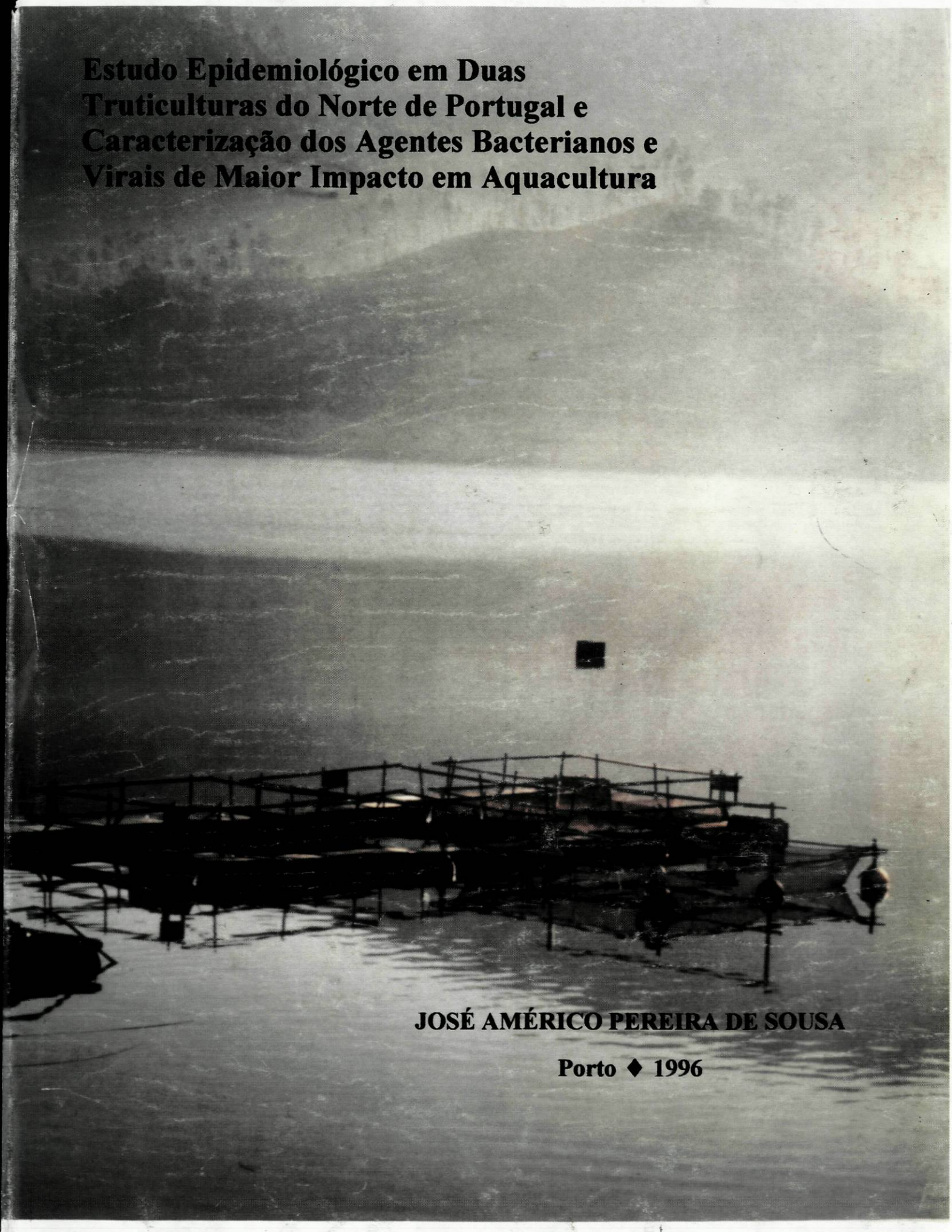
T Sec. D/52

Estudo Epidemiológico em Duas Truticulturas do Norte de Portugal e Caracterização dos Agentes Bacterianos e Virais de Maior Impacto em Aquacultura



JOSÉ AMÉRICO PEREIRA DE SOUSA

Porto ♦ 1996

RESUMO

Foi efectuado um estudo epidemiológico em duas truticulturas do norte de Portugal, o que permitiu concluír que, de um modo geral, os mesmos grupos bacterianos foram detectados nos órgãos internos dos peixes e nas amostras ambientais de água e sedimento, embora em quantidades relativas diferentes.

Uma parte importante deste estudo consistiu na pesquisa de bactérias e vírus causadores de doenças de peixes de declaração obrigatória, tendo sido detectadas as bactérias *Aeromonas salmonicida* e *Yersinia ruckeri* (serótipos O1 e O3) e o vírus da Necrose Pancreática Infecciosa (IPNV).

Estes isolamentos de *Y. ruckeri* e de IPNV foram os primeiros ocorridos em Portugal. As duas estirpes de IPNV constituem, ainda, o primeiro isolamento viral em unidades de aquacultura portuguesas.

O isolamento de estirpes do serótipo O3 de *Y. ruckeri* é particularmente significativo, pois ocorreu pela primeira vez fora da América do Norte. Também de grande significado é o isolamento de quatro estirpes do serótipo O1 imóveis e tween 80 negativas, anteriormente detectadas apenas no Reino Unido, Noruega e Alemanha.

RESUMEN

Se efectuó un estudio epidemiológico en dos piscifactorías del norte de Portugal, lo que permitió concluir que, en general, los grupos bacterianos detectados en los órganos internos de los peces y en las muestras ambientales de agua y sedimento fueron muy similares aunque en cantidades relativas diferentes.

Una parte importante de este estudio fue la búsqueda de bacterias y virus causantes de enfermedades de peces de declaración obligatoria, habiéndose detectado las bacterias *Aeromonas salmonicida* y *Yersinia ruckeri* (serotipos O1 y O3) y el virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV).

Estos aislamientos de *Y. ruckeri* y de IPNV fueron los primeros ocurridos en Portugal. Las dos cepas de IPNV constituyen, además, el primer aislamiento viral en unidades acuícolas portuguesas.

El aislamiento de cepas del serotipo O3 de *Y. ruckeri* es particularmente significativo, pues es la primera vez que se detecta este serotipo fuera de America del Norte. También es de gran importancia el aislamiento de cuatro cepas del serotipo O1 inmóviles y tween 80 negativas, únicamente detectadas hasta ahora en el Reino Unido, Noruega y Alemania.

UNIVERSIDADE DO PORTO

FACULDADE DE CIÊNCIAS

Estudo Epidemiológico em Duas Truticulturas do Norte de Portugal e Caracterização dos Agentes Bacterianos e Virais de Maior Impacto em Aquacultura

JOSÉ AMÉRICO PEREIRA DE SOUSA

PORTO ♦ 1996

JOSÉ AMÉRICO PEREIRA DE SOUSA

ASSISTENTE DA FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DO PORTO

Estudo Epidemiológico em Duas Truticulturas do Norte de Portugal e Caracterização dos Agentes Bacterianos e Virais de Maior Impacto em Aquacultura

Dissertação de Doutoramento em Biologia apresentada à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

UNIVERSIDADE DO PORTO
BIBLIOTECA
Sala
Coloc. IUP. 171
N.º 45562
FACULDADE DE CIÊNCIAS
NI-9364

PORTO ♦ 1996

À Fátima, à Ana Sofia e ao Pedro

Aos meus pais e ao meu irmão

AGRADECIMENTOS

Ao concluír este trabalho gostaria de expressar os meus sinceros agradecimentos às instituições e, sobretudo, às (muitas) pessoas que contribuiram para que ele seja uma realidade.

Ao Professor Doutor Jorge Guimarães da Costa Eiras, da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, o meu profundo reconhecimento por todo o empenho e dedicação que sempre colocou na orientação deste trabalho e pela disponibilidade com que sempre acompanhou a sua realização. Gostaria de acrescentar uma palavra de agradecimento, ainda, pelas facilidades concedidas como Director do Instituto de Zoologia "Dr. Augusto Nobre".

À Professora Doutora Alicia Estevez Toranzo, do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Faculdade de Biologia, Universidade de Santiago de Compostela (Espanha), pela disponibilidade em aceitar a co-orientação deste trabalho e por todo o interesse e dedicação com que sempre o fez. Gostaria de manifestar também o meu profundo reconhecimento pelo modo como sempre se mostrou disponível para me receber no seu Departamento, onde foi realizada uma parte muito significativa deste trabalho, e pela vontade que sempre manifestou de que eu me sentisse "em casa".

Ao Professor Doutor Jesús Lopez Romalde, do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Faculdade de Biologia, Universidade de Santiago de Compostela, pela acertada orientação de várias partes específicas deste trabalho, pelos valiosos conselhos e sugestões, e pela ajuda efectiva na realização de alguns dos trabalhos práticos, na interpretação de resultados e na obtenção de várias figuras. Ainda uma palavra de profundo reconhecimento pela leitura crítica do manuscrito e por todo o tempo e energias que dispendeu na resolução de inúmeras situações relacionadas com as minhas frequentes estadias no seu Departamento.

À Professora Doutora Maria Helena Galhano, gostaria de agradecer as facilidades concedidas durante o período em que foi Directora do Instituto de Zoologia "Dr. Augusto Nobre".

Ao Professor Doutor João Machado Cruz, da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, pelo apoio prestado ao longo destes anos.

À Comissão Científica do Grupo de Zoologia-Antropologia, pelas facilidades concedidas.

A todas as pessoas do Instituto de Zoologia "Dr. Augusto Nobre" que de algum modo contribuiram para a realização deste trabalho. Um agradecimento especial à Srª. Ilda Mateus, pela grande ajuda prestada durante o tratamento das amostras e pela preparação dos meios de cultura, e à Teresa, em particular pela realização de muitos dos antibiogramas. Gostaria ainda de agradecer em particular a ajuda recebida da Srª. Felisberta Machado e dos Srs. António Sá Pereira e José de Sá Pereira.

A todas as pessoas do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Faculdade de Biologia, Universidade de Santiago de Compostela, onde aprendi grande parte do que sei, agradeço a maneira simpática e solícita com que sempre me receberam e a disponibilidade que sempre manifestaram para ajudar a resolver os problemas que foram surgindo. Gostaria de agradecer de um modo especial ao Professor Doutor Juan Luis Barja e à Ysa Santos pelas palavras amigas e pelo encorajamento que me deram nos momentos mais difíceis e, também, pela ajuda na execução correcta de algumas técnicas. Um agradecimento especial também à Sol, com quem aprendi a identificar bactérias, à Bea, pela ajuda na extracção de DNA e na ribotipagem, e à Aurora, pela grande ajuda prestada no estudo viral.

Ao Engenheiro Peixoto Correia, do Centro Aquícola do Rio Ave, Vila do Conde, gostaria de agradecer as facilidades concedidas nas amostragens de peixes.

À empresa "Piscifactoria RIOBO", de A Estrada, Pontevedra (Espanha), agradeço a cedência dos peixes utilizados nos ensaios de patogenicidade.

Ao Dr. B. L. Nicholson (Departamento de Microbiologia, Universidade de Maine, Estados Unidos da América), agradeço a cedência dos anticorpos monoclonais usados neste trabalho.

Ao Serviço de Microscopia Electrónica da Universidade de Santiago de Compostela agradeço a realização das fotografias em microscópio electrónico.

À minha família, quero expressar também o meu profundo reconhecimento, e, em particular:

- à Fátima, que sempre esteve presente e me apoiou incondicionalmente, para além de "segurar as pontas" durante as minhas frequentes e, por vezes, longas ausências; à Ana Sofia e ao Pedro que, à sua medida, também me ajudaram a perceber que o fracasso de uma experiência não é necessariamente uma tragédia;
- aos meus pais, que sempre se empenharam para que a minha formação fosse a melhor possível, e ao meu irmão, que me foi "abrindo o caminho" ao longo das várias etapas.

RESUMO

Este trabalho consistiu na realização de um estudo epidemiológico em duas truticulturas do norte de Portugal, e dele constituiu parte importante a pesquisa de agentes, bacterianos e virais, de doenças de peixes de declaração obrigatória.

As duas truticulturas estudadas situam-se em diferentes bacias hidrográficas, a grande distância entre si, e possuem ambientes envolventes diversos, uma vez que uma delas (truticultura A) se situa junto de um pequeno rio, cuja água utiliza, e a outra (truticultura B) se encontra numa albufeira. As amostragens foram realizadas mensalmente, desde Janeiro até Dezembro de 1993, consistindo cada uma delas na recolha de peixes, água e sedimento de três tanques (truticultura A) ou jaulas flutuantes (truticultura B) e, ainda, na recolha de água e de sedimento de dois locais do rio, situados um a montante da entrada de água na truticultura A e o outro a jusante da saida desta. Sempre que possível, procedeu-se também à captura de peixes selvagens junto de ambas as truticulturas.

Foram identificados os grupos bacterianos e virais encontrados nos órgãos internos dos peixes, cultivados (saudáveis e doentes) e selvagens. Foi estudada a distribuição espácio-temporal dos grupos bacterianos isolados das amostras ambientais e efectuada a sua comparação com os encontrados nos peixes.

Os grupos bacterianos predominantes nos peixes não reflectiram os mais abundantes nas amostras de água e de sedimento, embora, de um modo geral, se trate dos mesmos grupos, que são similares aos referidos na generalidade dos trabalhos publicados sobre este assunto. Na truticultura A e no rio adjacente a esta verificou-se um predomínio de *Flavobacterium* nos peixes, enquanto que os grupos mais abundantes nas amostras ambientais foram *Pseudomonas-Xanthomonas* e *Aeromonas* móveis. Na truticultura B, a distribuição dos grupos bacterianos pelos diferentes tipos de amostras não obedeceu a padrões evidentes.

Nos peixes doentes amostrados na truticultura B foram detectados os mesmos grupos bacterianos que nos peixes saudáveis, embora em proporções diferentes. Estas diferenças foram mais notórias nos grupos *Pseudomonas-Xanthomonas*, que foi mais abundante nos peixes saudáveis, *Flavobacterium* e *Aeromonas* móveis, mais abundantes nos doentes. A situação encontrada na truticultura A foi diferente, tendo sido isoladas estirpes de *Aeromonas salmonicida* e de *Yersinia ruckeri* de peixes doentes, mas não de qualquer peixe aparentemente saudável. Nos peixes selvagens capturados junto da truticultura B foram detectados os mesmos grupos bacterianos que

nos peixes aparentemente saudáveis cultivados nesta truticultura, à excepção de *Y. ruckeri* e de *Staphylococcus-Micrococcus*.

Foi testada a resistência/sensibilidade a substâncias antimicrobianas das estirpes dos grupos mais abundantes nas duas truticulturas, nomeadamente *Pseudomonas-Xanthomonas*, *Flavobacterium*, *Enterobacteriaceae* e *Aeromonas* móveis. Verificou-se que entre os grupos de bactérias oxidativas, principalmente em *Pseudomonas-Xanthomonas*, as percentagens de estirpes resistentes a cada uma das substâncias testadas foram sempre muito superiores às encontradas nos grupos *Enterobacteriaceae* e *Aeromonas* móveis, nos quais se observaram muito baixas percentagens de estirpes resistentes a alguns dos antibióticos usados. Deste modo, o controle, por meios quimioterápicos, de eventuais epizootias causadas por bactérias pertencentes a estes dois grupos poderia ser conseguido bastante mais facilmente do que de epizootias provocadas por *Flavobacterium* ou *Pseudomonas-Xanthomonas*.

A pesquisa de agentes etiológicos de doenças de declaração obrigatória permitiu a obtenção de resultados altamente significativos no contexto da patologia na aquacultura em Portugal.

Foi isolada, na truticultura A, a bactéria *Aeromonas salmonicida*, já previamente detectada nesta truticultura (Saraiva *et al.*, 1989), na qual terá permanecido desde então em peixes portadores e/ou no meio ambiente. As quatro estirpes desta espécie, que foram isoladas aquando de uma epizootia de furunculose, revelaram uma total homogeneidade em quase todas as características, fenotípicas e moleculares, que foram estudadas. Assim, para além de todas proporcionarem os mesmos resultados nos testes bioquímicos e na sensibilidade/resistência a substâncias antibacterianas, também os padrões obtidos na análise de lipopolissacarídeos (LPS) e de proteínas do envoltório celular (proteínas totais e de membrana externa), bem como o perfil plasmídico, foram os mesmos para todas. Apenas a ribotipagem usando a enzima de restrição *Xba*I (mas não as enzimas *Sma*I, *Pvu*I ou *Pst*I) permitiu detectar alguma variabilidade entre elas.

Também foi detectada, em ambas as truticulturas, a espécie bacteriana *Yersinia ruckeri*, sendo estes os primeiros isolamentos desta bactéria em Portugal. As vinte e três estirpes isoladas distribuem-se pelos serótipos O1 (13 estirpes) e O3 (10 estirpes) de Romalde *et al.* (1993). Na truticultura A apenas foram isoladas estirpes do serótipo O1, embora o tenham sido de diferentes tipos de amostras, nomeadamente de uma truta arco-íris doente, de água e de sedimento. Na truticultura B, as estirpes do serótipo O1 foram isoladas principalmente de peixes, enquanto que as do serótipo O3 o foram maioritariamente do sedimento. Embora apenas estirpes do serótipo O1 tenham sido

isoladas em associação com problemas sanitários nas truticulturas, os ensaios de patogenicidade realizados revelaram que todas as estirpes neles usadas, independentemente do serótipo a que pertencem e do tipo de amostra de que foram isoladas, são altamente patogénicas para truta arco-íris, estando as respectivas Doses Letais 50% (DL_{50}) na gama de $1,1X10^3$ a $3,6X10^4$ células.

O isolamento de estirpes do serótipo O3 de *Y. ruckeri* tem um significado particular, pois é a primeira vez que estirpes deste serótipo são detectadas fora dos Estados Unidos da América. Todas estas estirpes revelaram possuir a capacidade de fermentar o sorbitol, ao contrário das estirpes do serótipo O1. Entre estas últimas, assume, também, um grande significado o facto de terem sido isoladas quatro estirpes imóveis e tween 80 negativas, anteriormente detectadas apenas no Reino Unido, Noruega e Alemanha.

Embora, de um modo geral, se tenha observado entre as estirpes de *Y. ruckeri* uma grande homogeneidade fenotípica, foi detectada alguma variabilidade a nível molecular. Foram encontrados dois padrões de LPS, cada um dos quais específico de um dos serótipos. Por outro lado, foram detectados diferentes padrões de proteínas do envoltório celular (quer totais, quer de membrana externa), inclusivé dentro de cada serótipo, o mesmo se verificando na ribotipagem usando qualquer das quatro enzimas de restrição (*Xba*I, *Sma*I, *Pvu*I e *Pst*I). Também foram encontrados diferentes perfis plasmídicos entre as estirpes do serótipo O3. Como melhores sistemas de tipagem revelaram-se a análise de proteínas do envoltório celular e a ribotipagem (esta especialmente no serótipo O1).

Não obstante alguma desta variabilidade poder ter sido originada por mutações ocorridas já dentro das truticulturas, este conjunto de resultados sugere que as estirpes de *Y. ruckeri* foram introduzidas em várias ocasiões diferentes nas duas truticulturas, embora principalmente na truticultura B.

A pesquisa de agentes etiológicos de doenças de declaração obrigatória permitiu, ainda, o isolamento de duas estirpes virais na truticultura B, as quais constituem o primeiro isolamento de um vírus em unidades de aquacultura em Portugal. A sua detecção ocorreu na amostragem de Junho em trutas arco-íris aparentemente saudáveis e, num dos casos, em simultâneo com uma estirpe de *Y. ruckeri*. A caracterização destes vírus permitiu identificá-los como pertencentes ao serótipo Ab do vírus da Necrose Pancreática Infecciosa (IPNV), um serótipo de origem tipicamente europeia considerado como muito pouco ou nada virulento.

Durante o presente estudo não foi detectada a bactéria *Renibacterium salmoninarum* nem os vírus da Necrose Hematopoiética Infecciosa (IHNV) ou da Septicémia Hemorrágica Viral (VHSV), bem como os serótipos mais virulentos do IPNV (Sp e VR-299). Este facto permite algum optimismo relativamente às consequências económicas da presença dos microrganismos patogénicos detectados, nomeadamente no caso do IPNV, as quais são, assim, potencialmente mais limitadas do que poderia parecer. Também, apesar da grande virulência das estirpes de *A. salmonicida* e de *Y. ruckeri* que foram isoladas, o seu controle não é tão difícil como o de *R. salmoninarum*.

SUMMARY

This study consisted in an epidemiological survey carried out on two trout farms located in the north of Portugal. One of the most important aims of this work was the search for bacteria and virus causing notifiable fish diseases.

The trout farms studied are situated in different hydrological basins, far away from each other, and have different environmental conditions, since one of them (Farm A) is located by a small river, whose water it utilises, and the other one (Farm B) is situated in a dam. The samplings took place monthly, from January until December 1993, each one consisting of fish, water and sediment from three tanks (Farm A) or floating cages (Farm B), as well as water and sediment from two sites in the river, one located upstream from the inlet to farm A and the other one downstream from the outlet of this farm. Whenever possible, wild fish were captured near both facilities.

The bacterial and viral groups isolated from the fish internal organs, both cultivated (healthy and diseased) and wild, were identified. The distribution patterns of the bacterial groups detected in the environmental samples were studied and their comparison to those found in the fish was carried out.

The most abundant bacterial groups in fish did not reflect those which prevailed in the water and sediment, although, in general, they are the same groups and, additionally, they were similar to those referred to in most of the studies which have been published on this subject. In farm A and in the river, a predominance of *Flavobacterium* was observed in fish, while *Pseudomonas-Xanthomonas* and motile *Aeromonas* were the most abundant in the environmental samples. In farm B, clear patterns in the distribution of the bacterial groups between the different types of samples were not detected.

