



Ensaio experimental de infecção de sargos (*Diplodus sargus*) e corvina (*Argyrosomus regius*) com *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

Sónia Margarida da Conceição Brunheta

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação da Doutora Janina Z Costa, e co-orientação da Mestre Teresa Baptista

2011



Ensaio experimental de infecção de sargos (*Diplodus sargus*) e corvina (*Argyrosomus regius*) com *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

Sónia Margarida da Conceição Brunheta

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação da Doutora Janina Z Costa e co-orientação da Mestre Teresa Baptista

2011

Título: Ensaio experimental de Infecção de sargos (*Diplodus sargus*) e corvina (*Argyrosomus regius*) com *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

Copyright © Sónia Margarida da Conceição Brunheta
Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche
Instituto Politécnico de Leiria
2011

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 projecto/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 objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Resumo

O objectivo deste trabalho foi realizar um estudo preliminar para verificar a susceptibilidade das espécies *Diplodus sargus* e *Argyrosomus regius* ao patógeno *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, e estudar as eventuais alterações a nível histopatológico e confirmar a presença da bactéria nos órgãos.

Os peixes foram infectados por injeção intraperitoneal com 1 ml de uma suspensão bacteriana com 10^6 células/ml e com 1 ml de PBS estéril no grupo controlo.

A experiência decorreu durante três semanas, sendo os peixes amostrados cada dois dias, recolhendo-se amostras de sangue e de órgãos internos (rim, baço e fígado) para realização de PCR, histopatologia e hematócrito. No final da experiência sacrificaram-se todos os exemplares para recolha de sangue e de órgãos internos.

Para o *Diplodus sargus* o hematócrito revelou que existiam diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controlo e o grupo infectado. Comparando os grupos por dia, apenas no dia 22 existem diferenças. Adicionalmente, foi ainda possível concluir que, em média o hematócrito no grupo controlo era superior ao grupo infectado.

Os resultados obtidos do hematócrito da *Argyrosomus regius* não evidenciaram a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos em análise. Contudo comparando o hematócrito dos dois grupos por dia, já existiam diferenças no dia 15.

As análises histopatológicas mostraram a presença de maior número de melanomacrófagos no grupo infectado tanto em *Diplodus sargus* como em *Argyrosomus regius*.

Com a realização da PCR não se observou, em nenhuma das amostras das duas espécies estudadas bases, o fragmento específico com 267 pares de bases. No entanto, foi possível detectar a olho nú a presença da banda acima mencionada na amostra 32 (Corvina Infectado Baço Fragmento 1).

Palavras-chave: *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*; *Diplodus sargus*; *Argyrosomus regius*; histopatologia; PCR.

Abstract

This study consisted in a preliminary research in order to verify the possibility susceptibility of *Diplodus sargus* and *Argyrosomus regius* to the pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and also contemplated the study of potential histopathological changes and the confirmation of the bacteria's presence in the organs.

The fish were infected by intraperitoneal injection with a bacterial suspension of 1 ml, 10^6 cells/ml in the infected group and with a 1 ml sterile PBS in the control group.

The experiment occurred during three weeks. In the beginning six specimens were sacrificed to collect blood and internal organs (kidney, spleen and liver) in order to perform a PCR and histopathology. Every two days, two fish of each tank were anaesthetized, for blood collection to perform a hematocrit. In the end, all the specimens were sacrificed to blood and internal organs sampling.

It was verified through the hematocrit of *Diplodus sargus* that there were statistically significant differences between the control and the infected groups. Comparing the groups per day, only in the day 22 there were differences. Furthermore, it was also possible to determine that, in average, the hematocrit in the control group was higher than the one in the infected group.

The achieved results of the hematocrit of *Argyrosomus regius* did not show evidence of the existence of statistically significant differences between the two analyzed groups. Nevertheless, comparing the hematocrit of the two groups per day, there were already differences in the day 15.

The histopathological analyses showed the presence of a larger number of melanomacrophages in the infected group in *Diplodus sargus* as well as in *Argyrosomus regius*.

The purpose of performing PCR to confirm the presence of the pathogen by obtaining a specific DNA fragment of 267, which did not occur in any of the examined species. Nonetheless, the above mentioned band was detected with the naked eye in sample 32 (*Argyrosomus regius* Infected Spleen Fragment 1).

Keywords: *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*; *Diplodus sargus*; *Argyrosomus regius*; histopathology; PCR.

Índice

Resumo	iii
Abstract	v
Índice de Figuras	ix
Índice de tabelas.....	xi
1. Introdução.....	1
1.1. Introdução geral	1
1.2. <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	2
1.2.1. Pasteurelose	2
1.2.2. Patologia.....	3
1.2.3. Factores de virulência	4
1.2.4. Transmissão	4
1.2.5. Posição taxonómica.....	5
1.2.6. Características morfológicas, bioquímicas e serológicas	5
1.2.7. Diagnóstico.....	7
1.3. Objectivos	7
2. Material e métodos	9
2.1. Desenho experimental.....	9
2.2. Material biológico	10
2.3. Infecção experimental	10
2.3.2. Hematócrito	11
2.3.3. Análises histopatológicas.....	12
2.3.4. PCR.....	12
2.4. Análise dos dados	12
3. Resultados.....	13
3.1. Hematócrito.....	13
3.1.1. Sargos	13
3.1.2. Corvinas	14
3.2. Análises histopatológicas	15
3.2.1 - Sargos	15
3.2.1.1 - Hematoxilina-Eosina	15
3.2.1.2 - Hematoxilina-Gram.....	19
3.2.2 - Corvivas.....	23
3.2.2.2- Hematoxilina-Gram.....	25

3.3. PCR	28
5. Considerações finais.....	35
6. Referências bibliográficas	37
7. Anexos.....	41
Anexo I – Processamento de tecidos	41
Anexo II - Cortes histológicos.....	41
Anexo III – Coloração (Matushima <i>et al.</i>).....	42

Índice de Figuras

Figura 2.1 - Desenho experimental.	9
Figura 2.2 - Exemplos de <i>Diplodus sargus</i>	10
Figura 2.3 - Exemplos de <i>Argyrosomus regius</i>	10
Figura 3.1 – Hematócrito do <i>Diplodus sargus</i> . (*) representa diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Resultados apresentados na forma média \pm desvio-padrão.	13
Figura 3.2 – Hematócrito do <i>Diplodus sargus</i> por dias. (*) representa diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Resultados apresentados na forma média \pm desvio-padrão.	13
Figura 3.3 - Hematócrito do <i>Argyrosomus regius</i> . Resultados apresentados na forma média \pm desvio-padrão.	14
Figura 3.4 – Hematócrito do <i>Argyrosomus regius</i> por dias (*) representa diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Resultados apresentados na forma média \pm desvio-padrão.	14
Figura 3.5 – Melanomacrófagos (seta) no baço de <i>Diplodus sargus</i> (grupo controlo) 100x.	15
Figura 3.6 – Melanomacrófagos (seta) no baço <i>Diplodus sargus</i> (grupo infectado) 100x.	16
Figura 3.7 – Melanomacrófagos (seta) e tecido hematopoiético (*) no baço de <i>Diplodus sargus</i> , grupo controlo (400x).	16
Figura 3.8 – Melanomacrófagos (seta) e tecido hematopoiético (*) no baço de <i>Diplodus sargus</i> , grupo infectado (400x).	17
Figura 3.9 – Melanomacrófagos (seta estreita) e túbulo proximal (seta larga) rodeados por tecido hematopoiético (*) no rim de <i>Diplodus sargus</i> , grupo controlo (400x).	17
Figura 3.10 - Melanomacrófagos (seta estreita), túbulo proximal (seta larga), células inflamatórias (*) no rim de <i>Diplodus sargus</i> , grupo infectado (400x).	18
Figura 3.11 – Vaso sanguíneo (seta). Hepatócitos (*) no fígado de <i>Diplodus sargus</i> , grupo controlo (400x).	18
Figura 3.12 - Vaso sanguíneo (seta). Hepatócitos (*) no fígado <i>Diplodus sargus</i> , grupo infectado (400x).	19
Figura 3.13- Melanomacrófagos (seta) no baço de <i>Diplodus sargus</i> , grupo controlo (1000x).	20
Figura 3.14 – Melanomacrófagos (seta) no baço de <i>Diplodus sargus</i> , grupo infectado (1000x).	20

Figura 3.15 – Melanomacrófagos (seta) no rim de <i>Diplodus sargus</i> , grupo controlo (1000x).	21
Figura 3.16 – Melanomacrófagos (seta) no rim de <i>Diplodus sargus</i> , grupo infectado (1000x).	21
Figura 3.17 - Hepatócitos (*) no fígado de <i>Diplodus sargus</i> , grupo controlo (1000x).....	22
Figura 3.18 – Vaso sanguíneo (seta) e hepatócitos (*) no fígado de <i>Diplodus sargus</i> , grupo infectado (1000x).	22
Figura 3.19 - Melanomacrófagos (seta). Tecido hematopoiético (*). Baço de <i>Argyrosomus regius</i> , grupo controlo (400x).	23
Figura 3.20 – Melanomacrófagos (seta). Tecido hematopoiético (*). Baço de <i>Argyrosomus regius</i> , grupo infectado (400x).	24
Figura 3.21 - Vaso sanguíneo (seta). Hepatócitos (*). Fígado de <i>Argyrosomus regius</i> , grupo controlo (400x).....	24
Figura 3.22 - Vasos sanguíneos (seta). Hepatócitos (*). Fígado de <i>Argyrosomus regius</i> , grupo infectado (400x).	25
Figura 3.23 - Melanomacrófagos (seta). Tecido hematopoiético (*). Baço de <i>Argyrosomus regius</i> , grupo controlo (1000x).	26
Figura 3.24 – Melanomacrófagos (seta). Tecido hematopoiético (*). Baço de <i>Argyrosomus regius</i> , grupo infectado (1000x).	26
Figura 3.25 - Vasos sanguíneos (seta). Hepatócitos (*). Fígado de <i>Argyrosomus regius</i> , grupo controlo (1000x).....	27
Figura 3.26 - Hepatócitos (*). Fígado de <i>Argyrosomus regius</i> , grupo infectado (1000x)...	27
Figura 3.27 – Electroforese em gel de agarose do produto de amplificação por PCR identificativa de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> das amostras de tecidos 1 a 26.	28
Figura 3.28 – Electroforese em gel de agarose do produto de amplificação por PCR identificativa de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> das amostras de tecidos 27 a 40.	28

Índice de tabelas

Tabela 1.1 - Produção mundial de pescado e sua utilização (excluindo a China).	1
Tabela 1.2 - Algumas espécies de peixes afectadas pela <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	3
Tabela 1.3 - Características bioquímicas de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> (Adaptado de Magariños <i>et al.</i> , 1992 e Baptista <i>et al.</i> , 1996)	6
Tabela 3.1 - Média do hematócrito do <i>Diplodus sargus</i> durante a experiência.....	13
Tabela 3.2 - Média do hematócrito da <i>Argyrosomus regius</i> durante a experiência.	14
Tabela 3.3 - Identificação das amostras utilizadas no PCR.....	29

1. Introdução

1.1. Introdução geral

A aquacultura é uma importante fonte de proteína e um sector em expansão que requer uma pesquisa contínua com aperfeiçoamento científico, técnico e de inovação. A produção de alimentos, para consumo humano, com produtos provenientes de aquacultura (peixes, crustáceos, moluscos e outros animais aquáticos) atingiu 52,2 milhões de toneladas em 2008. Entre os anos 1970 e 2008 os alimentos provenientes de aquacultura aumentaram em média 8,3% por ano (Toranzo *et al.*, 2005; FAO, 2010).

A pesca e a aquacultura forneceram 96,1 milhões de toneladas de peixe em 2009 e 75,5 milhões de toneladas destinaram-se ao consumo humano (tabela 1.1).

Tabela 1.1 - Produção mundial de pescado e sua utilização (excluindo a China).

	2004	2005	2006	2007	2008	2009*
(Milhões de toneladas)						
Produção Continental:						
Capturas	6,5	7,2	7,6	7,7	8,0	7,9
Aquacultura	8,9	9,5	10,2	11,0	12,2	12,9
Total	15,4	16,7	17,7	18,7	20,1	20,8
Produção Marinha						
Capturas	71,4	70,3	67,5	67,5	67,0	67,2
Aquacultura	6,5	6,7	7,3	7,5	7,6	8,1
Total	77,9	77,0	74,8	75,0	74,6	75,3
Total Capturas	77,9	77,5	75,1	75,2	74,9	75,1
Total Aquacultura	15,3	16,2	17,5	18,5	19,8	21,0
Total Produção Pescado	93,2	93,7	92,6	93,7	94,8	96,1
Consumo Humano	68,8	70,4	72,4	73,5	74,3	75,5
Utilização não alimentar	24,5	23,2	20,2	20,2	20,5	20,5
População (bilhões)	5,2	5,2	5,4	5,4	5,4	5,5
Consumo de pescado como alimento per capita (Kg)	13,4	13,5	13,7	13,7	13,7	13,7

Nota: Excluindo plantas aquáticas. * Estimativa provisória.

Fonte: FAO (2010)

Em países como Portugal, Espanha, Grécia, Itália e França a dourada (*Sparus aurata*) e o robalo (*Dicentrarchus labrax*) são as principais espécies cultivadas (Toranzo *et al.*, 2005). Mas com a produção excessiva destas espécies e a consequente saturação de mercado há um aumento da concorrência levando à diminuição das margens de lucro, criando-se assim uma necessidade de diversificar as espécies cultivadas (Guerreiro *et al.*, 2010; Rigos *et al.*, 2010).

Duas espécies potenciais para cultivo devido ao seu valor comercial são o sargo (*Diplodus sargus*) e a corvina (*Argyrosomus regius*) (Rigos *et al.*, 2010). Contudo, a introdução destas espécies em aquacultura pode ser comprometida devido a problemas patológicos como infecções bacterianas por *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Rigos *et al.*, 2010).

1.2. *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

1.2.1. Pasteurelose

Photobacterium damsela subsp. *piscicida* é o agente causador da pasteurelose ou pseudotuberculose em peixes (Gauthier *et al.*, 1995).

O primeiro caso registado foi no Verão de 1963 na Baía de Chesapeake em que a população de perca branca (*Roccus americanus*) sofreu uma perda elevada de indivíduos devido a esta bactéria (Snieszko *et al.*, 1964).

Em 1990 foi registado o primeiro caso em Espanha na dourada (*Sparus aurata*) (Toranzo *et al.*, 1991). Em Portugal, foi observada pela primeira vez em 1995 em dourada (*Sparus aurata*) (Baptista *et al.*, 1996).

