Sistema imunitário dos peixes	9
1.8 Resposta hematológica	10
1.9 Resposta imune humoral	12
1.10 Objetivos do trabalho	15
2 Metodologia.....	17
2.1 Aclimatização dos indivíduos	18
2.2 Crescimento de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	19
2.3 Cálculo do LD ₅₀	20
2.4 Infecção por coabitação	20
2.5 Hematologia.....	22
2.5.1 Contagens totais de células sanguíneas	22
2.5.2 Quantificação de hemoglobina no sangue	22
2.5.3 Contagens diferenciais de células sanguíneas.....	22
2.5.4 Análise da atividade do complemento (ACH50).....	23
2.5.5 Anti-tripsina	24
2.5.6 Lisozima	25
2.6 Extração de DNA e reação em cadeia da polimerase (PCR)	25
2.7 Estatística	26
3 Resultados.....	27
3.1 Cálculo do LD ₅₀	28
3.2 Hematologia.....	29
3.3 Contagens diferenciais de células imunes	31
3.4 Parâmetros humorais imunes não específicos	33
3.5 Análise microbiológica e molecular	35

4 Discussão	39
5 Conclusão	51
6 Bibliografia	53

Índice de figuras

Figura 1.1.1 – Gráfico representativo da captura e aquacultura mundial de pescado (FAO, 2014)...	3
Figura 1.3.1 – Ilustração de <i>Argyrosomus regius</i> (FAO, 2015)	4
Figura 1.3.2 – Produção de <i>Argyrosomus regius</i> em aquacultura a nível global (FAO, 2014).....	5
Figura 1.5.1 – Forma celular da estirpe DI-21 de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> a uma objetiva de x5000 no microscópio eletrónico de varrimento (Martínez, 2014).	7
Figura 2.1.1 – Tanque para aclimação dos indivíduos.	18
Figura 2.3.1 – Aquários isolados utilizados no ensaio para cálculo do LD ₅₀ em <i>Argyrosomus regius</i>	20
Figura 2.4.1 – Sistema elaborado para o ensaio de coabitação.	21
Figura 2.5.4.1 – Microplaca com amostras de plasma para análise de ACH50.	23
Figura 2.5.5.1 – Análise da atividade anti-tripsina.....	24
Figura 3.1.1 – Mortalidade cumulativa (%) para a estirpe AQP 17.1 de <i>Phdp</i> em <i>Argyrosomus regius</i> . Legenda: (✕) Controlo (♦) 10 ⁴ CFU ml ⁻¹ (■) 10 ⁵ CFU ml ⁻¹ (▲) 10 ⁶ CFU ml ⁻¹	28
Figura 3.2.1 – Gráficos com contagem de eritrócitos (3.2.1a) e de leucócitos (3.2.1b) no sangue de indivíduos injetados com HBSS (■) e <i>Phdp</i> (■). Resultados apresentados em média ± desvio padrão (n=6). Asterisco indica diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos num tempo específico (p ≤ 0,05).	29
Figura 3.2.2 – Gráfico representativo da concentração de hemoglobina (g dl ⁻¹) no sangue de indivíduos injetados com HBSS estéril (■) e <i>Phdp</i> (■). Resultados apresentados em média ± desvio padrão (n=6). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre tempos (p ≤ 0,05).	30
Figura 3.2.3 – Gráfico representativo dos níveis de concentração de hemoglobina presentes em cada eritrócito de indivíduos injetados com HBSS estéril (■) e <i>Phdp</i> (■). Resultados apresentados em média ± desvio padrão (n=6). Asterisco indica diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos num tempo específico (p ≤ 0,05).	30
Figura 3.3.1 – Gráfico para a contagem de trombócitos no sangue de indivíduos injetados com HBSS estéril (■) e <i>Phdp</i> (■). Resultados apresentados em média ± desvio padrão (n=6). Asterisco indica diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos num tempo específico (p ≤ 0,05).	31
Figura 3.3.2 – Gráfico para a contagem de monócitos no sangue de indivíduos injetados com HBSS estéril (■) e <i>Phdp</i> (■). Resultados apresentados em média ± desvio padrão (n=6). Asterisco indica diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos (p ≤ 0,05).....	32
Figura 3.3.3 – Gráfico para a contagem de linfócitos no sangue de indivíduos injetados com HBSS estéril (■) e <i>Phdp</i> (■). Resultados apresentados em média ± desvio padrão (n=6). Asterisco indica diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos num tempo específico (p ≤ 0,05).	32
Figura 3.3.4 – Gráfico para a contagem de neutrófilos no sangue de indivíduos injetados com HBSS estéril (■) e <i>Phdp</i> (■). Resultados apresentados em média ± desvio padrão (n=6). Asterisco indica diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos num tempo específico (p ≤ 0,05).	33
Figura 3.4.1 – Gráfico representativo do complemento (uni ml ⁻¹) no plasma sanguíneo de indivíduos injetados com HBSS estéril (■) e <i>Phdp</i> (■). Resultados apresentados em média ± desvio padrão (n=6). Asterisco indica diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos (p ≤ 0,05). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre tempos (p ≤ 0,05).	34

Figura 3.4.2 – Gráfico representativo da tripsina inibida (%) no plasma sanguíneo de indivíduos injetados com HBSS estéril (■) e <i>Phdp</i> (■). Resultados apresentados em média ± desvio padrão (n=6).....	34
Figura 3.4.3 – Gráfico representativo da concentração de lisozima (ug mg ⁻¹) no plasma sanguíneo de indivíduos injetados com HBSS estéril (■) e <i>Phdp</i> (■). Resultados apresentados em média ± desvio padrão (n=6). Asterisco indica diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos ($p \leq 0,05$). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre tempos ($p \leq 0,05$).....	35
Figura 3.5.1 – Fígado apresentando nódulos brancos típicos de acumulação de <i>Phdp</i>	35
Figura 3.5.2 – Mortalidade cumulativa (%) ocorrida nos indivíduos injetados ao longo do ensaio. Esquema: Grupo controlo réplicas 1, 2 e 3 (⊗); Grupo infetado réplica 1 (▲) Réplica 2 (◆) Réplica 3 (■).....	36
Figura 3.5.3 – Mortalidade cumulativa (%) ao longo do ensaio para os indivíduos coabitantes do grupo infetado. Esquema: Réplica 1 (▲) Réplica 2 (◆) Réplica 3 (■).....	37
Figura 3.5.4 – Gel de agarose demonstrativo da presença de DNA de <i>Phdp</i> em órgãos internos (PCR), 24 horas pós-infecção. Setas indicam o aparecimento de bandas representativas do gene 16s rRNA de <i>Phdp</i> . Esquema: A (Controlo positivo); B (12h, brânquias, réplica 2 bactéria, indivíduo B); C (12h, intestino anterior, réplica 2 bactéria, indivíduo B); D (12h, fígado, réplica 3 bactéria indivíduo A); E (12h, brânquias, réplica 3 bactéria indivíduo A); F (12h, intestino anterior, réplica 3 bactéria indivíduo A); G (24h, rim, réplica 3 bactéria indivíduo B); H (12h, brânquias, réplica 3 bactéria indivíduo B); I (24h, intestino anterior, réplica 3 bactéria indivíduo B); J (24h, rim, réplica 2 bactéria indivíduo B); K (24h, brânquias, réplica 2 bactéria indivíduo B); L (24h, intestino anterior, réplica 2 bactéria indivíduo B); M (24h, baço, réplica 3 bactéria indivíduo A); N (24h, rim, réplica 3 bactéria indivíduo A); O (24h, brânquias, réplica 3 bactéria indivíduo A); P (24h, baço, réplica 3 bactéria indivíduo B); Q (Controlo negativo).....	37

Índice de tabelas

Tabela 1.5.I - Características das estirpes europeias, japonesas e americanas de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> (Magarinõs, 1992; Baptista, 1996).	8
---	---

Índice de abreviaturas, siglas e símbolos

ACH50 – “Alternative Complement Pathway” – Via Alternativa do Complemento

CIIMAR – “Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental”

FAO – “Food and Agriculture Organization” – Organização para a Alimentação e Agricultura

HBSS – “Hanks Balanced Salt Solution” – Tampão salino de Hanks

LD₅₀ – “Median Lethal Dose” – Dose que mata 50% da população

MHC – “Mean Corpuscular Hemoglobin” – Hemoglobina Corpuscular Média

Phdp – “*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*”

PCR – “Polymerase Chain Reaction” – Reação em Cadeia da Polimerase

TMC – “Tropical Marine Center” – Centro Marinho Tropical

UFC – “Unidades Formadoras de Colónia”

1 Introdução

1.1 Aquacultura

Atualmente, a aquacultura é uma indústria lucrativa, sendo aquela que mais proteína animal produz para consumo humano e que maior crescimento regista a nível mundial (Figura 1.1.1). A produção de peixe de aquacultura teve uma taxa de expansão anual média de 6,2 % entre os anos de 2000 a 2012, passando de 32,4 milhões para 66,6 milhões de toneladas. No ano de 2012, esta indústria apresentou um pico de produção histórico de 90,4 milhões de toneladas, englobando uma vasta produção de organismos marinhos onde se incluem peixes, plantas aquáticas, moluscos, anfíbios, crustáceos e tartarugas de água doce. Incluem-se ainda outros animais como os ouriços e pepinos do mar, ascídias e medusas comestíveis produzidos com vista a consumo humano (FAO, 2014).

Registos de 2012 indicam que os produtos provenientes de aquacultura correspondem a 42,2% das capturas mundiais de pescado que se situaram nos 158 milhões de toneladas, estimando-se como sendo provável que a aquacultura continue a contribuir fortemente para a procura internacional de peixe (Soto, 2008; FAO, 2014). A Ásia tem um papel importante uma vez que de lá provêm 88% da produção de aquacultura (FAO, 2014).

Apesar de Portugal ser um dos maiores consumidores de peixe, na União Europeia, registando uma média anual de 56,7 kg por habitante, a aquacultura praticada no país não é suficiente para ser considerada uma alternativa à atividade pesqueira. Segundo dados publicados em 2014 pela Direção Geral de Recursos Marinhos, Segurança e Serviços Marítimos no plano estratégico para a aquacultura, Portugal continua muito longe da média Europeia, registando apenas 2% do total da produção europeia no ano de 2011 para um total de 10 317 toneladas, com a Europa como um todo a produzir apenas 3,2% de peixe de aquacultura a nível mundial. No contexto da União Europeia, Espanha, França, Reino Unido, Itália e Grécia são os países que produzem a maior fatia a justificarem com isso os 3/4 desta produção. Registos desta mesma entidade revelam que em Portugal, a produção em águas marinhas ou salobras tem mostrado sinais de crescimento, no entanto os valores obtidos ainda não contrabalançam a diminuição das capturas provenientes da atividade pesqueira, ocorrida nos últimos anos.

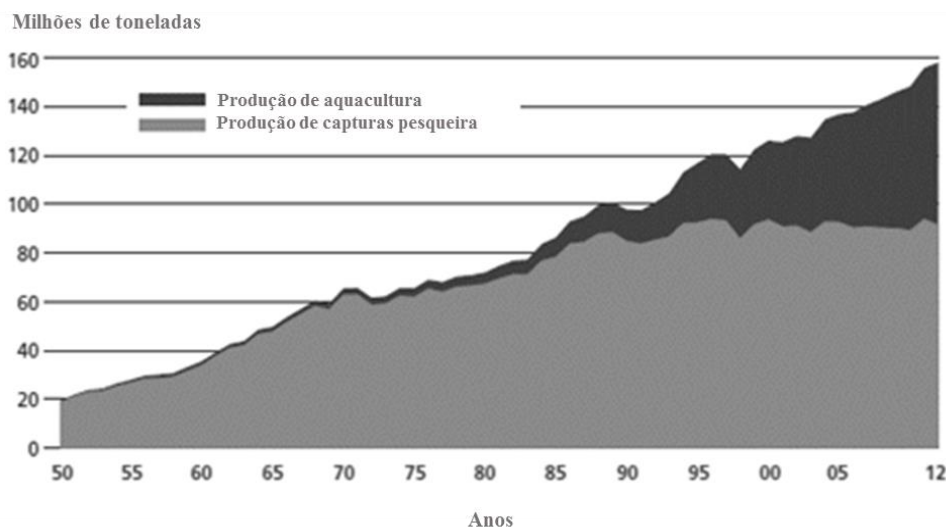


Figura 1.1.1 – Gráfico representativo da captura e aquacultura mundial de pescado (FAO, 2014)

1.2 Patógenos e aquacultura

Os sistemas intensivos de aquacultura e todo o *stress* que lhes é inerente podem levar ao aparecimento de doenças. Muitos dos prejuízos da indústria aquícola têm sido atribuídos não só ao aparecimento de doenças bacterianas, mas também a vírus e parasitas, cujo impacto prejudicial é promovido pela elevada densidade de indivíduos (Talpur, 2012). Estes surtos de doença são dos problemas mais significativos que impedem a indústria de evoluir e de se desenvolver (Laganà, 2011; Barroso, 2014; Ngugi, 2015). Como exemplo, entre 2009 e 2010 no Chile, vários surtos atingiram a produção de salmão do Atlântico em jaulas *offshore* levando a elevados prejuízos para a indústria aquícola do país (FAO, 2014).

Os peixes em aquacultura são submetidos a um *stress* maior do que os mesmos peixes no seu habitat selvagem, o elevado teor orgânico do meio que os envolve, as variações do teor de oxigénio dissolvido, a qualidade da água e a proximidade entre indivíduos contribui para aumentar a suscetibilidade a infeções (Prabhakar, 2010; Du, 2015). Por sua vez, o manuseamento, transporte, densidades e confinamento são também indutores de *stress*, agravando o problema (Costas, 2011).

Os peixes encontram-se em contacto direto com o meio ambiente que os rodeia, que contem uma grande variedade de microrganismos inofensivos ou extremamente patogénicos (Ellis, 2001). Muitas das bactérias que aparecem nos cultivos são patógenos oportunistas

facultativos que são ativados por ambientes adversos ou indivíduos debilitados (Prabhakar, 2010). Até hoje, têm sido descritas muitas bactérias patogénicas para os peixes, mas apenas um grupo relativamente pequeno é responsável pela maioria dos surtos e prejuízos em organismos de aquacultura (Toranzo, 2005).

Diversos trabalhos já publicados enumeram as doenças mais comuns para a produção em aquacultura, onde podemos encontrar como agentes bacterianos, *Vibrio anguillarum*, *Yersinia ruckeri*, *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida*, *Renibacterium salmoninarum* e *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Ellis, 1999).

1.3 *Argyrosomus regius*

A corvina, *Argyrosomus regius* (Asso, 1801) (Figura 1.3.1), membro da família Sciaenidae pode ser encontrada perto de estuários e lagoas costeiras no Mar Mediterrâneo, Mar Negro, Costa Atlântica da Europa e Costa Oeste de África (Mylonas, 2013).



Figura 1.3.1 – Ilustração de *Argyrosomus regius* (FAO, 2015)

Há um interesse crescente entre empresas de todo o mundo para o cultivo de espécies de rápido crescimento, como a cobia (*Rachycentrom canadum*), o charuteiro-catarino (*Seriola dumerili*) e diferentes espécies de garoupas e atuns, encontrando-se estes animais num pequeno grupo de peixes selecionados, onde se tem realizado a maioria da investigação (Roo, 2010; Shabana, 2012).

Em países como Portugal, Espanha, Grécia, Itália e França, a dourada (*Sparus aurata*) e o robalo (*Dicentrarchus labrax*) são as principais espécies cultivadas. No entanto, com a produção excessiva destas espécies e a consequente saturação de mercado, há um aumento da concorrência, conduzindo à diminuição das margens de lucro, levando à necessidade de diversificação das espécies cultivadas (Brunheta, 2011).

A. regius é uma espécie candidata para a diversificação de teleósteos marinhos em aquacultura. O seu cultivo cresceu exponencialmente nos últimos anos (Figura 1.3.2), principalmente porque possui uma carne de alta qualidade e sabor, tem elevado valor comercial, crescimento rápido de juvenis em jaulas (entre 16 e 20°C) e elevada tolerância à salinidade. Tem a particularidade de fornecer uma carne com pouca gordura, mesmo quando obtida a partir de condições de cultivo intensivo (Roo, 2010; Shabana, 2012; Vallés, 2013).

A história da corvina em aquacultura é bastante recente. O desenvolvimento do cultivo é confrontado com problemas de mortalidade de larvas e pós larvas devido a problemas com nutrição, patologias, malformações, canibalismo, tolerância ao manejo e densidade (Afonso, 2008). Atualmente o cultivo é realizado em tanques de terra e em jaulas em mar (FAO, 2015).



Figura 1.3.2 - Produção de *Argyrosomus regius* em aquacultura a nível global (FAO, 2015)

1.4 Pasteurelose

A pasteurelose ou fotobacteriose é uma doença importante à escala global, afetando cultivos em todo o mundo, onde se incluem diversas espécies de peixes, é frequentemente reportada como aparecendo em novas espécies em aquacultura (Elkamel, 2002). É uma patologia provocada pelo agente *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (*Phdp*), já antiga em países como os Estados Unidos da América e Japão (Baptista, 1996).

No Japão é bastante comum em peixes marinhos de aquacultura, incluindo espécies como *Plecoglossus altivelis*, *Spondyllosoma cantharus*, *Pagellus bogaraveo*, *Epinephelus*

morio e *Seriola quinqueradiata*. Nos Estados Unidos da América, causou epidemias isoladas em *Morone americanus* e *Morone saxatilis* (Avci, 2013).