The same bacterial groups were isolated from the diseased and from the healthy fish in farm B, although in different relative quantities. The differences were most evident for the groups *Pseudomonas-Xanthomonas*, which was the most abundant in healthy fish, *Flavobacterium* and motile *Aeromonas*, most frequently isolated from diseased trout. The situation found in farm A was different, as *Aeromonas salmonicida* and *Yersinia ruckeri* were isolated from diseased fish, but not from healthy specimens. The same bacterial groups were detected in wild fish captured near farm B and in the healthy fish cultivated in this facility, except *Y. ruckeri* and *Staphylococcus-Micrococcus*.

The resistance/susceptibility to antimicrobial substances, of strains belonging to the most abundant bacterial groups in both farms, namely *Pseudomonas-Xanthomonas*, *Flavobacterium*, *Enterobacteriaceae* and motile *Aeromonas*, was tested. The percentage of strains resistant to each of the substances was always much higher among the oxidative groups, particularly in *Pseudomonas-Xanthomonas*, than in *Enterobacteriaceae* or motile *Aeromonas*. In these groups of fermentative bacteria, the percentages of strains resistant to some of the antibiotics were very low. Thus, any epizootic caused by *Enterobacteriaceae* or motile *Aeromonas* would probably be much easier controled by chemotherapeutic means than epizootics caused by *Favobacterium* or *Pseudomonas-Xanthomonas*.

The search for aetiological agents of notifiable fish diseases allowed the obtention of highly significative results in the Portuguese context of pathology in aquaculture.

The bacterium *Aeromonas salmonicida* was isolated in farm A, where it had previously been detected (Saraiva *et al.*, 1989) and where it probably remained since then in carrier fish and/or in the environment. The four strains belonging to this species were isolated during an epizootic of furunculosis and revealed a complete homogeneity in almost all the phenotypic and molecular characteristics tested. Thus, besides the same results in all the biochemical tests and in the resistance/susceptibility to antimicrobial substances, also the patterns obtained in the lipopolysaccharide (LPS) and cell-envelope proteins (total and outer membrane) analyses, as well as the plasmidic profile, were the same for all strains. Only ribotyping using the restriction enzyme *Xba*I (but not any of the enzymes *Sma*I, *Pvu*I or *Pst*I) allowed the detection of some variability among those strains.

Yersinia ruckeri was also detected, in both farms. These are the first isolations of this bacterium in Portugal. The twenty-three strains isolated are distributed between serotypes O1 (13 strains) and O3 (10 strains) of Romalde *et al.* (1993) (former serotypes I and V, respectively). In farm A, only strains belonging to serotype O1 were detected, although they were isolated from different types of samples, namely rainbow trout, water and sediment. In farm B, the serotype O1 strains were isolated mainly from fish, while those belonging to serotype O3 were detected most frequently from sediment. Although only serotype O1 strains were found in association to sanitary problems in both farms, the pathogenicity assays have shown that all the strains used, regardless of their serotype or the type of sample they were isolated from, are highly virulent for rainbow trout, the respective Lethal Doses 50% (LD_{50}) falling in the range of $1.1X10^3$ - $3.6X10^4$ cells.

The isolation of *Y. ruckeri* strains belonging to the serotype O3 has a special significance, since it is the first time that this serotype is detected outside from the United States of America. All of these strains are capable of fermenting sorbitol, unlike those belonging to serotype O1. Among these, the isolation of four non motile/tween 80 negative strains, formerly detected only in the United Kingdom, Norway and Germany, is also of great significance.

Although, in general, a great phenotypic homogeneity was observed among the twenty-three *Y. ruckeri* strains, some variability was, nevertheless, found between them at the molecular level. Two LPS patterns were found, each being specific to one of the serotypes detected. On the other hand, different OMP patterns and ribotypes with all the restriction enzymes used were detected between, as well as within, the two serotypes. Also different plasmid profiles were found among the serotype O3 strains. The best typing systems were ribotyping (particularly for strains belonging to serotype O1) and the OMP analysis.

Although some the variability detected among strains of *Y. ruckeri* can be due to mutation(s) occurred inside the facilities studied, the results obtained suggest that this bacterial species was introduced in different occasions in both farms, but particularly in farm B.

The search for aetiological agents of notifiable fish diseases leaded also to the isolation of two viral strains in farm B. These constitute the first isolation of a virus in Portuguese aquaculture facilities. This detection occurred in apparently healthy rainbow trouts sampled in June, and, in one of the cases, the viral isolation was accompanied with the isolation of one *Y. ruckeri* strain. Both viral isolates revealed to belong to serotype Ab of Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV), one of the European serotypes of this virus, which is considered to be the least virulent serotype of IPNV (if virulent at all).

During the present study, the bacterium *Renibacterium salmoninarum* and the Infectious Haematopoietic Necrosis (IHN) or Viral Haemorrhagic Septicaemia (VHS) viruses, as well as the most virulent serotypes (Sp and VR-299) of IPNV, were not detected. This fact allows for some optimism facing the economic consequences caused by the presence of the pathogens detected, specially the IPNV, which are potentially more limited than could be expected. In spite of the great virulence of the tested strains of *A. salmonicida* and *Y. ruckeri*, their control is not as difficult as that of *R. salmoninarum*.

RÉSUMÉ

On a réalisé une étude épidemiologique chez deux élevages de truite du nord du Portugal. Une partie importante de ce travail a été la recherche de bactéries et de virus responsables par maladies des poissons de notification obligatoire.

Les deux élevages étudiées se localisent en différents bassins hydrographiques, a grande distance l'une de l'autre, et ont des conditions environnantes diverses. En fait, l'un de ces établissements de pisciculture (élevage A) est situé près d'une petite rivière, dont il utilise l'eau, pendant que l'autre (élevage B) est localisé dans un réservoir. Les prélèvements ont été réalisés mensuellement, dès Janvier jusqu'à Décembre 1993, et chacun était constitué par des poissons, de l'eau et du sédiment de trois étangs (élevage A) ou cages flottantes (élevage B), et aussi par de l'eau et du sédiment échantillonés en deux places de la rivière, l'une en amont de la entrée de l'eau dans l'élevage et l'autre en aval de la sortie de l'eau vers la rivière. Toutes les fois que possible des poissons sauvages ont été capturés près des deux élevages.

Les groupes bactériens et les virus isolés des organes internes des poissons, d'élevage (sains et malades) et sauvages, ont été identifiés et comparés avec les groupes bactériens présents dans les prélèvements environementaux d'eau et de sédiment.

Si bien que les mêmes groupes bactériens étaient présents dans les organes internes des poissons et dans les prélèvements environementaux, les quantités rélatives étaient différentes. Chez l'élevage A et chez la rivière, les groupes bactériens les plus abondants étaient *Flavobacterium* dans les organes internes des poissons, et *Pseudomonas-Xanthomonas* et *Aeromonas* mobiles dans les prélèvements environementaux. Chez l'élevage B, le modèle de distribution des groupes bactériens par les différents types de prélèvements n'était pas clair.

Chez l'élevage B, les poissons malades et les poissons sains avaient les mêmes groupes bactériens dans ses organes internes, bien qu'en différentes proportions. Ces différences ont été plus évidentes en ce qui concerne les groupes *Pseudomonas-Xanthomonas*, qui a été plus abondant chez les poissons sains, *Flavobacterium* et *Aeromonas* mobiles, plus fréquents chez les malades. Des poissons malades de l'élevage A ont été isolées des souches des espèces *Aeromonas salmonicida* et *Yersinia ruckeri*, lesquelles n'ont pas été détectées parmi les poissons sains. Des poissons sauvages capturés près de l'élevage B ont été isolés les mêmes groupes bactériens que des poissons sains échantillonés dans cette pisciculture, a l'exception de *Y. ruckeri* et *Staphylococcus-Micrococcus*.

La résistance/sensibilité des groupes bactériens les plus abondants chez les deux élevages, c'est a dire *Pseudomonas-Xanthomonas*, *Flavobacterium*, *Enterobacteriaceae* et *Aeromonas* mobiles, a été testé relativement a quelques substances antibacteriennes. Parmi les bactéries oxidatives, particulièrement *Pseudomonas-Xanthomonas*, les pourcentages de souches résistantes à chacune de ces substances ont été toujours beaucoup plus grandes que chez les groupes *Enterobacteriaceae* et *Aeromonas* mobiles. En fait, chez ces deux groupes de bactéries fermentatives on a trouvé de très petites proportions de souches résistantes a quelques-unes des substances utilisées. Donc, le contrôle par moyens chimiotérapeutiques d'éventuelles épizooties causées par *Enterobacteriaceae* ou *Aeromonas* mobiles serait probablement beaucoup plus facile que celui d'épizooties de la responsabilité de souches appartennant aux groupes *Pseudomonas-Xanthomonas* ou *Flavobacterium*.

La recherche d'agents étiologiques de maladies des poissons de déclaration obligatoire a permi l'obtention de résultats très significatifs dans le contexte de la patologie en aquaculture au Portugal.

Chez l'élevage A, a été isolée la bactérie *Aeromonas salmonicida*, déjà détectée dans le même élevage par Saraiva *et al.* (1989), òu elle a probablement séjourné dès lors chez des poissons porteurs et/ou dans l'environement. Les quatre souches de cette espèce, isolées lors d'une épizootie de furonculose, sont très homogènes concernant presque toutes les caractéristiques, phenotypiques et moleculaires, étudiées. Avec toutes les souches on a obtenu les mêmes résultats en ce qui concerne les tests biochimiques, et le modèle de résistance/sensibilité à des substances antibactériennes a été le même. D'ailleurs, les mêmes patrons ont été obtenus par les analyses de lypopolissacarides (LPS), de proteines de l'enveloppement celulaire (totales et de membrane externe) et du contenu plasmidique. La détection de quelque variabilité n'a été possible que par ribotypage, mais uniquement quand l'enzyme de restriction *Xba*I (mais non les enzymes *Sma*I, *Pvu*I ou *Pst*I) a été utilisée.

Yersinia ruckeri a été aussi détectée chez les deux élevages, ce qui établit les premiers isoléments de cette bactérie au Portugal. Les vingt-trois souches isolées sont réparties par les sérotypes O1 et O3 de Romalde *et al.* (1993). Les souches détectées chez l'élevage A appartiennent toutes au sérotype O1, bien qu'elles ont été isolées de différents types de prélèvements, nommément d'une trute arc-en-ciel, de l'eau et du sédiment. Chez l'élevage B, les souches du sérotype O1 ont été isolées surtout de poissons, pendant que les souches du sérotype O3 ont été détectées principalement dans le sédiment. Quoique seulement souches du sérotype O1 ont été isolées en association avec des problèmes sanitaires chez les élevages, les éssais de pathogénicité

ont montré que toutes les souches utilisées, indépendamment du sérotype et du type de prélèvement, sont hautement pathogéniques pour truite arc-en-ciel. Ses Doses Létales 50% (DL_{50}) se situent dans la gamme de $1,1X10^3$ - $3,6X10^4$ cellules.

La détection de souches d'*Y. ruckeri* appartenant au sérotype O3 a une signification particulière, parce que c'est la première fois que ce sérotype est isolé hors des États Unis d'Amérique. Toutes ces souches ont la capacité de fermenter le sorbitol, au contraire des souches du sérotype O1. La détection, parmi ces dernières, de quatre souches immobiles et tween 80 négatives, auparavant isolées uniquement en Grande Bretagne, Norvège et Allemagne, est aussi d'une grande signification.

En dépit de la grande homogénité phénotypique généralement observée dans les souches d'*Y. ruckeri*, une certaine variabilité était évidente au niveau moleculaire. L'analyse des LPS a révelé deux patrons, chacun spécifique d'un des sérotypes. D'ailleurs, ont été détectés différents patrons de proteines de l'enveloppement celulaire (totales et de membrane externe), inclus dans chaque sérotype, le même arrivant avec le ribotypage. Ont été trouvés, aussi, différents patrons plasmidiques parmi les souches du sérotype O3. Les meilleurs systèmes de typage ont été l'analyse des proteines de l'enveloppement celulaire et le ribotypage (ce dernier surtout pour les souches du sérotype O1).

Bien qu'une partie de cette variabilité peut être originaire de mutations ayant place déjà chez les élevages A et B, ces résultats suggèrent que les souches d'*Y. ruckeri* ont été introduites en diverses occasions dans les deux établissements, mais surtout dans l'élevage B.

La recherche d'agents étiologiques de maladies des poissons de déclaration obligatoire a permi, aussi, l'isolément de deux souches virales, chez l'élevage B, lesquelles sont les premiers isolats d'un virus chez les établissements d'aquaculture au Portugal. Sa détection a été réalisée lors du prélèvement de Juin, de truites arc-en-ciel apparemment sains. L'un de ces isolats virales a été obtenu en association avec une souche de *Y. ruckeri*. La caractérization de cettes souches virales a permi de les identifier comme appartenant au sérotype Ab du virus de la Nécrose Pancréatique Infeccieuse (IPNV), un sérotype european consideré comme très peu virulent, ou même pas virulent du tout.

Pendant la présente étude, nous n'avons pas détecté la bactérie *Renibacterium salmoninarum* ni les virus de la Nécrose Hématopoietique Infeccieuse (IHNV) et de la Sépticémie Hemorragique Virale (VHSV). Ce fait, associé à l'absence de détection des sérotypes plus virulents de l'IPNV (Sp et VR-299) permit quelque optimisme

rélativement aux conséquences économiques de la présence des microrganismes pathogènes isolés, particulièrement l'IPNV, potentiellement plus limitées qu'ont pourait le prévoir. Malgré la grande virulence des souches d'*A. salmonicida* et d'*Y. ruckeri* isolées, elles sont plus faciles a controler que *R. salmoninarum*.

RESUMEN

Este trabajo consistió en la realización de un estudio epidemiológico en dos piscifactorías del norte de Portugal, dedicadas al cultivo de trucha. Una parte importante de este estudio fue la búsqueda y caracterización de agentes bacterianos y virales causantes de enfermedades de declaración obligatoria.

Las dos piscifactorías estudiadas se situan en cuencas hidrográficas diferentes, a gran distância entre si. Una de ellas (piscifactoría A), situada al lado de un pequeño río, está constituída por tanques de tierra, mientras que la otra (piscifactoría B), consiste en jaulas flotantes en una albufera. Los muestreos se realizaron mensualmente, desde Enero hasta Diciembre de 1993, y consistieron en la recogida de peces, agua y sedimento de 3 tanques o jaulas. Además, se muestreó agua y sedimento en dos puntos del río, uno situado río arriba de la entrada de la piscifactoría y el otro río abajo de la salida de la misma. Siempre que fue possible, se capturaron peces salvajes en las cercanias de ambas piscifactorías.

Se identificaron los grupos bacterianos y virales encontrados en los órganos internos de los peces, cultivados (sanos y enfermos) y salvajes. Se estudió, asimismo, la distribución espacio-temporal de los grupos bacterianos aislados de las muestras ambientales, comparándose con los encontrados en los peces.

Los grupos bacterianos predominantes en los peces no reflejan los grupos más abundantes en agua y sedimento, aunque, en general se trate de los mismos grupos, que son similares a los referidos en la mayor parte de los trabajos publicados sobre el tema. En la piscifactoría A y en el río adyacente a la misma, se observó un predominio de *Flavobacterium* en los peces, mientras que los grupos más abundantes en las muestras ambientales fueron *Pseudomonas-Xanthomonas* y *Aeromonas* móviles. En la piscifactoría B, la distribución de los grupos bacterianos en los distintos tipos de muestras no se ajustan a patrones claros.

En los peces enfermos muestreados en la piscifactoría B se detectaron los mismos grupos bacterianos que en los peces sanos, aunque en proporciones diferentes. Estas diferencias fueron más notorias en los grupos *Pseudomonas-Xanthomonas*, que fue el más abundante en peces sanos, y *Flavobacterium* y *Aeromonas* móviles, más abundantes en los enfermos. En la piscifactoría A la situación fue diferente, aislándose *Aeromonas salmonicida* y *Yersinia ruckeri* de peces enfermos, pero no de peces sanos. En los peces salvajes capturados alrededor de la piscifactoría B se detectaron los mismos grupos que en los peces cultivados en esta instalación, con la excepción de *Y. ruckeri* y *Staphylococcus-Micrococcus*.

Se determinó la resistencia/sensibilidad a sustancias antimicrobianas de las cepas de los grupos más abundantes en las dos piscifactorías. Los porcentajes de cepas resistentes a cada una de las sustancias probadas fueron siempre muy superiores entre los grupos de bacterias oxidativas (*Pseudomonas-Xanthomonas* y *Flavobacterium*) que entre los de bacterias fermentativas (*Enterobacteriaceae* y *Aeromonas* móviles). Así, las posibles epizootias causadas por bacterias pertenecientes a estos dos grupos fermentativos podrían ser más facilmente controladas por medios quimioterápicos que epizootias causadas por representantes de *Flavobacterium* o *Pseudomonas-Xanthomonas*.

La búsqueda de agentes etiológicos de enfermedades de declaración obligatoria permitió la obtención de resultados altamente significativos en el contexto de la acuicultura en Portugal.

En la piscifactoría A, se aisló la bacteria *Aeromonas salmonicida*, que ya habia sido detectada con anterioridad en esta granja (Saraiva *et al.*, 1989), y en la que probablemente habrá permanecido desde entonces en peces portadores o en el medio ambiente. Las cuatro cepas de esta especie, aisladas durante una epizootia de furunculosis, revelaron una homogenidad total en casi todas sus características, fenotípicas y moleculares. Así, además de mostrar los mismos resultados en las pruebas bioquimicas y en la resistencia/sensibilidad a quimioterápicos, también los patrones de lipopolisacáridos (LPS) y de proteínas de envoltura celular (tanto proteínas totales como de membrana externa), así como los perfiles plasmídicos fueron los mismos para todas. Sólo el ribotipado usando el enzima de restricción *Xba*I (pero no con los enzimas *Sma*I, *Pvu*I y *Pst*I) permitió detectar alguna variabilidad entre ellas.

También se detectó, en ambas piscifactorías, la especie bacteriana *Yersinia ruckeri*, constituyendo los primeros aislamientos de esta bacteria en Portugal. Las 23 cepas aisladas se distribuyen en los serotipos O1 (13 cepas) y O3 (10 cepas) de Romalde *et al.* (1993).

En la piscifactoría A sólo se aislaron cepas del serotipo O1, aunque de varios tipos de muestra como trucha arcoiris enferma, agua y sedimento. En la piscifactoría B, las cepas del serotipo O1 se aislaron principalmente de peces, mientras que las del serotipo O3 se aislaron mayoritariamente de sedimento. Aunque sólo cepas del serotipo O1 estuvieron asociadas con problemas sanitarios en las piscifactorías, los ensayos de patogenicidad realizados revelaron que todas las cepas, independientemente del serotipo al que pertenezcan o del tipo de muestra del que

fueron aisladas, son altamente virulentas para trucha arcoiris, con Dosis Letales 50% (DL_{50}) en el rango entre $1,1X10^3$ y $3,6X10^4$ células.

El aislamiento de cepas del serotipo O3 de *Y. ruckeri* tiene un significado especial, pues es la primera vez que se detectan cepas de este serotipo fuera de Estados Unidos. Todas estas cepas mostraron capacidad de fermentación del sorbitol, al contrario que las cepas del serotipo O1. Entre estas últimas, tiene también un gran significado el hecho de aislar cuatro cepas inmóviles/tween 80 negativas, sólo detectadas anteriormente en el Reino Unido, Noruega y Alemania.

Aunque, en general, entre las cepas de *Y. ruckeri* se observó una gran homogenidad fenotípica, se encontró alguna variabilidad a nivel molecular. Así, se observaron dos patrones de LPS, cada uno especifico de uno de los serotipos. Por otro lado, se detectaron patrones diferentes de proteínas de la envoltura celular y distintos ribotipos, inclusive dentro de cada serotipo. También se encontraron, dentro del serotipo O3, distintos perfiles plasmídicos. El análisis de proteínas de la envoltura y el ribotipado, especialmente en el serotipo O1, se revelaron como los sistemas de tipado más eficaces.

A pesar de que parte de esta variabilidad se pueda haber originado por mutaciones ocurridas dentro de las piscifactorías, este conjunto de resultados sugiere que las cepas de *Y. ruckeri* podrian haberse introducido en varias ocasiones diferentes en las dos piscifactorías, y principalmente en la granja B.

La búsqueda de agentes etiológicos de enfermedades de declaración obligatoria nos permitió, además, el aislamiento de dos cepas virales en la piscifactoría B, que constituyen el primer aislamiento de un virus en unidades de acuicultura en Portugal. Su detección ocurrió en el muestreo de Junio en truchas arcoiris aparentemente sanas y, en uno de los casos, en asociación con una cepa de *Y. ruckeri*. La caracterización de estos virus permitió concluir que se trata de cepas pertenecientes al serotipo Ab del virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV). El serotipo Ab es considerado un serotipo típicamente europeo y con muy baja virulencia.

Durante el presente estudio no se detectaron ni la bacteria *Renibacterium salmoninarum* ni los virus de la Necrosis Hematopoyética Infecciosa (IHNV) o la Septicemia Hemorrágica Viral (VHSV), ni tampoco los serotipos más virulentos de IPNV (Sp y VR-299). Este hecho permite ser optimistas ya que las consecuencias económicas derivadas de la presencia de los microorganismos detectados, especialmente en el caso del IPNV, por ser un serotipo poco virulento, son, en princípio, menores de lo que cabría esperar. Además, a pesar de la gran virulencia de

las cepas de *A. salmonicida* y *Y. ruckeri* aisladas, el control de estas bacterias no es tan dificil como el de *R. salmoninarum*.