Desde a sua identificação que a *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* tem sido um importante agente patogénico causando perdas significativas em todo o mundo quer em animais selvagem como em animais de cultivo. Por este motivo tem sido alvo de vários estudos quer para identificar e conhecer o agente casual assim como para encontrar métodos para combatê-lo (Magariños *et al.*, 1992; Gauthier *et al.*, 1995; Magariños *et al.*, 1996a; Magariños *et al.*, 1996b; Bakopoulos *et al.*, 1997; Magariños *et al.*, 2001; Acosta *et al.*, 2003; Naka *et al.*, 2005; Acerete *et al.*, 2009).

A partir da sua primeira observação, em 1963, em populações de *Morone americanus* e *M. saxatilis* na Baía de Chesapeake (Snieszko *et al.*, 1964) a pasteurelose tem ocorrido por todo o mundo afectando várias espécies.

Tabela 1.2 - Algumas espécies de peixes afectadas pela *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

Espécie	País/Local	Referência
<i>Morone americanus</i>	EUA	Snieszko <i>et al.</i> , 1964
<i>R. saxatilis</i>	EUA	Snieszko <i>et al.</i> , 1964
<i>Seriola quinqueradiata</i>	Japão	Kusuda <i>et al.</i> , 1998
<i>Plecoglossus altivelis</i>	Japão	Kusuda <i>et al.</i> , 1998
<i>Rachycentron canadum</i>	Tailândia	Liu <i>et al.</i> , 2003
<i>Sparus aurata</i>	Espanha	Toranzo <i>et al.</i> , 1991
	Portugal	Baptista <i>et al.</i> , 1996
	Grécia	Bakopoulos <i>et al.</i> , 1995
<i>Dicentrarchus labrax</i>	Turquia	Candan <i>et al.</i> , 1996
<i>Thunnus thynnus</i>	Mar Adriático	Mladineo <i>et al.</i> , 2006

1.2.2. Patologia

A pasteurelose é uma septicemia bacteriana que pode ou não apresentar sinais clínicos externos e pode ocorrer de duas formas: aguda e crónica (Magariños *et al.*, 1996a).

Na forma aguda os sinais clínicos externos são pouco evidentes. Podem ocorrer pequenas hemorragias nos opérculos ou na base das barbatanas, escurecimento da pele. Internamente, o baço e o fígado podem sofrer aumento de tamanho e apresentar extensas zonas de necrose multifocal e acumulação de bactérias (Magariños *et al.*, 1996a; Romalde *et al.*, 1999).

Na forma crónica os órgãos internos apresentam nódulos brancos (0,5 a 3,5 mm de diâmetro) que são colónias da bactéria. No entanto a formação destes nódulos parece depender da espécie infectada, se a infecção ocorreu de modo natural ou foi induzida, se foram ou não utilizados antibióticos para combater a doença. O baço, o rim e o fígado apresentam acumulação de macrófagos muitos dos quais necróticos e com numerosas bactérias intactas, o que pode indicar que a *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* sobrevive nos macrófagos do hospedeiro e não é degradada (Baptista *et al.*, 1996; Magariños *et al.*, 1996a; Nagano, 2009; Noga, 2010).

1.2.3. Factores de virulência

Para que a infecção e a doença ocorram, o agente patogénico tem que conseguir entrar no hospedeiro, multiplicar-se, resistir ou não activar os mecanismos imunitários e por fim causar danos (Magariños *et al.*, 1996a).

Infecções experimentais realizadas em peixes demonstram a elevada patogenicidade da *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* indicando que deve possuir importantes mecanismos de virulência (Magariños *et al.*, 1996a).

A presença de uma cápsula na superfície celular é uma importante característica nos primeiros estádios de infecção, uma vez que está relacionada com a aderência e a invasão das células do hospedeiro desempenhando, assim, um papel importante na virulência desta bactéria (Magariños *et al.*, 1996a; Magariños *et al.*, 1996b). Esta cápsula confere resistência à acção bactericida do soro do peixe e aumenta a mortalidade nos peixes como demonstrou Magariños *et al.*, (1996b).

As células bacterianas são capazes de sobreviver pelo menos seis dias no interior das células do hospedeiro e propagarem-se de célula para célula dando origem a uma placa destrutiva entre as camadas de células (Magariños *et al.*, 1996a).

1.2.4. Transmissão

Photobacterium damsela subsp. *piscicida* pode ser transmitida através do meio aquático envolvente, horizontalmente de peixe para peixe e verticalmente através dos ovários e dos fluidos seminais dependendo do modo de transmissão do hospedeiro (Austin e Austin, 1989; Magariños *et al.*, 1996a; Toranzo *et al.*, 2005). Infectando o hospedeiro por lavagem gástrica ao fim de 72 h *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* está presente no sangue, indicando transmissão oral. Recorrendo a técnicas de anticorpos fluorescentes demonstrou-se que a infecção pode ocorrer através das brânquias ou através do tracto gastrointestinal por ingestão de alimentos contaminados (Magariños *et al.*, 1996a). A pele também é uma possível via de entrada, dependendo mais uma vez da espécie afectada. Na dourada (*Sparus aurata*) e no robalo (*Dicentrarchus labrax*) a infecção através da pele pode ocorrer uma vez que a *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* não é sensível ao seu muco, ao contrário do que se verifica para o pregado (*Scophthalmus maximus*) que produz um muco para o

qual a *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* é muito sensível (Magariños *et al.*, 1995).

1.2.5. Posição taxonómica

A denominação taxonómica da *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* tem gerado alguma controvérsia. Snieszko *et al.*, (1964) determinaram que esta bactéria pertencia ao género "*Pasteurella sp*" (estirpe isolada em perca branca).

Jansen e Surgalla (1968) estudaram morfológica, fisiológica e serologicamente esta bactéria e por ser a única bactéria do género *Pasteurella*, até então, a ser isolada e a causar infecções letais em peixes, sugeriram que a bactéria passasse a ser identificada como *Pasteurella piscicida*.

Posteriormente, foram sugeridas algumas propostas para o género desta bactéria: *Vibrio*, *Corynebacterium* e *Arthrobacter* (Gauthier *et al.*, 1995; Magariños *et al.*, 1996a).

Em 1995, Gauthier *et al.*, reclassificaram-na como *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, com base na análise das sequências rRNA e na hibridação ADN-ADN.

Trüper e De'Clari, (1997) corrigiram o epíteto específico de "*damsela*" para "*damselae*" passando então a designar-se *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

1.2.6. Características morfológicas, bioquímicas e serológicas

Photobacterium damsela subsp. *piscicida* é uma bactéria, com dimensões entre 0,5 - 0,7 x 0,7 - 2,6 µm, em forma de bacilo, Gram-negativa, sem mobilidade, halófila, anaeróbia facultativa, fermentativa, oxidase e catalase positivas e sensível ao agente vibriostático O/129. Apresenta coloração bipolar e dependendo da condição da cultura é pleomórfica. Possui uma cápsula constituída por 99,6% de hidratos de carbono e 0,4% de proteínas (Magariños *et al.*, 1996a; Romalde *et al.*, 1999, Woo *et al.*, 2002; tabela 1.2).

Do ponto de vista serológico, a *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* constitui um grupo altamente homogéneo. Esta homogeneidade deve-se ao facto de todas as células e os antígenos somáticos produzirem fortes aglutinações em lâmina com anti-soro produzido contra várias estirpes de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Testes de aglutinação cruzada demonstram que não é possível estabelecer serotipos (Magariños *et al.*, 1992; Magariños *et al.*, 1996a; Romalde, 2002).

Tabela 1.3 - Características bioquímicas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Adaptado de Magariños *et al.*, 1992 e Baptista *et al.*, 1996)

Teste	Reacção	Teste	Reacção
Coloração		Urease	-
Gram	-	Gelatinase	-
Bipolar	+	Caseinase	-
Mobilidade	-	Elastase	-
Oxidase	+	Lipase (Tween 80)	-
Catalase	+	Fosfolipase	+
Vermelho de metilo	(+)	Amilase	-
Voges-Proskauer	+	Hemólise de:	
Produção de indol	-	Eritrócitos de ovelha	-
Redução de nitrato	-	Eritrócitos de truta	-
Utilização de citrato	-	Produção de ácido a partir de:	
Produção de H ₂ S	-	Glucose	+
Oxidação-fermentação (glucose)	F	Manose	+
Produção de gás (glucose)	-	Galactose	+
Crescimento a:		Frutose	+
5°C	-	Maltose	-
15°C	+	Sacarose	-
25°C	+	Ramnose	-
37°C	-	Anabinose	-
Crescimento em:		Amigdalina	-
0% NaCl	-	Melibiose	-
3% NaCl	+	Manitol	-
5% NaCl	-	Inositol	-
8% NaCl	-	Sorbitol	-
10% NaCl	-	Glicerol	-
Crescimento em:		Sensibilidade/resistência a:	
TSA + 2% NaCl	+	Agente vibriostático O/129	S
BHIA + 2% NaCl	+	Ampicilina	S
Agar marinho	+	Clorofenicol	S
TCBS	-	Tetraciclina	S
MacConkey agar	-	Oxitetraciclina	S
Arginina dihidrolase	+	Estreptomicina	R
Lisina descarboxilase	-	Ácido oxolínico	S
Ornitina descarboxilase	-	Nitrofurantoína	S
Triptofano desaminase	-	Trimetoprim-sulfometoxazole	S
β- Galactosidase (ONPG)	-	Novobiocina	S

1.2.7. Diagnóstico

Como a doença praticamente não produz sinais externos nos peixes infectados é necessário isolar a bactéria.

Deve proceder-se ao isolamento da bactéria a partir dos órgãos internos, fígado, rim e baço, usando meios de cultura adequados como BHIA (Brain Heart Infusion Agar), TSA (Tryptone Soy Agar) ou Blood Agar todos suplementados com 1 a 2 % de NaCl. Esta bactéria tem um período de incubação de 2 a 4 dias a 20-25°C (Baptista *et al.*, 1996; Magariños *et al.*, 1996a; Magariños *et al.*, 2001; Romalde, 2002).

O diagnóstico presuntivo baseia-se no isolamento de bacilos bipolares, Gram-negativos, imóveis, oxidase e catalase positiva, fermentativa, sensível ao agente vibriostático O/129 (Janssen *et al.*, 1968; Magariños *et al.*, 1996a; Romalde, 2002; Liu *et al.*, 2003).

Para a confirmação do diagnóstico utilizam-se testes bioquímicos como as galerias API-20E (Magariños *et al.*, 1996a; Romalde, 2002; Liu *et al.*, 2003), testes serológicos como aglutinação com anti-soro específico, ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) e imunofluorescência directa (IFAT) (Magariños *et al.*, 1996a; Bakopoulos *et al.* 1997; Romalde *et al.*, 1999; Romalde, 2002; Nitzan *et al.*, 2004) e técnicas moleculares como PCR (Polymerase Chain Reaction) (Valle *et al.*, 2002; Rajan *et al.*, 2003; Toranzo *et al.*, 2005; Nagano *et al.*, 2009).

1.3. Objectivos

Sendo o sargo (*Diplodus sargus*) e a corvina (*Argyrosomus regius*) novas espécies em aquacultura, com elevado valor económico, e sabendo que a *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* é responsável por elevada mortalidade e perdas económicas consideráveis em espécies como a dourada (*Sparus aurata*) e o robalo (*Dicentrarchus labrax*), pretende-se com este trabalho fazer um estudo preliminar para verificar se é possível infectar as espécies *Diplodus sargus* e *Argyrosomus regius* com *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, e estudar as eventuais alterações a nível histopatológico e confirmar a presença da bactéria nos órgãos.

Para tal procedeu-se a:

1. Recolha de sangue para hematócrito;
2. Recolha de órgãos internos (rim, fígado e baço) para análises histopatológicas;
3. Recolha de órgãos internos (rim, fígado e baço) para PCR.

2. Material e métodos

O trabalho experimental realizou-se na sala de patologia do laboratório de Aquacultura da Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar de Peniche.

2.1. Desenho experimental

Para a realização da experiência foram utilizados doze aquários de 60 l, com água salgada (35‰) à temperatura de 22° C, com arejamento contínuo e com circuitos de circulação de água independentes.

Foram montados dois circuitos independentes com três aquários em cada um para cada espécie. Num dos circuitos foi colocado o grupo de controlo e no outro, o grupo infectado (figura 2.1).

O oxigénio, a amónia, os nitritos e a salinidade foram monitorizados no decorrer da experiência e ajustados sempre que necessário.

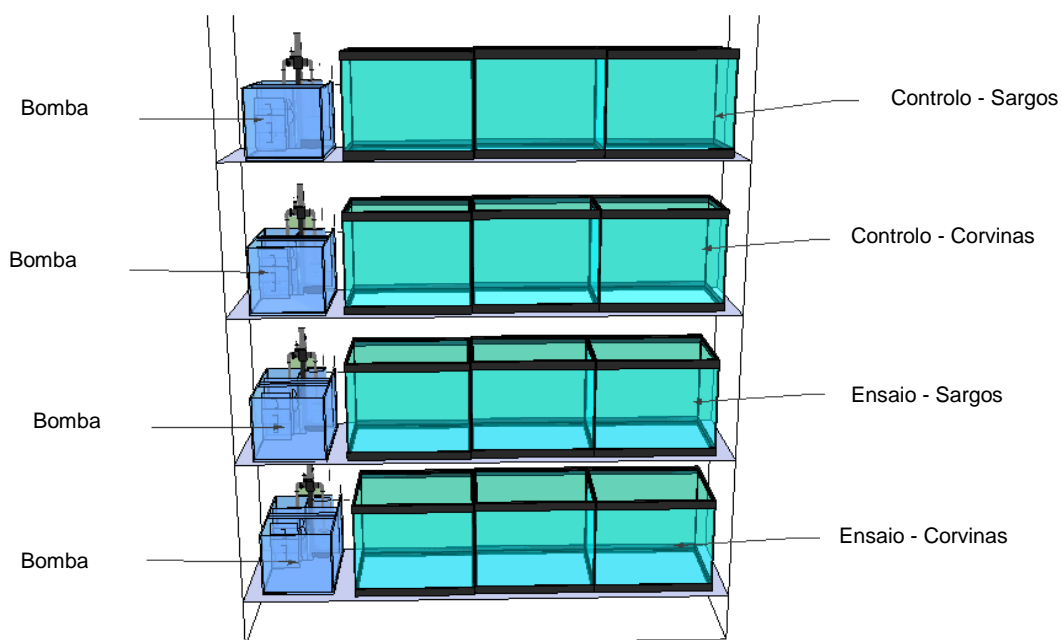


Figura 2.1 - Desenho experimental.

2.2. Material biológico

Utilizaram-se quarenta e dois exemplares de *Diplodus sargus*, com um comprimento total entre 15,0 - 18,5 cm e peso compreendido entre 61 e 120 g (figura 2.2).

Utilizaram-se trinta e nove exemplares de *Argyrosomus regius*, com um comprimento total entre 10,5 - 14,5 cm e peso compreendido entre 20 e 27 g, (figura 2.3).

Os animais foram alimentados de dois em dois dias a uma taxa de 3% de biomassa.