Isolada originalmente de surtos ocorridos em populações naturais de *Morone americanus*, em 1963, os primeiros registos de surtos da doença na Europa deram-se no ano de 1990 e têm causado perdas económicas nos países mediterrâneos na aquacultura de dourada, robalo e linguado (*Solea senegalensis* e *Solea solea*) (Nagano, 2009; Brunheta, 2011; Mauri, 2011; Pellizzari, 2013; Andreoni, 2014), continua a causar perdas de pescado selvagem e de cultura (Baptista, 1996).

Esta septicemia bacteriana ocorre principalmente durante os meses de Verão e Outono, estando associada a temperaturas elevadas e má qualidade da água.

No Verão, o período de uma epizootia dura em média cerca de dez dias, a mortalidade pode rapidamente chegar aos 80% em contraste com o período de Outono, onde as mortalidades se dão por um período mais longo. Devido à rapidez com que se dá a instalação da patologia nos indivíduos e devido também aos poucos sinais de aviso, torna-se mais complicado combater um surto com terapia adequada (Elkamel, 2002).

As larvas e juvenis são muito suscetíveis à doença, contrariamente a animais maiores do que 50g, que são mais resistentes, a mortalidade em larvas pode variar entre 50 e 100%, já em juvenis pode ir até 50% (Avci, 2013).

Esta resistência dos peixes maiores é provavelmente devida a uma maior maturidade do sistema imunitário dos indivíduos, nomeadamente à maior eficiência da fagocitose e destruição da bactéria por neutrófilos e macrófagos (Pellizzari, 2013; Andreoni, 2014).

1.5 Características culturais, morfológicas e formas de transmissão

A *Phdp* (Figura 1.5.1), anteriormente conhecida como *Pasteurella piscicida*, é uma bactéria gram-negativa, com dimensões de 0,5–0,8µm por 0,7–2,6µm, em forma de bacilo, halófico, sem mobilidade, anaeróbio facultativo, fermentativo, oxidase e catalase positiva, com coloração bipolar (Tabela 1.5.I) (Baptista, 1996; Elkamel, 2002; Brunheta, 2011).

Independentemente da origem geográfica e fonte de isolamento da bactéria, todas as estirpes do patógeno são bioquimicamente e serologicamente homogêneas (Toranzo, 2005).

Na fase exponencial de crescimento, a bactéria pode ocorrer em cadeias, ser mais longa e apresentar a forma de bastonete, mudando depois de forma em fases mais tardias de crescimento, tomando a forma de coco-bacilo (Elkamel, 2002).

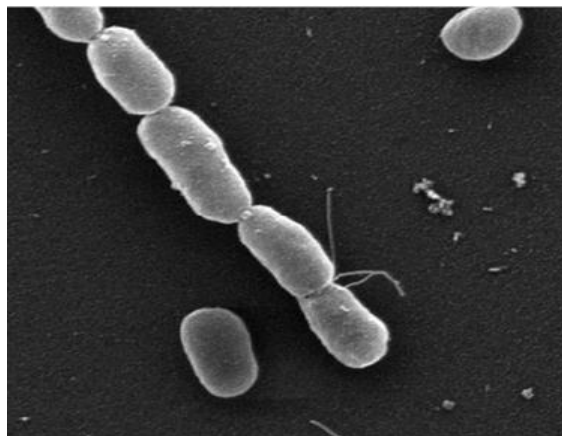


Figura 1.5.1 – Forma celular da estirpe DI-21 de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* a uma objetiva de x5000 no microscópio eletrônico de varrimento (Martínez, 2014).

É causadora de uma elevada taxa de mortalidade, podendo o indivíduo afetado não apresentar qualquer sinal externo da doença (Elkamel, 2002), exceto em raríssimas ocasiões, onde os indivíduos apresentam áreas ligeiramente hemorrágicas sobretudo na cabeça e brânquias. Normalmente o indivíduo afetado exibe uma aparência saudável (Toranzo, 2005; Brunheta, 2011).

Esta bactéria excreta uma exotoxina (AIP56) reconhecida como o fator chave na virulência de todas as estirpes patogênicas de *Phdp*, no entanto não se encontra presente nas estirpes não virulentas. Esta proteína é excretada em doses elevadas e é considerada responsável pela apoptose de fagócitos em casos de pasteurelose aguda, provocando a lise destas células e libertando com isso moléculas capazes de induzir danos nos tecidos (Vale, 2005; Vale, 2007; Andreoni, 2014).

Esta septicemia é caracterizada por lesões crônicas e pela presença de nódulos brancos com um diâmetro de aproximadamente 0,3 a 0,5 milímetros nos órgãos dos peixes afetados, sendo o rim e baço, os principais locais onde se dão acumulações de bactéria (podendo apresentar até uma certa palidez) (Baptista, 1996; Toranzo, 2005; Nagano, 2009; Brunheta, 2011; Banda, 2012; Andreoni, 2014; Domingues, 2014).

O patógeno pode ser transmitido verticalmente através dos fluídos ovários e seminais de peixes, aparentemente saudáveis, mas também horizontalmente (Toranzo, 2005; Brunheta, 2011). As vias de entrada dependem bastante do hospedeiro, alguns peixes podem mesmo ser infetados por ingestão do patógeno (Benhamed, 2014).

Infeções experimentais demonstraram que esta bactéria é bastante patogénica para várias espécies de peixes com uma dose letal que mata 50% de uma população de indivíduos (LD₅₀), num intervalo que varia entre 10³ e 10⁶ UFC ml⁻¹ (Elkamel, 2002).

De forma a controlar possíveis surtos, recorrer-se ao uso de vacinas como uma medida profilática para imunização dos peixes (Andreoni, 2014). Após aparecimento de sinais clínicos da doença, o uso de antibióticos é uma das formas de controlo utilizadas.

Tabela 1.5.I - Características das estirpes europeias, japonesas e americanas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Magarinõs, 1992; Baptista, 1996).

(+) Positivo, (-) Negativo

Teste presença/ausência	Crescimento
Coloração de Gram (-)	5°C (-)
Coloração Bipolar (+)	15°C (+)
Mobilidade (-)	25°C (+)
Oxidase (+)	37°C (-)
Catalase (+)	
Vermelho de Metilo (Fraco Positivo)	Salinidade
Voges-Proskauer (+)	0% NaCl (-)
Produção de Indol (-)	3% NaCl (+)
Redução de Nitratos (-)	5% NaCl (-)
Utilização de Citrato (-)	8% NaCl (-)
Produção de Sulfato de Hidrogénio (-)	10% NaCl (-)
Oxidação-Fermentação (Glucose) (F)	Meio de crescimento
Produção de gás a partir de glucose (-)	TSA+2% NaCl (+)
Arginina dihidrolase (+)	BHIA+2% NaCl (+)
Lisina descarboxilase (-)	Agar marinho (+)
Ornitina descarboxilase (-)	Agar de tiosulfato, citrato, bÍlis e sacarose (-)
Triptofano desaminase (-)	Agar de MacConkey (-)
β - Galactosidase (ONPG) (-)	Produção de Ácido
Urease (-)	Glucose (+)
Gelatinase (-)	Manose (+)
Caseinase (-)	Galactose (+)
Fosfolipase (+)	Frutose (+)
Elastase (-)	Ramnose (-)
Lipase (-)	Anabinose (-)
Amilase (-)	Amigdalina (-)
	Melibiose (-)
Hemólise	Resistência
Eritrócitos de truta (-)	Agente vibriostático O/129 (-)
Eritrócitos de ovelha (-)	Novobiocina (-)

1.6 Infecção por coabitação

Os ensaios de infecção com bactérias em animais marinhos devem refletir o que acontece naturalmente (Nagano, 2009), assim sendo, o método de transmissão mais comum e direto entre peixes, quer selvagens ou de aquacultura, é a transmissão horizontal sem a utilização de qualquer vetor ou hospedeiros intermediários (Woo, 2014).

No caso da pasteurelose, a infecção pode ser induzida por diversas formas, por infecção intraperitoneal, imersão ou por administração gástrica. No entanto não são estas, as vias naturais de infecção, uma vez que permitem à bactéria ultrapassar as defesas naturais presentes na pele, muco, brânquias e sistema intestinal do animal. Métodos como o de coabitação e de imersão são mais adequados, promovendo uma via de infecção natural, provocando o primeiro contacto da bactéria com o corpo do peixe (Murray, 1992; Alcorn, 2005; Nagano, 2009).

A infecção por imersão apresenta algumas diferenças que diferem do método de coabitação. Neste método, os animais serão expostos a uma concentração elevada do patógeno, o que não aconteceria no caso de uma infecção no seu habitat natural, além de que o cultivo *in vitro* de bactérias, por vezes, pode inativa-las, podendo perder virulência.

O uso do método de coabitação ultrapassa todos os aspetos já abordados e imita uma infecção idêntica aquela que se dá na natureza (Alcorn, 2005; Drangsholt, 2011).

A via de infecção usada pode provocar diferenças quanto à patogenicidade das bactérias (Nagano, 2009).

1.7 Sistema imunitário dos peixes

Os peixes possuem um sistema imunitário extremamente desenvolvido, permitindo elevada resistência às patologias que podem afetá-los no seu meio natural (Machado, 2014)

A principal função do sistema imune é fazer a distinção entre o que é próprio e o que é invasor, possibilitando a proteção contra patógenos e destruindo células modificadas ou alteradas, como é o caso das células malignas. Funciona de forma a não permitir que os

patógenos se estabeleçam impossibilitando o aparecimento de doença (Prabhakar, 2010; Workenhe, 2010; Fischer, 2013).

Os peixes, apesar de possuírem bastantes parecenças a nível molecular e celular com os mamíferos, o seu sistema imunitário têm diferenças tanto a nível estrutural como morfológico. Contrariamente aos mamíferos, os peixes não possuem medula óssea ou gânglios linfáticos, sendo o rim anterior, o baço e o timo os principais órgãos produtores de células sanguíneas. O rim anterior tem uma função idêntica à da medula óssea nos mamíferos, possuindo papel idêntico na hematopoese (Workenhe, 2010; Sfacteria, 2014).

Apesar de possuírem todos os componentes da resposta imune adaptativa, a resposta imune inata é preferencialmente ativada nos peixes, proporcionando a primeira linha de defesa contra organismos invasores (Sfacteria, 2014). Este é o sistema mais primitivo, capaz de fornecer proteção, encontrando-se presente em todos os organismos, sendo especialmente desenvolvido em peixes (Machado, 2014). Para vertebrados ectotérmicos como os peixes, a relativa autonomia do sistema inato relativamente à temperatura é importante, uma vez que o sistema de imunidade adaptativa demora um tempo considerável a responder e é mais dependente da temperatura (Ellis, 2001).

A imunidade adaptativa por contraste baseia-se numa função de memória imunológica, garantindo a defesa contra a reexposição a um mesmo patógeno (Prabhakar, 2010).

Ambos os sistemas de resposta possuem componentes humorais e celulares, sendo que o inato possui estruturas anatómicas que lhe permitem servir de barreira contra infeções. Apesar de funções distintas, eles intercalam-se, dependendo a resposta de um, da resposta proveniente do outro, influenciando-se mutuamente (Prabhakar, 2010).

1.8 Resposta hematológica

O sangue é conhecido por exibir mudanças patológicas antes de ser possível verificar qualquer mudança externa no corpo dos peixes após confronto com agressões externas (Li, 2011) O conhecimento das respostas hematológicas e imunológicas pode contribuir para a avaliação de resistência contra as doenças infecciosas (Santos, 2012).

Os índices hematológicos são parâmetros importantes para avaliação do estado fisiológico de um peixe, podendo-se alterar conforme um número diversificado de fatores, entre os quais, o estado de saúde dos indivíduos (Hrubec, 2001; Vázquez, 2007). Alterações nestes índices podem indicar uma resposta fisiológica contra infecções bacterianas, ocorrendo no caso de invasão por patógenos. O diagnóstico pode ser feito através de estudos hematológicos, caso os valores de referência estejam previamente estabelecidos. O estudo de um hemograma envolve a determinação da contagem total de eritrócitos, contagem total de leucócitos, hematócrito, a concentração de hemoglobina e contagens diferenciais de leucócitos (Vázquez, 2007).

Uma compreensão da imunologia deve ser baseada na função dos leucócitos, uma vez que as respostas imunes dos vertebrados são mediadas por leucócitos (Pastoret, 1998). Os diferentes tipos de leucócitos derivados das linhagens linfoides e mieloides encontrados em mamíferos estão presentes em peixes, incluindo linfócitos B e T, células *natural killer*, monócitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, trombócitos e células dendríticas, sendo estas morfológica e funcionalmente semelhantes (Secombes, 1996; Castro, 2015). As células associadas ao sistema imune inato, tais como por exemplo os monócitos, os neutrófilos e outros tipos de granulócitos, não requerem nenhuma ligação específica ao antígeno, uma vez que reconhecem estruturas moleculares comuns ou produtos libertados pelo patógeno. A ação é imediata, sendo induzida num curto espaço de tempo depois do encontro com um antígeno estranho (Cain, 2011).

A fagocitose é o principal mecanismo celular inato encontrado em todos os peixes. As etapas da fagocitose nos peixes são semelhantes aquelas presentes em mamíferos, sendo realizadas principalmente por neutrófilos e macrófagos. A sua ação é reforçada por opsoninas, enzimas entre as quais a lisozima, a peroxidase e por componentes de complemento (Pastoret, 1998).

Os neutrófilos são dos primeiros tipos celulares a chegarem e responderem ao local da inflamação (Rieger, 2011). Estes são conhecidos por possuírem atividade antimicrobiana através da sua elevada capacidade em realizar a fagocitose. A um nível extracelular, possuem capacidades que os diferenciam de outros leucócitos, tais como a desgranulação dos seus grânulos citoplasmáticos contendo uma vasta gama de mediadores solúveis incluindo enzimas, péptidos antimicrobianos e moléculas redox potentes. Recentemente foi descoberta também a capacidade de libertação de armadilhas extracelulares. Estas células estão

presentes nas espécies de peixes já estudadas e são componentes críticos da defesa imune inata (Castro, 2015). Todas estas capacidades nos neutrófilos procuram limitar a disseminação de uma série de patógenos (Rieger, 2011).

Os monócitos e macrófagos estão presentes em todo o corpo dos indivíduos, sendo as principais células fagocitárias fazendo uma vigilância imunológica ou patrulha dos tecidos. São as primeiras células a ocorrer ao local de infecção, onde produzem citocinas modelando a ação de outros tipos de células recrutadas (Rieger, 2011; Castro, 2015). Estas células possuem potentes defesas intracelulares e extracelulares antimicrobianas (Rieger, 2011). Após uma infecção ou danos em tecidos, os monócitos são rapidamente recrutados para os tecidos afetados, onde se diferenciam em macrófagos (Castro, 2015).

Os peixes possuem células equivalentes às plaquetas presentes nos mamíferos, sendo denominados de trombócitos que se encontram envolvidas na coagulação do sangue. Estas células possuem um núcleo como principal diferença para as plaquetas nos mamíferos (Castro, 2015).

1.9 Resposta imune humoral

A resposta imune inata é caracterizada pela proliferação e migração de células fagocíticas para o foco de infecção, estas produzem uma variedade de moléculas bactericidas capazes de degradar e matar organismos invasores. Tanto os macrófagos como os neutrófilos vão atacar com eficiência os patógenos através da geração de lisozima, fatores do complemento e compostos anti proteases, entre outros. (Machado, 2014).

O complemento é um mecanismo essencial, não específico, que participa na proteção, atuando como um sistema da primeira linha de defesa contra inflamações locais (Prabhakar, 2010; Nakao, 2011; Zhang, 2014; Melillo, 2015). É uma parte essencial do sistema imune inato e envolve cerca de 35 proteínas solúveis com ligação à membrana (Claire, 2002; Boshra, 2006). Apesar das suas inúmeras funções tais como a promoção de respostas inflamatórias, limpeza de células apoptóticas e de restos de células necróticas e modulação das respostas imunes adaptativas, o complemento é mais conhecido pela sua capacidade de matar agentes patogénicos através da criação de poros nas membranas de superfície (Claire, 2002; Secombes, 2012).

A atuação do complemento ocorre pela via clássica, via alternativa e via da lectina já descritas para vários teleósteos (Pellitero, 2008; Prabhakar, 2010; Uribe, 2011; Melillo, 2015). A via clássica do complemento é ativada quando se dá a ligação do anticorpo e/ou da proteína C-reativa à superfície celular do microrganismo invasor (Uribe, 2011). A via alternativa do complemento é independente de anticorpos e é extremamente ativa no plasma sanguíneo dos peixes, quando comparada com a mesma via no plasma dos mamíferos. É ativada diretamente por contacto com microrganismos estranhos (Ellis, 1999; Uribe, 2011; Yadav, 2014). A atividade pode ser medida através do potencial hemolítico do plasma (Yadav, 2014). A via da lectina requer a interação de lectinas (Pellitero, 2008).