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. O ESTADO ACTUAL DA AQUACULTURA PORTUGUESA 1

1.2. CONDIÇÃO SANITÁRIA DOS PEIXES CULTIVADOS EM PORTUGAL 1

1.3. BACTERIOLOGIA EM AMBIENTES DE AQUACULTURA 3

1.3.1. Comunidade bacteriana da água 3
1.3.2. Bactérias de peixes 6
1.3.3. Controle de doenças de etiologia bacteriana e resistência a substâncias antimicrobianas 12

1.4. VÍRUS DE PEIXES 16

1.5. MICRORGANISMOS PATOGÉNICOS PARA PEIXES, DE DECLARAÇÃO OBRIGATÓRIA 21

1.5.1. *Aeromonas salmonicida* 21

1.5.1.1. Considerações históricas 21
1.5.1.2. Doenças causadas por *A. salmonicida* 23
1.5.1.2.1. Furunculose 23
1.5.1.2.2. Outras doenças causadas por *A. salmonicida* 24
1.5.1.3. Descrição do agente etiológico 25
1.5.1.4. Diagnóstico de infecção e isolamento de *A. salmonicida* 29
1.5.1.5. Epizootiologia 31
1.5.1.6. Isolamento de *A. salmonicida* a partir de amostras ambientais 37
1.5.1.7. Controle 39
1.5.1.7.1. Quimioterapia 39
1.5.1.7.2. Vacinas 41

1.5.2. *Yersinia ruckeri* 42

1.5.2.1. Considerações históricas 42
1.5.2.2. Doença da boca vermelha ("Enteric Redmouth Disease; ERM) 44
1.5.2.3. Descrição do agente etiológico 46

1.5.2.4. Diagnóstico de infecção e isolamento de *Y. ruckeri* 54
1.5.2.5. Epizootiologia 57
1.5.2.6. Controle 61
1.5.2.6.1. Quimioterapia 61
1.5.2.6.2. Vacinas 62

1.5.3. VÍRUS DA NECROSE PANCREÁTICA INFECCIOSA ("Infectious Pancreatic Necrosis Virus"; IPNV) 63

1.5.3.1. Considerações históricas, hospedeiros e distribuição geográfica 63
1.5.3.2. Necrose pancreática infecciosa (IPN) 65
1.5.3.3. Caracterização do agente etiológico (IPNV e IPNV-"like") 67
1.5.3.4. Diagnóstico de IPN e identificação do IPNV 72
1.5.3.5. Controle 75

II. OBJECTIVOS 77

III. ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO EM DUAS TRUTICULTURAS DO NORTE DE PORTUGAL E CARACTERIZAÇÃO DOS AGENTES ETIOLÓGICOS DE DOENÇAS DE DECLARAÇÃO OBRIGATÓRIA

3.1. ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO BACTERIANO 79

3.1.1. Material e Métodos 79

3.1.1.1. Zonas de amostragem 79
3.1.1.2. Amostras de peixes 79
3.1.1.3. Amostras ambientais 80
3.1.1.4. Parâmetros físico-químicos 80
3.1.1.5. Processamento das amostras para isolamento e contagem de colónias bacterianas 85
3.1.1.5.1. Peixes 85
3.1.1.5.2. Água e sedimento 85
3.1.1.6. Isolamento de bactérias 85
3.1.1.7. Caracterização fenotípica de bactérias 86
3.1.1.8. Testes serológicos de aglutinação 89
3.1.1.8.1. Preparação dos antigénios (células intactas) 89

3.1.1.8.2. Preparação dos antigénios somáticos (antigénios "O") 89
3.1.1.8.3. Realização dos testes de aglutinação 89
3.1.1.9. Imunofluorescência directa (pesquisa de *Renibacterium salmoninarum*) 90
3.1.2. Resultados 91
3.1.2.1. Peixes 91
3.1.2.2. Água e sedimento 143
3.1.2.3. Resistência/sensibilidade a substâncias antibacterianas 207
3.1.3. Discussão 219
3.2. CARACTERIZAÇÃO DAS BACTÉRIAS CAUSADORAS DE DOENÇAS DE DECLARAÇÃO OBRIGATÓRIA: *Aeromonas salmonicida* e *Yersinia ruckeri* 231
3.2.1. Material e Métodos 231
3.2.1.1. Identificação e sensibilidade a substâncias antimicrobianas 231
3.2.1.2. Análise de lipopolissacarídeos e de proteínas da envoltura celular 231
3.2.1.2.1. Em geles de poliacrilamida-SDS 231
3.2.1.2.1.1. Lipopolissacarídeos (LPS) 231
3.2.1.2.1.2. Proteínas da envoltura celular (totais e de membrana externa) 232
3.2.1.2.2. Transferência a membranas de nitrocelulose ("western blot") e detecção imunológica 233
3.2.1.3. Detecção de plasmídeos 234
3.2.1.4. Estudo do genoma 235
3.2.1.4.1. Extracção do DNA 235
3.2.1.4.2. Ribotipagem 236
3.2.1.5. Ensaios de patogenicidade para trutas 238
3.2.2. Resultados 239
3.2.2.1. *Aeromonas salmonicida* 239
3.2.2.1.1. Identificação e sensibilidade a substâncias antimicrobianas 239

3.2.2.1.2. Análise de lipopolissacarídeos e de proteínas da envoltura celular 239
3.2.2.1.2.1. Lipopolissacarídeos 239
3.2.2.1.2.2. Proteínas da envoltura celular 241
3.2.2.1.3. Conteúdo plasmídico e análise do DNA cromossómico 241
3.2.2.1.3.1. Estudo do conteúdo plasmídico 241
3.2.2.1.3.2. Ribotipagem 242
3.2.2.1.4. Patogenicidade para trutas 242
3.2.2.2. *Yersinia ruckeri* 251
3.2.2.2.1. Identificação e sensibilidade a substâncias antimicrobianas 251
3.2.2.2.2. Análise de lipopolissacarídeos e de proteínas da envoltura celular 257
3.2.2.2.2.1. Lipopolissacarídeos 257
3.2.2.2.2.2. Proteínas da envoltura celular 257
3.2.2.2.3. Conteúdo plasmídico e análise do DNA cromossómico 261
3.2.2.2.3.1. Estudo do conteúdo plasmídico 261
3.2.2.2.3.2. Ribotipagem 261
3.2.2.2.4. Patogenicidade para trutas 264
3.2.3. Discussão 279
3.2.3.1. *Aeromonas salmonicida* 279
3.2.3.2. *Yersinia ruckeri* 280
3.3. ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO VIRAL E CARACTERIZAÇÃO DO VÍRUS DA NECROSE PANCREÁTICA INFECCIOSA 285
3.3.1. Material e Métodos 285
3.3.1.1. Linhas celulares utilizadas 285
3.3.1.2. Condições de cultura 286
3.3.1.2.1. Meios de cultura 286
3.3.1.2.2. Temperaturas de incubação e de manutenção 286
3.3.1.2.3. Individualização celular 286
3.3.1.2.4. Conservação celular 287
3.3.1.3. Amostras para estudo virológico 287
3.3.1.4. Processamento das amostras 287

3.3.1.5. Inoculação das amostras e avaliação da presença de vírus 288
3.3.1.6. Titulação viral 288
3.3.1.7. Caracterização das estirpes virais isoladas 289
3.3.1.7.1. Resistência ao clorofórmio 289
3.3.1.7.2. Microscopia electrónica de transmissão 290
3.3.1.7.3. Sensibilidade à 5-bromo-deoxiuridina (5-BDU) 290
3.3.1.7.4. Coloração do ácido nucleico viral 290
3.3.1.7.5. Seroneutralização 291
3.3.1.7.6. Teste "Immunodot" 292
3.3.1.7.7. Caracterização do RNA mediante electroforese em geles de poliacrilamida 293

3.3.2. Resultados 295

3.3.3. Discussão 309

IV. DISCUSSÃO GERAL 315

V. CONCLUSÕES 321

VI. BIBLIOGRAFIA 325

VII. ANEXOS (Protocolos) 355

Anexo 1. Imunofluorescência directa 355

Anexo 2. Padrões electroforéticos e "western blot" de lipopolissacarídeos e de proteínas da envoltura celular 357

Anexo 3. Detecção de plasmídeos 371

Anexo 4. Extracção de DNA 379

Anexo 5. Ribotipagem 387

I. INTRODUÇÃO GERAL

I. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. O ESTADO ACTUAL DA AQUACULTURA PORTUGUESA

Especialmente a partir da adesão do país à Comunidade Económica Europeia, em 1986, a aquacultura em Portugal conheceu uma fase de acentuado desenvolvimento, inicialmente mais em água doce e, depois, prioritariamente no domínio marinho (Gouveia, 1990).

Segundo este autor, a truticultura (culturas de *Salmo trutta* e de *Oncorhynchus mykiss*) representava cerca de 95% da produção total dulciaquícola, tendo sido produzidas 1157 toneladas em 1989 e sendo a previsão da produção para 1990 de 1686 toneladas. Outras espécies de água doce cultivadas incluíam o salmão do Atlântico (*Salmo salar*), carpa (*Cyprinus carpio*), achigã (*Mycropterus salmoides*) e tenca (*Tinca tinca*). As espécies cultivadas em água salgada (robalo, dourada, rodovalho, salmão, camarão, enguia e taínha) distribuiam-se maioritariamente por unidades que praticavam a policultura extensiva (67,5%) ou semi-intensiva (17,5%), sendo apenas de 15% a proporção das unidades que se dedicavam a monoculturas.

Num trabalho mais recente (Gouveia, 1994), o autor refere grandes investimentos em aquacultura, especialmente em unidades marinhas (localizadas principalmente no centro e no sul do país), embora apenas 30% dos projectos subsidiados pela União Europeia tenham atingido a fase de produção, devido a dificuldades várias. Nesta altura, a produção de truta arco-íris (*O. mykiss*) (estimada em 2200 toneladas) constituia cerca de 80% da produção de peixes de água doce, sendo efectuada em 26 truticulturas situadas nas regiões do norte e do centro. Os restantes cerca de 20 % da produção dulciaquícola (611 toneladas) eram referentes à anguilicultura.

1.2. CONDIÇÃO SANITÁRIA DOS PEIXES CULTIVADOS EM PORTUGAL

Apesar do grande desenvolvimento que a aquacultura portuguesa sofreu recentemente, os estudos sanitários das unidades de produção existentes não são abundantes. Por outro lado, a grande maioria das publicações de autores portugueses no domínio da ictiopatologia são referentes a trabalhos de parasitologia; de facto, das cerca de 130 publicações incluídas no índice compilado por Eiras (1990), apenas uma dezena se refere a trabalhos de microbiologia.

Os grandes prejuizos económicos causados pelas doenças, particularmente as doenças contagiosas, nas unidades de aquacultura intensiva levaram à adopção, em muitos países, de medidas legislativas sobre doenças de declaração obrigatória, procedimentos a adoptar quando detectadas e normas a cumprir nos movimentos de animais ou ovos (Eiras *et al.*, 1988). As doenças de declaração obrigatória referentes aos peixes foram definidas em Portugal pela portaria 396/85, de 28 de Junho, e são: as viroses Necrose Pancreática Infecciosa, Necrose Hematopoiética Infecciosa, Septicémia Hemorrágica Viral e Virémia Primaveril da Carpa; as bacterioses Furunculose, Doença Renal Bacteriana e Doença da Boca Vermelha; a parasitose designada por Mixosomose ou Doença do Rodopio, e a parasitose de etiologia ainda não totalmente esclarecida designada por Doença Renal Proliferativa.

No entanto, embora alguns trabalhos de bacteriologia tenham sido publicados, quer de peixes de água doce (Eiras & Saraiva, 1986; Machado-Cruz *et al.*, 1986) quer de água salgada (Grazina-Freitas, 1985; Albuquerque *et al.*, 1986; Menezes, 1991; Menezes *et al.*, 1989, 1991), para além dos estudos regulares que vão sendo efectuados pelo Laboratório Nacional de Investigação Veterinária. apenas um estudo extensivo foi realizado (Eiras *et al.*, 1987) no sentido de determinar se alguma das doenças de declaração obrigatória estava presente em unidades de aquacultura portuguesas. Neste trabalho, os autores efectuaram uma pesquisa das doenças de declaração obrigatória de etiologias bacteriana e parasitária em todas as truticulturas (19) existentes no país. Os resultados de todas as análises efectuadas foram negativos, pelo que os autores concluíram da ausência destas doenças (furunculose, doença renal bacteriana, doença da boca vermelha, doença do rodopio e doença renal proliferativa) e que, por este facto, Portugal se encontrava numa situação muito privilegiada relativamente à generalidade dos outros países europeus. Relativamente às doenças de etiologia viral, também não existe qualquer referência da ocorrência de qualquer delas em Portugal, ao contrário da situação encontrada noutros países da Europa.

Porém, o grande desenvolvimento da aquacultura (Gouveia, 1990, 1994) fazia aumentar consideravelmente os riscos de introdução de microrganismos patogénicos, de modo que não surpreende o facto de ter sido posteriormente detectada uma epizootia de furunculose (Saraiva *et al.*, 1989), que constituía a única doença de peixes de declaração obrigatória detectada em Portugal antes do início do presente trabalho.

1.3. BACTERIOLOGIA EM AMBIENTES DE AQUACULTURA

1.3.1. Comunidade Bacteriana da Água

Não há uniformidade de opiniões sobre a existência ou não de bactérias estritamente aquáticas, sendo a opinião generalizada que a maioria das bactérias que se encontram na água procede do solo por arrastamento pelas águas pluviais, ou, então, de introduções acidentais, sejam naturais ou como consequência directa da actividade humana (Clapés, 1969); o autor usa a expressão "bactérias de ecologia hídrica", a qual não implica qualquer classificação taxonómica determinada, mas admite que, sendo o solo o seu habitat normal, ao encontrarem-se no meio aquático, tais bactérias se adaptaram a novas condições ecológicas. Por outro lado, a maioria das bactérias arrastadas para a água sobrevive nesta por períodos de tempo curtos, devido aos processos de depuração (Guinea *et al.*, 1979).

De qualquer modo, todas as massas de água possuem populações bacterianas, embora estas populações tenham composições muito variáveis, tanto em número de células como em diversidade dos grupos taxonómicos presentes.

Entre os grupos mais importantes de bactérias mais bem adaptadas ao solo e à água, encontram-se bactérias esporuladas, do género *Bacillus*, e estirpes do grupo *Pseudomonas* (por exemplo, *P. aeruginosa*); estas bactérias podem, por vezes, resistir a tratamentos da água com cloro, permanecendo viáveis em águas armazenadas (Guinea *et al.*, 1979). Segundo estes autores, também podemos encontrar nas águas estirpes bacterianas pertencentes aos géneros *Citrobacter* e *Enterobacter* (família *Enterobacteriaceae*), sem que isto signifique necessariamente que estas águas sofreram uma contaminação fecal.

A família *Enterobacteriaceae* é constituida por bactérias que têm em comum o facto de serem bacilos Gram -, oxidase -, anaeróbios facultativos, com flagelação perítrica quando móveis (excepto *Tatumela*, que pode ter flagelos polares, subpolares ou laterais, quando cresce a 25 °C, sendo imóvel a 36 °C; Krieg & Holt, 1984). São bactérias entéricas (isto é, do intestino humano e animal) e, entre muitos outros géneros, incluem *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Escherichia*; estes quatro géneros constituem o grupo dos coliformes, caracterizado pelo potente metabolismo fermentativo da lactose, produzindo gás. A pesquisa de coliformes (embora especialmente de *Escherichia coli*) é feita em estudos destinados à detecção de contaminação fecal das águas, sendo estas bactérias (principalmente *E. coli*) usadas como indicadores da possível presença de outras bactérias, patogénicas para o Homem. No entanto, alguns coliformes, dos géneros *Citrobacter* e *Enterobacter*, têm habitat

natural sobre restos vegetais e solo (e não no intestino, humano ou animal), de modo que podem ser arrastados para a água, onde, evidentemente, não vão constituir uma contaminação fecal. Por esta razão, nos estudos sobre a contaminação fecal das águas procura-se determinar a porção dos coliformes de origem fecal (os que crescem a 44 °C; principalmente *Escherichia* e *Klebsiella*, para além de algumas estirpes de *Citrobacter*) entre os coliformes totais que estão presentes. Uma pequena porção de matéria orgânica presente na água permite a multiplicação dos coliformes não fecais, de modo que estes têm uma presença na água praticamente constante (Guinea *et al.*, 1979).

Por outro lado, convém lembrar que as bactérias entéricas, isto é, presentes no intestino, incluem, para além de membros da família *Enterobacteriaceae* (coliformes e outras, como, por exemplo, *Salmonella*, *Shigella*, *Serratia* e *Proteus/Morganella*), estirpes de outros grupos, como *Vibrionaceae* (por exemplo *Vibrio cholerae*), *Streptococcus* e bactérias anaeróbias (por exemplo, *Clostridium*). Destas, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi* e *S. paratyphi* são as bactérias fecais mais importantes, do ponto de vista de saúde pública humana, que podem utilizar a água como veículo de transporte; também estirpes de *Shigella* o podem fazer, embora a sua viabilidade na água seja inferior à daquelas três espécies (Guinea *et al.*, 1979).

Para além destes grupos, muitos outros géneros bacterianos são referidos como presentes, em diversas ocasiões, em massas de água doce, incluindo *Flavobacterium*, *Achromobacter* (actualmente *Acinetobacter-Moraxella*), *Aeromonas*, *Micrococcus* e *Staphylococcus* (Clapés, 1969; Guinea *et al.*, 1979; Toranzo *et al.*, 1989).

Quanto à carga microbiana presente na água, obviamente que os valores encontrados variam muito, aumentando desde as nascentes (onde, no entanto, não é raro encontrar-se *Pseudomonas aeruginosa*) até à foz dos rios e zonas marinhas costeiras; esta diferença pode ser da ordem dos 4 logaritmos (10000 vezes mais) ou, mesmo, superior, sendo frequente encontrar valores próximos de 10^5 bactérias/ml nestes últimos locais (no mar alto, a carga microbiana volta a descer, para valores não muito diferentes dos encontrados nas nascentes).

Por outro lado, os números de bactérias presentes nos sedimentos são, normalmente, superiores aos de bactérias em suspensão na água em 3-4 logaritmos (ou mais). Isto compreende-se tendo em conta o valor adaptativo da aderência das bactérias e, também, tendo em conta que, no sedimento, há 10-100 vezes mais matéria orgânica do que na água (Guinea *et al.*, 1979).

Porém, o número de bactérias presentes na água superficial é muito flutuante, ocorrendo variações importantes em curtos períodos de tempo (Guinea *et al.*, 1979). Esta abundância bacteriana, bem como a diversidade de grupos, presentes numa determinada massa de água dependem de factores ecológicos numerosos e variados, entre os quais (Clapés, 1969):

1) Transporte - de acordo com a origem telúrica da maioria (ou da totalidade) das bactérias da água, há que ter em conta o transporte destes microrganismos para o meio hídrico (terra, folhas, animais mortos, chuvas, etc.); por exemplo, a queda de grandes chuvas após um período de seca provoca o arrastamento de um grande número de bactérias, embora a continuação destas chuvas dê lugar a uma diluição dos microrganismos.

2) Temperatura - embora cada espécie tenha uma temperatura óptima para a sua multiplicação, observam-se, normalmente, aumentos dos números de bactérias durante a Primavera e o Verão, devido à subida da temperatura (também o aumento da temperatura da água devido a actividades humanas, como as relacionadas com centrais térmicas, provoca, normalmente, um aumento nos números de bactérias). Uma variação importante na temperatura pode provocar fortes alterações nos números de bactérias existentes na água, em apenas algumas horas. Por outro lado, o gelo não tem um efeito letal directo sobre as bactérias, mas paralisa o seu metabolismo, de modo que temperaturas muito baixas podem favorecer a sobrevivência de determinadas espécies.

3) pH - valores extremos de acidez ou alcalinidade podem inibir o crescimento de bactérias ou, mesmo, destruí-las. Os limites de tolerância variam de espécie para espécie (por exemplo, são mais estreitos para *E. coli* do que para bacilos esporulados).

4) Luz solar (radiações UV) - as radiações ultravioleta (radiações UV) têm acção bactericida, embora esta acção só se manifeste em águas claras e calmas, e até pequena profundidade (10-20 cm).

5) Intensidade da corrente e agitação da água - a influência da corrente é notável, tanto sobre as bactérias livres que são arrastadas por ela, como sobre as epibênticas, que, geralmente, se desenvolvem com maior abundância em águas em movimento do que em águas paradas.

6) Sedimentação - nos lagos e albufeiras, e nos grandes rios, a sedimentação tem alguma importância, produzindo-se como consequência do escasso movimento da água.

7) Bacteriófagos - por vezes, ocorrem fortes reduções nos números de bactérias de uma determinada espécie, as quais não podem ser explicadas por outros factores que não os bacteriófagos.