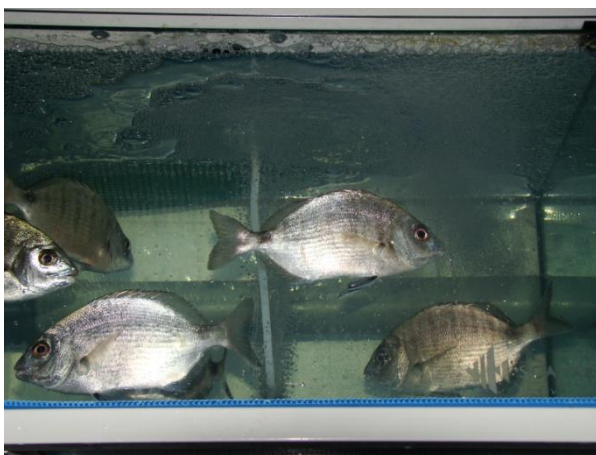


Figura 2.2 - Exemplares de *Diplodus sargus*.



Figura 2.3 - Exemplares de *Argyrosomus regius*.

2.3. Infecção experimental

Utilizou-se nesta experiência a estirpe de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, DSM 22834.

A bactéria foi descongelada e repicada para meio TSB (Tryptose Soy Broth) suplementado com 1,5% de NaCl e colocada a crescer a 25°C durante 48 horas. Após incubação a bactéria foi repicada para placas de TSA (Tryptic Soy Agar) suplementado com 1,5% NaCl e colocada na estufa a 25°C durante 24 horas. Após este período suspenderam-se as colónias em tubos de ensaio contendo 10 ml de PBS (tampão fosfato salino) estéril. Foi utilizada na infecção a dose do LD₅₀ determinado por Pestana (2002), 10⁶ células/ml. Esta concentração foi obtida por comparação da turbidez da suspensão com a escala de Mc Farland.

Procedeu-se à infecção por injeção intraperitoneal com 1 ml da suspensão bacteriana no grupo de peixes infectados. O grupo de peixes do controlo foi injectado com 1 ml de PBS estéril. Em ambos os grupos os peixes foram colocados nos aquários de forma sequencial, seis indivíduos por aquário, em ambos os grupos, nos sargos e cinco indivíduos por aquário no grupo de peixes de controlo e seis indivíduos por aquário no grupo das corvinas infectadas.

A experiência decorreu durante três semanas, no início sacrificaram-se seis exemplares de cada espécie (tempo 0) para recolha de sangue e de órgãos internos (rim, baço e fígado) e no final sacrificaram-se todos os exemplares para recolha de sangue e de órgãos internos. De dois em dois dias, dois peixes de cada aquário foram anestesiados para recolher sangue, sem sacrifício dos peixes, para a realização do hematócrito.

2.3.2. Hematócrito

O sangue foi recolhido da veia caudal dos peixes com uma seringa heparinizada e posteriormente colocado em tubos de centrífuga com volume de 1,5 ml e previamente heparinizados. Utilizaram-se tubos microhemáticos heparinizados (Brand 749321) com 7,5 cm de comprimento. Com uma das extremidades imersa no sangue rodou-se o tubo para que o sangue entrasse por capilaridade, até cerca de 6 cm no tubo. De seguida vedaram-se ambas as extremidades do tubo com plasticina e centrifugou-se durante 5 minutos a 3000 rpm.

Mediu-se a distância ocupada pelos glóbulos vermelhos e a distância total ocupada pelo sangue, em centímetros, com uma régua graduada e calculou-se o valor do hematócrito recorrendo à seguinte fórmula:

$$\text{Hematócrito} = \frac{X}{Y} \times 100$$

Onde:

X = distância ocupada pelos glóbulos vermelhos

Y = distância ocupada pelo sangue

2.3.3. Análises histopatológicas

Os órgãos (baço, rim e fígado nos sargos e baço e fígado nas corvinas) de metade dos peixes foram recolhidos e colocados em formol a 4% tamponado, até a sua inclusão em blocos de parafina (Anexo I).

Efectuaram-se cortes de 5 µm no micrótomo Sakura Accu-cut SRM 200 e colocaram-se em lâminas (Anexo II).

Após desparafinação e hidratação (Anexo III) foram efectuadas as colorações Hematoxilina-Eosina e de Hematoxilina - Gram (Anexo III).

2.3.4. PCR

Os órgãos da outra metade dos peixes foram recolhidos e colocados em álcool absoluto até a sua utilização para detecção de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* por PCR.

Para se efectuar o PCR (Polymerase Chain Reaction) utilizaram-se os primers, Car1 (18-mer 5'-GCTTGAAGAGATTCGAGT-3') e o Car2 (18-mer 5'-CACCTCGCGGTCTTGCTG-3') desenvolvidos por Osório *et al.* (2000). O primeiro passo foi proceder ao isolamento do ADN bacteriano a partir das amostras de tecido. Para a extracção do ADN foi utilizado o "JETquick Tissue DNA Spin Kit" de Genome de acordo com as indicações do fabricante para amostras de tecido fixadas em álcool. Osório *et al.* (2000) desenvolveram uma Nested PCR para a identificação específica de *P. damsela* subsp. *piscicida*, e a sua separação de *P. damsela* subsp. *damsela*. De acordo com este protocolo espera-se obter um fragmento com 267 pares de bases para *P. damsela* subsp. *piscicida*.

2.4. Análise dos dados

As diferenças entre o grupo controlo e o grupo infectado foram averiguadas através do teste *t-student* (Zar, 2010). As diferenças serão consideradas estatisticamente significativas ao nível de significância (α) de 0,05. Toda a análise estatística foi realizada com o software PASW Statistics 18.0.

3. Resultados

3.1. Hematócrito

3.1.1. Sargos

A média do volume de eritrócitos compactados para os sargos foi de $29,2 \pm 7,4$ no grupo controlo e de $23,8 \pm 8,0$ no grupo infectados (tabela 3.1).

Tabela 3.1 - Média do hematócrito do *Diplodus sargus* durante a experiência.

		Hematócrito (%)								
		Dias								
		1	3	6	8	11	15	18	22	Total
Controlo		27,2±6,5	35,6 ± 8,9	36,4*	34,9*	24,2±3,1	26,5±3,1	23,3±4,2	31,9±9,1	29,2 ± 7,4
Infeção			32,1±15,5	24,9±14,8	24,2±6,1	26,0±3,0	23,8±2,1	18,9±5,4	21,0±2,7	23,8 ± 8,0

* Uma amostra.

O volume de eritrócitos compactados, em média, no grupo controlo é superior ao grupo infectado (figura 3.1).

O teste *t-student* demonstrou a existência de diferenças estatisticamente significativas ($t_{0,95 (61)} = 2,741$; $p = 0,008 < 0,05$, figura 3.1) quando comparados os dois grupos, controlo e infectados. Comparando o hematócrito dos dois grupos por dia, verifica-se que apenas há diferenças estatisticamente significativas no dia 22 (figura 3.2).

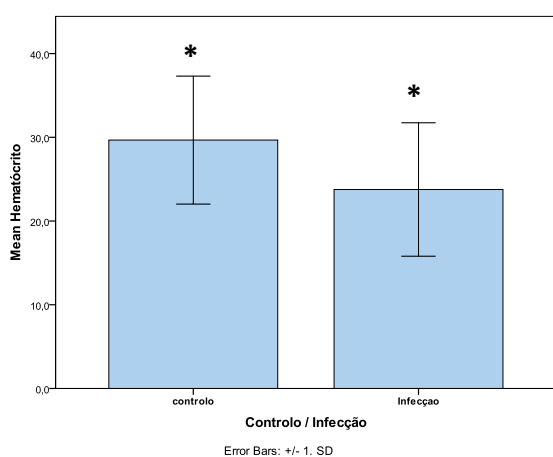


Figura 3.1 – Hematócrito do *Diplodus sargus*. (*) representa diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Resultados apresentados na forma média \pm desvio-padrão.

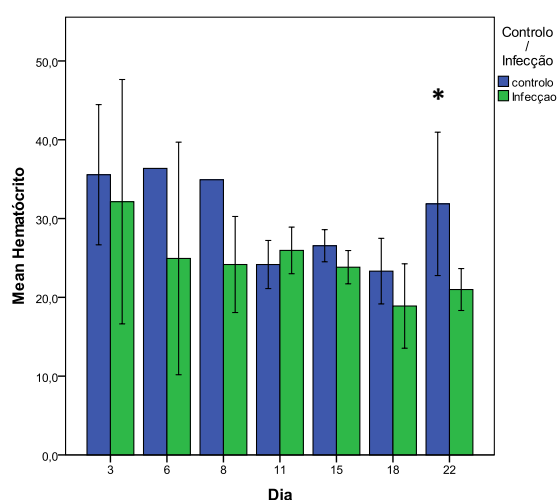


Figura 3.2 – Hematócrito do *Diplodus sargus* por dias. (*) representa diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Resultados apresentados na forma média \pm desvio-padrão.

3.1.2. Corvinas

Nas corvinas a média registada para o volume de células compactados foi mais elevado no grupo controlo, $23,2 \pm 6,0$ que no grupo infectado, $20,7 \pm 5,8$ (tabela 3.2).

Tabela 3.2 - Média do hematócrito da *Argyrosomus regius* durante a experiência.

		Hematócrito (%)								
		Dias								
		1	3	6	8	11	15	18	22	Total
Controlo		27,3*	27,2± 2,5	27,8± 1,1	22,0± 5,0	32,3*	24,5± 2,4	20,2± 5,2	18,6± 8,5	23,2 ± 6,0
Infeção			24,9±2,5	22,8± 2,6	20,5± 7,5	26,9± 0,9	15,0± 1,9	22,5± 1,3	15,3± 4,3	20,7 ± 5,8

* Uma amostra.

Os resultados do teste *t-student* não evidenciaram a existência de diferenças estatisticamente significativas para os dois grupos em análise ($t_{0,95(44)} = 1,427$; $p = 0,161 > 0,05$; figura 3.3). Comparando os valores obtidos para os dois grupos por dia, verifica-se que há diferenças estatisticamente significativas no dia 15 (figura 3.4).

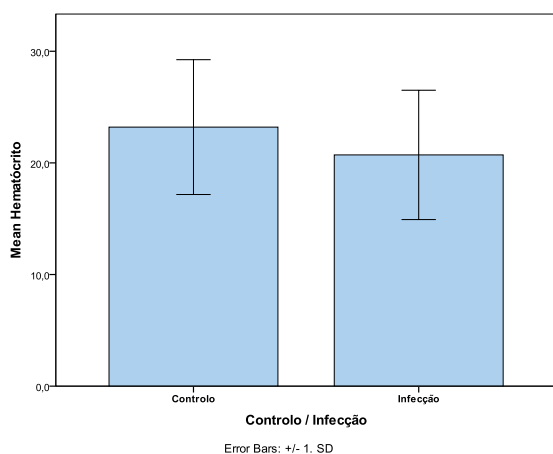


Figura 3.3 - Hematócrito do *Argyrosomus regius*. Resultados apresentados na forma média ± desvio-padrão.

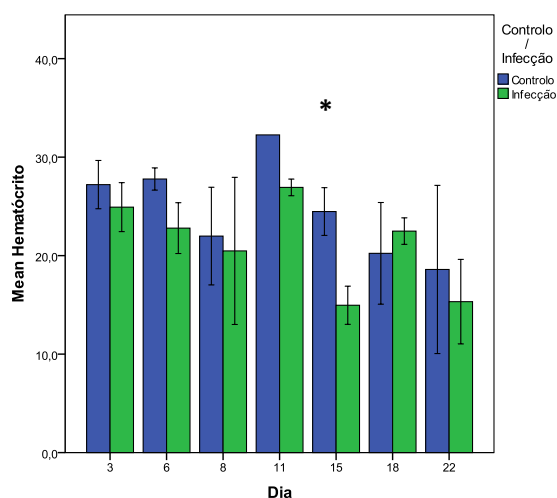


Figura 3.4 – Hematócrito do *Argyrosomus regius* por dias (*) representa diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Resultados apresentados na forma média ± desvio-padrão.

3.2. Análises histopatológicas

3.2.1 - Sargos

3.2.1.1 - Hematoxilina-Eosina

A observação das preparações do baço e do rim de sargo mostrou a presença de melanomacrófagos quer no grupo controlo quer no infectado (figura 3.5 e 3.6).

Com ampliação de 400x o baço apresentava tecido hematopoiético em ambos os grupos e no grupo infectado os melanomacrófagos estavam presentes em maior número e mais densos (figuras 3.7 e 3.8). No rim, de ambos os grupos, observou-se túbulo proximal, tecido hematopoiético e melanomacrófagos (figuras 3.9 e 3.10). O grupo infectado possuía melanomacrófagos mais densos e apresentava eritrócitos (figura 3.10)

No fígado observaram-se vasos sanguíneos e hepatócitos (figuras 3.11 e 3.12).

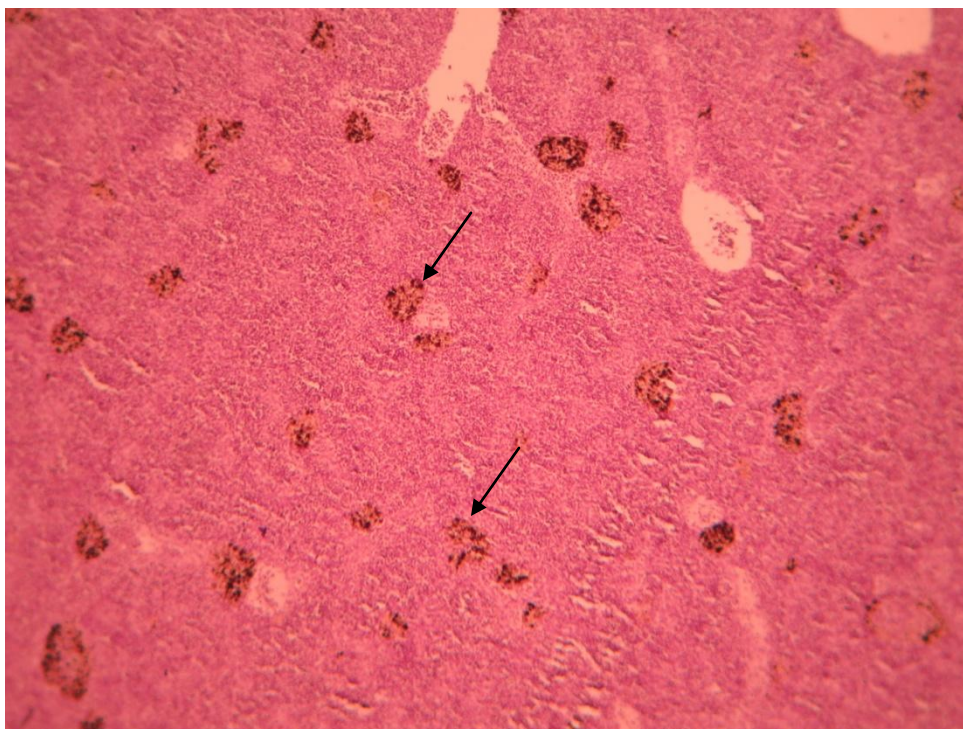


Figura 3.5 – Melanomacrófagos (seta) no baço de *Diplodus sargus* (grupo controlo) 100x.