A lisozima é uma enzima bacteriolítica amplamente distribuída por todo o corpo, fazendo parte dos mecanismos de defesa não específicos da maioria dos animais (Uribe, 2011). Tem sido estudada em muitas espécies de peixes, encontrando-se presente em todas as espécies estudadas. Atua através da hidrólise do ácido N-acetilmurâmico e a N-acetilglucosamina, que são constituintes da camada de peptidoglicano da parede celular, resultando em lise celular (Iwama, 1996; Ellis, 1999; Uribe, 2011; Adedeji, 2013). Inicialmente associada apenas à defesa contra bactérias Gram-positivas, foi também, mais recentemente descoberto que é eficaz contra bactérias Gram-negativas atuando na camada interior de peptidoglicano, havendo no entanto a necessidade de uma pré-disrupção da parede externa (Iwama, 1996; Ghafoori, 2014). Esta enzima é também conhecida por estimular uma opsonina do sistema do complemento e células fagocíticas, facilitando a fagocitose de partículas e ativando diretamente leucócitos (Uribe, 2011). Excretada por leucócitos (essencialmente por neutrófilos e monócitos) e por tecidos ricos em leucócitos, tais como rim, baço, pele, brânquias e trato digestivo. No plasma, as principais fontes de lisozima encontradas através de análise histoquímica são provavelmente os monócitos e neutrófilos (Ellis, 1999; Adedeji, 2013; Ghafoori, 2014).

Os patógenos muitas vezes produzem enzimas que os ajudam a penetrar os tecidos quando invadem o corpo de um indivíduo (Bowden, 1997). Estas enzimas proteolíticas têm como uma das suas finalidades, combater os mecanismos imunes do peixe infetado. Para lhes fazer oposição, os peixes possuem tanto no plasma como em outros fluidos corporais, inibidores de proteínas capazes de neutralizar as enzimas produzidas pelos organismos patogénicos, nas quais se encontram as anti-proteases (Bowden, 1997; Magnadóttir, 2006).

O complemento, a lisozima e as anti protéases são alguns dos parâmetros sanguíneos mais analisados para estudar o estado de saúde dos organismos ou a resposta do sistema imunitário quando confrontado num momento por algo que lhe é estranho.

1.10 Objetivos do trabalho

Este trabalho teve como objetivos:

I. A elaboração de um protocolo de infecção por coabitação de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* em *Argyrosomus regius*.

II. Estabelecer a dose letal 50% para *Argyrosomus regius* (LD₅₀).

III. Estudo da infecção com *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* em indivíduos experimentalmente infetados por coabitação.

IV. Estudar o perfil hematológico e parâmetros imunológicos de *Argyrosomus regius* na infecção por *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

2 Metodologia

2.1 Aclimatização dos indivíduos

Foram adquiridos 450 indivíduos da espécie *Argyrosomus regius* na empresa Maresa, Mariscos de Estero S.A., localizada na região de Ayamonte (Huelva, Espanha) e transportados para o Laboratório de Aquacultura da Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar, em Peniche, onde foram colocados num sistema de suporte de vida da Tropical Marine Center (TMC) com recirculação de água e arejamento contínuo. Os indivíduos foram mantidos num tanque de 500L (Figura 2.1.1), com constante fluxo de água salgada filtrada e fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão durante 7 dias até ao início do primeiro ensaio.

Durante o período de aclimação, os indivíduos foram alimentados a uma taxa de 1,5% de biomassa. A temperatura e salinidade foram controladas diariamente e mantidas a $19 \pm 1^\circ\text{C}$ e 35 ± 1 respetivamente. A concentração de amónia (ppm) (API ref.: LR8600) e nitritos (ppm) (API) presentes no sistema foram monitorizados regularmente e mantidos a valores nulos. Sempre que necessário, procedeu-se a mudanças parciais de água.

Todos os ensaios de infeção com *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, decorreram na sala de Patologia do Laboratório de Aquacultura da Escola Superior de Tecnologia do Mar de Peniche.

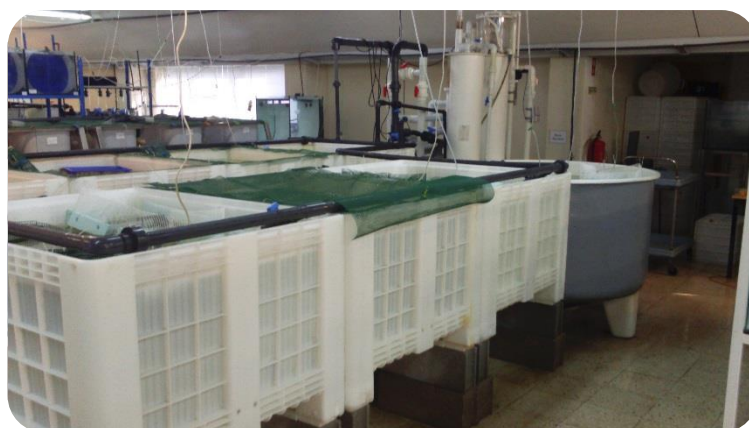


Figura 2.1.1 – Tanque para aclimação dos indivíduos.

2.2 Crescimento de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

Foi utilizada a estirpe AQP 17.1 de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* fornecida gentilmente pela Dra. Alicia Toranzo (Universidade de Santiago de Compostela, Espanha).

Em condições de assepsia, a bactéria *stock* foi descongelada e colocada em crescimento em Tryptic Soy Agar (Sigma-Aldrich ref.: 22091), suplementado com 1,5% (m/v) NaCl (VWR) – (TSA+1,5%NaCl) incubando de seguida durante 48 horas a uma temperatura de 25°C. Após crescimento, as colónias foram repicadas para Tryptic Soy Broth (Sigma-Aldrich ref.: 22092) suplementado com 1,5% (m/v) NaCl (VWR) – (TSB+1,5%NaCl) e incubado durante 48 horas, a 25°C, com agitação contínua (100 rpm) (Stuart ref.: SI500).

De forma a manter a cultura pura viável ao longo de todos os procedimentos, foram guardadas alíquotas de *Phdp* a -80°C em 10% de glicerol estéril. Sempre que necessário, procedeu-se à repicagem da cultura e crescimento em meio e condições adequadas.

A relação entre absorvância e concentração de bactéria presente em tampão salino de Hanks, foi calculada recorrendo a uma reta de calibração. Após crescimento em meio TSB+1,5%NaCl, foi realizada centrifugação a 3500 rpm (Eppendorf 5804 R) durante 30 minutos, à temperatura de 4°C e ressuspendeu-se o pellet em tampão salino de Hanks também conhecido como HBSS (5,4 mM de KCl, 0,3 mM de Na₂HPO₄, 0,4 mM de KH₂PO₄, 4,2 mM de NaHCO₃, 137 mM de NaCl, 5,6 mM de D-glucose, pH 7,4).

Foram realizadas diluições decimais sucessivas em HBSS e lida a absorvância, a 600nm, de cada uma das diluições. A fim de proceder à contagem do número de unidades formadoras de colónias por mililitro (UFC ml⁻¹), inoculou-se em duplicado, placas com 100µl de cada diluição em meio TSA+1,5%NaCl de cada diluição e contou-se as UFC obtidas após 48 horas de incubação a 25°C.

No final foi construído um gráfico com a relação UFC ml⁻¹ versus absorvância.

2.3 Cálculo do LD₅₀

Foi utilizado um total de 72 indivíduos com peso médio de $28,3 \pm 10,9$ g dos quais foram colocados aleatoriamente 6 indivíduos por cada aquário, densidade de 7kg m^{-3} em sistema fechado individual, arejamento contínuo, temperatura regulada a 22°C e salinidade a 35 ± 1 . Foram injetados intraperitonealmente com $100\mu\text{l}$ de suspensões previamente preparadas e ajustadas a $8,75 \times 10^4$, $8,75 \times 10^5$ e $8,75 \times 10^6$ UFC ml^{-1} . O grupo controle foi injetado com $100\mu\text{l}$ de HBSS estéril. Utilizou-se três réplicas por concentração (Figura 2.3.1).

Os indivíduos foram anestesiados utilizando 2-Phenoxietanol ($0,5\text{ml L}^{-1}$) (Sigma-Aldrich ref.: 77699) para se proceder a medições biométricas e respetiva injeção.

O ensaio decorreu por um período de dez dias durante os quais foi observado o comportamento e registada diariamente a mortalidade dos indivíduos. O cálculo do LD₅₀ baseou-se no método elaborado por Reed & Muench (1938).

Foi realizada extração do rim, fígado e baço de todos os indivíduos e feita a análise microbiológica dos órgãos dos indivíduos mortos em placas com meio TSA+1,5%NaCl. Os órgãos de todos os indivíduos foram conservados à temperatura de -80°C para posterior análise molecular.



Figura 2.3.1 – Aquários isolados utilizados no ensaio para cálculo do LD₅₀ em *Argyrosomus regius*.

2.4 Infecção por coabitação

Foram montados dois sistemas independentes com recirculação, cada um composto por três aquários nos quais foram colocados um total de 156 indivíduos com peso médio de $23,4 \pm 8,6$ g distribuídos aleatoriamente a uma razão final de 26 indivíduos por aquário, a uma densidade de $13,5\text{kg m}^{-3}$ (Figura 7).

Dos 26 indivíduos de cada aquário, 5 indivíduos foram injetados com 100µl de uma suspensão de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* em HBSS a uma dose de $2,29 \times 10^5$ UFCml⁻¹. No grupo controlo, os 5 indivíduos por aquário foram injetados com 100µl de HBSS estéril. Os indivíduos injetados foram marcados com um pequeno corte na barbatana caudal para que fosse possível fazer a distinção entre estes e os indivíduos não injetados.

O ensaio decorreu durante 2 semanas, nas quais foram amostrados 2 indivíduos por aquário, totalizando um n=6 por tratamento a cada intervalo de tempo. As amostragens decorreram às 0h, 3h, 6h, 9h, 12h, 24h, 48h, 72h e 360h após injeção.



Figura 2.4.1 – Sistema elaborado para o ensaio de coabitação.

A cada ponto de amostragem, os indivíduos foram anestesiados utilizando 2-Phenoxietanol (0,5ml L⁻¹) (Sigma-Aldrich ref.: 77699), o sangue foi recolhido com seringas heparinizadas (3000 unidades ml⁻¹) e colocado em tubos Eppendorfs com 20µl de heparina sódica (3000 unidades ml⁻¹). O sangue foi utilizado para contagens totais de eritrócitos e leucócitos e quantificação da concentração de hemoglobina. Também foi efetuado um esfregaço de sangue para contagens diferenciais de leucócitos. O plasma foi obtido após centrifugação do restante sangue (10000 rpm durante 10 minutos a 4°C) e imediatamente congelado a -80°C. A avaliação dos parâmetros plasmáticos e esfregaços de sangue foram realizados no Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR, Porto).

Brânquias, rim, fígado, baço e intestino anterior foram também amostrados e armazenados a -80°C para análise molecular.

Foi registada a mortalidade que ocorreu durante este período.

2.5 Hematologia

2.5.1 Contagens totais de células sanguíneas

Para avaliar a concentração total de leucócitos e eritrócitos no sangue foram realizadas diluições de 1:20 e 1:200 respetivamente. As diluições foram feitas em HBSS com heparina sódica a 30 unidades ml^{-1} . De ambas as diluições, foram colocados 9 μl numa câmara de Neubauer para contagens ao microscópio ótico e obtenção do número de células. Os resultados são apresentados em $\times 10^4$ células μl^{-1} e $\times 10^6$ células μl^{-1} para leucócitos e eritrócitos respetivamente.

2.5.2 Quantificação de hemoglobina no sangue

A hemoglobina foi quantificada utilizando o método colorimétrico de Drabkin (Spinreact, ref.:1001230). Num tubo foram colocados 500 μl de reagente de Drabkin diluído a 1 $\times$ com 2 μl do sangue a analisar, colocando-se posteriormente numa placa de 96 poços para leitura da absorvância a 540nm.

Durante a preparação, a placa foi mantida no escuro para impedir a reação prematura do reagente.

Todas as análises foram realizadas em triplicado.

2.5.3 Contagens diferenciais de células sanguíneas

A contagem pressupõe a preparação prévia das lâminas onde se realizou o esfregaço durante a amostragem dos indivíduos. Após secas e fixadas durante 1 minuto com solução de formol-etanol (10% de 37% formaldeído em etanol 96%), foi utilizado corante de Wright's (Haemacolor; Merck) para coloração das lâminas. Para deteção de neutrófilos foi utilizada a técnica descrita por Afonso *et al.* (1998), onde é facilitada a visualização de neutrófilos através da marcação da peroxidase presente nos neutrófilos. Foi realizada contagem de 200 leucócitos e classificados como trombócitos, linfócitos, neutrófilos e monócitos. As lâminas foram analisadas no microscópio ótico sob óleo de imersão (1000 $\times$). Os resultados são apresentados em valor absoluto ($\times 10^4$ μl^{-1}) de cada tipo celular.

2.5.4 Análise da atividade do complemento (ACH50)

A determinação da atividade alternativa do complemento teve como base o método de Sunyer *et al.* (1995). Foram utilizados os seguintes tampões: tampão teste - 5mM $C_4H_3N_2NaO_3$ (Sigma-Aldrich ref.:11715), 0,13mM NaCl (Merck ref.:106404.1000), 10mM Mg^{+2} (VWR), 10mM EGTA (Sigma-Aldrich ref.:03779), pH 7,3 com gelatina a 1% (Fluka), e tampão stop - 5mM $C_4H_3N_2NaO_3$, 0,13mM NaCl, 20mM EDTA (Sigma-Aldrich ref.:E4884), pH 7,3 com gelatina a 0,1%.

Utilizou-se eritrócitos de coelho desfibrinados (Probiológica, ref.:0401001) lavados com soro fisiológico (0,9% NaCl) e centrifugados (3500 rpm, 5 minutos) até exclusão das células mortas. Após lavagem, a suspensão foi ajustada a $2,8 \times 10^8$ células ml^{-1} com o auxílio do microscópio e de contagem numa câmara de Neubauer.

Foram realizadas duas diluições (1:32 e 1:48) do plasma de cada uma das amostras em tampão teste, transferidas para placas de 96 poços onde se procedeu às restantes diluições:

- 1:32 $\rightarrow$ 1:64 $\rightarrow$ 1:128
- 1:48 $\rightarrow$ 1:96 $\rightarrow$ 1:192

Em cada um dos poços colocou-se 10 μ l da suspensão de eritrócitos de coelho utilizando uma pipeta multicanal para rápida colocação na placa. Incubou-se a placa à temperatura ambiente durante 100 minutos com agitação contínua. Após o tempo decorrido a reação foi parada adicionando-se 150 μ l de tampão stop a cada um dos poços e colocaram-se as placas a centrifugar a 1000 rpm durante 150 segundos e temperatura ambiente.

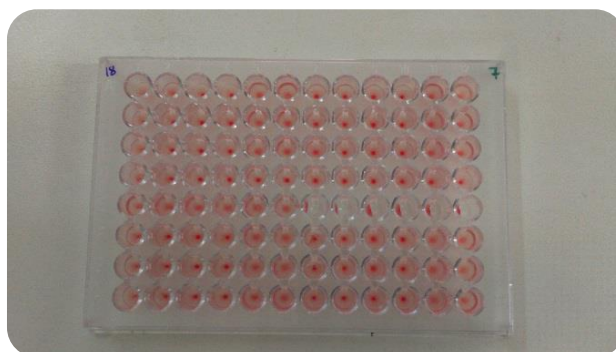


Figura 2.5.4.1 – Microplaca com amostras de plasma para análise de ACH50.

O sobrenadante foi recolhido e transferido para uma nova microplaca com fundo plano para leitura de absorvância a 414nm (Synergy HT, Biotek). O resultado é apresentado pela concentração de plasma que provoca a hemólise de 50% dos eritrócitos de coelho.

Todas as análises foram realizadas em triplicado.

2.5.5 Anti-tripsina

Protocolo realizado foi o descrito por Machado *et al.* (2015). A uma temperatura de 22°C, 10µl de plasma foram incubados com um volume igual de solução de tripsina (Sigma-Aldrich ref.:T0646) 5mg ml⁻¹ em NaHCO₃ (Sigma-Aldrich ref.:S8875) durante 10 minutos. Após incubação, 100µl de tampão fosfato salino (13,9mg ml⁻¹ NaH₂PO₄) e 125µl de azocaseína (Sigma-Aldrich ref.:A2765, 20mg ml⁻¹ em 5mg ml⁻¹ NaHCO₃), foram adicionados incubando-se novamente a 22°C durante 60 minutos.

Após incubação juntou-se 250µl de ácido tricloroacético, seguindo-se nova incubação a 22°C durante 30 minutos. Finalmente a mistura foi centrifugada a 9000 rpm durante 5 minutos e do sobrenadante obtido, 100µl foram transferidos para uma microplaca e medida a absorvância a 450nm (Synergy HT, Biotek).

Para o branco, foi utilizado tampão fosfato salino em vez de plasma e tripsina. Na amostra de referência o tampão fosfato salino foi colocado em vez do plasma para cálculos de percentagem de tripsina inibida.

Todas as análises foram realizadas em triplicado.

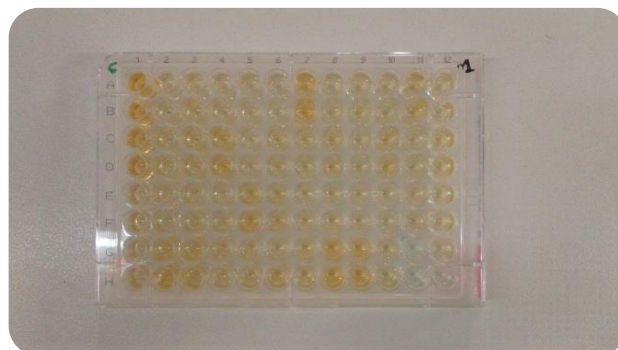


Figura 2.5.5.1 – Análise da atividade anti-tripsina.