8) Disponibilidade de alimento e sua qualidade - este factor tem importância decisiva na dinâmica das populações bacterianas, tanto em relação com os números de células (abundância) como relativamente às espécies presentes (diversidade). Os requisitos alimentares das bactérias são geralmente muito simples, de modo que, mesmo em águas muito puras, podem manter-se discretas populações (por vezes, até em água destilada); no entanto, qualquer introdução de matéria orgânica ou de substâncias minerais influencia a abundância e a diversidade da comunidade bacteriana, estimulando directamente o crescimento da maioria das espécies presentes (embora este estímulo possa ser maior para umas do que para as outras, dependendo do tipo de matéria introduzida). Por exemplo, a introdução de substâncias tóxicas que matem os animais ou as plantas superiores proporciona um abundante substrato nutritivo adicional, e leva a uma intensa proliferação bacteriana. Todavia, a introdução de substâncias como metais pesados, pesticidas, antibióticos, etc., pode ter, também, um efeito directo sobre as populações bacterianas, matando algumas bactérias e, consequentemente, seleccionando outras (as resistentes a essa substância nociva que foi introduzida). Também é importante o conteúdo em gases dissolvidos, e em particular o oxigénio, cujo nível condiciona decisivamente o desenvolvimento da autodepuração e define as características ecológicas antagónicas de aerobiose e anaerobiose.

Finalmente, a introdução massiva de grandes populações bacterianas, como é o caso de águas residuais domésticas (que, além de bactérias, também têm vírus), faz com que a "população hídrica normal" fique em nítida inferioridade numérica.

1.3.2. Bactérias de Peixes

A generalidade dos trabalhos publicados sobre as bactérias encontradas em peixes tem incidido sobretudo nas superfícies externas (brânquias e tegumento) e no tubo digestivo, apresentando, também, uma comparação com a comunidade bacteriana da água em que esses peixes se encontravam (Horsley, 1973; Sugita *et al.*, 1985; Sakata, 1989). No entanto, alguns estudos têm incluido a análise dos grupos

bacterianos presentes nos órgãos internos dos peixes saudáveis (Nieto *et al.*, 1984; Toranzo *et al.*, 1985, 1993; Cahill, 1990).

Horsley (1973) procurou obter dados que permitissem verificar uma sugestão feita anteriormente em diferentes publicações: a de que os grupos bacterianos encontrados nos peixes são apenas um reflexo da comunidade bacteriana do meio em que eles vivem. Nesse sentido, o autor analisou salmões (*Salmo salar* L.) capturados em diferentes locais, ao longo da sua migração de reprodução; um desses locais estava situado ainda no mar, outro no estuário, e os restantes ao longo do rio; o autor analisou, igualmente, a comunidade bacteriana da água de cada local de amostragem. Os resultados obtidos por Horsley revelaram que a comunidade bacteriana das superfícies externas dos peixes (tegumento e brânquias) era muito semelhante à encontrada na água dos locais em que os peixes tinham sido capturados; por outro lado, o autor refere que esta comunidade bacteriana era diferente de local para local. Estes resultados foram interpretados como indicativos de que, de facto, a comunidade bacteriana das superfícies externas dos peixes constitui um reflexo da encontrada no meio em que estes animais vivem.

Horsley refere, ainda, que os números de bactérias heterotróficas viáveis detectadas foram de cerca de 10^2 a 10^3 por cada mililitro de água. Segundo o autor, estes resultados estão de acordo com os que seriam de esperar, isto é, "os rios na sua zona mais a jusante tendem a ter uma elevada quantidade de matéria orgânica e, portanto, uma abundante população bacteriana, verificando-se o oposto nas zonas de montante".

Os principais grupos bacterianos encontrados por Horsley nos peixes e na água doce foram: *Moraxella*, Corineformes, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Micrococcaceae*, *Flavobacterium-Cytophaga*, *Aeromonas*, *Acinetobacter* e *Bacillus*. Os grupos encontrados na água do mar, bem como nos salmões capturados neste local, foram semelhantes, à excepção da presença de *Vibrio* e da ausência de membros da família *Enterobacteriaceae*.

Sakata (1989) apresenta uma revisão bibliográfica incidindo sobretudo nas técnicas de isolamento bacteriano e na composição taxonómica da comunidade bacteriana normal associada, especialmente, ao tubo digestivo de animais aquáticos. Segundo este autor, várias publicações "demonstram que os grupos bacterianos dos tubos digestivos dos peixes de água doce incluem principalmente espécies de *Aeromonas* e *Plesiomonas*, bem como representantes da família *Enterobacteriaceae*; estes grupos bacterianos estão largamente distribuidos nos meios dulciaquícolas, e pensa-se que sobrevivem e se multiplicam nas condições selectivas do tubo digestivo

dos peixes. Outras espécies bacterianas, que se considera serem derivadas da água e das dietas, incluem *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Moraxella* e *Pseudomonas*, e os seus números de células viáveis decrescem, ou desaparecem completamente, durante a sua passagem pelo tubo digestivo dos peixes". Porém, o autor refere que, ocasionalmente, *Acinetobacter* e *Pseudomonas* têm sido isolados como grupos predominantes desta comunidade bacteriana gastro-intestinal dos peixes, os quais podem ter sido mantidos em condições desfavoráveis (como alimento insuficiente, baixa temperatura ou stress fisiológico) antes de serem analisados.

Sakata (1989) enumera várias publicações que referem um predomínio constante de bactérias fermentativas (*Aeromonas* e *Enterobacteriaceae*, por vezes acompanhadas de *Plesiomonas shigelloides*) no tubo digestivo de salmonídeos vivendo em água doce. O autor refere, no entanto, que os grupos bacterianos dominantes no tegumento e nas brânquias são *Acinetobacter*, *Flavobacterium-Cytophaga*, *Moraxella* e *Pseudomonas*.

O mesmo autor indica, igualmente, os grupos bacterianos normalmente encontrados em peixes marinhos e afirma que estes têm sido estudados em maior detalhe do que os dos peixes de água doce, o que está relacionado com a maior utilização de peixes marinhos na alimentação humana; assim, em estudos efectuados durante os anos 30 e 40, eram referidos *Achromobacter* (= *Acinetobacter-Moraxella*), *Flavobacterium*, *Micrococcus* e *Pseudomonas* como presentes no intestino de peixes marinhos, mas desde Liston (1957, *in* Sakata, 1989) tem sido referido um predomínio, no tubo digestivo destes peixes (pertencentes a variadíssimas espécies), de estirpes do género *Vibrio*. Esta discrepância pode reflectir, segundo Sakata, o diferente grau de frescura das amostras, os métodos de amostragem e os métodos de identificação usados pelos primeiros investigadores. Também Newman *et al.* (1972) encontraram um predomínio de *Vibrio* (28,4%) na comunidade bacteriana intestinal de um peixe marinho (*Pomatomus saltatrix*), seguindo-se-lhe, por ordem decrescente de abundância, *Pseudomonas* (22,4%), *Enterobacteriaceae* (21,4%), *Achromobacter* (18,2%), *Flavobacterium* (1,6%), *Micrococcus* (1,4%) e *Bacillus* (0,9%).

Ainda segundo trabalhos citados por Sakata (1989), os grupos bacterianos aeróbios no intestino de salmonídeos saudáveis eram *Aeromonas* e *Enterobacteriaceae*, se os peixes estavam em água doce, mas quando estes peixes estavam num ambiente marinho, era *Vibrio* o grupo bacteriano predominante. Estes resultados indicam que a comunidade bacteriana normal dos intestinos de animais aquáticos se desenvolve através dos processos de selecção e adaptação de espécies derivadas directamente da água onde os peixes vivem ou, então, das suas dietas; no

entanto, ainda não se sabe quais são os factores biológicos que desempenham o papel mais importante na selecção destes microrganismos (Sakata, 1989).

Também outros autores referem uma comunidade bacteriana mais simples no tubo digestivo de peixes, particularmente salmonídeos, do que nas suas superfícies externas (tegumento e brânquias) e na água em que eles viviam (Nieto *et al.*, 1984; Toranzo *et al.*, 1985; Cahill, 1990). Assim, no tubo digestivo dos peixes analisados, predominavam, invariavelmente, bactérias fermentativas (nomeadamente *Aeromonas* e *Enterobacteriaceae*, por vezes acompanhadas de *Vibrio*); nas superfícies externas dos peixes, bem como na água, o predomínio pertencia, de um modo geral, a bactérias oxidativas: trabalhos referidos por Cahill (1990) indicam *Flavobacterium-Cytophaga*, *Acinetobacter-Moraxella* e *Pseudomonas* como os grupos predominantes na água (onde também estavam representados, no entanto, os grupos fermentativos mais abundantes no tubo digestivo, isto é, *Aeromonas* e *Enterobacteriaceae*); Toranzo *et al.* (1985) indicam o grupo *Pseudomonas-Xanthomonas* como o mais abundante nas brânquias de trutas arco-íris.

Também em *Tilapia zillii* foi encontrada uma comunidade microbiana intestinal (em que predominavam as *Aeromonas* móveis) muito mais simples do que na água doce em que os peixes viviam; nesta, os grupos bacterianos mais abundantes eram *Flavobacterium* e *Pseudomonas*. Em peixes desta mesma espécie, cultivados em água salgada, os grupos bacterianos predominantes no tubo digestivo eram *Vibrio* e *Aeromonas*, sendo *Pseudomonas* o mais abundante na água (Cahill, 1990).

Como vimos, em geral, os trabalhos consultados referem que a comunidade bacteriana das superfícies externas dos peixes (tegumento e brânquias) reflete, em grande extensão, aquela que está presente na água em que esses peixes vivem. Segundo Sakata (1989), a comunidade bacteriana que ocorre nas superfícies externas e no tubo digestivo dos animais aquáticos deve ser considerada como uma comunidade residente, e não como uma comunidade autóctone como existe nas superfícies externas dos mamíferos, pois é largamente dependente daquela que se encontra no meio ambiente onde vive o animal.

Por outro lado, a maioria dos autores encontrou uma comunidade bacteriana no tubo digestivo dos peixes estudados muito menos diversificada do que a da água, consistindo essencialmente em bactérias fermentativas; esta, porém, é considerada como derivada da comunidade bacteriana da água e dos alimentos. Esta comunidade poderá, no entanto, contribuir para a nutrição e processos fisiológicos dos hospedeiros, produzindo vitaminas, enzimas digestivas e metabolitos, de modo semelhante ao que se observa nos mamíferos (embora o papel desta comunidade bacteriana intestinal dos

peixes seja variável de espécie para espécie); adicionalmente, estas bactérias dos animais aquáticos ocupam habitats nas suas superfícies externas e tubos digestivos, geralmente evitando o crescimento de microrganismos patogénicos. Todavia, são necessários mais estudos para clarificar os significados ecológico e fisiológico da comunidade bacteriana normal dos animais aquáticos (Sakata, 1989; Cahill, 1990).

Cahill (1990) refere alguns trabalhos cujos autores concluiram que as bactérias isoladas da superfície de exemplares de *Scophtalmus maximus* não refletem de perto a comunidade bacteriana da água (salgada) dos tanques. A explicação para esta situação poderá residir, segundo a autora, no facto de, nestes trabalhos, a identificação ter sido feita até à espécie, utilizando um número muito grande de caracteres, enquanto que a generalidade dos trabalhos que referem uma similaridade estreita entre as comunidades microbianas das superfícies dos peixes e da água fazer as identificações apenas até ao género ou, mesmo, até uma categoria taxonómica mais elevada. De facto, embora a nível genérico as comunidades bacterianas da água e dos peixes possam ser idênticas, é possível a existência de diferenças importantes a nível específico ou, até, infra-específico; por exemplo, Austin (1982, *in* Cahill, 1990), utilizando técnicas de taxonomia numérica, encontrou estirpes bacterianas que foram isoladas exclusivamente da superfície de peixes saudáveis. Portanto, a identificação só até ao género ou até uma categoria taxonómica mais elevada pode simplificar demasiado a realidade.

Por outro lado, o muco presente nas brânquias, no tegumento e no tubo digestivo dos peixes contém lisozima e imunoglobulinas, entre outras substâncias, as quais, presumivelmente, actuam como mecanismos de defesa contra bactérias (Peleteiro & Richards, 1985; Lindsay, 1986; Austin & McIntosh, 1988; Cahill, 1990); este facto pode, também, contribuir para a existência de diferenças nas comunidades bacterianas dos peixes e da água. Fouz *et al.* (1990) referem, inclusivé, diferenças nos espectros antibacterianos do muco em diferentes espécies de peixes, o que, indubitavelmente, influencia os grupos bacterianos susceptíveis de serem encontrados naqueles exemplares.

Para além da água em que vivem, o alimento consumido pelos peixes também tem influência na comunidade bacteriana do tubo digestivo destes. Por exemplo, Nieto *et al.* (1984) verificaram que os números de *Pseudomonas*, *Aeromonas* e *Enterobacteriaceae* que isolaram, mensalmente, de peixes, apresentavam uma correlação com os números isolados da água, mas que isso não se verificou relativamente aos cocos Gram + (principalmente *Staphylococcus*); os autores admitem a possibilidade de que os elevados números detectados nos peixes e a ausência de

correlação destes números com os encontrados na água tenham ficado a dever-se ao manuseamento dos peixes e ao fornecimento de alimento contaminado com estas bactérias. Também Inglis *et al.* (1993) referem a infecção de várias espécies de peixes selvagens por *Streptococcus* sp., bem como a sobrevivência, durante 6 meses, de bactérias deste grupo em peixes (*Ammodytes personatus*) congelados, os quais iriam ser usados na alimentação de peixes cultivados.

Cahill (1990) refere outros estudos, nos quais foi concluido que a comunidade bacteriana intestinal em peixes com tubo digestivo relativamente pouco desenvolvido reflete a comunidade bacteriana da água e do alimento, enquanto que, em peixes com tubo digestivo mais especializado, este possui uma comunidade microbiana distinta, resistente, nomeadamente, à bílis e a valores de pH baixos (5,5).

Também o uso de antibióticos em aquacultura pode causar modificações na composição da população microbiana gastro-intestinal (Austin & Al-Zahrani, 1988; Cahill, 1990); a inibição das bactérias sensíveis a esses antibióticos permite que estas sejam substituidas por outras, resistentes a esses compostos químicos. Este facto sugere, também, que a presença da comunidade microbiana normal impede a colonização do tubo digestivo por outras bactérias (Cahill, 1990).

O fígado, os rins e o baço deveriam ser estéreis nos peixes saudáveis (Nieto *et al.*, 1984; Cahill, 1990), podendo a presença de bactérias nestes órgãos ser indicativa de uma "quebra" nos mecanismos de defesa imunológica, resultante de algum factor de stress, como má qualidade da água, valores de temperatura diferentes do óptimo para a espécie, deficiências nutricionais, densidades populacionais demasiado elevadas. traumatismos, parasitismo ou infecções primárias de origem vírica (Cahill, 1990).

Apesar disso, há algumas referências de isolamentos de bactérias de órgãos internos de peixes aparentemente saudáveis (Nieto *et al.*, 1984; Lindsay, 1986; Cahill. 1990). Estes microorganismos tiveram, de algum modo, de ter vencido os mecanismos de defesa do peixe (Cahill, 1990).

Nieto *et al.* (1984) isolaram, do fígado e dos rins de trutas arco-íris cultivadas em duas truticulturas galegas, estirpes de *Pseudomonas-Xanthomonas*, *Aeromonas* móveis, *Vibrio*, *Flavobacterium-Cytophaga*, *Enterobacteriaceae* e cocos Gram +.

Toranzo *et al.* (1985) isolaram, também do fígado e dos rins de trutas arco-íris cultivadas em duas truticulturas galegas, estirpes de *Pseudomonas-Xanthomonas*, *Vibrio*, *Acinetobacter-Moraxella*, *Enterobacteriaceae*, cocos Gram + e "Corinebactérias".

Em peixes marinhos (rodovalhos), Toranzo *et al.* (1993) verificaram que as bactérias existentes nos órgãos internos de exemplares aparentemente saudáveis, embora incluindo uma considerável variedade de grupos taxonómicos, consistiam principalmente em estirpes de *Vibrio* e de *Pseudomonas* (pelo menos 80% das estirpes isoladas, em cada uma das três pisciculturas estudadas). Curiosamente, nos rodovalhos doentes analisados pelos autores, estes dois géneros bacterianos eram, também, os mais representados (no entanto, nos exemplares doentes houve, nitidamente, uma maior presença de *Vibrio anguillarum* do que nos exemplares aparentemente saudáveis).

É importante que tenhamos bem presente que os métodos bacteriológicos utilizados normalmente apenas permitem detectar bactérias aeróbias ou anaeróbias facultativas. Porém, a comunidade microbiana intestinal dos peixes inclui, também, bactérias anaeróbias estritas (Trust *et al.*, 1979; Sakata, 1989; Cahill, 1990). Esta, embora variada, inclui, geralmente, *Bacteroides*, *Eubacterium* e *Fusobacterium* (Trust *et al.*, 1979). *Bacteroides* parece, contudo, constituir o grupo de bactérias anaeróbias estritas mais frequentemente detectado no tubo digestivo de peixes, quer estes se encontrem em água doce, quer em água salgada (Sugita *et al.*, 1985; Sakata, 1989; Cahill, 1990).

Algumas espécies bacterianas têm sido encaradas como espécies patogénicas obrigatórias, diferindo, assim, da generalidade das espécies, encaradas como patogénicas oportunistas, que vivem no meio ambiente e causam doença apenas quando condições de stress diminuem as defesas dos peixes. Dentro da categoria de bactérias patogénicas obrigatórias para os peixes têm sido incluídas *Yersinia ruckeri* e *Aeromonas salmonicida*. No entanto, alguns trabalhos parecem indicar que a incapacidade de detectar estas espécies em amostras ambientais (água ou sedimento) tem sido devida a uma inadequação dos métodos usados na amostragem ou no tratamento das amostras (Michel & Dubois-Darnaudpeys, 1980; McIntosh & Austin, 1990; Romalde, 1992; Romalde *et al.*, 1994b; Ford, 1994).

1.3.3. Controle de Doenças de Etiologia Bacteriana e Resistência a Substâncias Antimicrobianas

De entre os vários meios de controle de doenças, é evidente que, sempre que possível, se devem escolher os profiláticos, como o uso de práticas correctas de actuação nas pisciculturas (por exemplo, a manutenção de uma boa qualidade da água, a desinfecção de todo o equipamento e utensílios usados, especialmente quando ocorrem epizootias, e a desinfecção rotineira dos ovos que são provenientes de outras

instalações aquícolas, bem como a diminuição, ao mínimo possível, de todos os factores que provocam stress aos peixes), a preferência pela cultura de espécies ou "stocks" de peixes resistentes à doença (quando realizável, pois, por vezes, um determinado "stock" ou espécie de peixes é resistente a uma doença mas não o é a outras que ocorrem na mesma zona) (Cipriano, 1983; Gjedrem *et al.*, 1991; Houghton *et al.*, 1991; Fevolden *et al.*, 1992; Austin & Allen-Austin, 1993; Wiegertjes *et al.*, 1993) ou o desenvolvimento de vacinas eficazes (Munro, 1982; McCarthy & Roberts, 1980; Austin & Allen-Austin, 1993). Seguramente, porém, que a melhoria das práticas de actuação nas pisciculturas será difícil de conseguir em sistemas de aquacultura intensiva (Busch, 1983; Romalde, 1992; Furones *et al.*, 1993). Em áreas onde uma doença está confinada geograficamente a zonas determinadas, a prevenção da sua disseminação pode ser conseguida mediante a implantação de inspecções sanitárias nas pisciculturas e o estabelecimento de normas reguladoras do movimento dos peixes (Busch, 1983; Romalde, 1992; Austin & Allen-Austin, 1993; Furones *et al.*, 1993). Muitas vezes, porém, é necessário recorrer a métodos terapêuticos, nomeadamente o uso de compostos antimicrobianos, os quais devem ser acompanhados pela correcção do(s) eventual(ais) factor(es) de stress (seja ambiental, seja fisiológico) que possa(m) ter sido responsável(is) pela precipitação da epizootia; esta necessidade é especialmente premente quando a substância antimicrobiana utilizada tem um efeito bacteriostático sobre o microrganismo invasor (Munro, 1982; McCarthy & Roberts, 1980; Austin & Allen-Austin, 1993).

O uso intensivo de compostos antibacterianos tem, infelizmente, um efeito negativo importante, que consiste no desenvolvimento de resistências das bactérias a estas substâncias; mais grave, ainda, é o desenvolvimento de resistências múltiplas, a dois ou mais agentes quimioterápicos (McCarthy & Roberts, 1980; Munro, 1982; Austin & Allen-Austin, 1993; Inglis *et al.*, 1993) ou o aumento da frequência de plasmídeos R (plasmídeos R, ou factores R, são plasmídeos que codificam resistência a um ou mais antibióticos e/ou outras substâncias antimicrobianas, incluindo, por exemplo, metais pesados).

Por outro lado, esta resistência a agentes antimicrobianos, bem como outras propriedades mediadas por plasmídeos (como virulência ou produção de enterotoxinas), pode ser transferida para outras bactérias, relacionadas ou não com as primeiras. Assim, a presença de plasmídeos passíveis de serem transferidos por conjugação a outras bactérias constitui um problema, não apenas para as pisciculturas em si, mas também para a saúde pública humana, uma vez que estes plasmídeos podem ser transferidos para bactérias patogénicas para o Homem, eventualmente presentes nos tanques das pisciculturas (Toranzo *et al.*, 1983a, 1984).

Outro aspecto da quimioterapia tem a ver com a presença dos quimioterápicos utilizados nos tecidos dos peixes, de modo que é necessário que, após a conclusão do tratamento, se aguarde um período de tempo adequado antes que o peixe possa ser vendido para consumo humano. Isso permitirá a eliminação total do composto activo, e seus metabolitos, dos tecidos do peixe (Jacobsen, 1989).