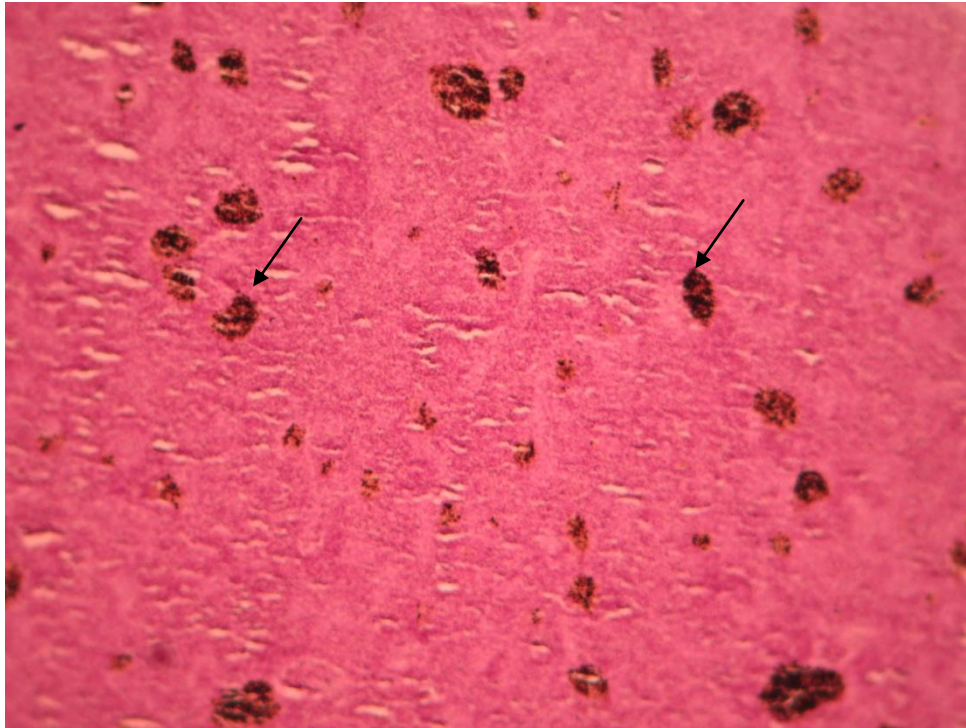


Figura 3.6 – Melanomacrófagos (seta) no baço *Diplodus sargus* (grupo infectado) 100x.

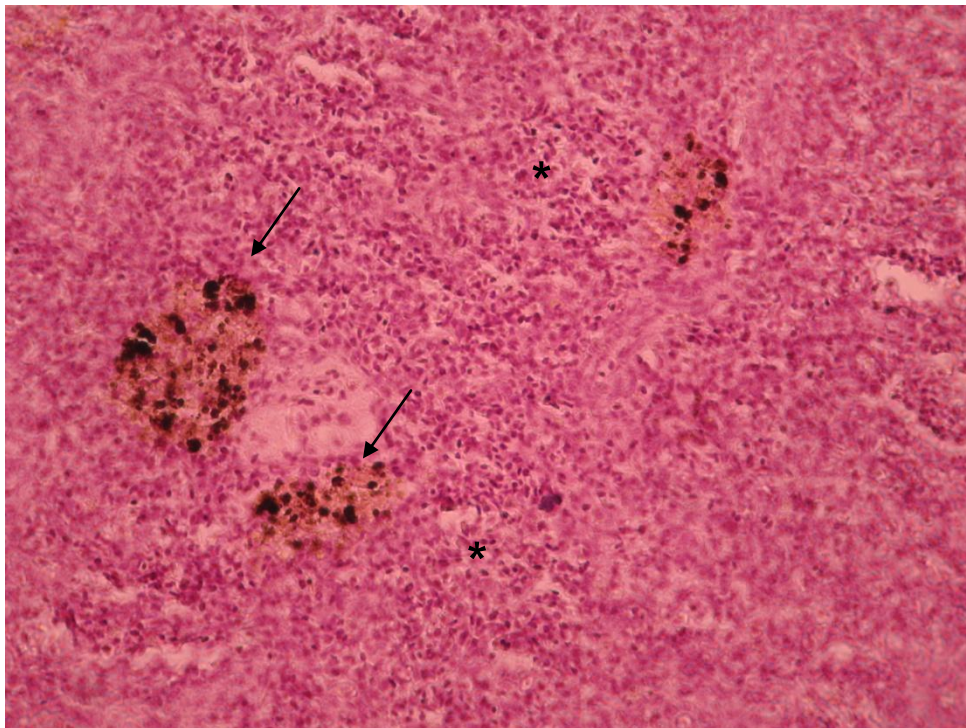


Figura 3.7 – Melanomacrófagos (seta) e tecido hematopoiético (*) no baço de *Diplodus sargus*, grupo controlo (400x).

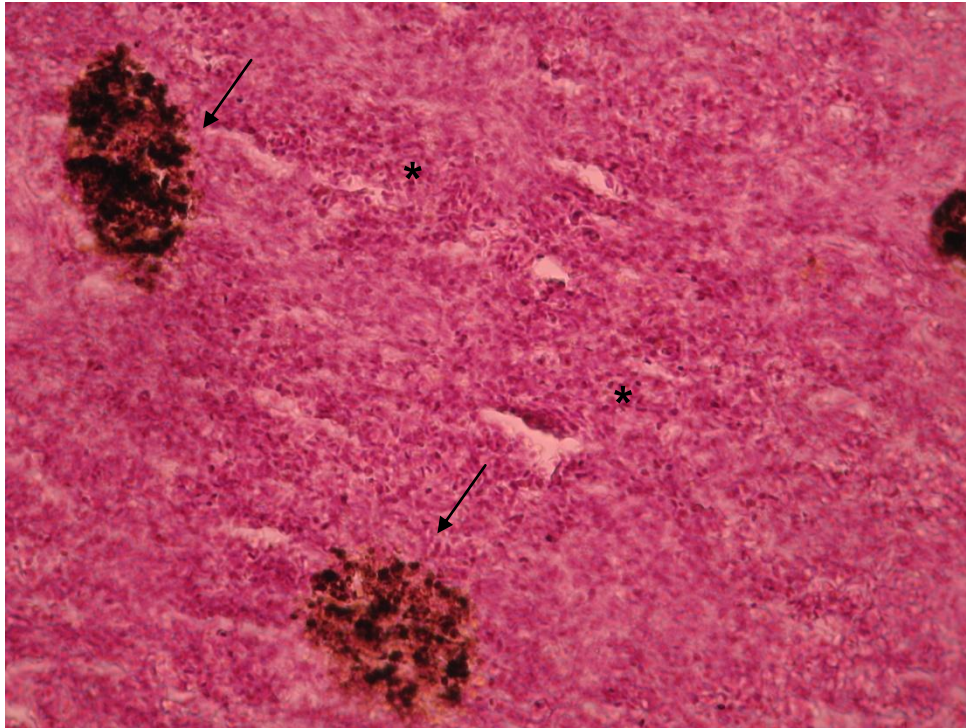


Figura 3.8 – Melanomacrófagos (seta) e tecido hematopoiético (*) no baço de *Diplodus sargus*, grupo infectado (400x).

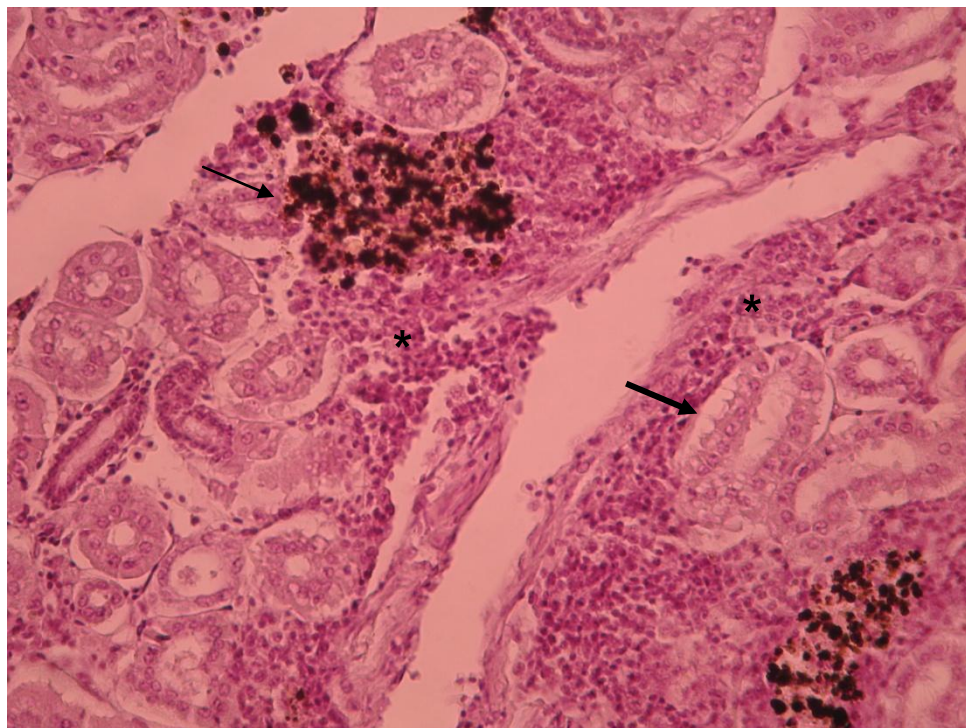


Figura 3.9 – Melanomacrófagos (seta estreita) e túbulo proximal (seta larga) rodeados por tecido hematopoiético (*) no rim de *Diplodus sargus*, grupo controlo (400x).

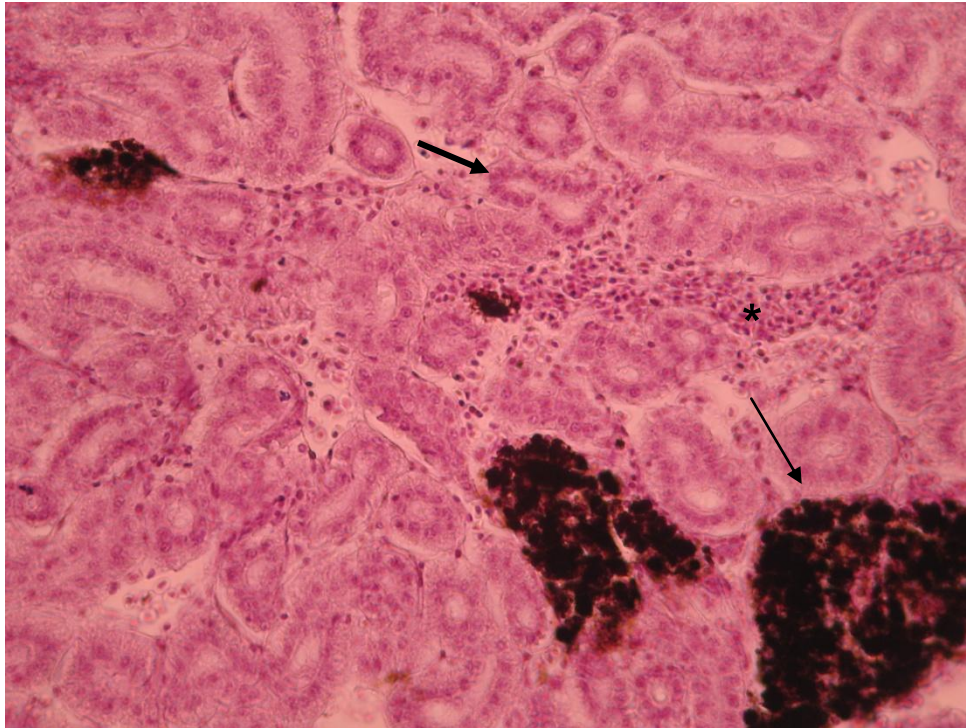


Figura 3.10 - Melanomacrófagos (seta estreita), túbulo proximal (seta larga), células inflamatórias (*) no rim de *Diplodus sargus*, grupo infectado (400x).

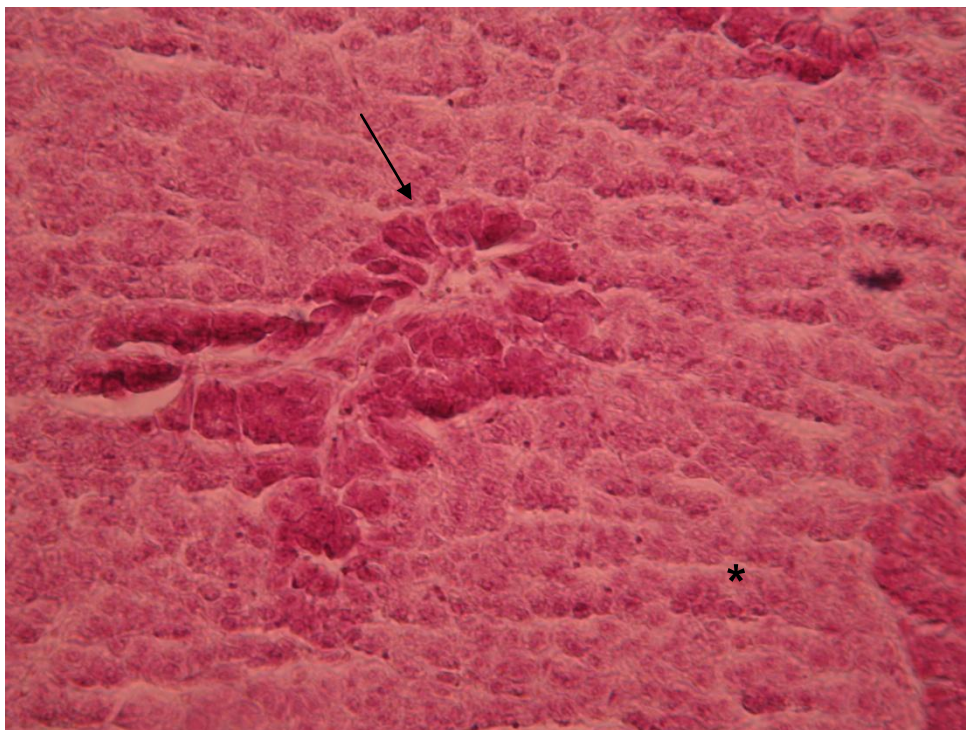


Figura 3.11 – Vaso sanguíneo (seta). Hepatócitos (*) no fígado de *Diplodus sargus*, grupo controlo (400x).