2.5.6 Lisozima

Colocou-se 15µl das amostras de plasma numa microplaca com fundo plano onde se adicionou imediatamente 250µl de solução de *Micrococcus lysodeikticus* 0,5mg ml⁻¹, 0,05M Na₂HPO₄, pH 6,2 (Sigma-Aldrich ref.:M3770).

A reação após a adição da solução bacteriana deu-se a uma temperatura de 25°C e foram feitas leituras da absorvância a 450nm (Synergy HT, Biotek), 0,5 e 4,5 minutos após adição.

Para determinação da concentração de lisozima nas amostras, foi elaborada uma reta padrão onde se diluiu serialmente lisozima *hen egg white* liofilizada em tampão de fosfato de sódio (0,05M, pH 6,2) a partir da qual foi possível extrapolar os resultados das absorvâncias medidas de cada amostra de plasma.

Todas as análises foram realizadas em triplicado.

2.6 Extração de DNA e reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para confirmar a presença do agente patogénico nos indivíduos através de ferramentas moleculares, foram realizadas reações de confirmação por PCR aos órgãos dos indivíduos.

Começou por se proceder à extração de DNA de tecidos, utilizando o Kit DNeasy Blood & Tissue (Quiagen ref.:69506).

Seguiu-se o método descrito por Osório *et al.* (1999). Procedeu-se à amplificação, utilizando na mesma reação PCR, dois pares de primers para possibilitar a diferenciação entre as duas espécies de *Photobacterium*, caso exista a sua presença. Os primers para deteção de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, Car1 (5'-GCT TGA AGA GAT TCG AGT -3') e Car2 (5'-CAC CTG GCG GTC TTG CTG -3') têm como alvo, o gene 16s RNA de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* e para deteção de *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, o par de primers, Ure5 (5'-TCC GGA ATA GGT AAA GCG GG -3') e Ure3 (5'-CTT GAA TAT CCA TCT CAT CTG C -3') tendo como alvo o gene *ureC*. Estes primers resultam na amplificação de fragmentos de 267 pb e 448 pb, respetivamente. A

amplificação dos dois fragmentos na mesma reação só é visível caso se esteja na presença de *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*.

Além dos dois pares de primers foi colocado ainda na reação, Master Mix (já contendo Taq DNA polimerase e dNTP's) (NZYTech ref.:MB04902), MgCl₂ (concentração final na reação 2mM) (NZYTech ref.:MB04902) e DNA extraído a analisar.

As condições da amplificação foram 95°C, 4 minutos seguido de 45 ciclos de 95°C, 1 minuto, 63°C, 1 minuto e 72°C, 90 segundos. Foi realizada ainda uma extensão final a 72°C durante 5 minutos.

O controlo positivo, para todas as reações, foi obtido usando DNA genómico extraído de bactérias provenientes de *stock*, de uma cultura pura, com recurso ao kit de extração G-spin[™] para DNA genómico de bactérias Gram-negativas (Intron ref.:17231). Um outro controlo positivo foi realizado, usando tecidos de um peixe infetado e de cujos tecidos foi feita uma extração de DNA total. O controlo negativo foi obtido utilizando água estéril em vez de DNA.

A análise molecular aos órgãos foi realizada após a homogeneização dos mesmos em tampão HBSS estéril.

A análise dos resultados de PCR foi feita realizando uma eletroforese em gel de agarose (1,5%, Sigma-Aldrich), que foi corrida durante 45 minutos, a uma voltagem constante de 90V, usando Gel-Red como corante. A visualização das bandas foi registada no aparelho Gel-Doc.

2.7 Estatística

Para tratamento dos dados, a homogeneidade dos mesmos foi verificada e todos os dados apresentados como percentagem foram transformados em arcoseno (Zar, 1999). Foi realizado o teste ANOVA de duas vias e sempre que foram verificadas diferenças estatisticamente significativas, foi realizado de seguida, o teste post-hoc Tukey para determinação de diferenças estatísticas entre tratamentos. Toda a análise estatística dos dados foi realizada recorrendo-se à utilização do *software* STATISTICA versão 12 para Windows. Todos os dados são apresentados em forma gráfica através de média $\pm$ desvio padrão.

3 Resultados

3.1 Cálculo do LD₅₀

Antes da realização do ensaio de coabitação, foi necessário proceder a um ensaio para determinar a concentração de bactéria que mata 50% de indivíduos presentes numa determinada amostra (LD₅₀). A determinação deste valor permitiu a seleção da concentração da suspensão bacteriana a usar no ensaio. Uma concentração igual ao LD₅₀ foi então utilizada para infectar os indivíduos dadores, no ensaio de coabitação, provocando nestes um estado de infeção latente que lhes permitiu servir de vetores na transmissão da doença. No gráfico da figura 3.1.1 estão apresentados os resultados para o ensaio que decorreu num período de 10 dias, com a estirpe AQP 17.1 de *Phdp*.

Foi possível observar, tal como esperado, que a mortalidade se encontra dependente da concentração de bactéria injetada. A mortalidade começou a observar-se após 48 horas de infeção na concentração $8,75 \times 10^6$ UFC ml⁻¹, ao longo dos dias seguintes, ocorreu mortalidade para esta mesma concentração, até a um máximo de 83% do total de indivíduos inicialmente presentes. Por sua vez, na concentração de $8,75 \times 10^5$ UFC ml⁻¹, a mortalidade começou a ocorrer após 120 horas de infeção atingindo um máximo de 33%. Os indivíduos infetados com a concentração $8,75 \times 10^4$ UFC ml⁻¹ e nos do controlo, não foi registada mortalidade.

Após análise conclui-se que na infeção de indivíduos da espécie *Argyrosomus regius*, com peso médio de $28,3 \pm 10,9$ g, utilizando a estirpe AQP 17.1 de *Phdp*, o LD₅₀ obtido foi $2,29 \times 10^5$ UFC ml⁻¹.

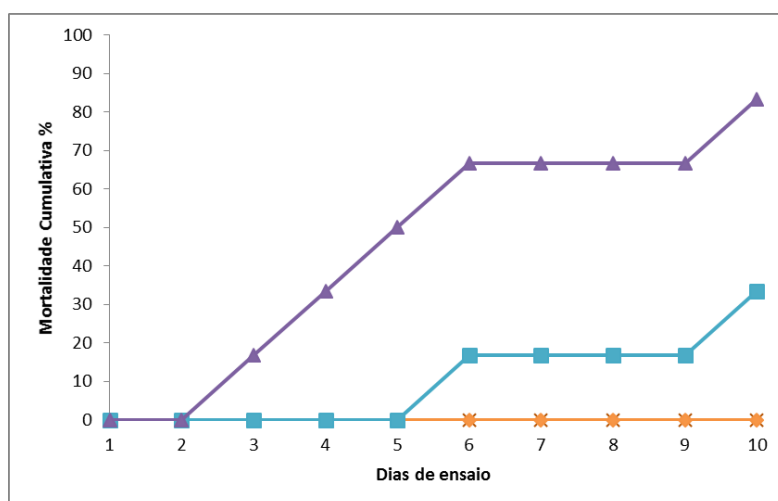


Figura 3.1.1 – Mortalidade cumulativa (%) para a estirpe AQP 17.1 de *Phdp* em *Argyrosomus regius*. Legenda: (X) Controlo (losango) 10^4 CFU ml⁻¹ (quadrado) 10^5 CFU ml⁻¹ (triângulo) 10^6 CFU ml⁻¹.

3.2 Hematologia

Relativamente à contagem de eritrócitos presentes no sangue dos indivíduos, não foram verificadas diferenças visíveis entre os tratamentos, mantendo-se estes constantes ao longo do tempo. No entanto, observaram-se diferenças significativas às 0 horas, momento em que os indivíduos foram injetados com o patógeno (Figura 3.2.1a).

Na contagem de leucócitos verifica-se uma tendência para um aumento gradual ao longo do tempo. É observado um pico 72 horas após injeção em que se regista um número significativamente superior de leucócitos nos indivíduos infectados ($1,32 \times 10^5$ leucócitos/ μl) em relação aos indivíduos controlo ($7,95 \times 10^4$ leucócitos/ μl) (Figura 3.2.1b).

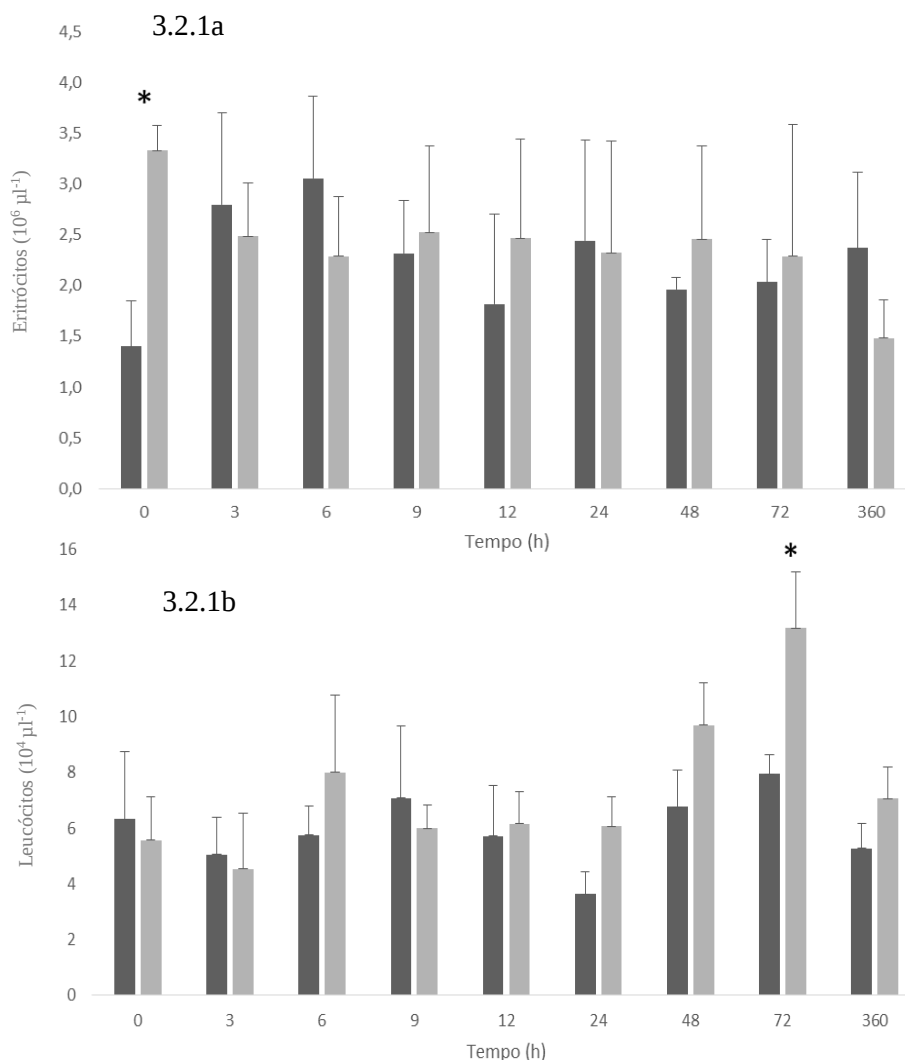


Figura 3.2.1 – Gráficos com contagem de eritrócitos (3.2.1a) e de leucócitos (3.2.1b) no sangue de indivíduos injetados com HBSS (■) e *Phdp* (■). Resultados apresentados em média $\pm$ desvio padrão (n=6). Asterisco indica diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos para um tempo específico ($p \leq 0,05$).

Para os valores de hemoglobina, observa-se uma diminuição tanto no controle, como no grupo infectado, no entanto não se encontraram diferenças estatisticamente significativas na interação dos dois tratamentos (Figura 3.2.2). Quanto aos níveis de hemoglobina corpuscular média (MHC), estes revelam uma estabilidade, observando-se contudo, diferenças significativas entre tratamentos às 0 horas de ensaio (Figura 3.2.3).

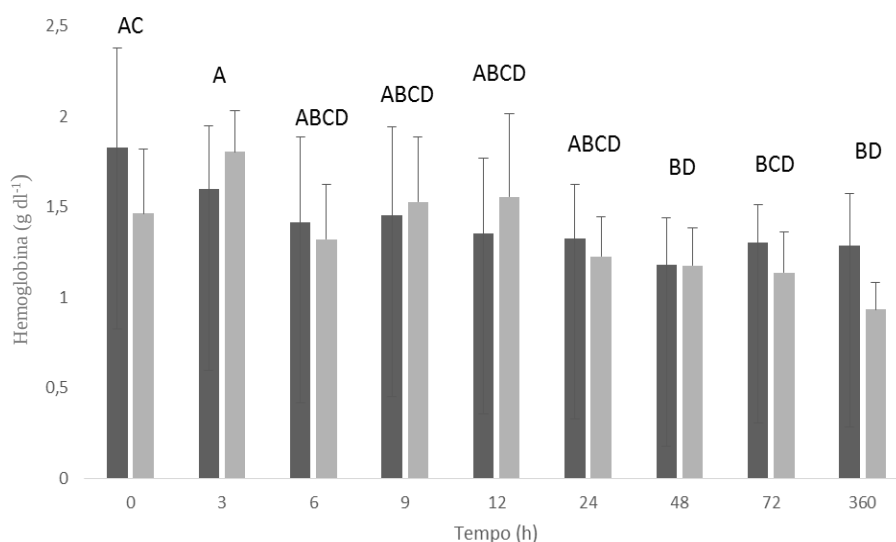


Figura 3.2.2 – Gráfico representativo da concentração de hemoglobina (g dl^{-1}) no sangue de indivíduos injetados com HBSS estéril (■) e *Phdp* (▒). Resultados apresentados em média $\pm$ desvio padrão ($n=6$). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre tempos ($p \leq 0,05$).

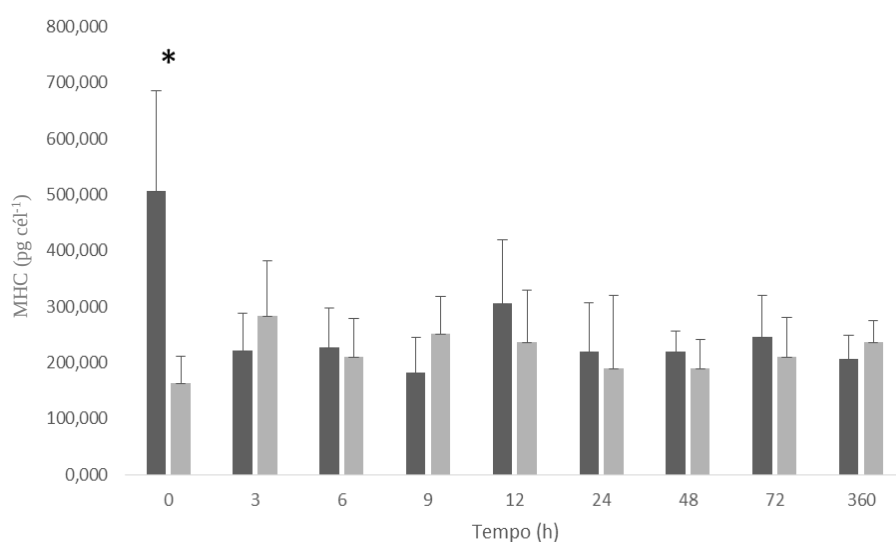


Figura 3.2.3 – Gráfico representativo dos níveis de concentração de hemoglobina presentes em cada eritrócito (MHC) (pg cél^{-1}) de indivíduos injetados com HBSS estéril (■) e *Phdp* (▒). Resultados apresentados em média $\pm$ desvio padrão ($n=6$). Asterisco indica diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos para um tempo específico ($p \leq 0,05$).

3.3 Contagens diferenciais de células imunes

As contagens diferenciais de células sanguíneas permitiram verificar que todos os tipos de leucócitos responderam à infecção, aumentando os níveis em tempos diferentes após injeção. Os trombócitos mantêm-se estáveis aproximadamente até às 24 horas, momento em que se dá o aumento dos mesmos, com um máximo às 72 horas após infecção, onde atingiram aproximadamente 7×10^4 trombócitos μl^{-1} de sangue para o grupo infectado com *Phdp*, apresentando o controlo, $4,5 \times 10^4$ trombócitos μl^{-1} (Figura 3.3.1). Ao observar a ação dos monócitos (Figura 3.3.2), é possível apurar que foram os primeiros a responder à infecção, aumentando durante as primeiras 6 horas pós-infecção para os indivíduos infectados, momento após o qual se verifica que os seus níveis de ação baixam consideravelmente mantendo-se estáveis quando comparados com os valores do controlo. No entanto é possível de observar que após 360 horas, os níveis do grupo infectado se encontram mais elevados que os do controlo. Para os linfócitos observou-se uma estabilidade até as 24 horas, após a qual se deu uma subida nos níveis deste tipo de células, observando-se o pico às 72 horas, onde o grupo infectado atingiu aproximadamente 5×10^4 linfócitos μl^{-1} , em contraste com 3×10^4 linfócitos μl^{-1} do controlo (Figura 3.3.3). Os neutrófilos do grupo injetado com *Phdp* apresentaram uma subida expressiva das 48 às 72 horas onde se verificaram diferenças, com um máximo de $0,81 \times 10^4$ neutrófilos μl^{-1} para o grupo infectado e $0,09 \times 10^4$ neutrófilos μl^{-1} para o controlo às 72 horas (Figura 3.3.4). Após 360 horas de ensaio, observa-se uma descida nos valores de todos os leucócitos, no entanto, os valores para o grupo infectado continuaram elevados quando comparados com o grupo controlo.