Tendo em conta todos os problemas inerentes à quimioterapia em aquacultura, Inglis *et al.* (1993) afirmam que é desejável uma situação em que se possa usar, efectivamente, uma grande variedade de substâncias antibacterianas (o seu uso deve ser legalmente permitido), mas na qual a necessidade do seu uso seja mínima.

Vários autores referem diferentes aspectos da resistência de bactérias a substâncias antimicrobianas (Hayashi *et al.*, 1982; Krieg & Holt, 1984; Toranzo *et al.*, 1984, 1985, 1992, 1993; Ledo *et al.*, 1987; DePaola *et al.*, 1995).

DePaola *et al.* (1995) estudaram os efeitos da oxitetraciclina, fornecida a peixes-gato juntamente com o alimento, sobre a resistência de bactérias Gram - (isoladas do tubo digestivo dos peixes e da água dos tanques) à tetraciclina. Usando tanques onde anteriormente não tinha sido usado qualquer antibiótico, os autores verificaram que as percentagens de bactérias resistentes à tetraciclina aumentaram significativamente após 10 dias de tratamento com o alimento medicado com oxitetraciclina. Porém, numa série de experiências, as percentagens de bactérias resistentes à tetraciclina regressaram a um nível semelhante ao de antes do tratamento, 21 dias depois de este ter terminado; noutra série de experiências (realizadas na Primavera), as percentagens de resistência também diminuiram depois de terminar o tratamento com alimentos medicados, mas mantiveram-se mais elevadas do que inicialmente (antes do início do tratamento), durante, pelo menos, 21 dias nas bactérias do tubo digestivo dos peixes e 5 meses nas bactérias da água. Os autores concluiram, ainda, que, na série de experiências realizadas na Primavera, o tratamento com oxitetraciclina poderá ter acelerado uma modificação nas percentagens relativas das diferentes espécies bacterianas, no sentido de uma maior prevalência de membros da família *Enterobacteriaceae*.

Toranzo *et al.* (1984) usaram 10 antibióticos (cloranfenicol, estreptomicina, tetraciclina, gentamicina, kanamicina, eritromicina, ampicilina, ácido nalidíxico, sulfadiazina e nitrofurantoína) e verificaram que a resistência à sulfadiazina estava distribuida uniformemente por todos os grupos bacterianos mais representativos (*Pseudomonas-Xanthomonas*, *Aeromonas*, *Enterobacteriaceae*, *Vibrio* e Cocos Gram +), o que, segundo os autores, confirma o já conhecido pequeno valor deste antibiótico

para uso nos sistemas de aquacultura. Pelo contrário, a resistência ao cloranfenicol e à nitrofurantoína estava associada principalmente ao grupo das *Pseudomonas-Xanthomonas*, no qual o perfil de resistências mais comum era ampicilina-eritromicina-cloranfenicol-nitrofurantoína-ácido nalidíxico (embora se observassem desde perfis de resistência a apenas um - o cloranfenicol - até sete antibióticos diferentes). Ledo *et al.* (1987), utilizando ampicilina, cloranfenicol, tetraciclina, ácido oxolínico, flumequina, nitrofurantoína e nitrofurazona (para além do agente vibriostático O/129), verificaram que as suas estirpes de *Pseudomonas* (*P. fluorescens*) eram resistentes a todos estes compostos. Também Toranzo *et al.* (1993), usando 9 compostos antimicrobianos (ampicilina, tetraciclina, oxitetraciclina, cloranfenicol, estreptomicina, ácido oxolínico, trimetoprim-sulfametoxazol, nitrofurantoína e penicilina G), observaram que uma grande porção das estirpes de *Pseudomonas*, isoladas de rodovalhos, eram "resistentes às drogas normalmente usadas em aquacultura", o que, segundo os autores, "parece ser uma característica comum nas estirpes deste grupo isoladas em pisciculturas". Estes resultados são bem indicativos das dificuldades que traz o tratamento de septicémias causadas por *Pseudomonas* (Ledo *et al.*, 1987; Toranzo *et al.*, 1992, 1993).

No grupo das *Aeromonas*, Toranzo *et al.* (1984) encontraram desde uma resistência apenas à ampicilina até resistências múltiplas a 5 substâncias antibacterianas, sendo o perfil mais frequente a resistência simultânea à ampicilina e à sulfadiazina; a resistência à ampicilina constitui, no entanto, uma característica da maioria das *Aeromonas* móveis (Toranzo *et al.*, 1989; Carnahan *et al.*, 1991; DePaola *et al.*, 1995). Ledo *et al.* (1987) detectaram resistências à tetraciclina e ao cloranfenicol, chamando a atenção para o facto de serem resistências susceptíveis de serem codificadas por plasmídeos. Curiosamente, Toranzo *et al.* (1992) referem a grande sensibilidade das estirpes de *A. hydrophila* (mas não de *A. sobria*) a estes dois antibióticos, para além de uma sensibilidade, também muito elevada, de todas as *Aeromonas* móveis ao ácido oxolínico.

Relativamente às *Enterobacteriaceae*, Toranzo *et al.* (1984) observaram a existência de resistências múltiplas, embora não tenham detectado um perfil de resistências claramente predominante neste grupo.

Toranzo *et al.* (1984, 1985) estudaram 96 estirpes, de diferentes espécies bacterianas, no sentido de detectarem factores R susceptíveis de serem transferidos a outras bactérias (por conjugação), tendo verificado que 9 daquelas estirpes foram capazes de doar tais factores de resistência a estirpes de *Escherichia coli*. Destas 9 estirpes doadoras, 1 pertencia a *Aeromonas*, 2 a *Vibrio* e 6 eram da família

Enterobacteriaceae (3 do género *Citrobacter* e 3 de *Enterobacter*). A maioria das 9 estirpes transferiu resistências ao cloranfenicol e à sulfadiazina, embora também tenha sido transferida resistência à tetraciclina e à estreptomicina, em diferentes associações. Por outro lado, estes autores não detectaram a transferência de qualquer perfil de resistências nos grupos *Pseudomonas-Xanthomonas*, *Flavobacterium-Cytophaga* e *Acinetobacter-Moraxella*, embora reconheçam que o facto de apenas nove estirpes terem expressado o seu potencial de transferência não exclui, de modo nenhum, a possibilidade de que um maior número de estirpes o tivesse feito se as experiências tivessem sido realizadas noutras condições ou com outras estirpes receptoras.

Toranzo *et al.* (1984) afirmam terem realizado as experiências de conjugação a 25 °C pelo facto de as frequências de transferência mais elevadas ocorrerem a temperaturas de 20-25 °C; este fenómeno aumenta, pois, o potencial de disseminação dos factores R na maioria dos sistemas aquáticos.

1.4. VÍRUS DE PEIXES

De todas as doenças de origem microbiológica que têm lugar em peixes cultivados, as de etiologia viral revestem-se de uma importância especial, devido à ausência de um tratamento eficaz e ao facto de os sobreviventes se converterem, geralmente, em portadores assintomáticos, eliminando o vírus através das fezes, da urina e dos produtos sexuais (Wolf, 1988; Rivas, 1994; Romalde & Toranzo, 1995).

Devido, por um lado, ao grande desenvolvimento da aquacultura e, por outro lado, às técnicas de culturas celulares e obtenção de linhas celulares de peixes, desde os anos 50 que têm vindo a descobrir-se diferentes vírus nas instalações aquícolas. Alguns destes, neste momento, são já bem conhecidos e estão bem caracterizados, tendo sido implicados como os agentes etiológicos de doenças específicas. Outros, todavia, foram detectados exclusivamente através de microscopia electrónica em tecidos de peixes infectados; em alguns casos, inclusivé, apenas foi possível determinar a existência, nesses tecidos, de "partículas semelhantes a vírus" ("virus-like particles") (Wolf, 1982; McAllister, 1988; Ledo, 1990; Dopazo, 1991; Romalde & Toranzo, 1995).

McAllister (1988), Ledo (1990) e Romalde & Toranzo (1995) apresentam listagens dos diferentes vírus com importância em aquacultura, bem como uma descrição de cada um deles. Para além de vários vírus ainda não classificados,

causadores de doenças em peixes pertencentes a diversas espécies, estes agentes etiológicos distribuem-se pelas seguintes famílias:

A) *Adenoviridae* - vírus icosaédricos, sem envoltura lipoproteica (vírus não envoltos), com 70-90 nm de diâmetro; o seu genoma consiste numa molécula de DNA bicatenário e possuem, pelo menos, 10 proteínas estruturais; alguns são oncogénicos, e alguns requerem vírus ajudantes ("helper") para a sua replicação; esta, bem como a montagem das partículas virais, ocorre no núcleo das células infectadas, constituindo a destruição destas o modo de libertação dos viriões (McAllister, 1988; Murphy & Kingsbury, 1990).

Os Adenovírus são conhecidos, principalmente, pelas suas longas infecções e infecções latentes, facilmente activadas, em mamíferos (género *Mastadenovirus* = adenovírus de mamíferos) e em aves (género *Aviadenovirus* = adenovírus de aves) (Murphy & Kingsbury, 1990).

Quatro agentes semelhantes a adenovírus foram reconhecidos em peixes (por microscopia electrónica), embora não tenham sido isolados, em associação com doenças crónicas em esturjões cultivados (*Acipenser* sp.), com hiperplasias epidérmicas em bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*) e em *Gaidopsaurus mediterraneus*, e, ainda, com a "doença do morango" ("strawberry disease") na truta arco-íris (McAllister, 1988; Ledo, 1990; Murphy & Kingsbury, 1990).

B) *Herpesviridae* - são vírus com uma nucleocápside icosaédrica de 100 nm de diâmetro, possuindo uma envoltura lipoproteica (vírus envoltos) complexa, o que faz aumentar o diâmetro da partícula viral para 150-200 nm; o seu genoma consiste numa molécula de DNA bicatenário (120-200 Kbp), que se encontra enrolado sobre um "núcleo" constituido por um rolo fibrilar; os viriões possuem mais de 30 proteínas estruturais; a replicação tem lugar no núcleo das células infectadas, e as cápsides adquirem a porção lipídica da sua envoltura a partir de material da membrana nuclear; a libertação dos vírus ocorre por exocitose, após transporte em vesículas membranosas através do citoplasma, por fusão destas com a membrana citoplasmática; alguns herpesvírus induzem neoplasia, e muitos deles, se não todos, persistem no seu hospedeiro durante toda a vida deste (McAllister, 1988; Murphy & Kingsbury, 1990).

Em peixes, foram descritos 12 herpesvírus, isolados de várias espécies de peixes, incluindo salmonídeos do género *Oncorhynchus*, peixe gato (*Ictalurus punctatus*), carpa (*Cyprinus carpio*), lúcio (*Esox lucius*), *Stizostedium vitreum*, rodovalho

UNIVERSIDADE DO PORTO
FACULDADE DE CIÊNCIAS
BIBLIOTECA

(*Scophthalmus maximus*), bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*) e um tubarão do género *Mustelus* (McAllister, 1988; Ledo, 1990).

Entre os Herpesvírus de peixes, encontram-se o vírus dos silurídeos (CCV), o "*Herpesvirus salmonis*" (HS), o "*Herpesvirus cyprini*" (CHV) e os Herpesvírus dos salmões do Pacífico, do Japão (OMV, Nevta e YTV). Destes, o CCV e o HS, embora provocando poucos sintomas, (alguns casos de exoftalmia e distensão abdominal), podem produzir elevadas mortalidades; os restantes vírus desta família, embora possam provocar o aparecimento de sintomas bem evidentes, raramente são fatais (Romalde & Toranzo, 1995).

C) *Iridoviridae* - vírus com uma nucleocápside icosaédrica, envoltos, com diâmetro total de 125-300 nm; o genoma consiste numa molécula de DNA bicatenário (150-350 Kbp); existem mais de 20 proteínas estruturais em cada virião; a replicação ocorre no citoplasma das células infectadas, e a libertação das partículas virais pode envolver, ou não, a destruição celular (McAllister, 1988; Murphy & Kingsbury, 1990).

McAllister (1988) e Ledo (1990) descrevem algumas doenças de peixes provocadas por iridovírus, que afectam muitas espécies, pertencentes a várias famílias, entre as quais salmonídeos (várias espécies), anguilídeos (*Anguilla japonica*), percídeos (*Perca fluviatilis*) e gadídeos (*Gadus morhua*). Romalde & Toranzo (1995) referem que 8 Iridovírus de peixes foram isolados em culturas celulares e outros 3 foram observados apenas em microscopia electrónica. Estes autores afirmam que os vírus desta família provocam uma larga gama de síndromes, desde doenças mortais até benignas e infecções inaparentes. Os vírus deste grupo que apresentam uma distribuição mundial mais ampla são o vírus da Linfociste, o vírus da Necrose Eritrocítica (VEN) (que afecta principalmente espécies marinhas, e nunca foi isolado em culturas celulares) e o vírus da Necrose Hematopoiética Epizoótica (que provoca graves mortalidades em truta e perca, na Austrália).

D) *Paramyxoviridae* - nucleocápside (diâmetro de 12-18 nm) enrolada em espiral dentro da envoltura lipoproteica, que é pleomórfica (diâmetro total de 150-300 nm); o genoma consiste numa molécula de RNA monocatenário, de sentido negativo, com 16-20 quilobases; a replicação ocorre no citoplasma, e a envoltura lipídica é adquirida a partir de material da membrana citoplasmática das células infectadas (Murphy & Kingsbury, 1990).

Ledo (1990) indica como exemplo de vírus desta família isolados de peixes o paramixovírus de salmão (*Oncorhynchus tshawytscha*).

E) *Birnaviridae* - vírus com nucleocápside icosaédrica, não envoltos, e cujo diâmetro é de cerca de 60 nm; o genoma consiste em 2 segmentos lineares de RNA bicatenário (no total, 7 Kbp); os viriões possuem 4 polipéptidos estruturais principais, incluindo uma transcriptase; a replicação e a montagem ocorre no citoplasma, enquanto que a libertação tem lugar através da destruição das células infectadas (Murphy & Kingsbury, 1990).

Nesta família estão incluidos o Vírus da Infecção da Bolsa (de Fabricius) da galinha, o Vírus X da mosca do vinagre (*Drosophila melanogaster*) e vários birnavírus aquáticos, nomeadamente Vírus da Necrose Pancreática Infecciosa (IPNV e "IPNV-like") de peixes, crustáceos e moluscos aquáticos (McAllister, 1988; Ledo, 1990; Murphy & Kingsbury, 1990).

F) *Rhabdoviridae* - viriões baciliformes (rabdovírus de plantas) ou em forma de bala, com 70-85 nm de diâmetro e 130-380 nm (geralmente, 180 nm) de comprimento; cada virião consiste numa nucleocápside, enrolada numa forma exactamente cilíndrica, dentro de uma envoltura lipoproteica; o genoma consiste numa molécula de RNA monocatenário de sentido negativo (13-16 Kb); existem 4-5 polipéptidos principais, incluindo uma transcriptase; a replicação ocorre no citoplasma (Murphy & Kingsbury, 1990).

Em peixes, foram isolados 12 rabdovírus (McAllister, 1988), que provocam doenças em várias espécies, entre as quais várias espécies de salmonídeos, carpa, enguias, lúcio, perca e bacalhau do Atlântico (McAllister, 1988; Ledo, 1990).

Os Rabdovírus que provocam as perdas económicas mais importantes na aquacultura em águas doces são o vírus da Necrose Hematopoiética Infecciosa ("Infeccious Hematopoietic Necrosis Virus"; IHNV) e o vírus da Septicémia Hemorrágica Viral ("Viral Hemorrhagic Septicemia Virus"; VHSV; também conhecido como Egtved Virus) (Romalde & Toranzo, 1995). As doenças provocadas por estes vírus, juntamente com a IPN (causada por IPNV; família *Birnaviridae*), são consideradas as três doenças virais que causam mortalidades mais severas em salmonídeos cultivados (Sanz & Coll, 1992). Outros Rabdovírus, que têm uma repercussão económica menor, são os Rabdovírus das enguias (EVA e EVEX), o vírus da Virémia Primaveril da Carpa ("Spring Viraemia of Carp Virus"; SVCV; ou *Rhabdovirus carpio*) e o *Rhabdovirus olivaceus* (ou *R. hirame*; HRV) (Romalde & Toranzo, 1995).

G) *Reoviridae* - são vírus não envoltos, apresentam duas cápsides com simetria icosaédrica e têm um diâmetro de 60-80 nm; o genoma é constituido por RNA bicatenário dividido em 10 a 12 segmentos (consoante os géneros), com 16 a 27 Kbp (variável consoante os géneros); têm 10-12 polipéptidos estruturais (tantos quantos os segmentos de RNA), possuindo uma transcriptase e outras enzimas; a replicação e a montagem têm lugar no citoplasma das células infectadas (McAllister, 1988; Ledo, 1990; Murphy & Kingsbury, 1990).

Os membros desta família são numerosos e infectam uma ampla gama de hospedeiros (plantas, insectos, mamíferos, aves, peixes e moluscos aquáticos), e distribuem-se por vários géneros (que se distinguem uns dos outros por pormenores físico-químicos e morfológicos). A maior parte dos reovírus produz infecções que não dão lugar a um quadro patológico específico de doença, nem a mortalidade no hospedeiro (McAllister, 1988; Ledo, 1990). No entanto, os Reovírus estão a adquirir uma grande importância, devido ao crescente número de membros deste grupo que têm sido isolados de várias espécies de peixes, incluindo salmonídeos (*Salmo salar* e *Oncorhynchus keta*), peixe gato, carpa (*Ctenopharyngodon idella*), robalo americano (*Morone saxatilis*), tenca (*Tinca tinca*), escalo (*Leuciscus cephalus*) e, ainda, de moluscos (ostra americana, *Crassostrea virginica*) e crustáceos (*Carcinus mediterraneus* e *Penaeus monodon*) (McAllister, 1988; Ledo, 1990; Romalde & Toranzo, 1995).

Como exemplos de vírus desta família, podemos citar o Reovírus do Rodovalho (TRV), isolado recentemente na Galiza, o Reovírus do Robalo Americano, *Morone saxatilis*, ("Striped Bass Rotavirus"; SBR) e vários Reovírus de Salmão Atlântico (ASR) (da costa leste dos Estados Unidos da América) e de Salmão "Chum" do Japão. Estes vírus, que pertencem ao género *Aquareovirus*, não têm causado grandes perdas económicas, e as alterações patológicas externas que provocam são muito reduzidas (Dopazo *et al.*, 1990; Romalde & Toranzo, 1995).

H) *Retroviridae* - vírus envoltos, com uma cápside icosaédrica que contém uma nucleocápside provavelmente helicoidal; o diâmetro dos viriões é de 80-130 nm; o genoma consiste em duas moléculas, idênticas, de RNA monocatenário, de sentido positivo; cada subunidade de RNA contém 3,5-9 kb (consoante o vírus); os vírus têm 7 polipéptidos principais, incluindo uma transcriptase reversa (DNA-polimerase dependente de RNA); a replicação do RNA é única - este serve como molde para a síntese de DNA viral através da acção da transcriptase reversa presente no vírus, seguindo-se a digestão da cadeia de RNA e a sua substituição por uma nova cadeia de DNA, que entretanto é sintetizada -; este DNA

bicatenário, produzido a partir do RNA monocatenário do vírus, é circularizado, integrado no DNA da célula hospedeira, e, então, usado para a transcrição (incluindo a síntese do RNA que irá constituir o genoma dos novos viriões); a maior parte dos Retrovírus é oncogénica (Murphy & Kingsbury, 1990).

Em peixes, os Retrovírus foram associados a 9 doenças neoplásicas, observadas em salmão do Atlântico, lúcio, *Stizostedium vitreum*, *Catostomus commersoni* e *Xiphophorus* sp. (McAllister, 1988; Ledo, 1990). No entanto, os vírus foram apenas observados em microscópio electrónico, não tendo sido isolados; todavia, a actividade da transcriptase reversa foi demonstrada em algumas ocasiões (McAllister, 1988).

Romalde & Toranzo (1995) referem a descoberta recente em peixes de um outro grupo de vírus RNA de pequeno tamanho, presumivelmente da família *Picornaviridae*. Estes agentes foram encontrados em várias espécies (incluindo salmonídeos) de peixes cultivados, quer em águas continentais, quer marinhas (da Europa, dos Estados Unidos da América e do Japão); no entanto, não foram isolados em culturas celulares, tendo sido estudados apenas por microscopia electrónica. A doença que produzem caracteriza-se por afectar o sistema nervoso central, ocorre nas fases larvares (1° ou 2° mês) e causa mortalidades que chegam a 80-90% da população.

1.5. MICRORGANISMOS PATOGÉNICOS PARA PEIXES, DE DECLARAÇÃO OBRIGATÓRIA

1.5.1. *Aeromonas salmonicida*

1.5.1.1. Considerações Históricas

A bactéria actualmente conhecida como *Aeromonas salmonicida* é uma das bactérias patogénicas para peixes descritas há mais tempo. A primeira referência segura desta espécie data de 1894, quando Emmerich & Weibel a isolaram de trutas comuns doentes, obtidas de uma truticultura alemã, dando-lhe o nome de "Bacillus der Forellenseuche", isto é, "Bacilo da Doença Contagiosa de Trutas". Vários trabalhos anteriores sugerem, porém, a ocorrência anterior deste microorganismo, embora as insuficientes descrições das doenças observadas não permitam ter a certeza disso (McCarthy & Roberts, 1980; Austin & Allen-Austin, 1993; Inglis *et al.*, 1993).