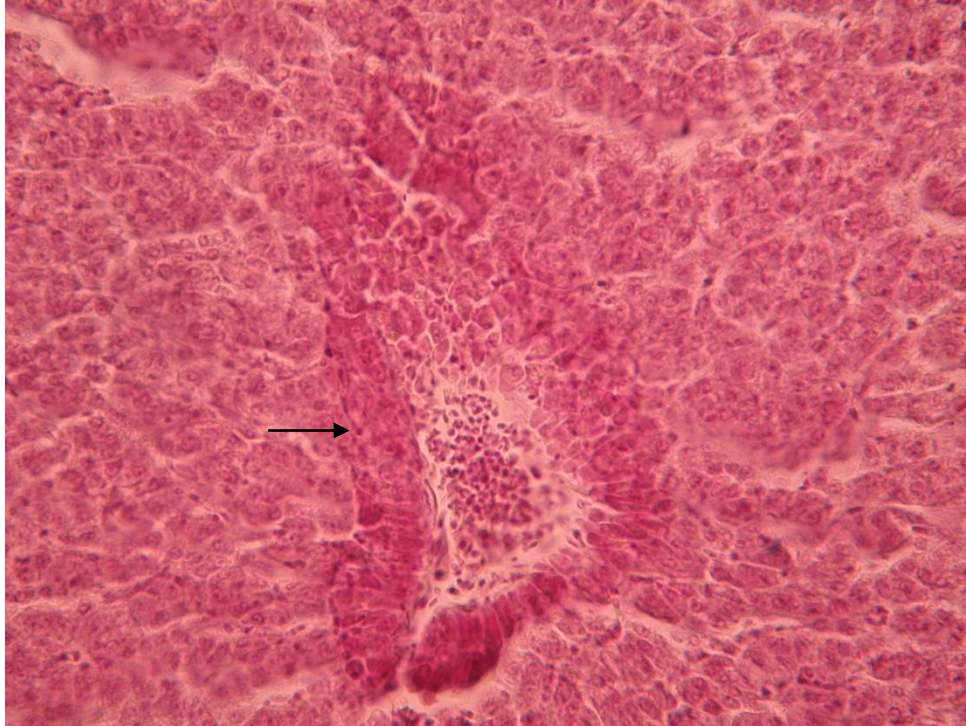


Figura 3.12 - Vaso sanguíneo (seta). Hepatócitos (*) no fígado *Diplodus sargus*, grupo infectado (400x).

3.2.1.2 - Hematoxilina-Gram

O baço e o rim de sargo mostram a presença de tecido hematopoiético e de melanomacrófagos no grupo controlo e no grupo infectado (figuras 3.13 a 3.16). Todavia no grupo infectado os melanomacrófagos eram mais densos (figuras 3.16 e 3.14).

No fígado observaram-se hepatócitos no grupo controlo (figura 3.17) e vasos sanguíneos e hepatócitos no grupo infectado (figuras 3.18).

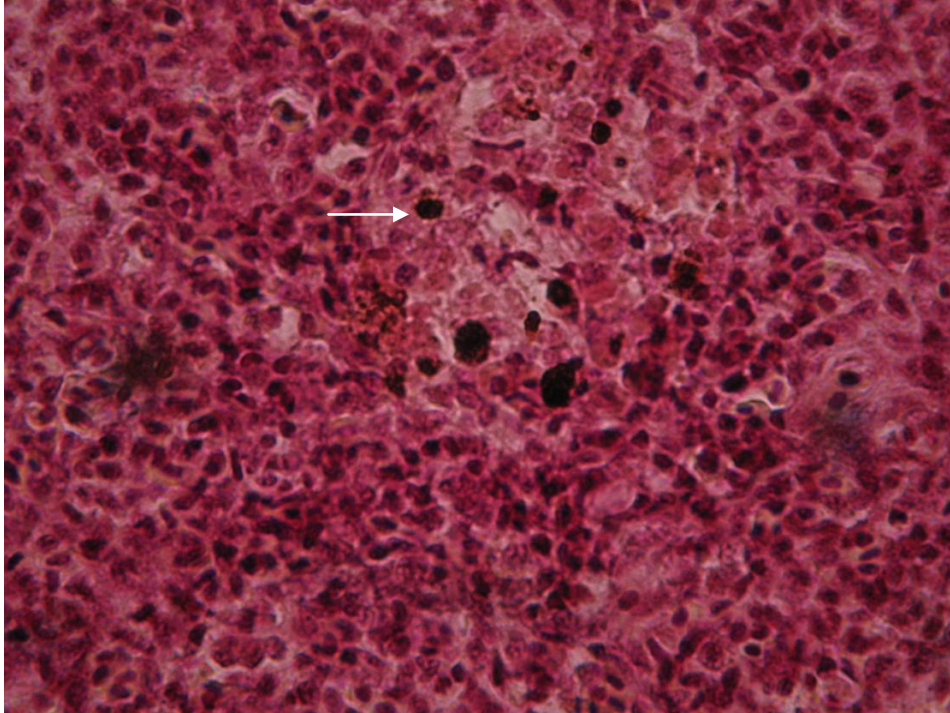


Figura 3.13- Melanomacrófagos (seta) no baço de *Diplodus sargus*, grupo controlo (1000x).

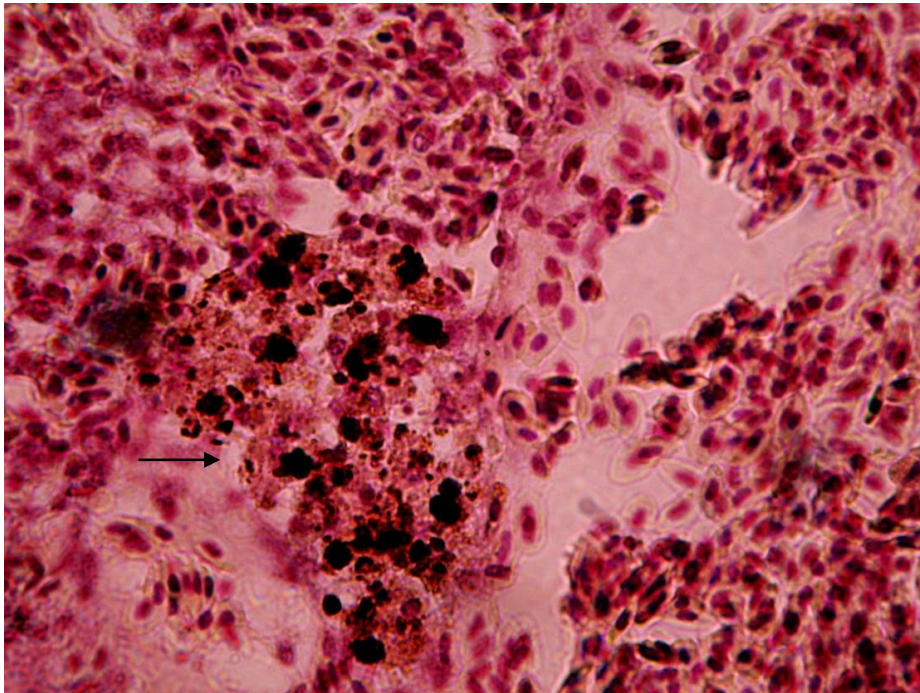


Figura 3.14 – Melanomacrófagos (seta) no baço de *Diplodus sargus*, grupo infectado (1000x).

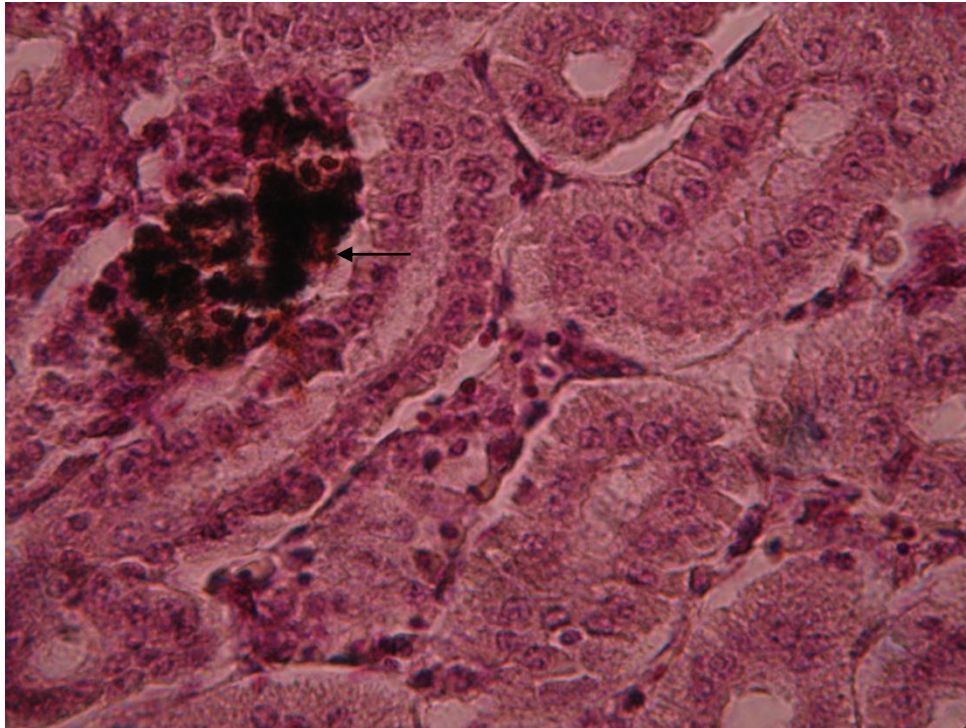


Figura 3.15 – Melanomacrófagos (seta) no rim de *Diplodus sargus*, grupo controlo (1000x).

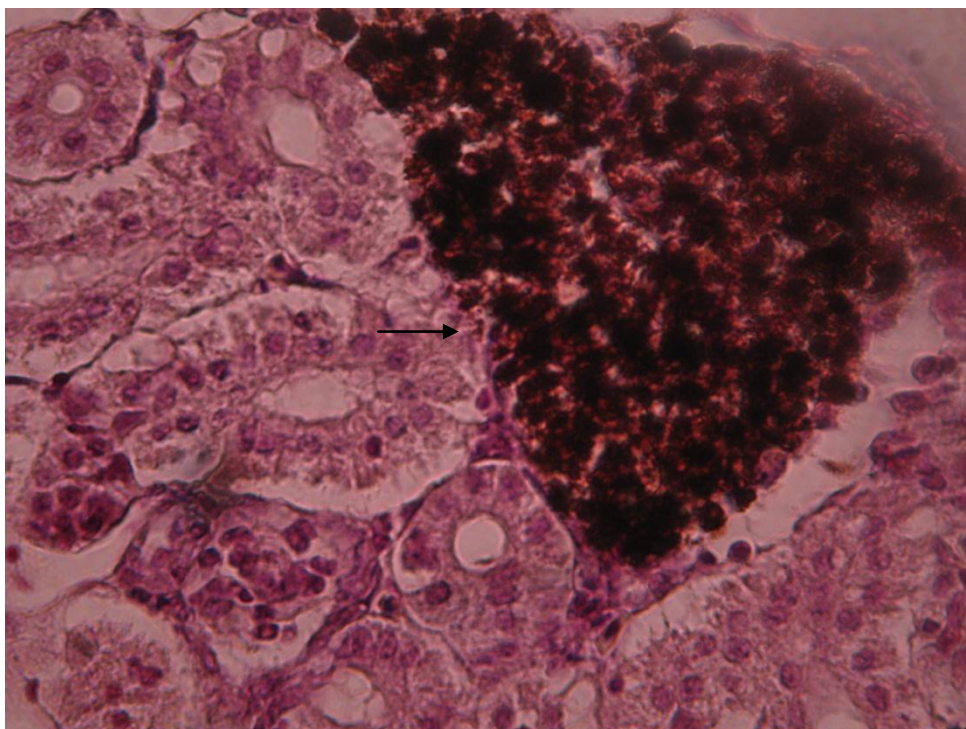


Figura 3.16 – Melanomacrófagos (seta) no rim de *Diplodus sargus*, grupo infectado (1000x).

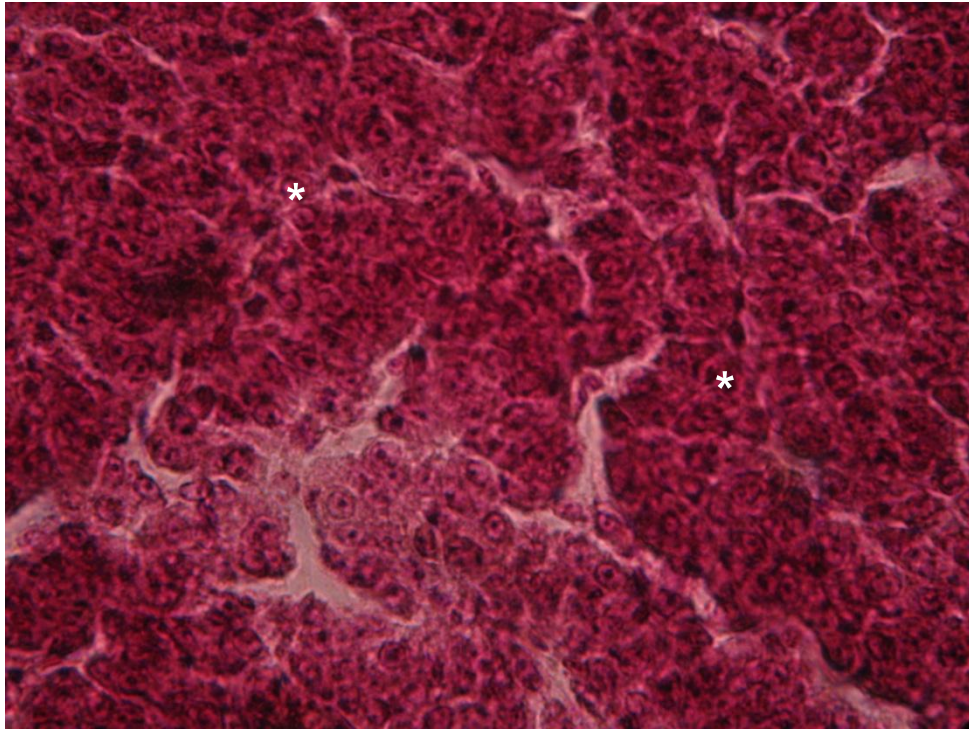


Figura 3.17 - Hepatócitos (*) no fígado de *Diplodus sargus*, grupo controlo (1000x).