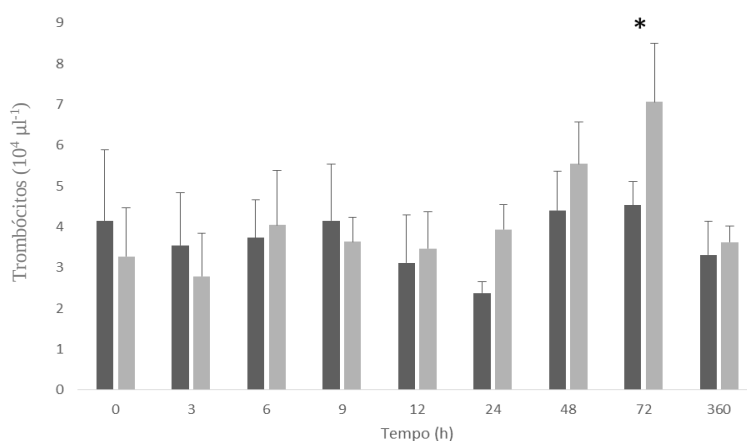


Figura 3.3.1 – Gráfico para a contagem de trombócitos ($10^4 \mu\text{l}^{-1}$) no sangue de indivíduos injetados com HBSS estéril (■) e *Phdp* (▒). Resultados apresentados em média $\pm$ desvio padrão ($n=6$). Asterisco indica diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos para um tempo específico ($p \leq 0,05$).

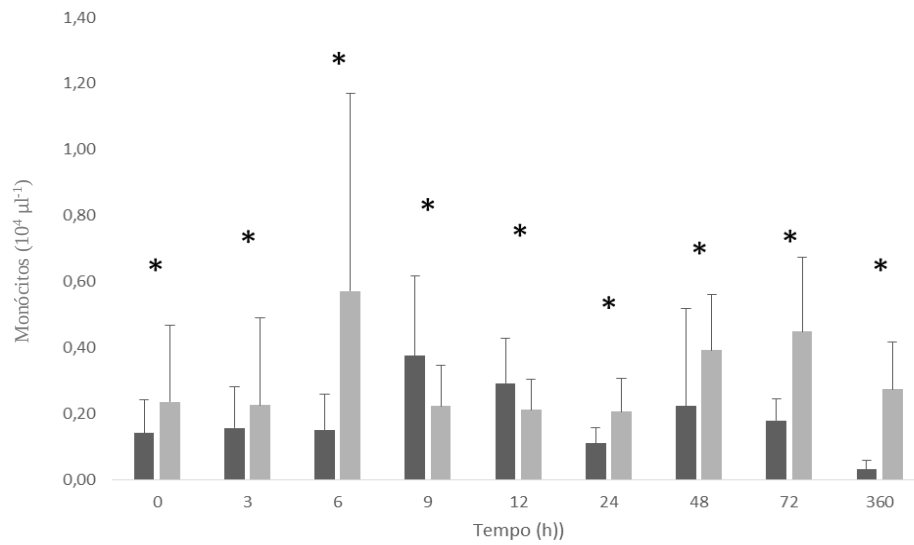


Figura 3.3.2 – Gráfico para a contagem de monócitos (10⁴ μl⁻¹) no sangue de indivíduos injetados com HBSS estéril (■) e *Phdp* (■). Resultados apresentados em média ± desvio padrão (n=6). Asterisco indica diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos (p ≤ 0,05).

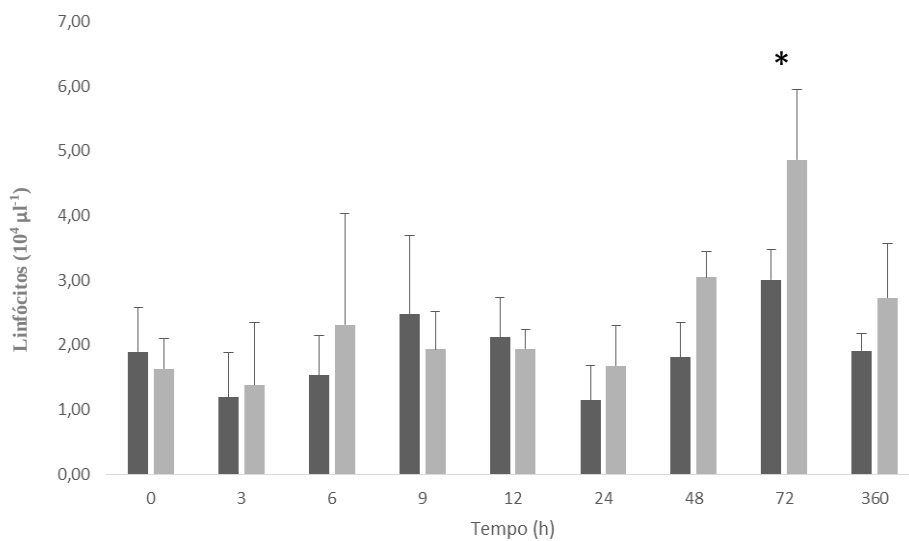


Figura 3.3.3 – Gráfico para a contagem de linfócitos (10⁴ μl⁻¹) no sangue de indivíduos injetados com HBSS estéril (■) e *Phdp* (■). Resultados apresentados em média ± desvio padrão (n=6). Asterisco indica diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos para um tempo específico (p ≤ 0,05).

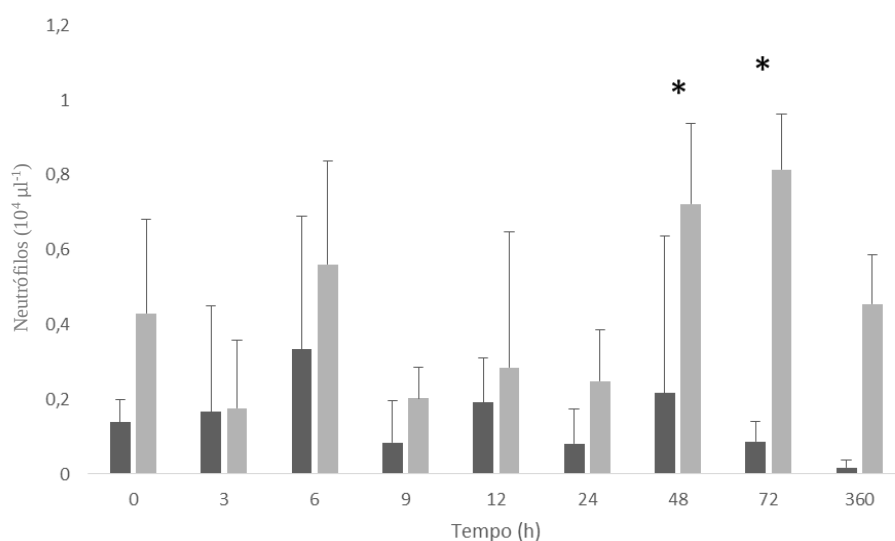


Figura 3.3.4 – Gráfico para a contagem de neutrófilos ($10^4 \mu\text{l}^{-1}$) no sangue de indivíduos injetados com HBSS estéril (■) e *Phdp* (▒). Resultados apresentados em média $\pm$ desvio padrão ($n=6$). Asterisco indica diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos para um tempo específico ($p \leq 0,05$).

3.4 Parâmetros humorais imunes não específicos

Os valores obtidos dos parâmetros humorais demonstraram também diferentes variações durante o ensaio. Os valores de complemento mantiveram-se estáveis até às 12 horas, momento em que se observou uma subida dos mesmos para o grupo infetado quando comparado com o grupo controlo (Figura 3.4.1). O valor máximo observou-se às 24 horas após injeção, onde se registou aproximadamente 353 unidades ml^{-1} de plasma para os indivíduos infetados e 169 unidades ml^{-1} para o controlo. Nota-se que após este momento, os níveis de complemento caem e às 72 horas existe uma subida destes.

Tanto os níveis observados para a atividade da anti-tripsina dos peixes controlo, como dos peixes infetados, não possuem diferenças, permanecendo estáveis ao longo de todo o ensaio (Figura 3.4.2).

A lisozima por sua vez foi o parâmetro imunológico que maior diferença apresentou quando comparada a atividade no plasma de indivíduos injetados com *Phdp* e HBSS (Figura 3.4.3).

Observou-se uma subida na atividade para o grupo infectado das 12 até às 48 horas, onde os níveis desta enzima atingiram um máximo de aproximadamente $9 \mu\text{g mg}^{-1}$, baixando os valores às 72 horas. Neste mesmo período os valores do grupo controlo mantiveram-se estáveis para um máximo de aproximadamente $2 \mu\text{g mg}^{-1}$.

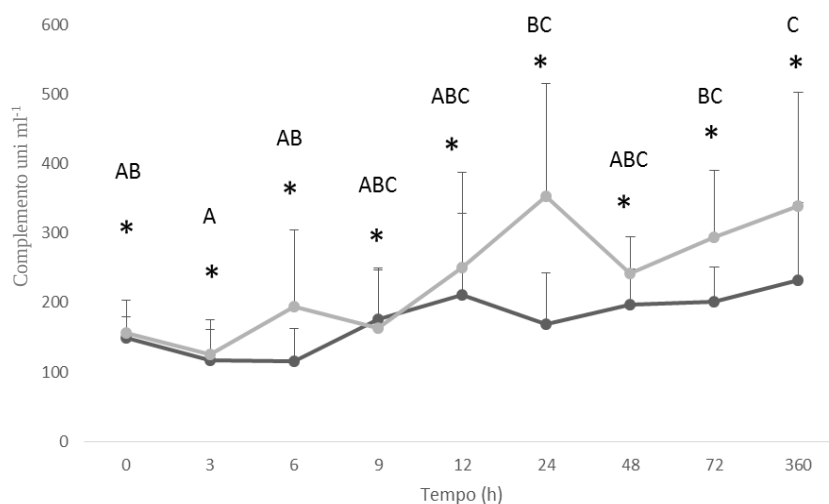


Figura 3.4.1 – Gráfico representativo do complemento (uni ml⁻¹) no plasma sanguíneo de indivíduos injetados com HBSS estéril (■) e *Phdp* (■). Resultados apresentados em média $\pm$ desvio padrão (n=6). Asterisco indica diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos ($p \leq 0,05$). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre tempos ($p \leq 0,05$).

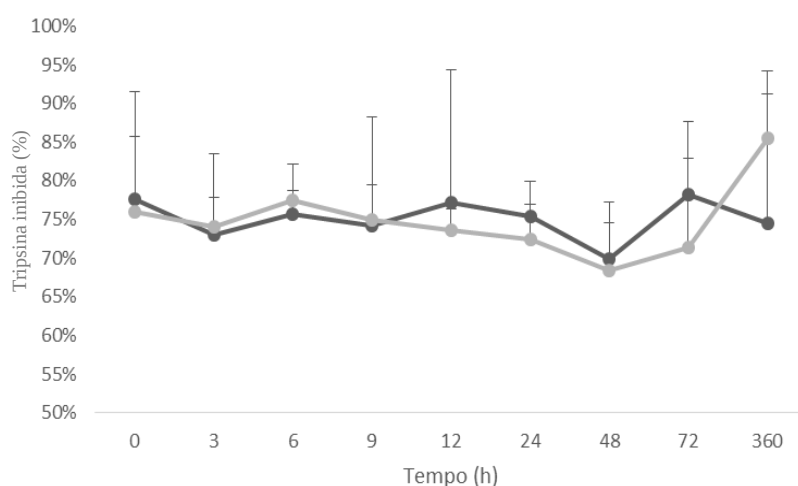


Figura 3.4.2 – Gráfico representativo da tripsina inibida (%) no plasma sanguíneo de indivíduos injetados com HBSS estéril (■) e *Phdp* (■). Resultados apresentados em média $\pm$ desvio padrão (n=6).

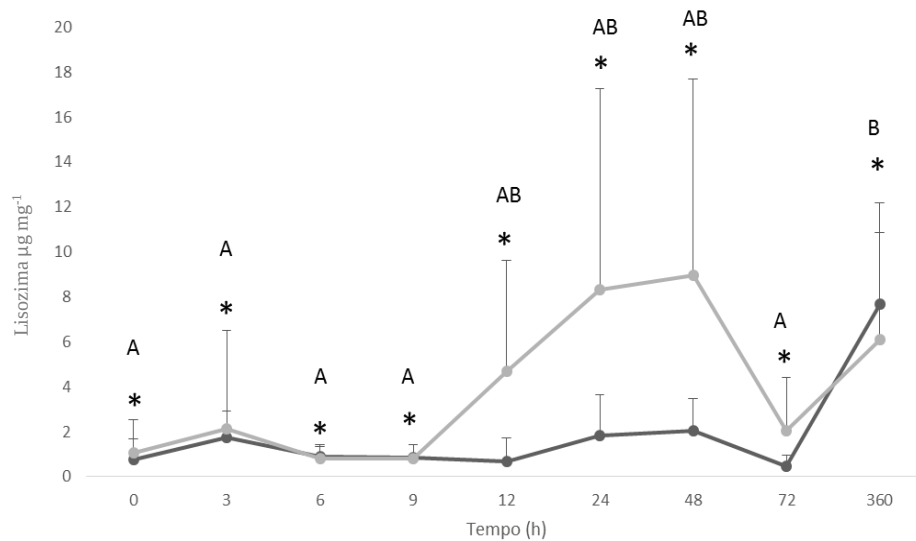


Figura 3.4.3 – Gráfico representativo da concentração de lisozima ($\mu\text{g mg}^{-1}$) no plasma sanguíneo de indivíduos injetados com HBSS estéril (■) e *Phdp* (■). Resultados apresentados em média $\pm$ desvio padrão ($n=6$). Asterisco indica diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos ($p \leq 0,05$). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre tempos ($p \leq 0,05$).

3.5 Análise microbiológica e molecular

Os órgãos que foram extraídos dos indivíduos apresentavam sinais típicos de infecção por *Phdp*. Foram observados alguns órgãos com coloração pálida às 48 e 72 horas. Alguns dos órgãos apresentaram nódulos brancos típicos da acumulação de colônias da bactéria (Figura 3.5.1).



Figura 3.5.1 – Fígado apresentando nódulos brancos típicos de acumulação de *Phdp*.

A análise por PCR para detecção do gene 16s rRNA de *Phdp* confirmou a presença da bactéria nos órgãos dos indivíduos coabitantes. Nos órgãos dos indivíduos pertencentes ao tratamento controlo, não foram detetados produtos PCR resultantes da amplificação.

Obteve-se mortalidade nos indivíduos injetados com a suspensão bacteriana que serviram como vetores para a infeção durante o decorrer do ensaio, com uma tendência para a mortalidade entre as 48 e 72 horas após injeção (Figura 3.5.2). Observou-se uma mortalidade cumulativa baixa, para os restantes indivíduos com um máximo de 14% ao longo de todo o ensaio (Figura 3.5.3). Confirmou-se a presença da bactéria nos órgãos dos indivíduos mortos através do resultado do produto de PCR.

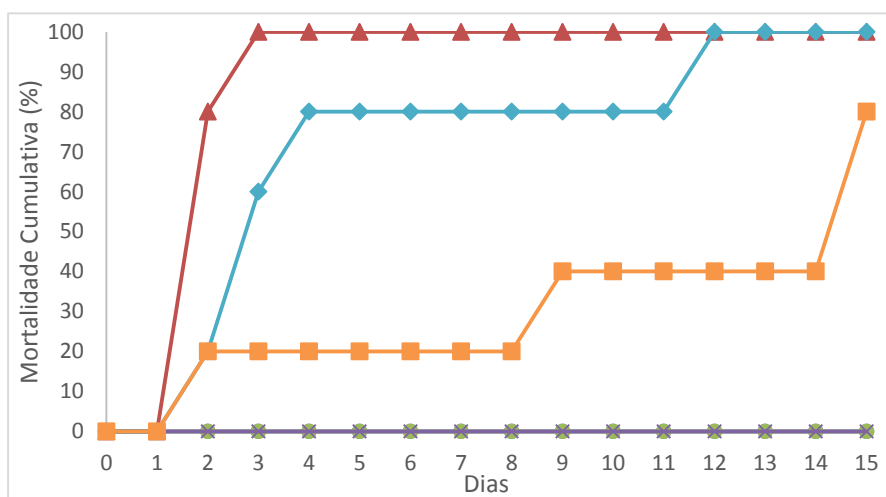


Figura 3.5.2 – Mortalidade cumulativa (%) ocorrida nos indivíduos injetados ao longo do ensaio. Esquema: Grupo controlo réplicas 1, 2 e 3 (X); Grupo infetado réplica 1 (▲) Réplica 2 (◆) Réplica 3 (■).

Confirmou-se a presença de DNA de *Phdp* em alguns órgãos e em diferentes tempos de amostragem através da análise dos órgãos extraídos provenientes dos indivíduos sacrificados ao longo do tempo de ensaio.

O primeiro momento em que se detetou DNA de *Phdp* foi às 6 horas após injeção, registando-se resultado positivo apenas nas brânquias. Decorridas 24 horas desde o momento da injeção, foi possível de observar que a bactéria já tinha migrado para alguns dos órgãos internos do peixe, confirmando-se o seu aparecimento em locais como o rim e intestino anterior dos indivíduos sacrificados, mantendo-se esta deteção em tempos posteriores (Figura 3.5.4).