Pouco depois da referência de Emmerich & Weibel, esta bactéria foi classificada no género *Bacterium* por Lehmann & Newmann (1896, *in* Austin & Allen-

Austin, 1993). No entanto, vários outros nomes (como, por exemplo, *Bacillus devorans*, *Bacterium salmonica*, *Bacterium truttae* e *Bacillus salmonicida*) foram utilizados posteriormente para designar esta espécie, antes de Griffin, Snieszko & Friddle, em 1953, a transferirem para o género *Aeromonas*, então classificado na família *Pseudomonadaceae* (Krieg & Holt, 1984; Austin & Allen-Austin, 1993; Inglis *et al.*, 1993). Posteriormente, o género *Aeromonas* foi transferido para a família *Vibrionaceae*, na qual continua, segundo alguns autores (Krieg & Holt, 1984; Inglis *et al.*, 1993), embora outros autores (Board *et al.*, 1992; Austin & Allen-Austin, 1993) retenham a classificação deste género na sua própria família, *Aeromonadaceae*, proposta por Colwell *et al.* (1986).

Com base em algumas diferenças relativamente à definição do género *Aeromonas*, incluindo a imobilidade e a não produção de gás de glucose, mas produção de gás de manitol, Smith (1963, *in* Austin & Allen-Austin, 1993) propôs a transferência da espécie *A. salmonicida* para um novo género, *Necromonas*, como *N. salmonicida*. Porém, segundo Austin & Allen-Austin (1993), "muitas vezes, em sistemática bacteriana, é uma decisão difícil determinar o grau de variação que se pode permitir dentro da definição de uma espécie ou género, antes que se trace a linha de demarcação e se declare a existência, ou inexistência, de interrelação". Como exemplo, os autores referem o facto de, na 8ª Edição do "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", a produção de 2,3-butanodiol (um carácter genérico) ser indicada como ocorrendo em *algumas* espécies de *Aeromonas* móveis; também a imobilidade é tida em consideração, e é indicada a produção, a partir de carboidratos, de ácido ou de ácido e gás. Estas modificações da descrição do género eliminam, segundo os autores, as principais objecções de Smith. Por outro lado, *A. salmonicida* apresenta, em relação a *Aeromonas hydrophila*, uma homologia do DNA de 56-65%, o que, segundo Inglis *et al.* (1993), indica que as duas espécies deverão ser mantidas no mesmo género, *Aeromonas*. Austin & Allen-Austin (1993) referem, também, que "têm sido acumulados dados adicionais que apoiam a manutenção desta espécie no género *Aeromonas*", entre os quais se encontram a existência de um antigénio comum entre *A. hydrophila* e muitas estirpes de *A. salmonicida* (é frequente observarem-se reacções serológicas cruzadas entre as duas espécies) e a sensibilidade de algumas culturas de *A. hydrophila* a bacteriófagos de *A. salmonicida* (Paterson *et al.*, 1980b; Austin & Allen-Austin, 1993).

A origem, europeia ou norte-americana, de *A. salmonicida* ainda não está (e, provavelmente, nunca estará) definitivamente estabelecida. Por um lado, a confirmação da sua existência na América do Norte ocorreu em 1902, ao contrário do que aconteceu na Europa (isolada em 1894); esta observação poderá indicar que *A.*

salmonicida teve origem na Europa e foi introduzida na América do Norte através da exportação de truta comum (*Salmo trutta*). Por outro lado, porém, esta bactéria poderá ser originária da América do Norte e ter sido introduzida na Europa pelas importações de truta arco-íris; um argumento a favor desta interpretação é o facto de a truta arco-íris ser relativamente resistente à furunculose (principal doença causada, nos salmonídeos, por *A. salmonicida*), pelo que seria o hospedeiro original da bactéria, tendo desenvolvido resistência à doença (McCarthy & Roberts, 1980; Austin & Allen-Austin, 1993).

1.5.1.2. Doenças Causadas por *A. salmonicida*

Tradicionalmente, *A. salmonicida* tem sido conhecida como o agente etiológico da furunculose dos salmonídeos, mas também provoca outras condições patológicas, sobretudo em peixes não-salmonídeos (McCarthy & Roberts, 1980; Barja & Toranzo, 1988; Austin & Allen-Austin, 1993; Inglis *et al.*, 1993; Thoesen, 1994).

De facto, embora classicamente se tenha considerado que esta bactéria era patogénica de salmonídeos cultivados em água doce, ela pode causar mortalidades em salmonídeos e não-salmonídeos, seja em água doce (carpa, perca, tenca, lúcio e peixe-gato, entre outras), seja em água salgada (salmão do Pacífico, salmão do Atlântico, truta, enguias e bacalhau, entre outras) (Barja & Toranzo, 1988; Austin & Allen-Austin, 1993). As infecções por *A. salmonicida* atingem espécies de várias das principais famílias de Osteícteos, para além de lampreias (família *Petromyzonidae*).

Actualmente, a distribuição desta bactéria é praticamente mundial, incluindo a Austrália e a Ásia, de onde inicialmente se pensava que ela estava ausente (Austin & Allen-Austin, 1993). A sua primeira detecção numa piscicultura portuguesa é referida por Saraiva *et al.* (1989).

1.5.1.2.1. Furunculose

O nome "furunculose" deve-se ao facto de, sobretudo nas formas subaguda e crónica da doença, poderem observar-se na musculatura e no tegumento dos peixes doentes grandes erupções conhecidas como furúnculos. Segundo Austin & Allen-Austin (1993), este nome induz em erro, uma vez que as suas lesões características (furúnculos) não se assemelham às encontradas numa doença humana com o mesmo nome. Os furúnculos dos salmonídeos consistem num exsudado tecidular, alguns (poucos) macrófagos e outras células sanguíneas necróticas, e elementos necróticos do tecido no qual o furúnculo se desenvolveu, para além, obviamente, de um grande número de bactérias (alguns destes furúnculos podem ulcerar, libertando o seu

conteúdo infectado para a água); estas lesões diferem dos furúnculos encontrados nos vertebrados superiores (homeotérmicos) pelo facto de estes possuirem como componente principal um número muito elevado de macrófagos e leucócitos polimorfonucleares (embora possuam, também, restos celulares necróticos e fluido tecidular).

No entanto, "furunculose" é um nome já de tal modo estabelecido na literatura que continua a ser usado por conveniência, para evitar a confusão que poderia resultar de um novo nome.

A ocorrência clínica da furunculose típica dos salmonídeos segue os padrões sazonais de temperatura, tendo lugar, geralmente, apenas quando a temperatura da água excede 16 °C. Quando a temperatura da água é de 20 °C, a doença pode desenvolver-se dentro de 4-12 dias, enquanto que, a cerca de 13 °C, é mais provável o desenvolvimento de infecções crónicas, com períodos de incubação de até várias semanas. A temperaturas inferiores a 8 °C, podem não ser visíveis sintomas da doença (Thoesen, 1994).

Esta doença pode manifestar-se numa das seguintes formas: hiperaguda, aguda, subaguda, crónica e latente. As formas hiperaguda e aguda são as que causam as maiores mortalidades, enquanto que as formas subaguda, crónica e latente têm grande importância na manutenção da bactéria dentro da população de peixes (Ferguson & McCarthy, 1978; McCarthy & Roberts, 1980; Austin & Allen-Austin, 1993; Inglis *et al.*, 1993; Thoesen, 1994).

1.5.1.2.2. Outras doenças causadas por *A. salmonicida*

Outras condições patológicas, diferentes da furunculose, são causadas por estirpes atípicas de *A. salmonicida*. Estas doenças incluem a Eritrodermatite da Carpa, a Doença Ulcerativa de *Carassius auratus*, a Doença Cefálica Ulcerativa de Enguias, a Doença Ulcerativa de Trutas e infecções sistémicas em várias espécies de peixes marinhos e de água quentes (McCarthy & Roberts, 1980; Barja & Toranzo, 1988; Austin & Allen-Austin, 1993; Thoesen, 1994). No entanto, muitas são as referências a isolamentos de estirpes atípicas de *A. salmonicida*, muitas vezes causando condições patológicas (principalmente doenças cutâneas ulcerativas), de uma grande variedade de peixes, quer salmonídeos, quer não-salmonídeos, em água doce ou salgada (Evelyn, 1971; Hastein *et al.*, 1978; Paterson *et al.*, 1980a, b; Trust *et al.*, 1980; Hayasaka & Sullivan, 1981; Boomker *et al.*, 1984; Cornick *et al.*, 1984; Ezura *et al.*, 1984; Bruno, 1986; Dalsgaard & Paulsen, 1986; Ostland *et al.*, 1987; Whittington & Cullis, 1988; Benediktsdottir & Helgason, 1990; Chapman, 1990; Noga & Berkhoff, 1990;

Nougayrede *et al.*, 1990; McIntosh & Austin, 1991; Rintamaki & Valtonen, 1991; Wiklund, 1990; Wiklund & Bylund, 1991; Frerichs *et al.*, 1992; Teska *et al.*, 1992; Austin, 1993; Wiklund & Bylund, 1993; Wiklund *et al.*, 1993, 1994; Real *et al.*, 1994).

1.5.1.3. Descrição do Agente Etiológico

A descrição tradicional de *A. salmonicida* é a de bacilos curtos (1,2 X 0,8 μm), Gram negativos, fermentativos, imóveis, capazes de produzir, após 3-4 dias de incubação a 20-25 °C, um pigmento castanho difusível em meios sólidos contendo triptona (sendo essencial a presença de tirosina ou fenilalanina), que não crescem a 37 °C, e que produzem catalase e oxidase (Krieg & Holt, 1984; Austin & Allen-Austin, 1993; Thoesen, 1994). Estes testes, juntamente com a não produção de ácido da xilose e da sacarose (embora algumas estirpes possam produzir ácido deste último açúcar), permitem uma identificação presumível desta espécie, mas é conveniente proceder, também, aos testes de degradação da gelatina (positivo), do amido (positivo) e da ureia (negativo), da presença de arginina deidrolase (positivo), de oxidação do gluconato (negativo) e da presença da descarboxilase da ornitina (negativo) (Austin & Allen-Austin, 1993). Infelizmente, a situação é complicada pelo contínuo aparecimento de estirpes atípicas, particularmente de peixes não-salmonídeos, nas quais se têm observado várias reacções diferentes destas (Austin & Allen-Austin, 1993). A % G+C em *A. salmonicida* é de 57-59 % (Krieg & Holt, 1984).

A imobilidade de *A. salmonicida* é um carácter que tem sido tradicionalmente usado para distinguir esta espécie das "*Aeromonas* móveis". No entanto, McIntosh & Austin (1991) observaram mobilidade (através de flagelação polar) numa estirpe de *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* sujeita a uma incubação a temperaturas superiores à óptima, isto é, 30-37 °C (especialmente a 37 °C). Este aparecimento da mobilidade foi acompanhado por modificações no padrão de fermentação de açúcares, perda da capacidade de degradar esculina, DNA, elastina e gelatina, e aumento da resistência ao antibiótico co-trimoxazol. Também a produção de pigmento e de catalase, bem como a capacidade de autoagregação, deixaram de ocorrer quando a temperatura de incubação era igual ou superior a 30 °C. Os autores sugerem que a perda das referidas actividades enzimáticas a estas temperaturas elevadas (as quais eram readquiridas por incubação a menos de 25 °C) podem estar relacionadas com a perda de virulência observada a temperaturas de 30 °C ou mais.

Também a produção de pigmento não pode ser usado como carácter distintivo absoluto, pois, para além da ocorrência de estirpes de *A. salmonicida* que não o produzem (ou que o fazem muito lentamente), há estirpes de outras espécies

(nomeadamente *A. hydrophila* e *A. media*, bem como algumas estirpes do género *Pseudomonas*) que são capazes de o sintetizar (Frerichs & Holliman, 1991; Austin & Allen-Austin, 1993).

Por outro lado, alguns autores (Chapman, 1990; Wiklund & Bylund, 1991; Teska *et al.*, 1992; Pedersen *et al.*, 1994b; Wiklund *et al.*, 1994) referiram o isolamento de estirpes oxidase negativas que foram classificadas como estirpes atípicas de *A. salmonicida*, com base num conjunto de outros caracteres, entre os quais o facto de reagirem com anticorpos contra a "A-layer" e com anticorpos monoclonais contra o antigénio "O" de *A. salmonicida* típicas (Wiklund *et al.*, 1994). Estes autores sugerem, inclusivé, que estas estirpes podem constituir uma nova subespécie desta bactéria.

Na 8ª Edição do "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", é considerada a existência de três subespécies de *A. salmonicida*: uma incluindo as estirpes típicas, produtoras de pigmento, *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, e duas incluindo estirpes atípicas e não produtoras de pigmento, *A. salmonicida* subsp. *achromogenes* e *A. salmonicida* subsp. *masoucida*, as quais diferiam entre si, ainda, por um conjunto de outras características. Posteriormente, McCarthy & Roberts (1980) chamaram a atenção para o facto de que a descrição original das estirpes atípicas, tal como aparecia na 8ª Edição do Manual referido, se baseava em dados conseguidos com apenas algumas estirpes, e, baseando-se num estudo efectuado por McCarthy (1977), propuseram uma nova classificação intraespecífica, igualmente com três subespécies: *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* (estirpes típicas) *A. salmonicida* subsp. *achromogenes* (estirpes atípicas isoladas de salmonídeos, incluindo a "*masoucida*") e *A. salmonicida* subsp. *nova* (estirpes atípicas isoladas de não-salmonídeos). Embora esta classificação de McCarthy & Roberts (1980) tenha sido apoiada por outros autores, como, por exemplo, Belland & Trust (1988), na 9ª Edição do "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" (Krieg & Holt, 1984), tal como na 8ª, as subespécies consideradas são *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* (produzem pigmento, mas não indol, hidrolizam esculina e fermentam o manitol), *A. salmonicida* subsp. *achromogenes* (não produzem pigmento, mas podem produzir indol, não hidrolizam a esculina e não fermentam o manitol) e *A. salmonicida* subsp. *masoucida* (não produzem pigmento, produzem indol, hidrolizam a esculina e fermentam o manitol). Austin *et al.* (1989) propuseram a criação de uma nova subespécie de *A. salmonicida*, que seria denominada "*A. salmonicida* subsp. *smithia*" (estirpes atípicas não produtoras de pigmento, ou produzindo-o lentamente, não produzem indol, não hidrolizam a esculina e não fermentam o manitol, para além de possuirem um conjunto de outras características que as distinguem das estirpes das outras três subespécies consideradas por Krieg & Holt, 1984). Austin & Allen-Austin (1993) apresentam uma

comparação das características que permitem distinguir entre si, não apenas as subespécies de *A. salmonicida* já consideradas (*A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, *A. salmonicida* subsp. *achromogenes*, *A. salmonicida* subsp. *masoucida* e *A. salmonicida* subsp. *smithia*, proposta por Austin *et al.*, 1989), mas também várias outras estirpes das muitas que vão sendo isoladas e não podem ser incluídas em qualquer das subespécies referidas.

A. salmonicida tem a particularidade de ser capaz de se dissociar em diferentes tipos de colónias, nomeadamente colónias pequenas e quebradiças, constituidas por células autoaglutinantes e possuidoras de "A-layer" (colónias rugosas; "rough colonies"), e colónias grandes, mais viscosas e menos comuns (aparecem, normalmente, aquando da manutenção por períodos prolongados, em meios de cultura artificiais), cujas células não possuem a "A-layer" e não autoaglutinam (colónias lisas; "smooth colonies"); existe, ainda, um tipo de colónia intermédio entre estes dois (colónias "G-phase") (Austin & Rodgers, 1981; Austin & Allen-Austin, 1993; Inglis *et al.*, 1993).

Para compreender e controlar a furunculose, é desejável o desenvolvimento de sistemas de tipagem que tornem possíveis estudos epidemiológicos detalhados (Nielsen *et al.*, 1993). No entanto, *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* constitui um grupo muito homogéneo, que inviabiliza ou dificulta grandemente o uso de sistemas tradicionais de tipagem (Toranzo *et al.*, 1991; Austin & Allen-Austin, 1993; Inglis *et al.*, 1993; Nielsen *et al.*, 1993, 1994; Dalsgaard *et al.*, 1994; Hänninen *et al.*, 1995).

Apesar de Toranzo *et al.* (1991) e Dalsgaard *et al.* (1994) terem obtido variações em algumas (poucas) características bioquímicas de estirpes isoladas em diferentes áreas geográficas, os autores não encontraram qualquer base para o estabelecimento de diferentes biótipos.

Serologicamente, a homogeneidade das estirpes típicas de *A. salmonicida* é total, pois não se detecta qualquer variação quando se utilizam quer células inteiras, quer o antigénio "O" (Toranzo *et al.*, 1991; Austin & Allen-Austin, 1993; Inglis *et al.*, 1993; Dalsgaard *et al.*, 1994). No entanto, as culturas velhas, por vezes, tendem a perder a reactividade (Inglis *et al.*, 1993).

A análise electroforética das proteínas do envoltório celular efectuada por Hänninen *et al.* (1995), levou os autores a concluír que, também quanto a esta característica, há uma grande homogeneidade entre as estirpes de *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, apesar de terem detectado pequenas variações na área de pesos moleculares próxima de 25 Kda.

A tipagem por bacteriófagos parece constituir um sistema com alguma utilidade, mas ainda não foi avaliada em grandes estudos epidemiológicos de *A. salmonicida* (Austin & Allen-Austin, 1993; Inglis *et al.*, 1993; Nielsen *et al.*, 1993, 1994).

A variabilidade nos padrões de resistência a diversos antibióticos demonstrou algum potencial como sistema de tipagem das estirpes testadas por Dalsgaard *et al.* (1994), mas tal não se verificou com as estirpes utilizadas por Bast *et al.* (1988) ou por Toranzo *et al.* (1991).

Todas as estirpes de *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* cujo conteúdo plasmídico foi estudado demonstraram possuír vários plasmídeos. Entre estes, um grupo de três ou quatro plasmídeos de baixo peso molecular parece ser característico da grande maioria destas estirpes bacterianas (Toranzo *et al.*, 1983a, 1991; Bast *et al.*, 1988). Os pesos moleculares indicados por diferentes autores para estes plasmídeos apresentam pequenas variações dentro da gama de 3-5 Mda (Bast *et al.*, 1988; Toranzo *et al.*, 1983a, 1991) ou de 5-7 Mda (Nielsen *et al.*, 1993); também Hänninen *et al.* (1995) referem a existência de plasmídeos "universais" com pesos moleculares de 5-6 Mda. Segundo Toranzo *et al.* (1991). este padrão de 3 ou 4 pequenos plasmídeos parece ser típico desta subespécie bacteriana e suficientemente estável para ser usado como meio de confirmação da identificação das estirpes que o possuem como pertencentes a *A. salmonicida*, tendo valor potencial como base para o uso de sondas de DNA para a detecção rápida da furunculose. É frequente, porém, que apareça, na gama de 8-10 Mda (próximo da banda correspondente ao cromossoma) (Toranzo *et al.*, 1991) ou 8-11,2 (Bast *et al.*, 1988), um conjunto de outras tantas bandas que espelham estes plasmídeos de baixo peso molecular, e que correspondem às formas abertas ("open circular"; OC) destes (os quais se encontram na forma circular fechada covalentemente). Segundo Bast *et al.* (1988) e Toranzo *et al.* (1991), estas formas OC são removidas selectivamente pela extracção com fenol efectuada com o método de Kado & Liu (1981). Para além destes 4 plasmídeos de baixo peso molecular (um ou dois dos quais, por vezes, podem não estar presentes) é muito frequente a existência de um plasmídeo de elevado peso molecular (superior a 50 Mda), que é facilmente "perdido" durante a extracção (Toranzo *et al.*, 1983a; Bast *et al.*, 1988; Nielsen *et al.*, 1993; Hänninen *et al.*, 1995), embora Toranzo *et al.* (1991) não o tenham detectado. Outros plasmídeos estão, ainda, presentes em algumas das estirpes típicas de *A. salmonicida*, mas proporcionando uma variação nos perfis plasmídicos insuficiente para que estes constituam um método de tipagem de grande utilidade em estudos epidemiológicos (Toranzo *et al.*, 1983a, 1991; Bast *et al.*, 1988; Nielsen *et al.*, 1993). No entanto, Nielsen *et al.* (1993) e Hänninen *et al.* (1995) reconheceram-lhe algum

valor na determinação do modo como se espalhou a infecção em áreas restritas, pois os autores verificaram a presença de alguns plasmídeos únicos em algumas estirpes (no entanto, estes plasmídeos eram raros).

Outros estudos genéticos, usando hibridação DNA-DNA (Belland & Trust, 1988) ou ribotipagem (Nielsen *et al.*, 1994; Hänninen *et al.*, 1995), entre outros, corroboram a estreita semelhança entre as estirpes típicas de *A. salmonicida*, independentemente da origem destas (Hänninen *et al.*, 1995). Segundo Nielsen *et al.* (1994), a ribotipagem tem menor valor do que a tipagem por bacteriófagos ou a tipagem por perfis plasmídicos nos estudos epizootiológicos da furunculose, embora possa ser útil em certas áreas geográficas. Pelo contrário, usando 4 enzimas de restrição, Hänninen *et al.* (1995) concluíram que a ribotipagem é o método mais sensível para estudar as estirpes, geneticamente homogéneas, de *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*.

1.5.1.4. Diagnóstico de Infecção e Isolamento de *A. salmonicida*

Embora vários dos sintomas clínicos das doenças causadas por *A. salmonicida* constituam indicadores úteis de infecção por esta bactéria, o facto de alguns deles se observarem, também, em doenças causadas por outros microrganismos torna necessário que a confirmação das infecções por este agente etiológico se baseie em outras técnicas, nomeadamente o seu isolamento e identificação (Austin & Allen-Austin, 1993).