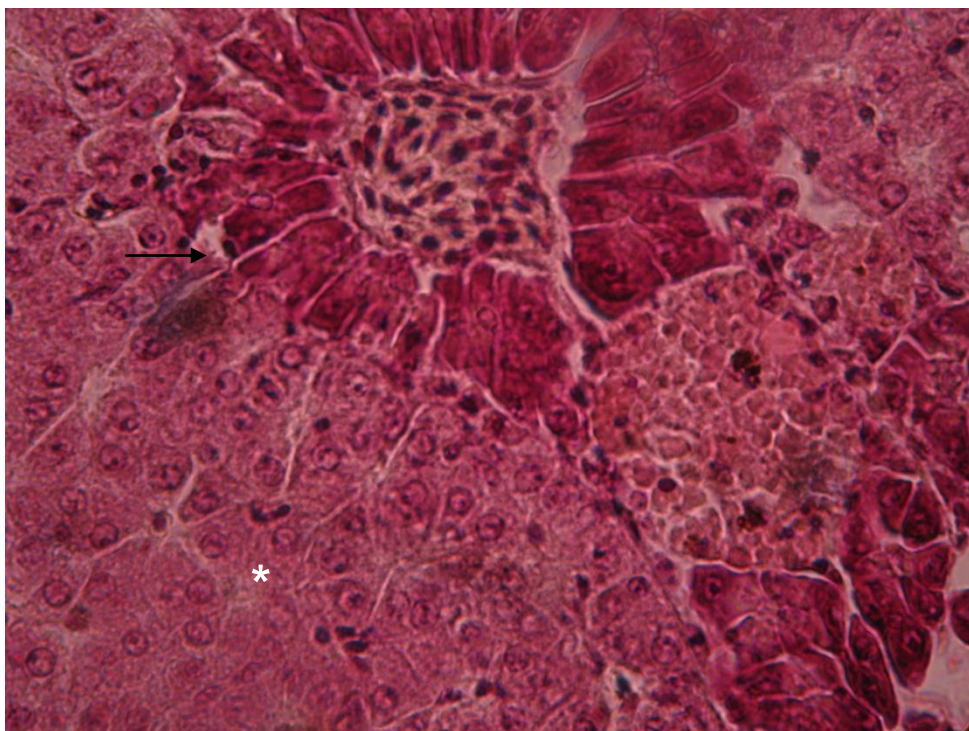


Figura 3.18 – Vaso sanguíneo (seta) e hepatócitos (*) no fígado de *Diplodus sargus*, grupo infectado (1000x).

3.2.2 - Corvivas

3.2.2.1- Hematoxilina-Eosina

A observação das preparações do baço de corvina mostrou o tecido hematopoiético e melanomacrófagos em ambos os grupos. Contudo no grupo infectado os melanomacrófagos estavam presentes em maior número e eram mais densos (figura 3.19 e 3.20).

No fígado observaram-se vasos sanguíneos e hepatócitos (figuras 3.21 e 3.21).

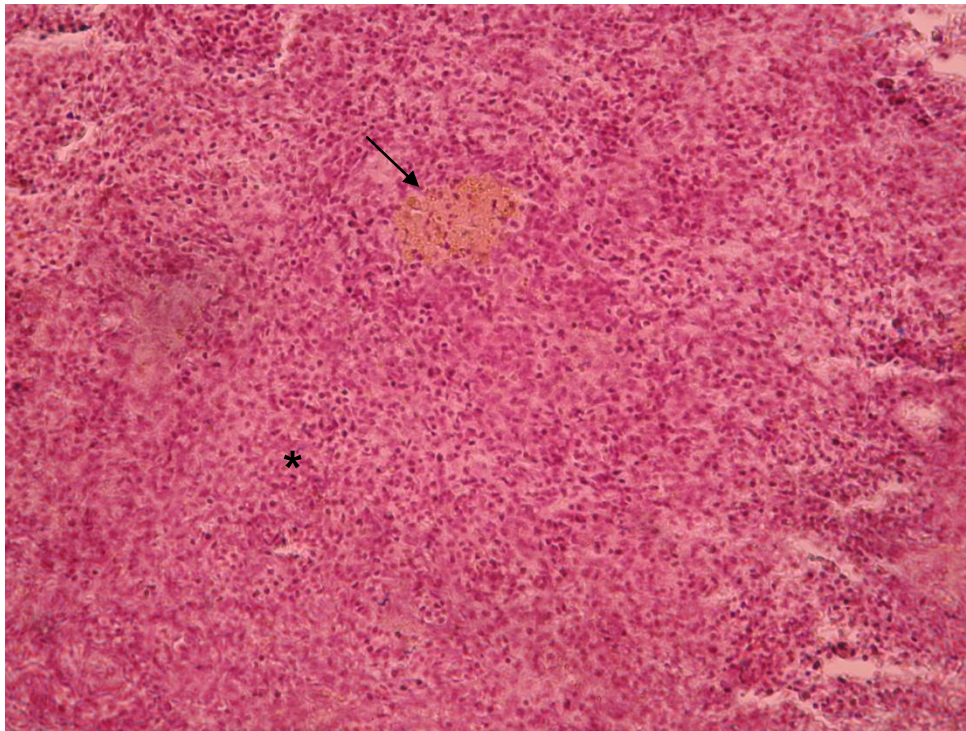


Figura 3.19 - Melanomacrófagos (seta). Tecido hematopoiético (*). Baço de *Argyrosomus regius*, grupo controle (400x).

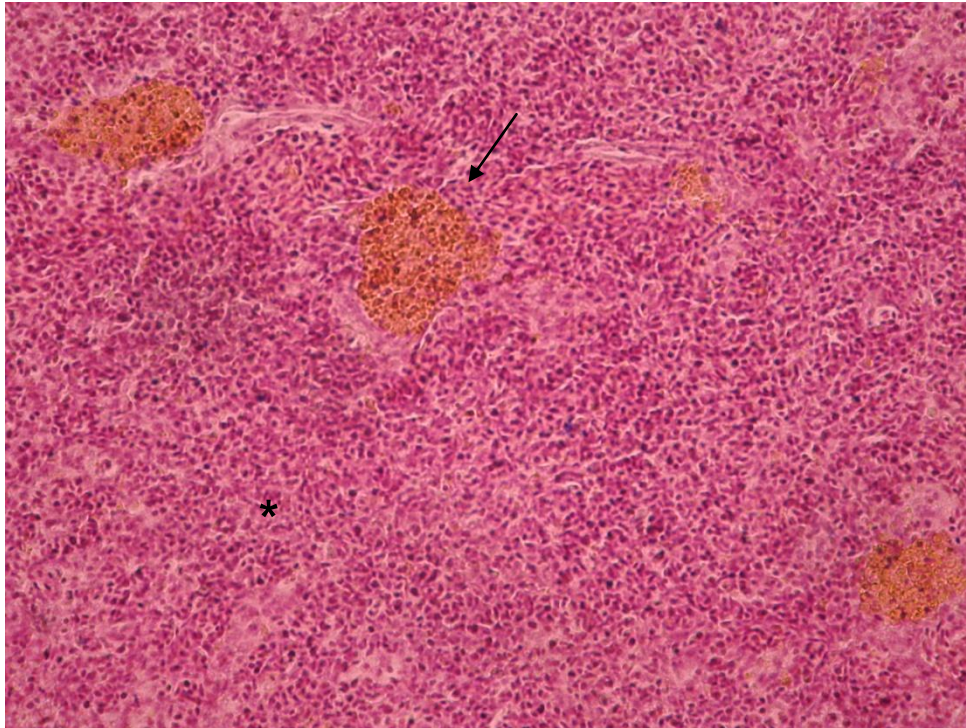


Figura 3.20 – Melanomacrófagos (seta). Tecido hematopoiético (*). Baço de *Argyrosomus regius*, grupo infectado (400x).

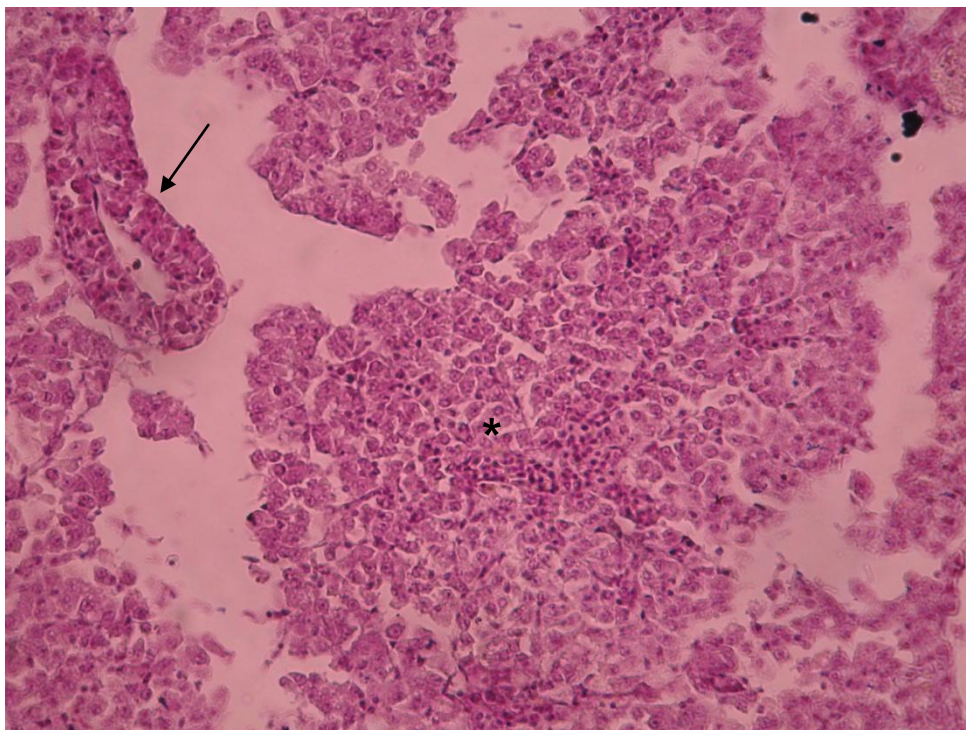


Figura 3.21 - Vaso sanguíneo (seta). Hepatócitos (*). Fígado de *Argyrosomus regius*, grupo control (400x).

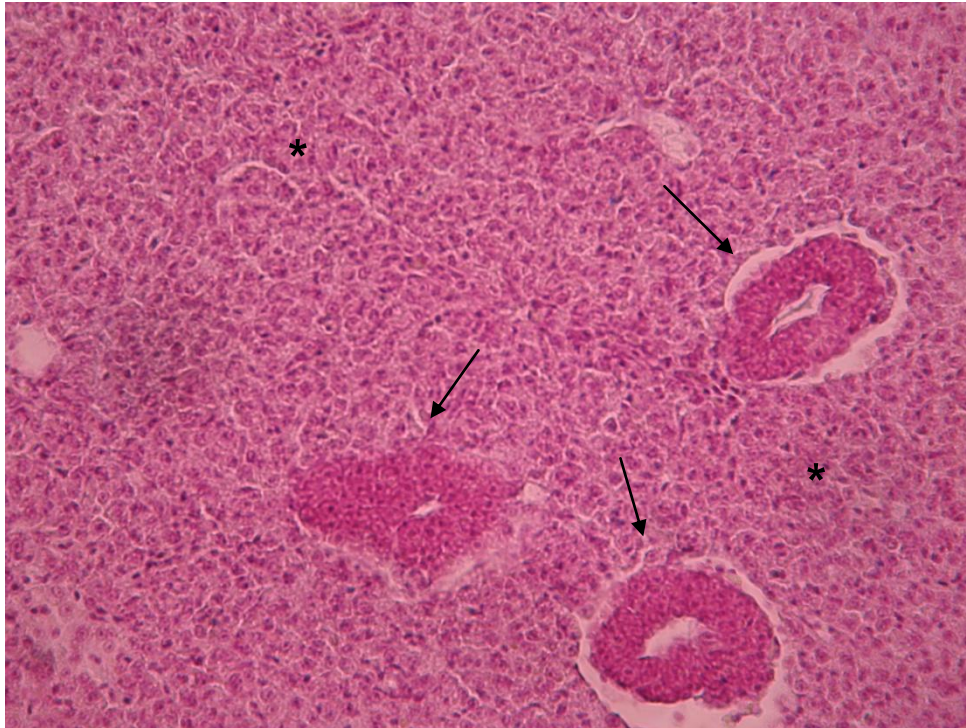


Figura 3.22 - Vasos sanguíneos (seta). Hepatócitos (*). Fígado de *Argyrosomus regius*, grupo infectado (400x).

3.2.2.2- Hematoxilina-Gram

O baço de corvina mostrou a presença de tecido hematopoiético e de melanomacrófagos no grupo controle e no grupo infectado (figuras 3.23 e 3.24). Porém no grupo infectado os melanomacrófagos eram mais densos.

No fígado observaram-se vasos sanguíneos e hepatócitos no grupo controle (figura 3.25) e hepatócitos no grupo infectado (figura 3.26).

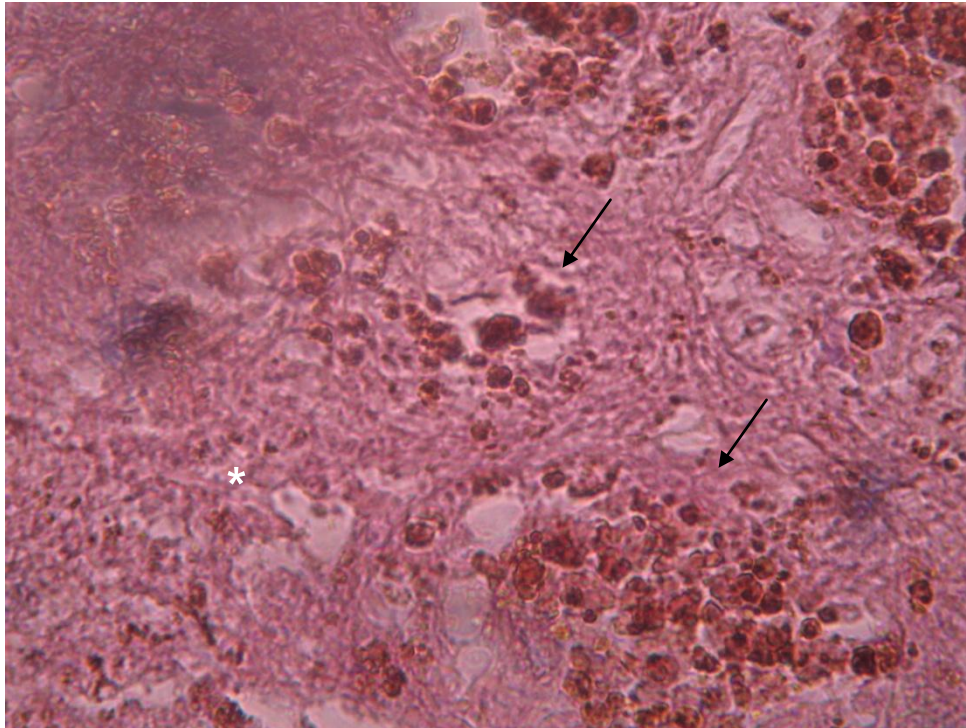


Figura 3.23 - Melanomacrófagos (seta). Tecido hematopoiético (*). Baço de *Argyrosomus regius*, grupo controle (1000x).