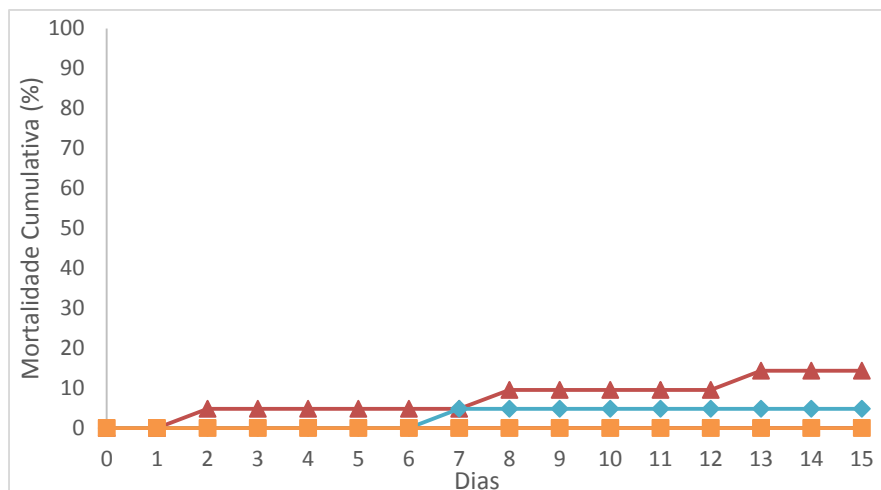


Figura 3.5.3 – Mortalidade cumulativa (%) ao longo do ensaio para os indivíduos coabitantes do grupo infectado. Esquema: Réplica 1 (▲) Réplica 2 (◆) Réplica 3 (■).

Os indivíduos sacrificados do tratamento controle, incluindo os vetores injetados com HBSS estéril, não exibiram qualquer comportamento anormal durante o decorrer da experiência, sobrevivendo ao ensaio e nestes não foi detetado DNA de *Phdp*.

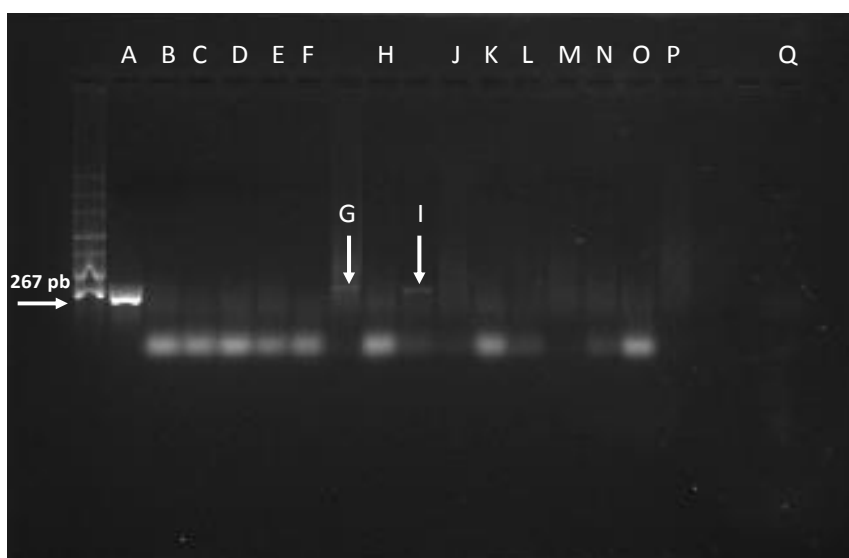


Figura 3.5.4 – Gel de agarose demonstrativo da presença de DNA de *Phdp* (PCR) em órgãos internos, 24 horas após-infecção. Setas indicam o aparecimento de bandas representativas do gene 16s rRNA de *Phdp*. Esquema: A (Controlo positivo); B (12h, brânquias, réplica 2 bactéria, indivíduo B); C (12h, intestino anterior, réplica 2 bactéria, ind. B); D (12h, fígado, réplica 3 bactéria ind. A); E (12h, brânquias, réplica 3 bactéria ind. A); F (12h, intestino anterior, réplica 3 bactéria ind. A); G (24h, rim, réplica 3 bactéria ind. B); H (12h, brânquias, réplica 3 bactéria ind. B); I (24h, intestino anterior, réplica 3 bactéria ind. B); J (24h, rim, réplica 2 bactéria ind. B); K (24h, brânquias, réplica 2 bactéria ind. B); L (24h, intestino anterior, réplica 2 bactéria ind. B); M (24h, baço, réplica 3 bactéria ind. A); N (24h, rim, réplica 3 bactéria ind. A); O (24h, brânquias, réplica 3 bactéria ind. A); P (24h, baço, réplica 3 bactéria ind. B); Q (Controlo negativo).

4 Discussão

O crescimento e desenvolvimento da aquacultura levam a que os sistemas convirjam para uma base de produção mais intensiva, onde a densidade de peixes é elevada (Magnadóttir, 2010).

Photobacterium damsela subsp. *piscicida* é o agente etiológico da pasteurelose. Continua a ser considerada uma das bactérias mais patogénicas, afetando os peixes tanto no seu meio natural, como em aquacultura. Encontra-se já documentada a sua virulência para diversas espécies de animais aquáticos (Barnes, 2005), sendo que os surtos provocados são causadores de elevadas perdas económicas (Toranzo, 1991). A infeção por *Phdp*, incluindo o seu modo de ação e a forma como o sistema imune dos animais reage à agressão, são assuntos debatido em diversos estudos científicos (Vale, 2002; Afonso, 2005; Acosta, 2006; Mauri, 2011; Costas, 2013; Barroso, 2014; Guardiola, 2014; Mosca, 2014), sendo vários destes tópicos questões em aberto, o que torna possível e desejável um aumento do conhecimento científico sobre os mecanismos protetores durante a infeção (Mosca, 2014).

A corvina é um peixe relativamente recente em aquacultura (Quémener, 2002; Mesa, 2014). É conhecido que *Phdp* consegue provocar mortalidades elevadas em corvina (Costa, J. Z. comentário pessoal). No entanto este estudo torna-se inovador uma vez que pretende realizar um estudo sobre a infeção deste patógeno pela primeira vez em *Argyrosomus regius*.

Fez parte do presente trabalho, a avaliação da resposta imune inata da corvina quando o organismo é confrontado com *Phdp* através deste modelo de infeção. Segundo Pellitero (2008), tem aumentado a importância de informação sobre a resposta imune de peixes economicamente relevantes para a aquacultura. A informação aqui presente pode permitir avaliar a resposta da corvina a este patógeno, estimando os mecanismos por detrás dessa resposta inata. Será ainda possível fazer um paralelismo com a já conhecida resposta à infeção por *Phdp* com recurso à injeção intraperitoneal.

Determinou-se neste trabalho a virulência da estirpe AQP 17.1 de *Phdp* para a espécie *A. regius* através da avaliação da dose letal (LD₅₀) para indivíduos juvenis. Indivíduos com um tamanho médio de 28,3±10,9g foram suscetíveis à infeção intraperitoneal de *Phdp*, situando-se o LD₅₀ em 2,29×10⁵ UFC ml⁻¹. A nível sintomatológico, os indivíduos infetados apresentaram sintomas iguais aos anteriormente reportados na bibliografia para esta bactéria (Noga, 2010). Deparou-se neste trabalho com indivíduos com olhos exoftálmicos, muitos exibindo uma pigmentação de pele mais escura, quando comparada

com o controlo, alguns apresentando fígados com nódulos brancos e baços anémicos. Toranzo *et al.* (1991) testou a suscetibilidade de indivíduos da espécie *Sparus aurata* com tamanho médio de 4 e 20g a *Phdp*. Este trabalho obteve um LD₅₀ de $1,6 \times 10^5$ UFC ml⁻¹ para os indivíduos de 4g e um LD₅₀ de $9,5 \times 10^5$ UFC ml⁻¹ para os indivíduos de 20g de peso médio. O resultado deste trabalho é idêntico ao obtido por Magarinões *et al.* (1992), que para indivíduos juvenis das espécies *S. aurata*, *Oncorhynchus mykiss* e *Scophthalmus maximus*, demonstrou que o LD₅₀ de várias estirpes de *Phdp* se encontra entre 10³ e 10⁶ UFC ml⁻¹. Costas *et al.* (2013) concluiu que para *Solea senegalensis*, o LD₅₀ em indivíduos com 37,9±12,9g de peso médio injetados com as estirpes PC566.1 e PP3 de *Phdp*, foi respetivamente de 5×10^3 UFC ml⁻¹ e $1,2 \times 10^4$ UFC ml⁻¹.

Para a realização do ensaio de coabitação, foram colocados no mesmo aquário, indivíduos saudáveis junto com indivíduos infetados (por injeção intraperitoneal com *Phdp* no momento das 0 horas (início do ensaio) com uma dose igual ao LD₅₀ anteriormente calculado). Como era de esperar, foi observada a mortalidade da maioria dos indivíduos injetados utilizados como vetores para a transmissão horizontal da bactéria, ocorrendo a mortalidade da maioria dos indivíduos entre as 48 e 72 horas após injeção. O método de injeção intraperitoneal é bastante agressivo, uma vez que garante o acesso direto da bactéria à vasculatura do peixe (Patterson, 2012).

No decorrer do ensaio não foram verificadas contagens totais de eritrócitos significativamente diferentes entre os indivíduos do tratamento controlo e os indivíduos sujeitos à infeção. Quando comparados, nos diversos pontos de amostragem, observou-se uma regularidade nas contagens para os dois tratamentos, não se podendo afirmar com clareza que tenha existido influência da bactéria sobre o número de eritrócitos presentes no sangue dos indivíduos ao longo do tempo. Contrariamente ao observado neste estudo, encontra-se já demonstrado que a fosfolipase extracelular produzida por *Phdp* possui uma atividade hemolítica muito forte para os eritrócitos de peixe (Naka, 2007).

Conforme enunciado por Magarinões (1994), todos os isolados de *Phdp* estudados no seu trabalho, utilizam a hemoglobina como fonte de ferro de forma a aumentar a virulência da bactéria. Normalmente, quando estes valores se encontram mais baixos do que os valores base para os indivíduos de uma determinada espécie, pode ser significativo da existência de hemorragias a diversos níveis, incluindo destruição dos tecidos hematopoéticos (Das, 2011).

Neste trabalho, parâmetros como a hemoglobina e os níveis de hemoglobina corpuscular média não demonstraram grandes variações entre tratamentos ao longo do ensaio. Os resultados obtidos sugerem que possivelmente não terá ocorrido uma condição anémica nos indivíduos.

Vários tipos celulares encontram-se envolvidos na resposta imune inata dos peixes, nas quais se encontram uma variedade de leucócitos (Secombes, 2012). Observou-se, neste trabalho, uma subida gradual dos leucócitos no sangue ao longo do tempo de coabitação, principalmente passadas 24 horas. Verificou-se que existe uma contagem significativamente mais elevada às 72 horas ($p \leq 0,05$) para o grupo infetado. Ainda assim, a comparação é dificultada pelo facto de existirem poucos estudos a quantificar os leucócitos presentes no sangue de peixes infetados (Faílde, 2014). Este cenário de leucocitose sugere que a bactéria provocou um estado de infeção, uma vez que as respostas imunes são mediadas por uma alta variedade de células, nas quais os leucócitos são centrais a todas as respostas imunes (Secombes, 2012).

Segundo Secombes *et al.* (1996), as células fagocitárias possuem um papel importante nas defesas anti bacterianas, com os macrófagos e os neutrófilos a serem as principais células envolvidas na defesa imune inata. Após observação dos valores para as contagens diferenciais de monócitos e neutrófilos no sangue, apurou-se que estes dois tipos de células responderam de uma forma ativa à infeção, ainda que de diferentes formas ao longo do tempo. Para os monócitos apesar de não existirem diferenças significativas entre tratamentos ao longo do tempo, podemos visualizar valores mais elevados nos indivíduos sacrificados do tratamento com *Phdp*, sendo às 6 horas o ponto máximo da sua presença no sangue. Por sua vez, na contagem diferencial de neutrófilos, os dois tratamentos possuem diferenças significativas ($p \leq 0,05$) com uma subida extrema das 48 até às 72 horas para os indivíduos do grupo infetado, aumentando o número deste tipo de células em cerca de 3 vezes quando comparado com o valor às 24 horas. No entanto, ao final de 360 horas, os níveis de neutrófilos e macrófagos permaneceram mais elevados no grupo infetado do que no grupo controlo, podendo revelar que mesmo após este tempo, o sistema imune inato dos indivíduos, ainda se encontrava a combater a infeção. Estes fagócitos são as primeiras células a proceder ao encontro com o microrganismo invasor. Afonso *et al.* (1998) enuncia que os monócitos presentes no sangue são rapidamente recrutados para os locais da infeção onde são utilizados por forma a aumentar a população de macrófagos no local. Há estudos que

referem que quando os peixes se encontram em contacto com bactérias, podem ocorrer casos de neutrófilia e de monócitose para várias espécies (Costas, 2013). Resultados já obtidos por Vale *et al.* (2002) demonstram que para *Dicentrarchus labrax*, em adição aos macrófagos, também os neutrófilos possuem fortes capacidades fagocíticas e são mobilizados muito rapidamente. O aumento dos granulócitos (neutrófilos incluídos) possui uma relação com a resposta do peixe à infeção por bactérias (Faíld, 2014). Noya *et al.* (1995a) observou que indivíduos com tamanho entre 20 a 30g da espécie *S. aurata*, mostraram resistência à infeção por *Phdp*, apesar da injeção de doses elevadas de bactéria. Este facto surgiu da ação das células fagocitárias, observando-se uma intensa desgranulação sofrida pelos granulócitos da cavidade peritoneal dos peixes às 5 horas após a injeção, sendo que os peixes após 24 horas de ensaio, não apresentavam bactérias morfologicamente intactas na cavidade peritoneal e não desenvolveram pasteurelose. Neste mesmo estudo, Noya *et al.* (1995a) observou que os macrófagos de peixes com 0,5g não conseguiram eliminar *Phdp* o que levou à morte dos peixes no espaço de 5 dias. Segundo enunciado, os macrófagos destes peixes mais pequenos podem estar envolvidos na disseminação da bactéria pelo corpo do peixe. É sugerido que este caso pode dever-se à fraca atividade de eliminação ou inativação dos macrófagos (Noya, 1995b)

Para os trombócitos, o seu modo de ação nesta infeção foi relativamente parecido com o que foi desenvolvido pelos neutrófilos ao longo do tempo. Estas células obtiveram um aumento considerável das 48 para as 72 horas nas contagens para o grupo infetado. Às 72 horas obteve-se uma contagem significativamente mais elevada que a contagem das mesmas células para o grupo controlo ($p \leq 0,05$). Os trombócitos possuem no seu arsenal substâncias tais como o glicogénio e a fosfatase alcalina que são importantes para a fagocitose (Hill, 1998; Stosik, 2002; Reque, 2010). No entanto a sua principal função destina-se à coagulação do sangue através de agregação (Kollner, 2004).

Neste estudo, as contagens diferenciais para os linfócitos determinaram que os valores permaneceram ligeiramente inalterados ao longo do ensaio, havendo no entanto uma subida do valor destes leucócitos às 72 horas. As contagens destas células determinaram um valor significativamente diferente na interação entre os tratamentos às 72 horas ($p \leq 0,05$), com uma expressão mais elevada por parte da contagem no grupo infetado. Em estudo realizado por Costas *et al.* (2013), obteve-se um decréscimo nos níveis de linfócitos no sangue de *S. senegalensis*, 6 e 24 horas após infeção intraperitoneal com *Phdp*.

Em anteriores estudos, ficou demonstrado que o mecanismo de complemento dos peixes consegue realizar a lise de bactérias (Mauri, 2011). Acosta *et al.* (2006) sugere que a ativação da via clássica do complemento pode ter um efeito protetor contra a pasteurelose. Os resultados que se obtiveram para a capacidade hemolítica do complemento estão de acordo com o enunciado anteriormente. O complemento presente no plasma do grupo infetado apresentou uma atividade hemolítica superior à do grupo controlo, logo mais capacidade de combate à bactéria. Os valores obtidos neste ensaio aumentam às 12 horas após infeção, observando-se o valor máximo às 24 horas para o grupo infetado. Os resultados aparentam ser idênticos aos obtidos por Mauri *et al.* (2011) que infetou indivíduos das espécies *S. aurata* e *D. labrax* com um peso médio entre 30 a 40g através de imersão com *Phdp*, onde obteve uma subida nos níveis de complemento às 24 horas.

Neste trabalho verificou-se ainda que para o grupo infetado, existe um aumento dos monócitos e neutrófilos durante e após aumento dos níveis de complemento. Segundo Ellis (2001), o mecanismo de complemento é importante no recrutamento de células fagocíticas. É enunciado por Costas *et al.* (2011) que a atividade da via alternativa do complemento é acompanhada de um aumento dos neutrófilos em *S. senegalensis*, uma vez que as proteínas do complemento estimulam a fagocitose. A atividade do complemento está ligada à resistência a patógenos bacterianos participando também no processo de resposta inflamatória (Yadav, 2014; Zhang, 2014).

Em conjunto com a resposta do complemento, apurou-se que a resposta da atividade da lisozima comportou-se também de diferentes formas em ambos os tratamentos. O tratamento com *Phdp* sobre *A. regius* resultou numa atividade da lisozima elevada para o mesmo intervalo temporal a que se deu o aumento dos níveis de complemento. Comparando os resultados deste parâmetro com os resultados para as células imunes, pode observar-se que a subida dos níveis de lisozima se deu ao mesmo tempo que a subida do número de neutrófilos e após a maior subida dos monócitos. O aumento da lisozima pode ser explicado como uma resposta à infeção pela bactéria. Este resultado podia ser minimamente esperado, uma vez que já era conhecido anteriormente que a principal fonte de produção de lisozima são os neutrófilos (Costas, 2011). Além destes, sabe-se também que a presença de macrófagos, resultada numa maior produção de lisozima (Sarder, 2001). No entanto, existe um aumento idêntico para os níveis de lisozima às 360 horas de infeção para ambos os tratamentos. Uma possível explicação para estes valores elevados, pode derivar do facto de

se ter dado uma quebra prolongada do fornecimento de eletricidade nas instalações, no penúltimo dia de ensaio, levando ao corte do arejamento e circulação da água em ambos os sistemas.