Nos casos de furunculose típica, causada por estirpes típicas de *A. salmonicida*, esta bactéria pode ser isolada, com relativa facilidade, dos peixes doentes (especialmente do rim e das lesões cutâneas), usando meios bacteriológicos não selectivos, como TSA ("Triptone Soya Agar") ou BHIA, incubando a 20-25 °C durante 1-4 dias (Shotts & Teska, 1989; Austin & Allen-Austin, 1993; Thoesen, 1994). Alguns autores referem uma maior conveniência de BHIA para isolar e manter esta espécie bacteriana (Austin & Allen-Austin, 1993; Thoesen, 1994); também Austin & Allen-Austin (1993) observaram que em BHIA foi isolada uma maior proporção de colónias rugosas (característica relacionada com virulência) do que com TSA. Ainda Austin & Allen-Austin (1993), referem que um enriquecimento prévio, semeando porções de órgãos de exemplares doentes em TSB ("Triptone Soya Broth") e, após incubação a 26 °C durante 48 horas, semeando pequenas porções das culturas resultantes em TSA para isolamento das colónias, resultou na duplicação dos casos de recuperação de *A. salmonicida* relativamente à sementeira directa de porções de órgãos em meio sólido (TSA).

Como já foi referido, a produção do pigmento castanho não pode ser considerado patognomónico de *A. salmonicida*, pois ocorre, igualmente, em estirpes de outras espécies dos géneros *Aeromonas* e *Pseudomonas* (nomeadamente *P. aeruginosa* e *P. fluorescens*) (Frerichs & Holliman, 1991). Estes autores isolaram uma estirpe de *P. fluorescens* que, além de produzir pigmento castanho difusível, reagiu positivamente em testes de diagnóstico serológico rápido ("kits") de *A. salmonicida*. Inclusivé, os testes serológicos efectuados posteriormente, em laboratório, usando anti-soros policlonais, confirmaram parcialmente os resultados obtidos inicialmente. Por esta razão, os autores chamam a atenção para a necessidade de incluir algumas características fenotípicas chave na identificação de *A. salmonicida*, para que qualquer estirpe bacteriana não seja considerada como pertencendo a esta espécie unicamente com base na produção de pigmento e nos resultados de testes serológicos. Também Turnbull *et al.* (1989) sugeriram a ocorrência de antigénios comuns entre *A. salmonicida* e outras bactérias, nomeadamente das famílias *Vibrionaceae*, *Pseudomonadaceae* e *Enterobacteriaceae*.

É comum que, em exemplares que sucumbiram a infecções secundárias, o crescimento de *A. salmonicida* seja impedido, ou "mascarado", por outra(s) bactéria(s), ou, ainda, que a produção de pigmento seja inibida. Por esta razão, McCarthy & Roberts (1980) recomendam a análise de, pelo menos, seis peixes, em qualquer epizootia cuja causa se suspeite ser esta bactéria; os autores aconselham, também, que se efectue a análise bacteriológica, não apenas de vários órgãos internos (fígado, coração e baço), para além dos rins, mas também das eventuais lesões cutâneas em todos os estados de desenvolvimento. Também Rose *et al.* (1989) concluiram que a amostragem unicamente do rim pode levar a subestimar o número de peixes que possuem a bactéria, e recomendaram a análise adicional do intestino.

Vários testes serológicos podem, também, ser usados no diagnósticos de *A. salmonicida*. Segundo Austin & Allen-Austin (1993), embora o teste de aglutinação seja rápido e fácil de efectuar, esta técnica é menos eficaz com as colónias rugosas (autoaglutinantes), que são isoladas na maioria dos casos de doença.

Uma vez que um estabelecimento rápido de medidas terapêuticas pode reduzir consideravelmente os efeitos da doença, tem havido muitas tentativas de desenvolvimento de métodos de diagnóstico eficazes e rápidos (Austin & Allen-Austin, 1993). Um destes métodos consiste no Teste de Aglutinação com Latex, introduzido por McCarthy (1975), e particularmente útil por permitir a detecção de *A. salmonicida* em tecidos de peixes doentes em cerca de 2 horas; outra vantagem consiste no facto de este teste poder ser realizado com tecidos que não permitiriam o

isolamento da bactéria em meios de cultura (por exemplo, peixes conservados a -20 °C durante 14 dias, ou a 5 °C durante 7 dias, ou, ainda, tecidos fixados em formol). Outras técnicas de diagnóstico rápido de *A. salmonicida*, entre as quais o Teste de Coaglutinação (usando suspensões de estafilococos sensibilizados com anticorpos anti-*A. salmonicida*) e a imunofluorescência indirecta, são indicadas por Austin & Allen-Austin (1993) como úteis para o diagnóstico de *A. salmonicida*. Austin & Allen-Austin (1993) referem, também, o uso de anticorpos monoclonais no diagnóstico da furunculose. Os próprios autores utilizaram, com sucesso, uma combinação do uso de anticorpos monoclonais com a técnica ELISA, num teste que consideraram conveniente para ser aplicado em pisciculturas. Embora as experiências tenham demonstrado que se conseguiam diagnósticos dignos de confiança dentro de 30 minutos, os "kits" concebidos com a finalidade de permitirem diagnósticos rápidos de doenças de peixes não parecem ter atingido um uso generalizado, provavelmente devido à falta de uma procura suficiente para justificar os seus altos custos de produção (Austin & Allen-Austin, 1993).

Também o desenvolvimento e uso de sondas de DNA poderá vir a ser importante no diagnóstico de *A. salmonicida* (Austin & Allen-Austin, 1993; Hiney *et al.*, 1992), embora Hennigan *et al.* (1989), usando quatro sondas de DNA em combinação com sete enzimas de restrição e sete estirpes de *A. salmonicida*, tenham obtido resultados que sugerem que a sequência de DNA nesta espécie bacteriana está muito fortemente conservada. Deste modo, Hennigan *et al.* (1989) chamaram a atenção para as prováveis limitações que o uso de sondas de DNA terá na diferenciação entre estirpes deste microrganismo; no entanto, estes resultados indicam que se trata de um método muito útil para a detecção desta espécie bacteriana.

1.5.1.5. Epizootiologia

Embora *A. salmonicida* seja conhecida desde há cerca de 100 anos, ainda não foi possível obter respostas inequívocas a algumas questões cruciais relativas aos factores que controlam ou determinam a disseminação deste microrganismo. A controvérsia persiste, sobretudo, quanto às seguintes questões: a) a capacidade da bactéria de existir no meio ambiente, fora do corpo dos peixes; b) o papel do meio ambiente na sua transmissão; c) o(s) local(is) de entrada no peixe (Austin & Allen-Austin, 1993; Thoesen, 1994).

Os estudos sobre a ecologia de *A. salmonicida* têm sido grandemente prejudicados devido às dificuldades que envolvem o seu isolamento especialmente de amostras ambientais. Esta espécie é, actualmente, definida como sendo patogénica obrigatória de peixes, e não se encontrando, assim, em águas superficiais (Krieg &

Holt, 1984). Esta definição foi formulada devido à escassez de evidência conclusiva sobre uma existência livre desta bactéria, que, por exemplo, frequentemente, não é isolada da água das pisciculturas em que está em curso uma epizootia de furunculose (Austin & Allen-Austin, 1993). No entanto, esta definição não ajuda a explicar a disseminação deste microrganismo entre diferentes populações de peixes (nomeadamente o seu aparecimento em locais que não tiveram contacto com peixes infectados) (Austin & Allen-Austin, 1993; Effendi & Austin, 1994). A falta de evidência conclusiva da possibilidade de *A. salmonicida* ter uma vida livre pode ser explicada por várias razões, entre as quais a dificuldade, já referida anteriormente, de isolar este microrganismo em culturas mistas com outras bactérias (onde o seu crescimento é rapidamente inibido, através de competição ou da produção de substâncias antimicrobianas, pela maior parte das bactérias normalmente presentes na água) ou a inibição da produção de pigmento quando existem colónias de outros tipos bacterianos muito próximas.

É bem conhecido o facto de que esta espécie bacteriana pode ser transmitida horizontalmente, provavelmente através do contacto com peixes infectados (doentes ou portadores), de água contaminada ou de utensílios usados na piscicultura (McCarthy & Roberts, 1980; Austin & Allen-Austin, 1993; Thoesen, 1994). Todavia, a possibilidade da sua transmissão vertical nunca foi demonstrada (McCarthy & Roberts, 1980; Bullock, 1987; Inglis *et al.*, 1993; Thoesen, 1994), embora a bactéria tenha sido frequentemente isolada dos produtos sexuais de peixes infectados (Barja & Toranzo, 1988; Austin & Allen-Austin, 1993). Tendo em conta a falta de uma demonstração inequívoca, quer da ocorrência, quer da não ocorrência de transmissão vertical deste microrganismo, alguns autores recomendam a desinfecção preventiva dos ovos que vão ser transferidos para áreas livres de furunculose (McCarthy & Roberts, 1980; Barja & Toranzo, 1988). McCarthy & Roberts (1980) concluíram que tal desinfecção pode ser efectuada eficazmente com acriflavina (que é muito pouco tóxica para os ovos) e que esta é mais eficaz, em doses não tóxicas, do que iodóforos como o betadine.

A maior parte dos trabalhos que têm sido realizados sobre a epizootiologia tem incidido sobre a investigação de potenciais fontes de infecção, como a água, o sedimento e detritos, outros animais e, em particular, peixes portadores (salmonídeos e não-salmonídeos). O estudo deste assunto tem sido efectuado procurando determinar a presença e a capacidade de sobrevivência de *A. salmonicida* em cada um dos vários habitats citados (Austin & Allen-Austin, 1993).

A sobrevivência de *A. salmonicida* em água tem sido estudada por numerosos autores (McCarthy & Roberts, 1980; Sakai, 1986; Barja & Toranzo, 1988; Austin &

Allen-Austin, 1993). No entanto, é necessária prudência na interpretação de muitos dos resultados obtidos, uma vez que muitos estudos foram realizados utilizando água previamente esterilizada ou outros tipos de água (por exemplo, água destilada ou água da torneira) onde *A. salmonicida* não está normalmente presente (McCarthy & Roberts, 1980; Austin & Allen-Austin, 1993). Apesar disso, Austin & Allen-Austin (1993) afirmam que podem ser tiradas algumas conclusões preliminares. Deste modo, *A. salmonicida* parece ser capaz de sobreviver, durante longos períodos de tempo, em água doce, salobra ou salgada, embora o tempo exacto de sobrevivência, indicado pelos diferentes autores, seja muito variável, e, também, abundem resultados contraditórios. Aqueles autores referem trabalhos em que foram obtidos os seguintes períodos de sobrevivência da bactéria em águas não esterilizadas: a) em água doce, incluindo água de rio, entre 1 e 19 dias; b) em água salobra, de 16 a 25 dias; c) em água salgada, entre 1 e 8 dias. Quando era utilizada água esterilizada, os períodos de sobrevivência obtidos eram, invariavelmente, muito mais longos (por exemplo, até 63 dias, em água doce, e até 24 dias, em água salgada). Também McCarthy & Roberts (1980) referem períodos de sobrevivência de *A. salmonicida* em água bastante variáveis. Segundo Dubois-Darnaudpeys (1977, *in* McCarthy & Roberts, 1980), a sobrevivência desta espécie bacteriana em água de rio estava relacionada com o pH e com a temperatura: 50 dias a 4 °C, 21 dias a 14 °C e 15 dias a 22 °C. Também Pérez *et al.* (1995) obtiveram uma sobrevivência mais longa a 10 °C do que a 20 °C. Groberg *et al.* (1978) verificaram que o progresso da infecção por *A. salmonicida* foi acelerado (maior percentagem de mortalidade e menor tempo decorrido desde o início das experiências até à morte dos peixes) às temperaturas mais elevadas (superiores a 15 °C) e retardado (menor mortalidade e mais tempo de incubação da doença) a temperaturas inferiores a 10 °C.

Todavia, outros factores têm influência na variabilidade dos resultados obtidos em diferentes estudos de sobrevivência de *A. salmonicida*. Para além da temperatura a que é realizada a experiência, o inóculo usado é muito importante (Austin & Allen-Austin, 1993); deste modo, se o inóculo normalmente usado nestes estudos (10^6-10^7/ml, que só muito dificilmente poderia ser encontrado no meio natural, mesmo no caso de poder existir livremente neste meio, excepto, talvez, durante epizootias de furunculose, nas quais os peixes mortos ou moribundos libertam grandes números de células de *A. salmonicida* para a água) for reduzido para 10^1-10^2/ml, a sobrevivência da bactéria é diminuida consideravelmente. Também as condições nutritivas desempenham um papel na sobrevivência deste microrganismo, pois a suplementação dos microcosmos com baixas concentrações de nutrientes, como, por exemplo, BHI a 0,005% (Austin & Allen-Austin, 1993) ou TSA a 0,01% (Pérez *et al.*, 1995), causa um aumento nos números de células dentro de algumas horas. Inclusivé, este aumento do

número de bactérias ocorre qualquer que seja o inóculo inicial (Austin & Allen-Austin, 1993).

Também a persistência de *A. salmonicida* em sedimentos tem sido estudada por vários autores. McCarthy & Roberts (1980), referindo um trabalho anterior, não publicado, de McCarthy, afirmam que este autor demonstrou a sobrevivência da bactéria em números de cerca de 10^5 células viáveis, durante pelo menos 29 dias (tempo de duração das experiências). Os autores acrescentam que este número "é altamente significativo, pois se esta quantidade de células for libertada na água doce, o seu período de sobrevivência é de, no mínimo, 14 dias". Por outro lado, Michel & Dubois-Darnaudpeys (1980) determinaram um período de sobrevivência de *A. salmonicida* em sedimentos de rio esterilizados superior a 10 meses; no entanto, a patogenicidade destas estirpes diminuiu a partir dos 6 meses, tendo-se perdido completamente ao fim de 8-9 meses. Os autores concluíram que, em condições naturais, tal intervalo de tempo permitiria que a bactéria fosse libertada do sedimento para a água, e que o comportamento dos animais que se alimentam nos fundos permitiria uma contaminação directa dos peixes, possivelmente tornando-se portadores.

Alternativamente, Rose *et al.* (1990), Austin & Allen-Austin (1993) e Effendi & Austin (1995b) referem a possibilidade de que *A. salmonicida* entre num "Estado de Dormência" que lhe permita ultrapassar as dificuldades que lhe são impostas por modificações ambientais (nomeadamente, diferentes graus de insolação, temperatura, disponibilidade de azoto e de oxigénio). Este estado de dormência é definido por Austin & Allen-Austin (1993) como "qualquer período de repouso ou interrupção reversível do desenvolvimento fenotípico de um organismo", e consideram que não pode descartar-se a possibilidade de que *A. salmonicida*, quando está no meio natural, fora do corpo dos peixes, assuma um tal estado fisiológico, e por esse motivo não pode ser recuperada nos meios de cultura usados para o isolamento bacteriano. Ainda Austin & Allen-Austin (1993) referem vários trabalhos em que células bacterianas (*Vibrio cholerae* e *A. salmonicida*) eram observáveis por métodos microscópicos de contagem directa (por exemplo, epifluorescência usando o corante laranja de acridina) quando não era possível conseguir o crescimento bacteriano em meios de cultura. Num destes estudos, com *A. salmonicida*, os autores verificaram, julgando pela incapacidade de recuperar a bactéria em meios de cultura, que, após 17 dias, o microcosmos utilizado parecia totalmente desprovido de bactérias, mas, por observação microscópica, após um decréscimo inicial no número de células bacterianas presentes, este se mantinha constante em cerca de 8,0 X 10^2/ml. Sete dias depois, adicionou-se meio de cultura fresco (0,01% vol./vol.) e foi observada uma recuperação da capacidade de isolamento

de *A. salmonicida* em placas a diferentes temperaturas (22, 18 e 15 °C), acompanhada de um grande aumento no número de células observadas nas contagens directas em microscópio. No entanto, em microcosmos incubados às mesmas temperaturas, e tratados da mesma maneira que estes, excepto no que se refere à adição de TSB, não foi observada qualquer recuperação da capacidade das células bacterianas serem cultivadas em meios bacteriológicos em placa. Deste modo, as modificações, quer na temperatura, quer nas condições nutricionais, parecem ser responsáveis pela reactivação das células de *A. salmonicida* (Allen-Austin *et al.*, 1984, *in* Austin & Allen-Austin, 1993). Effendi & Austin (1995b) descreveram alterações nos perfis de proteínas (mas não de LPS), perda significativa de DNA e modificações na forma das células "dormentes", e demonstraram a viabilidade destas células, em água do mar. Segundo Rose *et al.* (1990) e Effendi & Austin (1995b), a capacidade de *A. salmonicida* causar doença perde-se quando a bactéria entra no estado de dormência.

Em face dos resultados já obtidos nos muitos estudos de sobrevivência, podemos afirmar que *A. salmonicida* é capaz de permanecer no meio aquático durante longos períodos de tempo. É no mecanismo dessa sobrevivência e nos seus efeitos sobre o organismo no ambiente natural que se centra, agora, o debate (Austin & Allen-Austin, 1993).

Os peixes desempenham, certamente, um papel importante na transmissão da doença a outros peixes, podendo actuar como fonte de infecção de duas maneiras: estando doentes, ou mortos pela doença, possuem grandes números de células bacterianas; sendo portadores, aparentemente saudáveis (McCarthy & Roberts, 1980; Austin & Allen-Austin, 1993). McCarthy (1980, *in* Austin & Allen-Austin, 1993) indica que o material dos furúnculos pode conter 10^8 células bacterianas viáveis/ml de tecido necrótico. Uma outra fonte importante de infecção é a presença nos tanques de peixes que sucumbiram à doença, e McCarthy (1977b, *in* McCarthy & Roberts, 1980) verificou que, embora o número de células bacterianas viáveis presentes nos peixes mortos (músculo) diminuisse gradualmente, elas ainda podiam ser recuperadas durante 30 dias, estando presentes na água do tanque durante, pelo menos, mais 8 dias (o autor admite que a bactéria se tenha alojado nas paredes do tanque e estivesse a ser gradualmente eliminada destas). Cornick *et al.* (1969, *in* Austin & Allen-Austin, 1993), indicam uma permanência, em estado viável, deste microrganismo em órgãos internos (coração, fígado, rim e baço) durante 49 dias a -10 °C, o que constitui, potencialmente, um risco de infecção por ingestão de peixe contaminado conservado em frio.

Embora a existência de peixes portadores de *A. salmonicida* e a possibilidade de eles terem um papel na transmissão da bactéria tenham sido reconhecidos cedo na história da furunculose, a investigação deste aspecto da epizootiologia da doença tem sido grandemente dificultada por dificuldades técnicas na detecção destes peixes, uma vez que os actuais métodos de cultura parecem ser muito pouco sensíveis (McCarthy & Roberts, 1980; Austin & Allen-Austin, 1993). A detecção pode, por vezes, ser conseguida cultivando a bactéria a partir de tecidos do peixe (geralmente rim ou tubo digestivo), embora seja comum obterem-se falsos negativos; também pode conseguir-se cultivar este microrganismo a partir do tegumento ou das brânquias, mas o facto de estes tecidos serem colonizados por outras espécies bacterianas torna problemática a detecção de pequenos números de *A. salmonicida* (Inglis *et al.*, 1993). A detecção de peixes portadores pode ser melhorada provocando stress aos peixes, através de um aumento da temperatura (para 18 °C) e, simultaneamente, da injecção de corticosteróides ("Stress Test"; "Stress Inducible Furunculosis") (Bullock & Stuckey, 1975; McCarthy & Roberts, 1980; Inglis *et al.*, 1993; Austin & Allen-Austin, 1993; Scallan & Smith, 1993; Hiney, 1995). Este método baseia-se no trabalho de Bullock & Stuckey (1975), e McCarthy (1980, *in* Austin & Allen-Austin, 1993) afirmaram que o acetato de prednisolona foi o corticosteróide mais eficaz, dos vários que o autor usou, para induzir furunculose nos peixes. Este teste também foi aplicado, por McCarthy (1975a, *in* Austin & Allen-Austin, 1993) a peixes não-salmonídeos infectados com uma estirpe atípica de *A. salmonicida*. O uso de métodos ELISA possui, também, potencial para a detecção de peixes portadores assintomáticos de *A. salmonicida*. Inglis *et al.* (1993) afirmam que os métodos ELISA desenvolvidos até agora não oferecem maior sensibilidade ou confiança do que os métodos bacteriológicos convencionais. No entanto, Rose *et al.* (1989), compararam um "Kit" ELISA comercial, o "stress test" e a sementeira em placas com BHIA e TSA de amostras recolhidas de salmões (*Salmo salar*) obtidos numa piscicultura onde já tinham ocorrido epizootias de furunculose, e verificaram que a técnica ELISA foi a que demonstrou uma maior percentagem (53,85%) de peixes portadores, seguindo-se o "stress test" (26,4%), enquanto que a sementeira em placas de BHIA e TSA não proporcionou o isolamento de *A. salmonicida* de nenhum dos peixes analisados. Adams & Thompson (1990) determinaram como limite de sensibilidade do método ELISA que utilizaram o número de 10^3 bactérias/ml, e consideraram-no como um método específico, rápido e sensível para o diagnóstico da furunculose durante epizootias e para pesquisar a presença de *A. salmonicida* em grandes populações de peixes. A técnica ELISA tem, todavia, algumas desvantagens, nomeadamente a incapacidade de distinguir as bactérias vivas das mortas (e, por isso, a impossibilidade de diferenciar as células bacterianas patogénicas viáveis das provenientes de vacinas) e o facto de não proporcionar a obtenção de

culturas que possam ser usadas para investigação adicional (como a realização de antibiogramas) (Austin & Allen-Austin, 1993); apesar das desvantagens apontadas, estes autores consideram a técnica ELISA como um método valioso para a rápida detecção de *A. salmonicida* em peixes, quer doentes com furunculose, quer portadores assintomáticos desta bactéria. Um método bastante promissor, mas que ainda não está totalmente desenvolvido, consiste no uso de sondas de ácidos nucleicos (Inglis *et al.*, 1993).