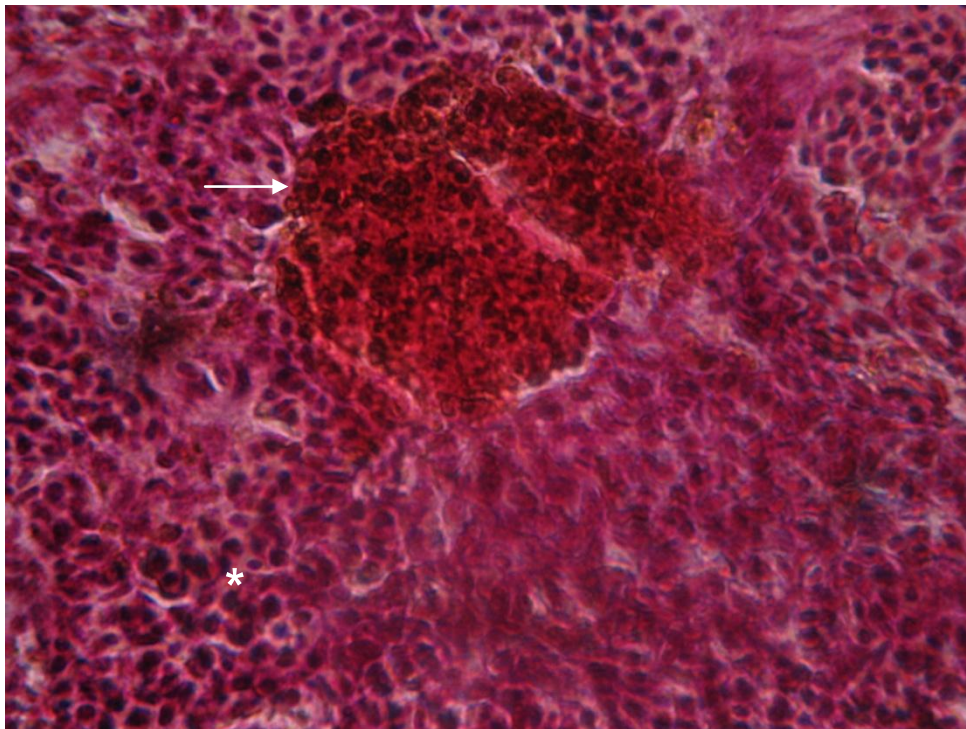


Figura 3.24 – Melanomacrófagos (seta). Tecido hematopoiético (*). Baço de *Argyrosomus regius*, grupo infectado (1000x).

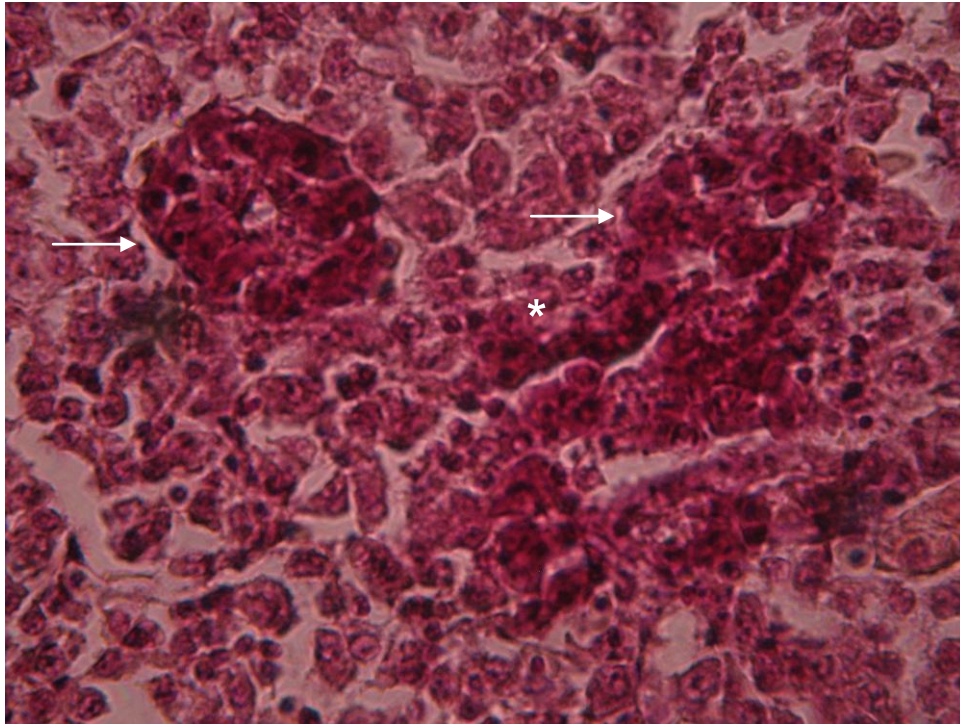


Figura 3.25 - Vasos sanguíneos (seta). Hepatócitos (*). Fígado de *Argyrosomus regius*, grupo control (1000x).

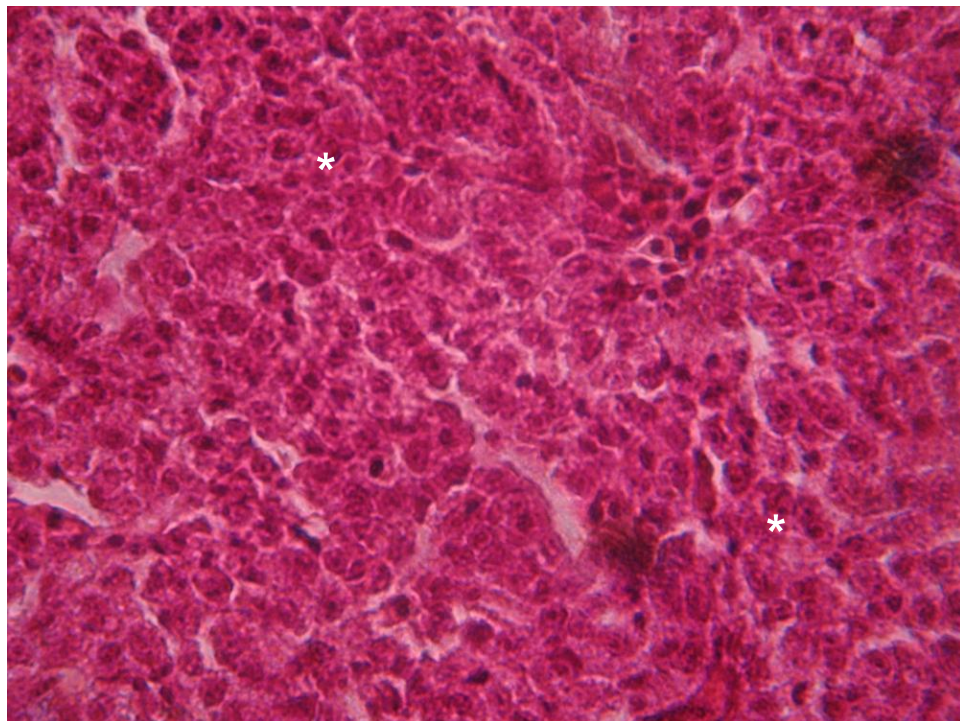


Figura 3.26 - Hepatócitos (*). Fígado de *Argyrosomus regius*, grupo infectado (1000x).

3.3. PCR

Os resultados da amplificação de ADN produzida pelo PCR era a obtenção de um fragmento com 267 pares de bases. Um fragmento com este tamanho não foi observado para nenhuma das amostras das duas espécies estudadas (figuras 3.27 e 3.28). No entanto, a olho nu, foi possível detectar a presença da banda na amostra 32 (Corvinas Infectado Baço Fragmento 1 – Tabela 3.3).

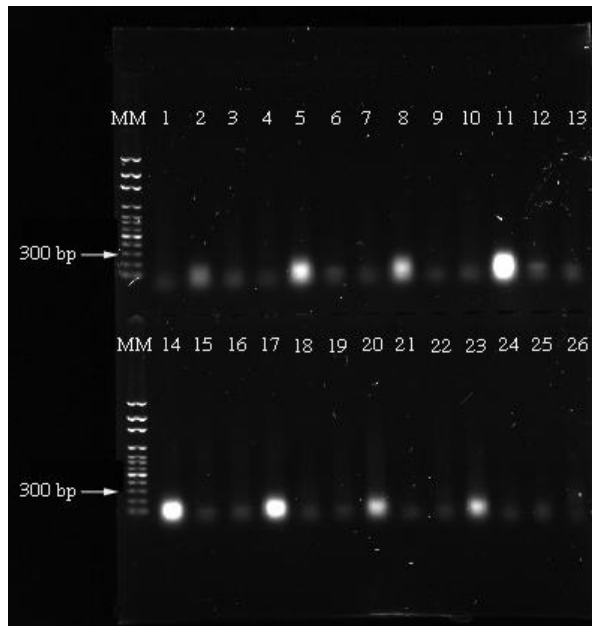


Figura 3.27 – Electroforese em gel de agarose do produto de amplificação por PCR identificativa de *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* das amostras de tecidos 1 a 26.

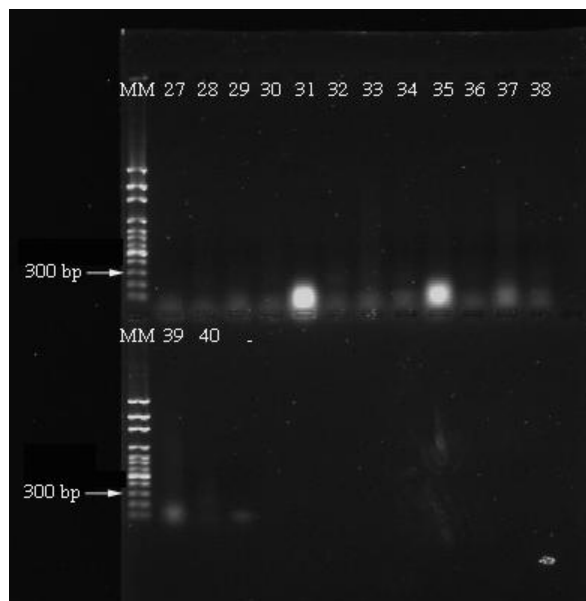


Figura 3.28 – Electroforese em gel de agarose do produto de amplificação por PCR identificativa de *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* das amostras de tecidos 27 a 40.

Tabela 3.3 - Identificação das amostras utilizadas no PCR.

Amostra	Código	Referência	Peso do órgão analisado (g)
1	SCR1	Sargo Controlo Rim Fragmento 1	19,0
2	SCF1	Sargo Controlo Fígado Fragmento 2	15,2
3	SCB1	Sargo Controlo Baço Fragmento 3	23,2
4	SCR2	Sargo Controlo Rim Fragmento 2	27,5
5	SCF2	Sargo Controlo Fígado Fragmento 2	13,7
6	SCB2	Sargo Controlo Baço Fragmento 2	16,3
7	SCR3	Sargo Controlo Rim Fragmento 3	21,7
8	SCF3	Sargo Controlo Fígado Fragmento 3	16,6
9	SCB3	Sargo Controlo Baço Fragmento 3	13,2
10	SIR1	Sargo Infectado Rim Fragmento 1	28,1
11	SIF1	Sargo Infectado Fígado Fragmento 1	27,7
12	SIB1	Sargo Infectado Baço Fragmento 1	18,5
13	SIR2	Sargo Infectado Rim Fragmento 2	22,3
14	SIF2	Sargo Infectado Fígado Fragmento 2	18,7
15	SIB2	Sargo Infectado Baço Fragmento 2	24,4
16	SIR3	Sargo Infectado Rim Fragmento 3	33,4
17	SIF3	Sargo Infectado Fígado Fragmento 3	24,0
18	SIB3	Sargo Infectado Baço Fragmento 3	27,1
19	SIR4	Sargo Infectado Rim Fragmento 4	19,3
20	SIF4	Sargo Infectado Fígado Fragmento 4	14,9
21	SIB4	Sargo Infectado Baço Fragmento 4	26,4
22	SIR5	Sargo Infectado Rim Fragmento 5	26,1
23	SIF5	Sargo Infectado Fígado Fragmento 5	18,4
24	SIB5	Sargo Infectado Baço Fragmento 5	23,2
25	CCF1	Corvina Controlo Fígado Fragmento 1	27,9
26	CCB1	Corvina Controlo Baço Fragmento 1	5,1
27	CCF2	Corvina Controlo Fígado Fragmento 2	16,1
28	CCB2	Corvina Controlo Baço Fragmento 2	6,8
29	CCF3	Corvina Controlo Fígado Fragmento 3	20,0
30	CCB3	Corvina Controlo Baço Fragmento 3	4,2
31	CIF1	Corvina Infectado Fígado Fragmento 1	22,8
32	CIB1	Corvina Infectado Baço Fragmento 1	13,2
33	CIF2	Corvina Infectado Fígado Fragmento 2	22,6
34	CIB2	Corvina Infectado Baço Fragmento 2	17,4
35	CIF3	Corvina Infectado Fígado Fragmento 3	22,3
36	CIB3	Corvina Infectado Baço Fragmento 3	8,2
37	CIF4	Corvina Infectado Fígado Fragmento 4	27,5
38	CIB4	Corvina Infectado Baço Fragmento 4	7,3
39	CIF5	Corvina Infectado Fígado Fragmento 5	31,1
40	CIB5	Corvina Infectado Baço Fragmento 5	9,0

4. Discussão

O futuro económico da aquacultura passa pela diversificação das espécies produzidas em busca de novos mercados e de satisfazer um número cada vez maior de consumidores. O sargo e a corvina são espécies “novas” para a aquacultura e a sua introdução é devida ao seu elevado valor económico (Rigos *et al.*, 2010). Um dos grandes problemas para a aquacultura marinha mediterrânica são os surtos de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, sendo esta responsável por elevada mortalidade e perdas económicas consideráveis em espécies como a dourada (*Sparus aurata*) e o robalo (*Dicentrarchus labrax*), (Toranzo *et al.*, 1991; Bakopoulos *et al.*, 1995; Baptista *et al.*, 1996; Candan *et al.*, 1996). Assim, é relevante estudar a possível infecção capacidade de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* infectar as espécies *Diplodus sargus* e *Argyrosomus regius* e estudar as eventuais alterações a nível histopatológico e confirmar a presença da bactéria nos órgãos.

O sangue dos peixes é um tecido especializado composto por eritrócitos, leucócitos e plaquetas. A quantidade de eritrócitos no sangue depende da espécie, da idade da estação do ano e das condições ambientais (Genten *et al.*, 2009). O hematócrito expressa a percentagem de eritrócitos no volume total de sangue (Ziskowski *et al.*, 2008). Diminuição dos valores de hematócrito está associada a situações como perda de sangue, stress, anemia e exposição a metais pesados. A anemia pode ser causada por vários factores tais como: aumento do volume do plasma sanguíneo, hemorragias, destruição de eritrócitos, diminuição na produção de eritrócitos, infecções e alimentação insuficiente (Ziskowski *et al.*, 2008; Acerete *et al.*, 2009). A exposição ao agente infeccioso *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, pode estar associada às diferenças significativas observadas para *Diplodus sargus* entre os grupos de controlo e de infecção. Uma vez que factores como o stress foram bastante diminuídos com a aclimação dos animais ao circuito experimental durante oito dias prévios ao início da experiência e a alimentação foi administrada como usualmente e com a ração apropriada para a espécie. Os valores de hematócrito, para espécie *Argyrosomus regius*, em média não apresentaram diferenças, contudo, no dia 15 verificam-se diferenças o que pode estar associado a uma possível recuperação dos animais.