As bactérias conseguem produzir enzimas proteolíticas, que auxiliam no seu crescimento e replicação dentro do hospedeiro. Nomeadamente algumas proteases ajudam na digestão de proteínas pela bactéria de forma a adquirir como fonte de aminoácidos (Ellis, 2001). De forma a inibir estas enzimas extracelulares, os peixes possuem no seu plasma sanguíneo as anti-proteases que ajudam na defesa do indivíduo contra os patógenos que o possam afetar (Rao, 2004). Neste trabalho não se observaram diferenças entre a percentagem da capacidade inibitória da anti-tripsina presente no sangue dos indivíduos de ambos os tratamentos ao longo do ensaio. Segundo outros estudos, verificou-se que a atividade das anti proteases foi sempre elevada em peixes quando expostos a uma infeção com outras bactérias, não existindo uma relação direta destas com a infeção a que são sujeitos, nas quais os níveis se mantiveram geralmente elevados (Magnadóttir, 2006; Das, 2011). Das *et al.* (2011) sugere no seu trabalho de infeção por *Aeromonas hydrophila*, que a razão para não existirem alterações neste parâmetro pode resultar do facto do organismo do peixe produzir normalmente anti protease suficiente para combater a atividade da protease. Outra das razões pode ser também o facto da protease ter pouco efeito na ativação das anti proteases (Das, 2011).

A variação no número dos vários tipos de leucócitos e nos parâmetros humorais imunes ao longo do decorrer do ensaio sugere que a infeção por *Phdp* em coabitação resulta numa resposta imune humoral coordenada por parte dos mecanismos dos indivíduos coabitantes da espécie *A. regius*.

Resultados apresentados por Janssen *et al.* (1968) demonstram que *Phdp* se encontra pouco adaptada a uma sobrevivência exterior ao organismo hospedeiro devido principalmente a fatores como os limites de salinidade e temperatura a que a bactéria em questão resiste. A bactéria parece não conseguir sobreviver na água salgada por um período superior de 3 a 5 dias, o que requer que os peixes se mantenham em extremo contacto de forma a manter a bactéria viável dentro de uma população de indivíduos (Woo, 2011).

Em aquacultura os peixes são facilmente magoados fisicamente devido a todo o *stress* a que são sujeitos durante processos de manuseamento, criando condições propícias

para o estabelecimento da pasteurelose. Na infecção experimental através do modelo de coabitação que se realizou para avaliar a virulência que a bactéria possuiria dentro de um sistema que se assemelhasse a um cultivo intensivo de aquacultura da espécie *A. regius*, observou-se que a transmissão de *Phdp* se deu entre peixes infetados e peixes saudáveis. Averiguou-se o percurso que a bactéria percorreu ao longo das 360 horas em que os indivíduos estiveram em coabitação. Segundo os resultados, às 6 horas após infecção, as brânquias foram o único órgão a apresentar contaminação com DNA da bactéria, sugerindo que este é um dos locais de entrada no corpo do peixe e sugerindo a hipótese de que as brânquias são um sítio importante para o processo de instalação da infecção. A passagem para outros tecidos do corpo do peixe não é exatamente imediata, no entanto verificou-se que após 24 horas, a bactéria já se encontra a colonizar o intestino anterior e o rim. No trabalho realizado por Magariños *et al.* (1996) é enunciado que *Phdp* tem a capacidade de aderir ao epitélio intestinal dos peixes.

Os resultados obtidos por Kawahara *et al.* (1989) infetando indivíduos da espécie *Seriola quinqueradiata*, através do método de imersão com *Phdp*, apontam para o tecido branquial como local de entrada do patógeno, logo às 0 horas após imersão, com a bactéria a desenvolver-se para outros tecidos decorridas 3 horas de ensaio e surgindo no intestino após 24 horas de infecção.

Na comparação com o estudo de Kawahara *et al.* (1989) sobre diferentes métodos do estabelecimento de infecção com *Phdp*, verificou-se que o método utilizado neste trabalho parece ser de um desenvolvimento mais lento quando comparado com métodos como a imersão, a injeção intramuscular ou a aplicação oral, no entanto é provavelmente o mais fidedigno em relação a uma infecção num tanque de aquacultura, permitindo a defesa total pelo sistema imunitário do peixe.

Relativamente à deteção de *Phdp* por técnicas moleculares, os primers usados neste trabalho, foram os anteriormente descritos por Osório *et al.* (1999) que amplificam um fragmento de 267 pb do gene 16S rRNA deste organismo. O autor em questão desenhou os primers Car1 e Car2 com base no 16s rRNA de *Escherichia coli*, o que gerou que numa primeira amplificação vários fragmentos não específicos tenham surgido, embora se tenha demonstrado que, com uma segunda reação de PCR é possível detetar de forma específica *Phdp*.

Tal como descrito no trabalho mencionado, também neste houve amplificação de fragmentos não específicos quando foram usadas temperaturas de emparelhamento inferiores. No entanto, a temperatura que permitiu um melhor resultado, e à qual foi posteriormente feita a detecção, foi a 63°C.

Amagliani *et al.* (2009) fez um ensaio semelhante ao realizado neste trabalho, ao infectar peixes com *Phdp* e verificar a presença da bactéria em diferentes órgãos. Tal como aconteceu no trabalho aqui descrito, também os autores tiveram que aumentar a temperatura de emparelhamento dos primers, durante o PCR, por forma a eliminar amplificações não específicas. Adicionalmente, Amagliani *et al.* (2009) usou um controlo de forma a garantir a ausência de inibidores da reação de PCR. Neste trabalho, o controlo positivo usado corresponde a uma amostra de tecido de um peixe que fora infectado com *Phdp*, pelo que este controlo se encontra nas mesmas condições (presença de sais e eventualmente outros inibidores da reação de PCR) que as amostras posteriormente analisadas. Assim, julga-se que a existirem, os compostos que poderiam inibir a reação de PCR, estes estariam em pequenas concentrações, já que sempre se obteve amplificação do controlo positivo.

De referir que em todos os trabalhos em que se usou o PCR como método de detecção (sozinho ou em conjunto com métodos microbiológicos), a avaliação do método foi feita ou usando culturas puras, ou adicionando culturas bacterianas a tecidos, seguindo-se uma extração de DNA e PCR. Seguindo essa metodologia, a sensibilidade da primeira reação de PCR descrita por Osório *et al.* (1999) apresentou-se na ordem de 10 fg a 1 pg de DNA, ou seja, o correspondente a 20-200 células bacterianas (resultados semelhantes descritos por Andreoni *et al.*, 2004 e Rajan *et al.*, 2003). O autor refere que sensibilidades semelhantes foram determinadas quando usou amostras de tecido inoculadas. No caso do trabalho agora descrito, apenas se usou DNA de culturas puras bacterianas nos ensaios iniciais de verificação das condições de PCR a usar. Em todos os restantes ensaios as amostras analisadas por PCR são provenientes de tecidos, o que faz variar grandemente os resultados obtidos.

Rajan *et al.* (2003) quando ressuspendeu as células bacterianas em água destilada e usou a suspensão diretamente para detecção por PCR, não conseguiu obter amplificação, facto justificado com o excesso de sal presente na amostra. Assim, compostos presentes nas amostras obtidas a partir de tecidos é também provável que tenham componentes que sejam inibidores para a reação de PCR, pelo que a não obtenção de amplificação em algumas das

amostras analisadas não será de estranhar, uma vez que no processo de homogeneização se adicionou tampão com 137 mM de NaCl, o que pode afetar nitidamente os resultados.

Não foi analisada a sensibilidade do método de PCR para detecção de *Phdp* a partir de tecidos de peixes infetados, no entanto de futuro esta deverá ser determinada pois é um fator importante para a valorização do método utilizado. O facto de um indivíduo morrer com uma infeção por *Phdp*, comprovada por métodos microbiológicos, nada nos diz sobre a concentração bacteriana em cada um dos tecidos analisados. Além do mais, estes tecidos sofrem posteriormente algumas manipulações (homogeneização e purificação de DNA) que originam com certeza algumas perdas, pelo que a amostra final usada para a reação de PCR tem uma menor concentração de DNA bacteriano do que a amostra de tecido original. Assim, a sensibilidade do método será provavelmente menor do que a determinada por Osório *et al.* (1999). Ao longo do ensaio, a concentração bacteriana pode ir variando nos tecidos analisados e assim, poderá estar abaixo do limite de detecção do método utilizado. No entanto, a sua presença é indiscutível e concordante com uma possível invasão da bactéria nos órgãos dos peixes.

De forma a obter um resultado mais fiável, poderia ser importante a utilização de técnicas de quantificação molecular para a análise da concentração de *Phdp* nos órgãos dos peixes, avaliando a expressão do gene da bactéria. Acerete *et al.* (2009) estudou a expressão do gene de *Phdp* no tecido de fígado de peixes infetados num ensaio que decorreu durante um período de 5 semanas. Os resultados obtidos indicaram que só se verificou a presença da bactéria, ou a expressão de alguns dos seus genes na primeira e segunda semana após descoberta da infeção, sendo que nas restantes 3 semanas, a mesma não foi verificada. Segundo este mesmo estudo, Acerete *et al.* (2009) indica que se observou a presença da bactéria exatamente nas semanas em que os peixes apresentavam no baço os nódulos brancos típicos de acumulação de bactéria na fase crónica da doença. No presente trabalho, a técnica de quantificação através de PCR em tempo real seria bastante vantajosa, uma vez que alguns dos indivíduos poderiam provavelmente estar infetados com a bactéria, logo expressando genes deste microrganismo, só que devido à pouca concentração de células bacterianas presentes nos órgãos num determinado momento, as mesmas poderão não ter sido detetadas pelo método de PCR convencional, provavelmente por estarem numa concentração abaixo do limite de detecção que a técnica permite.

O uso dos primers *ure* permite a diferenciação entre *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* e *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, gerando um fragmento de 448 pb, correspondente ao gene *ureC*. Esta diferenciação deve ser feita após (ou em simultâneo) a detecção do fragmento de 267 pb que surge nas duas espécies (Osório *et al.*, 2000). Neste trabalho foi feita esta diferenciação, tendo-se verificado sempre a presença de *Phdp*.

Quando comparados os dados da presença de *Phdp* nos órgãos dos indivíduos coabitantes com a resposta imunitária destes, percebe-se rapidamente que o momento em que se registam as maiores contagens para grande parte dos leucócitos, e a maior atividade por parte do complemento e da lisozima, é exatamente o momento em que a bactéria se encontrava a proliferar o rim e intestino anterior dos indivíduos sacrificados. Tendo em conta os resultados presentes neste trabalho, pode afirmar-se que *Phdp* infecta com sucesso *A.regius* através do método de coabitação, influenciando a forma de resposta do sistema imune inato do peixe.

5 Conclusão

Os estudos das doenças possíveis de afetar os peixes em aquacultura têm-se vindo a revelar de extrema importância. A diversificação de espécies e o crescimento da aquacultura aumentam a necessidade de manter as populações saudáveis de forma a afastar potenciais perdas monetárias originadas da perda de indivíduos.

Neste trabalho foi obtido com sucesso o LD₅₀ para a estirpe AQP 17.1 de *Phdp*. O valor definido após ensaio foi de $2,29 \times 10^5$ UFC ml⁻¹ para indivíduos da espécie *Argyrosomus regius* com um peso médio de $28,3 \pm 10,9$ g.

Os resultados obtidos demonstram pela primeira vez que a corvina pode ser afetada por *Phdp* com eficácia através de um modelo de coabitação experimental, instalando-se a infeção nos indivíduos saudáveis (coabitantes), num curto espaço de tempo.

Concluiu-se que a bactéria colonizou eficazmente os órgãos do peixe ao longo do tempo em que decorreu a infeção, com as brânquias a serem um local de entrada no corpo dos indivíduos. Observou-se também que após 24 horas a bactéria já tinha invadido intestino anterior, mas também o rim, que é um órgão importante a nível imunitário. Esta evidência coincidiu o aumento da resposta imunológica dos indivíduos, através do aumento dos leucócitos, onde se verificaram diferenças entre tratamentos. Observou-se também um aumento de atividade dos parâmetros humorais imunes não específicos.

Em conjunto, estes resultados levam a concluir que o modelo de coabitação é um método que pode ser usado de forma a induzir nos peixes uma infeção por *Phdp* idêntica aquela que estes poderiam sofrer de forma mais realista. Concluiu-se também que o contacto da bactéria com o corpo de um peixe saudável leva a uma ação generalizada do sistema imune inato como forma de resposta à infeção.

6 Bibliografia

- Acosta, F., Ellis, A., Vivas, J., Padilla, D., Acosta, B., Déniz, S., Bravo, J., Real, F., 2006. Complement consumption by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in seabream, red porgy and seabass normal and immune serum. Effect of the capsule on the bactericidal effect. *Fish & Shellfish Immunology*. 20, 709-717.
- Acerete, L., Espinosa, E., Josa, A., Tort, L., 2009. Physiological response of hybrid striped bass subjected to *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Aquaculture* 298, 16–23.
- Adedeji, O., Okerentugba, P., Onianwa, O., Okonko, I., 2013. Immune response of fish to bacterial infections. *Researcher*. 5, 96-10.
- Afonso, A., Lousada, A., Silva, J., Ellis, A., Silva, M., 1998. Neutrophil and macrophage responses to inflammation in the peritoneal cavity of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A light and electron microscopic cytochemical study. *Diseases of Aquatic Organisms*. 34, 27-37.
- Afonso, A., Gomes, S., Silva, J., Marques, F., Henrique, M., 2005. Side effects in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) due to intraperitoneal vaccination against vibriosis and pasteurellosis. *Fish & Shellfish Immunology*. 19, 1-16.
- Afonso, A., 2008. Review of aquaculture development in Portugal and Europe. *Life and Marine Sciences*. 7, 6-7.
- Alcorn, S., Murray, A., Pascho, R., Varney, J., 2005. A cohabitation challenge to compare the efficacies of vaccines for bacterial kidney disease (BKD) in chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *Diseases Of Aquatic Organisms*. 63, 151-160.
- Amagliani, G., Omiccioli, E., Andreoni, F., Boiani, R., Bianconi, I., Zacccone, R., Mancuso, M., Magnani, M., 2009. Development of a multiplex PCR assay for *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* identification in fish samples. *Journal of Fish Diseases*. 32, 645-653.
- Andreoni, F., Magnani, M., 2014. Photobacteriosis: prevention and diagnosis. *Journal of Immunology Research*. Article ID 793817.
- Avci, H., Birincioglu, S., Epikmen, E., 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*. *Revue de Médecine Vétérinaire*. 164, 72-79.
- Banda, I., Lobo, C., Chabrilón, M., Rubio, J., Arijo, S., Pazos, G., Lucas, L., Morinigo, M., 2012. Influence of dietary administration of a probiotic strain *Shewanella putrefaciens* on senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) growth, body composition and resistance to *Photobacterium damsela* subsp *piscicida*. *Aquaculture Research*. 43, 662–669.
- Baptista, T., Romalde, J., Toranzo, A., 1996. First occurrence of Pasteurellosis in Portugal affecting cultured gilthead seabream (*Sparus Aurata*). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*. 16, 92-96.
- Barnes, A., dos Santos, N., Ellis, A., 2005. Update on bacterial vaccines: *Photobacterium Damsela* subsp. *piscicida*. *Developmental Biology*. 121, 75-84.
- Barroso, C., Ozório, R., Afonso, A., Moraes, J., Costas, B., 2014. Immune responses and gut morphology in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) fed dietary probiotic supplementation and following exposure to *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Aquaculture Research*, 1-10.
- Benhamed, S., Guardiola, F., Mars, M., Esteban, M., 2014. Pathogen bacteria adhesion to skin mucus of fishes. *Veterinary Microbiology*. 171, 1–12.
- Boshra, H., Li, J., Sunyer, J., 2006. Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish & Shellfish Immunology*. 20, 239-262.