Os macrófagos são os primeiros agentes fagocitários a responder quando as barreiras exteriores são ultrapassadas por organismos invasores (Afonso *et al.*, 1998). Estas células formam agregados, centros melanomacrófagos, no baço, rim e por vezes no fígado, possuem pigmentos como a melanina que lhe confere cor preta ou outros

pigmentos que lhe conferem um tom dourado ou rosa pálido. A melanina presente nos melanomacrófagos pode expulsar radicais livres produzidos pelo invasor e assim proteger os tecidos do hospedeiro de futuros danos (Ferguson, 2006; Genten *et al.*, 2009).

Histopatologicamente observou-se a presença de centros melanomacrófagos nos tecidos do baço e rim dos sargos quer no grupo controlo quer no grupo infectado. Nas corvinas apenas o baço apresentava melanomacrófagos nos dois grupos estudados. Os melanomacrófagos estão naturalmente presentes nos tecidos prontos para uma resposta imunitária (Afonso *et al.*, 1998). Contudo, em ambas as espécies o grupo infectado apresentava melanomacrófagos em maior número e mais densos, o que pode indicar uma infecção pelo patógeno *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* uma vez que o aumento dos centros melanomacrófagos nos tecidos hematopoiéticos é uma característica da resposta inflamatória (Ferguson, 2006).

Durante os ensaios com *Diplodus sargus* e *Argyrosomus regius* não ocorreu mortalidade. Este facto pode dever-se ao tamanho dos indivíduos e à presença de menos factores de stress que num sistema de produção.

Pestana (2008) determinou que *Diplodus sargus* com comprimento total entre 2,50 – 5,10 cm e peso entre 0,26 – 2,54 g são sensíveis à *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida*. Sabe-se que douradas com tamanho superior a 50 g são resistentes à *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* (Magariños *et al.*, 1996a) e apresentando os sargos um peso compreendido entre 61 – 120g a possibilidade destes serem resistentes à bactéria é elevada.

A produção de corvina em Tenerife e Canárias, em 2008, foi seriamente atingida por surtos de *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* provocando até 50% de mortalidade. O agente etiológico foi isolado em animais com peso compreendido entre 7,2 -15 g, demonstrando a susceptibilidade da corvina à *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* (Costa, J. Z. comentário pessoal). Tendo as corvinas peso entre 20 e 27 g e sem ocorrência de mortalidade supõe-se já não serão tão susceptíveis a uma infecção pelo patógeno.

Não foi possível detectar a presença de *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* nos órgãos analisados por PCR. Apenas foi possível detectar, a olho nú, a presença da banda indicativa da *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida*, com 267 pares de bases, na amostra 32. Para confirmar esta observação seria necessário repetir

com mais amostras ou até mesmo adaptar o protocolo de PCR pois Osório *et al.*, (2000) desenvolveu o protocolo utilizado para um isolado distinto e, talvez seja preciso adaptar este protocolo ao isolado de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, DSM 22834.

5. Considerações finais

Os resultados apresentados sobre a possibilidade de infecção do *Diplodus sargus* e *Argyrosomus regius* com *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, sugerem uma necessidade de repetir o ensaio com peixes de menor tamanho, realizar imunohistoquímica assim como ELISA.

Estudar quais as vias de entrada da bactéria nos hospedeiro é também uma mais valia para se perceber como se pode combater a infecção e minimizar as perdas provocadas pela *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

6. Referências bibliográficas

- 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.
- Acosta, F., Real, F., Ruiz de Galarreta, C. M., Díaz, R., Padilha, D., Ellis, A. E. 2003. Toxicity of nitric oxide and peroxy-nitrite to *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Fish & Shellfish Immunology*. 15:241-248.
- Afonso, A., Lousada, S., Silva, J., Ellis, A. E., Silva, M. T. 1998. Neutrophil and macrophage responses to inflammation in the peritoneal cavity of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A light and electron microscopic cytochemical study. *Dis Aquat Org*. 34:27-37.
- Austin, B. e Austin, D. A. 1989. Bacterial fish pathogen: disease in farmed and wild fish. Ellis Horwood, Ltd., U.K., 363 p.
- Bakopoulos, V., Adams, A., Richards, R. H. 1995. Some biochemical properties and antibiotic sensitivities of *Pasteurella piscicida* isolated in Greece and comparison with strains from Japan, France and Italy. *Journal of Fish Diseases*. 18: 1-7.
- Bakopoulos, V., Volpatti, D., Papapanagiotou, E., Richards, R., Galleotti, M., Adams, A. 1997. Development of an ELISA to detect *Pasteurella piscicida* in culture and 'spiked' fish tissue. *Aquaculture*, 156: 359-366.
- Baptista, T., Romalde, J. L., Toranzo, A. E. 1996. First occurrence of Pasteurellosis in Portugal Affecting Cultured Gilthead Seabream (*Sparus aurata*). *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 16 (3): 92-95.
- Candan, A., Ang Kucker, M., Karatas, S. 1996. Pasteurellosis in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in Turkey. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 16 (5): 150-152.
- FAO - Food and Agriculture Organization, 2010. The State of World Fisheries and Aquaculture. Rome.
- Ferguson, H.W. 2006. Systemic Pathology of Fish: a text and atlas of normal tissues in teleosts and their responses in disease. 2nd edition. Scotian Press. UK.
- Gauthier, G., Lafay, B., Ruimy, R., Breitmayer, V., Nicolas, J. L., Gauthier, M., Christen R. 1995. Small-subunit rRNA sequences and whole DNA relatedness concur for the reassignment of *Pasteurella piscicida* (Snieszko *et al.*) Janssen and Surgalla to the genus *Photobacterium* as *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, Vol. 45, No. 1, p 139-144.
- Genten, F., Terwingle, E., Danguy, A. 2009. Atlas of Fish Histology. Science Publishers. EUA.
- Guerreiro, I., Vareilles, M., Pousão-Ferreira, P., Rodrigues, V., Dinis, M. T., Ribeiro, L. 2010. Effect of age-at-weaning on digestive capacity of white seabream (*Diplodus sargus*). *Aquaculture*. 300:194-205.

- Janssen, W. A., Surgalla, M. J. 1968. Morphology, physiology, and serology of a *Pasteurella* species pathogenic for white perch (*Roccus americanus*). *J. Bacteriol.*, 96 (5): 1606-1610.
- Kusuda, R., Kawai, K. 1998. Bacterial diseases of cultural marine fish in Japan. *Fish Pathol.*, 33: 221-227.
- Liu, P., Yang, J., Lee, K. 2003. Virulence of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in cultured cobis *Rachycentron canadum*. *J. Basic Microbiol.* 43 (6):499-507.
- Magariños, B., Romalde, J. L., Bandín, I., Fouz, B., Toranzo, A. E. 1992. Phenotypic, antigenic, and molecular characterization of *Pasteurella piscicida* strains isolated from fish. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 3316-3322.
- Magariños, B., Pazos, F., Santos, Y., Romalde, J. L., Toranzo, A.E. 1995. Response of *Pasteurella piscicida* and *Flexibacter maritimus* to skin mucus of marine fish. *Dis. Aquat. Org.*. 21: 103-108.
- Magariños, B., Toranzo, A. E., Romalde, J. L. 1996a. Phenotypic and pathobiological characteristics of *Pasteurella piscicida*. *Annu. Rev. Fish Dis.*, Vol. 6, pp. 41-64.
- Magariños, B., Bonet, R., Romalde, J. L., Martínez, M. J., Congregado, F., Toranzo, A. E. 1996b. Influence of capsular layer on the virulence of *Pasteurella piscicida* for fish. *Microbial Pathogenesis*, 21: 289-297.
- Magariños, B., Couso, N., Noya, M., Merino, P., Toranzo, A. E., Lamas, J. 2001. Effect of temperature on the development of pasteurellosis in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*. 195: 17-21.
- Matushima, E.R., Rego, A. Guia prático de necropsia em peixes. Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica da Universidade de São Paulo.
- Mladineo, I., Miletic, I., Bocina, I. 2006. *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* outbreak in cage-reared Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus*. *Journal of Aquatic Animal Health* 18:51-54.
- Nagano, I., Inoue, S., Kawai, K., Oshima, S. 2009. Repeatable immersion infection with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* reproducing clinical signs and moderate mortality. *Fish Sci.* 75:707-714.
- Naka, H., Hirono, I., Kurokawa, K., Aoki, T. 2005. Random sequencing of genomic DNA of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Fisheries Science*. 71:1209-1216.
- Nitzan, S., Shwartsburd, B., Heller, E.D. 2004. The effect of growth medium salinity of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* on the immune response of hybrid bass (*Morone saxatilis* x *M. chrysops*). *Fish & Shellfish Immunology*. 16: 107-116.
- Noga, E. J. 2010. *Fish Disease: Diagnosis and Treatment*. 2nd edition. Wiley-Blackwell. Iowa (EUA).

- Osorio, C. R., Toranzo, A. E., Romalde, J. L., Barja, J. L. 2000. Multiplex PCR assay for *ureC* and 16s *rRNA* genes clearly discriminates between both subspecies of *Photobacterium damsela*. *Dis Aquat Org.* 40:177-183.
- Pestana, R. 2002. Infecção experimental em juvenis de *Diplodus sargus* (Linnaeus, 1758) com *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* e efeito de uma vacina comercial. Relatório de estágio do curso de Licenciatura em Biologia Marinha e Pescas. Faculdade de Ciências do Mar e do Ambiente. Universidade do Algarve.
- Rajan, P. R., Lin, J.H.-Y., Ho, M. -S., Yang, H. -L. 2003. Simple and rapid detection of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* by a PCR technique and plating method. *Journal of Applied Microbiology.* 95: 1375-1380.
- Rigos, G., Katharios, P. 2010. Pathological obstacles of newly-introduced fish species in Mediterranean mariculture: a review. *Fish Biol Fisheries.* 20:47-70.
- Romalde, J. L., Magariños, B., Toranzo, A. E. 1999. Pasteurellosis. ICES Leaf et nº 54. International Council for the Exploration of the sea.
- Romalde, J. L. 2002. *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: an integrated view of a bacterial fish pathogen. *Int Microbiol.* 5: 3-9.
- Snieszko, S. F., Bullock, G. L., Hollis E., Boone, J. G. 1964. *Pasteurella* sp. from an epizootic of white perch (*Roccus americanus*) in Chesapeake Bay tidewater areas. *J. Bacteriol.*, 88: 1814-1815.
- Toranzo, A. E., Barreiro, S., Casal, J. F., Figueras, A., Magariños B., Barja, J. L. 1991. Pasteurellosis in cultured gilthead seabream (*Sparus aurata*): first report in Spain. *Aquaculture*, 99: 1-15.
- Toranzo, A. E., Magariños, B., Romalde, L. 2005. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture.* 246: 37-61.
- Trüper H. G., De'Clari L. 1997. Taxonomic note: necessary correction of epithets formed as substantives (nouns) "in apposition". *Int J Syst Bacteriol* 47:908–909.
- Valle, L. D., Zanella, L., Belvedere, P., Colombo, L. 2002. Use of random amplification to develop a PCR detection method for the causative agent of fish pasteurellosis, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Vibrionaceae). *Aquaculture* 207: 187-202.
- Woo, P. T.K., Bruno, D. W., Lim, L. H. S. 2002. Diseases and disorders of finfish in cage culture. CABI Publishing. New York. p 201.
- Zar, J.H. 2010. Biostatistical Analysis. 5th ed. Pearson Education, Inc. New Jersey. p 99.
- Ziskowski, J., Mercaldo-Allen, R., Pereira, J.J., Kuropat, C., Goldberg R. 2008. The effects of fin rot disease and sampling method on blood chemistry and hematocrit measurements of winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus* from New Haven Harbor (1987–1990). *Marine Pollution Bulletin* 56: 740– 750.

7. Anexos

Anexo I – Processamento de tecidos

Os tecidos são inseridos em cestos devidamente identificados e colocados no primeiro recipiente de álcool do processador de tecidos (Leica TP 1020).

O programa desidratação dos tecidos de peixes utilizado:

- | | |
|--------------------------|----------|
| • álcool 50% | 6 horas |
| • álcool 70% | 6 horas |
| • álcool 85% | 6 horas |
| • álcool 100% | 6 horas |
| • álcool 100% | 6 horas |
| • xilol I | 3 horas |
| • xilol II | 3 horas |
| • xilol + parafina (1:1) | 12 horas |
| • parafina | 18 horas |

Os tecidos são impregnados em parafina (Leica EG 1120, 58 – 62°C) e solidificados numa placa fria (Kunz Instruments CP-4).

Anexo II - Cortes histológicos

Os cortes histológicos são executados com o micrótomo (Sakura Accu – cut SRM 200). Depois são colocados cuidadosamente com uma pinça e uma agulha de dissecação numa lâmina com uma gota de água. Quando o corte está esticado e seco a lâmina é colocada numa estufa a 37°C.

Anexo III – Coloração (Matushima *et al.*)

Coloração Hematoxilina – Eosina

O processo requer duas etapas:

- Desparafinação e hidratação
 - histolemon 5 minutos
 - histolemon 5 minutos
 - álcool a 100% 5 minutos
 - álcool a 100% 5 minutos
 - álcool a 85% 5 minutos
 - álcool a 70% 5 minutos
 - álcool a 50% 5 minutos
 - água destilada 5 minutos
 - hematoxilina de Harris 5 minutos
 - eosina 3 minutos

- Desidratação
 - álcool a 70% 1 minuto
 - álcool a 85% 1 minuto
 - álcool a 100% 1 minuto
 - álcool a 100% 1 minuto
 - histolemon 5 minutos
 - histolemon 5 minutos

Após a coloração segue-se um período de secagem.

Coloração Hematoxilina - Gram

Desparafinação e hidratação:

- histolemon 5 minutos
 - histolemon 5 minutos
 - álcool a 100% 5 minutos
 - álcool a 100% 5 minutos
 - álcool a 85% 5 minutos
 - álcool a 70% 5 minutos
 - álcool a 50% 5 minutos
 - água destilada 5 minutos
 - hematoxilina de Harris 5 minutos
 - Gram
-
- Desidratação
 - álcool a 70% 1 minuto
 - álcool a 85% 1 minuto
 - álcool a 100% 1 minuto
 - álcool a 100% 1 minuto
 - histolemon 5 minutos
 - histolemon 5 minutos

Após a coloração segue-se um período de secagem.