- Bowden, T., Butler, R., Bricknell, I., Ellis, A., 1997. Serum trypsin-inhibitory activity in five species of farmed fish. *Fish & Shellfish Immunology*. 7, 377–385.
- Brunheta, S., 2011. Ensaio experimental de infeção de sargos (*Diplodus sargus*) e corvina (*Argyrosomus regius*) com *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Mestrado em Aquacultura. Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar. Peniche.
- Cain, K., Swan, C., 2011. Barrier function and immunology. In: Grosell, M., Farrell, A., Brauner, C., (Eds). *Fish Physiology: The multifunctional gut of fish*, 1^a ed. Academic Press., pp. 111-134.
- Castro, R., Tafalla, C., 2015. Overview of fish immunity. In: Beck, B., Peatman, E., (Eds). *Mucosal Health in Aquaculture*, 1^a ed. Academic Press., pp. 3-36.
- Claire, M., Holland, H., Lambris, J., 2002. The complement system in teleosts. *Fish & Shellfish Immunology*. 12, 399-420.
- Costas, B., Conceição, L., Dias, J., Novoa, B., Figueras, A., Afonso, A., 2011. Dietary arginine and repeated handling increase disease resistance and modulate innate immune mechanisms of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858). *Fish & Shellfish Immunology*. 31, 838-847.
- Costas, B., Rêgo, P., Simões, I., Marques, J., Cunha, M., Afonso, A., 2013. Cellular and humoral immune responses of Senegalese sole, *Solea senegalensis* (Kaup), following challenge with two *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* strains from different geographical origins. *Journal of Fish Diseases*. 36, 543–553.
- Das, A., Sahoo, P., Mohanty, B., Jena, J., 2011. Pathophysiology of experimental *Aeromonas hydrophila* infection in *Puntius sarana*: Early changes in blood and aspects of the innate immune-related gene expression in survivors. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 142, 207–218.
- DGRM. 2014. Plano estratégico para a aquicultura portuguesa 2014-2020. Governo de Portugal. Portugal.
- Domingues, A., 2014. Estudo da aplicação de probióticos na aquicultura de linguado senegalês (*Solea senegalensis* Kaup, 1858). Mestrado em Aquacultura. Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar. Peniche.
- Drangsholt, T., Gjerde, B., Ødegård, J., Finne-Fridell, F., Evensen, Ø., Bentsen, H., 2011. Quantitative genetics of disease resistance in vaccinated and unvaccinated Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Heredity*. 107, 471-477.
- Du, Y., Yi, M., Xiao, P., Meng, L., Li, X., Sun, G., Liu, Y., 2015. The impact of *Aeromonas salmonicida* infection on innate immune parameters of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish & Shellfish Immunology*. 44, 307-315.
- Ellis, A., 1999. Immunity to bacteria in fish. *Fish & Shellfish Immunology*. 9, 291–308.
- Ellis, A., 2001. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental and Comparative Immunology*. 25, 827-839.
- Elkamel, A., 2002. Pathogenic mechanisms of *Photobacterium damsela* subspecies *piscicida* in hybrid striped bass. *Pathobiological Sciences*. Assiut University. Louisiana.
- Faílde, L., Losada, A., Bermúdez, R., Santos, Y., Quiroga, M., 2014. Evaluation of immune response in turbot (*Psetta maxima* L.) tenacibaculosis: Haematological and immunohistochemical studies. *Microbial Pathogenesis*. 76, 1-9.
- FAO. 2014. The State of World Fisheries and Aquaculture Nations, Food and Agriculture Organization of the United. pp. 243. Roma.
- FAO. 2015. Cultured Aquatic Species Information Programme. *Argyrosomus regius*. In: FAO Fisheries and Aquaculture Department. Roma.

- Fischer, U., Koppang, E., Nakanishi, T., 2013. Teleost T and NK cell immunity. *Fish & Shellfish Immunology*. 35, 197-206.
- Ghafoori, Z., Heidari, B., Farzadfar, F., Aghamaali, M., 2014. Variations of serum and mucus lysozyme activity and total protein content in the male and female Caspian kutum (*Rutilus frisii kutum*, Kamensky 1901) during reproductive period. *Fish & Shellfish Immunology*. 37, 139-146.
- Guardiola, F., Cuesta, A., Arizcun, M., Meseguer, J., Esteban, M., 2014. Comparative skin mucus and serum humoral defence mechanisms in the teleost gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish & Shellfish Immunology*. 36, 545-551.
- Hill, D., Rowley, A., 1998. Are intergrins involved in the aggregatory and phagocytic behaviour of fish haemostatic cells?. *The Journal of Experimental Biology*. 201, 599–608.
- Hrubec, T., Smith, S., Robertson, J., 2001. Age-Related Changes in Hematology and Plasma Chemistry Values of Hybrid Striped Bass (*Morone Chrysops* × *Morone saxatilis*). *Veterinary Clinical Pathology*. 30, 8-15.
- Iwama, G., Nakanishi, T., 1996. *The Fish Immune System - Organism, Pathogen, and Environment*. 1^a ed. Academic Press., pp. 380.
- Janssen, W., Surgalla, M., 1968. Morphology, physiology, and serology of a *Pasteurella* species pathogenic for white perch. *Journal of Bacteriology*. 96, 1606-1610.
- Kawahara, E., Kawai, K., Kusuda, R., 1989. Invasion of *Pasteurella piscicida* in tissues of experimentally infected yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 55, 499-501.
- Kollner, B., Fischer, U., Rombout, J., Thiele, J., Hansen, J., 2004. Potential involvement of rainbow trout thrombocytes in immune functions: a study using a panel of monoclonal antibodies and RT-PCR. *Developmental and Comparative Immunology*. 28, 1049–1062.
- Laganà, P., Caruso, G., Minutoli, E., Zacccone, R., Delia, S., 2011. Susceptibility to antibiotics of *Vibrio* spp. and *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* strains isolated from Italian aquaculture farms. *New Microbiologica*. 34, 53-63.
- Li, Z., Velisek, J., Grabic, R., Li, P., Kolarova, J., Randak, T., 2011. Use of hematological and plasma biochemical parameters to assess the chronic effects of a fungicide propiconazole on a freshwater teleost. *Chemosphere*. 83, 572–578.
- Machado, M., 2014. Dietary tryptophan and methionine as modulators of the European seabass (*Dicentrarchus labrax*) immune status and inflammatory response. *Mestrado em Ciências do Mar - Recursos Marinhos - Especialidade Aquacultura e Pescas*. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto. Porto.
- Machado, M., Azeredo, R., Rosales, P., Afonso, A., Peres, H., Teles, A., Costas, B., 2015. Dietary tryptophan and methionine as modulators of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) immune status and inflammatory response. *Fish & Shellfish Immunology*. 42, 353-362.
- Magariños, B., Santos, Y., Romalde, J., Rivas, C., Barja, J., Toranzo, A., 1992. Pathogenic activities of live cells and extracellular products of the fish pathogen *Pasteurella piscicida*. *Journal of General Microbiology*. 138, 2491-2498.
- Magariños, B., Romalde, J., Lemos, M., Barja, J., Toranzo, A., 1994. Iron uptake by *Pasteurella piscicida* and its role in pathogenicity for fish. *Applied and Environmental Microbiology*. 60, 2990-2998.
- Magariños, B., Romalde, J., Noya, M., Barja, J., Toranzo, A., 1996. Adherence and invasive capacities of the fish pathogen *Pasteurella piscicida*. *FEMS Microbiology Letters*. 138, 29-34.

- Magnadóttir, B., 2006. Innate immunity of fish (overview). *Fish & Shellfish Immunology*. 20, 137-151.
- Magnadóttir, B., 2010. Immunological control of fish diseases. *Marine Biotechnology*. 12, 361-379.
- Martínez, S., Díez, M., Padilla, D., Veja, B., Aamri, F., Icardo, J., Acosta, F., Vivas, J., 2014. New aspects in the biology of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: Pili, motility and adherence to solid surfaces. *Veterinary Microbiology*. 174, 247-254.
- Mauri, I., Romero, A., Acerete, L., MacKenzie, S., Roher, N., Callol, A., Cano, I., Alvarez, M., Tort, L., 2011. Changes in complement responses in Gilthead seabream (*Sparus aurata*) and European seabass (*Dicentrarchus labrax*) under crowding stress, plus viral and bacterial challenges. *Fish & Shellfish Immunology*. 30, 182-188.
- Melillo, D., Varriale, S., Giacomelli, S., Natalea, L., Bargelloni, L., Oresteb, U., Pinto, M., Coscia, M., 2015. Evolution of the complement system C3 gene in Antarctic teleosts. *Molecular Immunology*. 66, 299-309.
- Mesa, S., Suárez, M., Rúa, A., Cárdenas, S., Gallego, M., 2014. Productive and physiological implications of different feeding frequencies in meagre *Argyrosomus regius* (Asso, 1801). *Aquacultural Engineering*. 60, 6-13.
- Mosca, F., Ciulli, S., Volpatti, D., Romano, N., Volpe, E., Bulfon, C., Massimini, M., Caccia, E., Galeotti, M., Tiscar, P., 2014. Defensive response of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) against *Listonella anguillarum* or *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* experimental infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 162, 83-95.
- Murray, C.B., Evelyn, T.P.T., Beacham, T.D., Barner, L.W., Ketcheson, J.E., Prosperi-Porta, L., 1992. Experimental induction of bacterial kidney disease in chinook salmon by immersion and cohabitation challenges. *Diseases Of Aquatic Organisms*. 12, 91-96.
- Mylonas, C., Mitrizakis, N., Papadaki, M., Sigelaki, I., 2013. Reproduction of hatchery-produced meagre *Argyrosomus regius* in captivity I. Description of the annual reproductive cycle. *Aquaculture*. 414, 309-317.
- Nagano, I., Inoue, S., Kawai, K., Oshima, S., 2009. Repeatable immersion infection with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* reproducing clinical signs and moderate mortality. *Fisheries Science*. 75, 707-714.
- Naka, H., Hirono, I., Aoki, T., 2007. Cloning and characterization of *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* phospholipase: an enzyme that shows haemolytic activity. *Journal of Fish Diseases*. 30, 681-690.
- Nakao, M., Tsujikura, M., Ichiki, S., Vo, T., Somamoto, T., 2011. The complement system in teleost fish: progress of post-homolog-hunting researches. *Developmental and Comparative Immunology*. 35, 1296-1308.
- Ngugi, C., Okoth, E., Bundi, J., Orina, P., Chemoiwa, E., Aloo, P., 2015. Effects of dietary administration of stinging nettle (*Urtica dioica*) on the growth performance, biochemical, hematological and immunological parameters in juvenile and adult Victoria Labeo (*Labeo victorianus*) challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology*. 44, 533-541.
- Noga, E., 2010. Fish Disease: Diagnosis and Treatment. 2^a ed. Wiley-Blackwell., pp. 536.
- Noya, M., Magariños, B., Lamas, J., 1995a. Interactions between peritoneal exudate cells (PECs) of gilthead seabream (*Sparus aurata*) and *Pasteurella piscicida*. A morphological study. *Aquaculture*. 131, 11-21.
- Noya, M., Magariños, B., Toranzo, A., Lamas, J., 1995b. Sequential pathology of experimental pasteurellosis in gilthead seabream *Sparus aurata*. A light- and electron-microscopic study. *Diseases of Aquatic Organisms*. 21, 177-186.

- Osorio, C., Collins, M., Toranzo, A., Barja, J., Romalde, J., 1999. 16S rRNA gene sequence analysis of *Photobacterium damsela* and nested PCR method for rapid detection of the causative agent of fish pasteurellosis. *Applied and Environmental microbiology*. 65, 2942–2946.
- Pastoret, P., Griebel, P., Bazin, H., Govaerts, A., 1998. *Handbook of Vertebrate Immunology*. Academic Press Limited., pp. 672.
- Patterson, H., Saralahti, A., Parikka, M., Dramsi, S., Cuot, P., Poyart, C., Rounioja, S., Rämetsä, M., 2012. Adult zebrafish model of bacterial meningitis in *Streptococcus agalactiae* infection. *Developmental and Comparative Immunology*. 38, 447–455.
- Pellitero, P., 2008. Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 126, 171–198.
- Pellizzari, C., Krasnov, A., Afanasyev, S., Vitulo, N., Franch, R., Pegolo, S., Patarnello, T., Bargelloni, L., 2013. High mortality of juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata*) from photobacteriosis is associated with alternative macrophage activation and anti-inflammatory response: Results of gene expression profiling of early responses in the head kidney. *Fish and Shellfish Immunology*. 34, 1269–1278.
- Prabhakar, A., 2010. *Fish immunology and biotechnology*. Swastik Publications., pp. 320.
- Quémener, L., 2002. *Le maigre commun (Argyrosomus regius)* Biologie, pêche, marché et potentiel aquacole. IFremer.
- Rajan, P., Lin, J., Ho, M., Yang, H., 2003. Simple and rapid detection of *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* by a PCR technique and plating method. *Journal of Applied Microbiology*. 95, 1375–1380.
- Rao, Y., Chakrabarti, R., 2004. Enhanced anti-proteases in *Labeo rohita* fed with diet containing herbal ingredients. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 19, 132–134.
- Reed, L., Muench, H., 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Epidemiology*. 27, 493–497.
- Reque, V., Moraes, J., Belo, M., Moraes, F., 2010. Inflammation induced by inactivated *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia fed diets supplemented with *Saccharomyces cerevisiae*. *Aquaculture*. 300, 37–42.
- Rieger, A., Barreda, D., 2011. Antimicrobial mechanisms of fish leukocytes. *Developmental and Comparative Immunology*. 35, 1238–1245.
- Roo, J., Hernandez-Cruz, C.M., Borrero, C., Schuchardt, D., Fernandez-Palacios, H., 2010. Effect of larval density and feeding sequence on meagre (*Argyrosomus regius*; Asso, 1801) larval rearing. *Aquaculture*. 302, 82–88.
- Santos, A., Paiva, M., Veiga, M., Faustino, L., Egami, M., 2012. Hematological parameters and phagocytic activity in fat snook (*Centropomus parallelus*) bred in captivity. *Fish & Shellfish Immunology*. 33, 953–961.
- Sardet, M., Thompson, K., Penman, D., McAndrew, B., 2001. Immune responses of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) clones: I. Non-specific responses. *Developmental and Comparative Immunology*. 25, 37–46.
- Secombes, C., 1996. The nonspecific immune system: cellular defense. In: Iwama, G., Nakanishi, T., (Eds). *The fish immune system*. Academic Press. pp. 63–95.
- Secombes, C., Wang, T., 2012. *The innate and adaptive immune system of fish*. Woodhead Publishing, Cambridge, United Kingdom.
- Sfacteria, A., Brines, M., Blank, U., 2014. The mast cell plays a central role in the immune system of teleost fish. *Molecular Immunology*. 63, 3–8.

- Shabana, N., Rahman, S., Absawy, M., Assem, S., 2012. Reproductive biology of *Argyrosomus regius* (Asso, 1801) inhabiting the south eastern Mediterranean Sea, Egypt. *Egyptian Journal of Aquatic Research*. 38, 147–156.
- Soto, D., 2008. Status of world aquaculture and its future development within an ecosystem's perspective. *Life and Marine Sciences*. 7, 3-5.
- Stosik, M., Deptula, W., Trávnicek, M., Chudzik, K., 2002. Phagocytic and bactericidal activity of blood thrombocytes in carps (*Cyprinus carpio*). *Veterinary Medicine*. 47, 21-25.
- Sunyer, J., Tort, L., 1995. Natural hemolytic and bactericidal activities of sea bream *Sparus aurata* serum are effected by the alternative complement pathway. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 45, 333-45.
- Talpur, A., Ikhwanuddin, M., 2012. Dietary effects of garlic (*Allium sativum*) on haemato-immunological parameters, survival, growth, and disease resistance against *Vibrio harveyi* infection in Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch). *Aquaculture*. 364-365, 6–12.
- Toranzo, A., Barreiro, A., Casal, J., Figueiras, A., Magarinõs, B., Barja, J., 1991. Pasteurellosis in cultured gilthead seabream (*Sparus aurata*) : first report in Spain. *Aquaculture*. 99, 1-15.
- Toranzo, A., Magarinõs, B., Romalde, J., 2005. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture*. 246, 37– 61.
- Uribe, C., Folch, H., Enriquez, R., Moran, G., 2011. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Veterinari Medicina*. 56, 486–503.
- Vale, A., Afonso, A., Silva, M., 2002. The professional phagocytes of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): cytochemical characterisation of neutrophils and macrophages in the normal and inflamed peritoneal cavity. *Fish & Shellfish Immunology*. 13, 183–198.
- Vale, A., Silva, M., Santos, N., Nascimento, D., Rodrigues, P., Ramos, C., Ellis, A., Azevedo, J., 2005. AIP56, a novel plasmid-encoded virulence factor of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* with apoptogenic activity against sea bass macrophages and neutrophils. *Molecular Microbiology*. 58, 1025–1038.
- Vale, A., Ramos, C., Silva, A., Silva, D., Gärtner, F., Santos, N., Silva, M., 2007. Systemic macrophage and neutrophil destruction by secondary necrosis induced by a bacterial exotoxin in a Gram-negative septicaemia. *Cellular Microbiology* 9, 988–1003.
- Vallés, R., Estévez, A., 2013. Light conditions for larval rearing of meagre (*Argyrosomus regius*). *Aquaculture*. 376, 15–19.
- Vázquez, G., Guerrero, G., 2007. Characterization of blood cells and hematological parameters in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). *Tissue and Cell*. 39, 151–160.
- Woo, P., Bruno, D., 2011. Fish Diseases and Disorders Vol. 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections. CABI international Publishing., pp. 930.
- Woo, P., Bruno, D., 2014. Fish Diseases and Disorders, vol. 3. CABI international Publishing., pp. 354.
- Workenhe, S., Rise, M., Kibenge, M., Kibenge, F., 2010. The fight between the teleost fish immune response and aquatic viruses. *Molecular Immunology*. 47, 2525–2536.
- Yadav, M., Pradhan, P., Sood, N., Chaudhary, D., Verma, D., Debnath, C., Sahoo, L., Chauhan, U., Punia, P., Jena, J., 2014. Innate immune response of Indian major carp, *Labeo rohita* infected with oomycete pathogen *Aphanomyces invadans*. *Fish & Shellfish Immunology*. 39, 524-531.
- Zar, J., 1999. Biostatistical Analysis, ed. Editors, Prentice Hall International. pp. 663.

Zhang, S., Cui, P., 2014. Complement system in zebrafish. *Developmental and Comparative Immunology*. 46, 3–10