Também peixes não-salmonídeos, para além das espécies afectadas por doenças provocadas por estirpes atípicas de *A. salmonicida*, podem ser portadores, quer da forma típica, quer de formas atípicas, desta bactéria (Austin & Allen-Austin, 1993; Treasurer & Laidler, 1994).

Barja & Toranzo (1988) e Austin & Allen-Austin (1993) referem vários trabalhos que indicam que a entrada de *A. salmonicida* no corpo dos peixes pode ter lugar através de vários locais, incluindo boca, narinas, brânquias, ânus, tegumento ou linha lateral. Effendi & Austin (1995a) verificaram que as brânquias e o ânus de salmões do Atlântico eram os locais de entrada da bactéria mais eficazes, conduzindo a mortalidades mais elevadas do que quando a entrada ocorria através da linha lateral, dos flancos ou da superfície ventral dos peixes. A infecção através de alimento contaminado tem sido frequentemente referida como possível, embora diferentes autores manifestem opiniões contraditórias sobre este assunto (Austin & Allen-Austin, 1993). Todavia, Markwardt & Klontz (1989a, b), comparando 4 métodos usados na tentativa de induzir em salmões "chinook" (*Oncorhynchus tshawytscha*) o estado de portador de *A. salmonicida*, conseguiram induzir este estado em 65% dos peixes através de um entubamento gástrico.

1.5.1.6. Isolamento de *A. salmonicida* a partir de amostras ambientais

Alguns trabalhos envolvendo filtração de amostras de água para a concentração de *A. salmonicida* têm sido realizados, com, pelo menos, algum sucesso. Maheshkumar *et al.* (1990) semearam com *A. salmonicida* diferentes volumes (até 5 litros) de água de uma piscicultura e passaram esta mistura por filtros electropositivos; de seguida, os filtros eram sujeitos a uma filtração em sentido contrário, imersos num pequeno volume de uma solução a 3% de extracto de carne e raspados com um bisturi esterilizado, para retirar as células bacterianas aderidas. Os autores conseguiram uma redução considerável (300 vezes) do volume da água, e uma recuperação média das bactérias semeadas de cerca de 35%, e concluíram que esta técnica de filtração demonstrou maior sensibilidade do que a análise directa da água. No entanto, segundo Austin & Allen-Austin (1993), persiste o dilema clássico de muitos estudos ecológicos,

isto é, qual é a relação entre a resposta de um organismo em experiências laboratoriais com a resposta que ele teria num ambiente natural, em que necessita de interactuar numa comunidade diversa e heterogénea?

Ford (1994) apresenta um método, que envolve, igualmente, filtração de amostras de água, mas estas amostras foram retiradas de tanques de uma salmonicultura. Após a filtração das amostras de água, os filtros eram assepticamente retirados e invertidos em placas de agar de Azul de Coomassie Brilhante ("Coomassie Brilliant Blue", CBB). Para cada amostra, era efectuado o cálculo do número de "Unidades Formadoras de Colónias" ("Colony-Forming Units"; CFU) por mililitro (CFU/ml) e registado o número de colónias azuis escuras (possíveis *A. salmonicida*); estas eram, posteriormente, repicadas para TSA para identificação. A autora conseguiu, frequentemente (embora nem sempre), detectar *A. salmonicida* na água antes de ocorrerem mortalidades devidas a furunculose. Segundo a mesma autora, este método de filtração tem várias vantagens relativamente a outros métodos descritos para a detecção da bactéria na água, incluindo o de Maheshkumar *et al.* (1990): é um método simples e barato, facilmente incorporável na gestão das instalações aquícolas; não é necessário proceder à retirada das bactérias do filtro; a identificação presumível de *A. salmonicida* (forma típica) é possível dentro de 72 horas, e confirmada dentro de 96 horas. Ao contrário do método de Maheshkumar *et al.* (1990), este método, segundo a sua autora, não exclui a detecção de estirpes atípicas de *A. salmonicida*, e, para além de quantificar *A. salmonicida* na água, também permite a quantificação do total de bactérias presentes nesta (podendo, assim, ser usado, não apenas para detectar a bactéria, mas também para avaliar eficiências de tratamentos da água, tal como a irradiação com luz ultravioleta ou a desinfecção química).

O método de Ford (1994) constitui um método não destrutivo de amostragem, especialmente importante para amostragens de rotina em stocks de peixes particularmente valiosos, como é o caso de reprodutores. Um outro método não destrutivo consiste na análise do muco, tendo Cipriano *et al.* (1992) conseguido isolar *A. salmonicida* do muco de exemplares de diferentes espécies de salmonídeos com percentagens de recuperação sempre superiores às obtidas do rim.

Por outro lado, O'Brien *et al.* (1994) usaram uma sonda de DNA específica para *A. salmonicida*, desenvolvida por Hiney *et al.* (1992), a qual permitiu àqueles autores a detecção desta bactéria na água, nas fezes e no efluente de um tanque em que se encontravam "smolts" de *Salmo salar*. Os meios bacteriológicos apenas permitiam detectar este microrganismo em peixes mortos por furunculose ou moribundos. Os autores conseguiram, ainda, detectar *A. salmonicida* em amostras recolhidas em

efluentes de dois outros tanques, que continham peixes aparentemente saudáveis, tanques onde, subsequentemente, aumentou a mortalidade e a bactéria passou a ser recuperada dos peixes mortos ou moribundos, por meios bacteriológicos normais.

Vários outros métodos têm sido usados, entretanto, na tentativa de detectar células viáveis de *A. salmonicida* em amostras ambientais. Assim, Effendi & Austin (1993, 1994) utilizaram microscopia de contraste de fase para efectuarem contagens directas, microscopia de epifluorescência, imunofluorescência indirecta (IFAT) e determinação da actividade respiratória. Effendi & Austin (1993) consideram, mesmo, que o método de determinação da actividade respiratória proporciona uma interpretação dos resultados menos problemática do que métodos como a epifluorescência e a imunofluorescência.

Muitos autores admitem que a falta de um meio selectivo eficaz para o isolamento de *A. salmonicida* tem prejudicado os estudos sobre a ecologia desta espécie bacteriana (McCarthy & Roberts, 1980; Austin & Allen-Austin, 1993; Inglis *et al.*, 1993), embora Austin & Allen-Austin (1993) afirmem que a existência deste meio, por si só, não resolveria todas as dificuldades que ainda subsistem nesta área. Estes mesmos autores afirmam, ainda, que enquanto um meio selectivo para esta bactéria não é desenvolvido, o meio CBB serve bem como um meio diferencial para o seu crescimento, e é cada vez mais usado para este fim; no entanto, o meio CBB é especialmente útil para a detecção de *A. salmonicida* nos tecidos dos peixes (Austin & Allen-Austin, 1993).

1.5.1.7. Controle

1.5.1.7.1. Quimioterapia

Várias substâncias antimicrobianas têm sido aplicadas, com variados graus de sucesso, no tratamento da furunculose.

Entre estas substâncias, contam-se sulfamidas, como a sulfamerazina (McCarthy & Roberts, 1980), sulfamidas potenciadas (McCarthy *et al.*, 1974; McCarthy & Roberts, 1980; Fréchette *et al.*, 1983; Hirvela-Koski *et al.*, 1994), trimetoprim (Shieh, 1979), cloranfenicol, oxitetraciclina, furazolidona e nitrofurantoína (McCarthy & Roberts, 1980; Bohm *et al.*, 1986; Austin & Allen-Austin, 1993; Hirvela-Koski *et al.*, 1994), tetraciclina (McCarthy & Roberts, 1980), clortetraciclina (Bohm *et al.*, 1986), o nonapéptido da polimixina B (McCashion & Lynch, 1987), cefalotina (Hirvela-Koski *et al.*, 1994), ampicilina (Bohm *et al.*, 1986; Hirvala-Koski *et al.*, 1994) e quinolonas como a flumequina (Michel *et al.*, 1980;

Chevalier *et al.*, 1981) ou o ácido oxolínico (Austin *et al.*, 1983; Hirvela-Koski *et al.*, 1994).

Segundo Barja & Toranzo (1988), "na actualidade, considera-se que os agentes quimioterápicos de eleição para o tratamento da furunculose são as quinolonas (ácido oxolínico e flumequina)". Estes autores afirmam que também se consideram úteis as sulfamidas potenciadas e a oxitetraciclina, mas não deixam de chamar a atenção para a possibilidade de se encontrarem estirpes de *A. salmonicida* resistentes a vários destes compostos, incluindo as quinolonas. Por outro lado, Toranzo *et al.* (1992) referem uma grande sensibilidade desta bactéria ao cloranfenicol e à tetraciclina.

É importante ter em conta que Sutherland & Inglis (1992) encontraram, em estirpes de *A. salmonicida*, padrões de sensibilidade a seis substâncias antibacterianas (oxitetraciclina, ácido oxolínico, furazolidona, nitrofurantoína, trimetoprim-sulfadiazina e amoxicilina) que variavam, na mesma piscicultura, quer de peixe para peixe, quer ao longo do tempo. Isto evidencia a necessidade de proceder a estudos de sensibilidade a agentes antibacterianos sempre que a quimioterapia é imprescindível.

O desenvolvimento de resistências às drogas normalmente usadas em aquacultura torna necessária a procura de novas substâncias capazes de realizarem a importantíssima tarefa de evitar grandes perdas económicas durante as epizootias de doenças de etiologia bacteriana. Assim, devido ao uso intensivo de quinolonas, especialmente do ácido oxolínico, têm sido repetidamente referidos isolamentos de estirpes resistentes a estes compostos (Tsoumas *et al.*, 1989; Inglis *et al.*, 1991a; Toranzo *et al.*, 1992). Entretanto, uma nova geração de quinolonas - as quinolonas fluoradas - tem-se mostrado potencialmente mais eficaz do que o ácido oxolínico para o controle da furunculose (Lewin & Hastings, 1990; Barnes *et al.*, 1991; Inglis & Richards, 1991). No entanto, também a outros compostos antimicrobianos se tem observado resistência em estirpes de *A. salmonicida*, nomeadamente à amoxicilina, ao cloranfenicol, à tetraciclina, estreptomicina, sulfamidas potenciadas, etc. (Ledo et al., 1987; Austin & Allen-Austin, 1993; Inglis *et al.*, 1993; Barnes *et al.*, 1994). Por outro lado, Oppegaard *et al.* (1995) apresentam uma nova sulfamida (sulfaclorpiridazina) que, quando potenciada com trimetoprim, poderá constituir uma alternativa às sulfamidas potenciadas actualmente em uso. Uma outra droga potencialmente utilizável em aquacultura é o florfenicol (que é o análogo fluorado do tianfenicol, um composto estruturalmente relacionado com o cloranfenicol) (Inglis & Richards, 1991; Inglis *et al.*, 1991b); este antibiótico mostrou-se, inclusivé, capaz de não provocar problemas de alimentação nem anormalidades histopatológicas em doses superiores às terapêuticas, para além de conferir um elevado grau de protecção (Inglis *et al.*, 1991b).

Inglis & Richards (1991) referem a sensibilidade de *A. salmonicida*, ainda, à amoxicilina e à sulfaclorpiridazina-trimetoprim.

1.5.1.7.2. Vacinas

Embora os salmonídeos sejam susceptíveis à infecção por estirpes atípicas de *A. salmonicida*, eles exibem, com muito maior frequência, os sinais clássicos da doença, e a maior ameaça para a piscicultura continua a provir das estirpes típicas, pigmentadas, da bactéria; consequentemente, a maior parte do trabalho dedicado à pesquisa sobre os métodos de vacinação para o controle de doenças provocadas por *A. salmonicida* tem sido efectuada com estirpes típicas em salmonídeos (Michel, 1982). No entanto, Evenberg *et al.* (1988) e Daly *et al.* (1994) conseguiram algum sucesso em trabalhos de investigação sobre vacinas contra estirpes atípicas causadoras da eritrodermatite da carpa (doença que ocorre frequentemente, e que é economicamente importante, nas culturas intensivas de carpa).

A primeira tentativa de desenvolvimento de uma vacina contra a furunculose (e, ao mesmo tempo, qualquer doença bacteriana de peixes) deve-se a Duff (1942, *in* Michel, 1982), que administrou oralmente uma vacina, constituida por células *de A. salmonicida* inactivadas com clorofórmio, tendo obtido uma mortalidade de 25% nas trutas (*Salmo clarki*) tratadas, contra 75% no grupo controle. Curiosamente, na década de 50, os esforços sobre o desenvolvimento de vacinas foram praticamente abandonados, devido ao estabelecimento da quimioterapia como principal método de controle das doenças, apenas sendo retomados quando o aparecimento de resistências aos agentes quimioterápicos começou a causar problemas e tornou clara a necessidade de medidas de controle alternativas (Michel, 1982; Austin & Allen-Austin, 1993).

Infelizmente, o sucesso de Duff não foi ultrapassado, e, muitas vezes, nem sequer foi igualado, em trabalhos posteriores utilizando o mesmo tipo de vacina (células de *A. salmonicida* inactivadas) e o mesmo modo, oral, de administração desta. Assim, alguns autores (Spence *et al.*, 1965; Michel, 1979) não obtiveram qualquer protecção, enquanto que Smith *et al.* (1980, *in* Michel, 1982) obtiveram resultados positivos na sua tentativa de protecção de truta comum com células bacterianas mortas com formol.

Vários autores têm, entretanto, testado vacinas com outras composições (Michel, 1982; Austin & Allen-Austin, 1993), e administradas por diferentes vias (Paterson & Fryer, 1974; Michel, 1979; Austin & Rodgers, 1981; Cipriano, 1982a, b; Cipriano & Starliper, 1982; Ellis *et al.*, 1988; Marquis & Lallier, 1989). Embora

alguns tenham obtido algum sucesso, este foi, em muitos casos, bastante limitado (Austin & Allen-Austin, 1993).

Actualmente, ainda não existe uma vacina totalmente eficaz contra a furunculose, apesar de várias décadas de estudo (Michel, 1982; Inglis *et al.*, 1993; Allen & Allen-Austin, 1993) e apesar de já existirem vacinas comerciais que funcionam razoavelmente bem (Lillehaug *et al.*, 1992; Sandvik & Hvaal, 1992; Newman, 1993; Thuvander *et al.*, 1993), consistindo as vacinas comerciais mais promissoras essencialmente em variações de preparações de células inteiras com adjuvantes (glucanos ou alúmen e substâncias como óleos minerais) (Robertsen *et al.*, 1990; Lund *et al.*, 1991; Newman, 1993). Para além dos problemas de natureza económica, existem, também, problemas científicos no desenvolvimento de vacinas. Estes são devidos a uma compreensão incompleta da biologia de *A. salmonicida*. Especificamente, o progresso tem sido dificultado pela incerteza que envolve a natureza dos componentes antigénicos desta espécie bacteriana (especialmente os capazes de induzir protecção contra a doença), o efeito das diferenças entre estirpes e a falta de um método consistente e fiável para testar a resistência à doença ("challenge method") (Austin & Allen-Austin, 1993), embora entre alguns trabalhos que têm sido publicados sobre este assunto (Rydlo & Weismann, 1977; Cipriano, 1982b), recentemente Bricknell (1995) tenha descrito um método que considerou "simples e fiável para a avaliação de vacinas". Por outro lado, é possível que os antigénios desta bactéria presentes nas vacinas actuais não sejam relevantes para a protecção, e que os antigénios protectores realmente importantes sejam factores de virulência diferentes, possivelmente apenas expressados *in vivo* (Garduño *et al.*, 1993a, b; Thornton *et al.*, 1993).

Várias tentativas têm, todavia, sido feitas para obviar a estes problemas, incidindo na investigação do potencial de alguns dos prováveis factores de virulência (produtos extracelulares, LPS e proteína A) como antigénios protectores (Kawahara *et al.*, 1990; Lund *et al.*, 1991) ou no uso de células bacterianas avirulentas como vacinas vivas (Thornton *et al.*, 1991, 1994).

1.5.2. *Yersinia ruckeri*

1.5.2.1. Considerações Históricas

Yersinia ruckeri é o agente etiológico de uma doença de peixes observada pela primeira vez, por Rucker, no início da década de 1950, no vale de Hagerman ("Hagerman Valley"), no Estado de Idaho (Estados Unidos da América), onde causou

perdas económicas importantes nas pisciculturas de truta arco-íris (Ross *et al.*, 1966; Busch, 1978; Ewing *et al.*, 1978; Barja & Toranzo, 1988; Romalde, 1992; Austin & Allen-Austin, 1993; Inglis *et al.*, 1993). Esta bactéria foi inicialmente denominada "Bactéria da Boca Vermelha" ("Redmouth Bacterium" ou "RM Bacterium"), mas esta terminologia provocava confusão deste microrganismo com outras bactérias patogénicas que causam sindromas clínicos similares, pois o termo "Redmouth" foi usado para descrever outras septicémias de salmonídeos, causadas por *Pseudomonas* sp., *Aeromonas hydrophila* e por *Vibrio anguillarum* (Bullock *et al.*, 1978; Busch, 1978; Inglis *et al.*, 1993). Assim, McDaniel (1971, *in* Busch, 1978) propôs para a doença o nome "Hagerman Redmouth" (HRM), tendo em conta o local do primeiro isolamento da bactéria.

A primeira descrição deste microrganismo é a de um bacilo rectilíneo ou ligeiramente encurvado, Gram negativo, com flagelação perítrica, fermentativo, oxidase negativo, e não produtor de pigmento, tendo sido classificado na família *Enterobacteriaceae* (Ross *et al.*, 1966); por esta razão, passou a chamar-se "Enteric Redmouth Bacterium", sendo a doença denominada "Enteric Redmouth Disease". Ross *et al.* (1966) não conseguiram, todavia, determinar a posição taxonómica da bactéria dentro desta família.

Posteriormente, Ewing *et al.* (1978) efectuaram estudos de hibridação de DNA e determinaram a percentagem de guanina-citosina (mol % G+C) neste ácido nucleico, confirmando a classificação da bactéria na família *Enterobacteriaceae*. Dentro desta família, as suas reacções bioquímicas aproximavam-se mais das de *Serratia* e *Yersinia* (sendo, porém, um pouco mais próximas das de *Yersinia*), enquanto que a similaridade do seu DNA com espécies destes dois géneros era, também, aproximadamente igual (cerca de 30%). Ewing *et al.* (1978) classificaram a bactéria no género *Yersinia*, como *Y. ruckeri* (em homenagem a R.R. Rucker), devido à % G+C, cujo valor em *Y. ruckeri* (47,5-48,5 %) se encontrava dentro do intervalo observado em *Yersinia* (46-50 %) mas não no observado em *Serratia* (52-60 %).

O'Leary *et al.* (1979) não observaram, tal como Ewing *et al.* (1978), uma grande semelhança entre *Y. ruckeri* e as outras espécies do género *Yersinia*, quer pelas reacções bioquímicas, quer pelas homologias dos respectivos DNA. Apesar disso, os autores apoiaram o nome *Yersinia ruckeri* devido à % G+C que determinaram nesta bactéria (47,95 + 0,45 %). Todavia, Austin *et al.* (1982) e Green & Austin (1983) consideraram, com base em características fenotípicas e serológicas, que *Y. ruckeri* se relaciona mais estreitamente com *Salmonella arizonae* do que com as outras espécies de *Yersinia*.

Na 9ª Edição do "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" (Krieg & Holt, 1984), embora seja retida a classificação de Ewing *et al.* (1978), como *Yersinia ruckeri*, os autores consideram que a bactéria poderá constituir, por si mesma, um novo género, uma vez que, por um lado, a similaridade dos DNA entre as espécies de *Yersinia* é de, pelo menos, 40 %, excepto no caso de *Y. ruckeri*, espécie para a qual essa similaridade é, no máximo, 38 %, e, por outro lado, as características fenotípicas são, também, bastante diferentes entre *Y. ruckeri* e as outras espécies do mesmo género. Também DeGrandis *et al.* (1988) obtiveram uma pequena hibridação entre o DNA de *Y. ruckeri* e o de *Y. enterocolitica*.

Y. ruckeri foi descrita como "uma espécie bacteriana em busca de um género melhor como lugar final" (Farmer *et al.*, 1985, *in* Romalde, 1992). Assim, embora pareça não haver dúvidas de que as estirpes conhecidas desta espécie pertencem à família *Enterobacteriaceae*, é necessário que estudos adicionais venham a demonstrar se esta bactéria pertence a outro género já estabelecido ou se será suficientemente diferente para justificar a criação de um género novo (Furones *et al.*, 1993).

1.5.2.2. Doença da Boca Vermelha ("Enteric Redmouth Disease", ERM)

A doença da boca vermelha causada por *Y. ruckeri* pode ocorrer sob as formas hiperaguda, aguda, subaguda e crónica (Barja & Toranzo, 1988; Thoesen, 1994). Os sintomas clínicos da fase aguda são muito similares aos observados em outras septicémias bacterianas agudas, como as causadas por *Aeromonas salmonicida*, *A. hydrophila* e *Vibrio anguillarum*, pelo que não é possível fazer um diagnóstico definitivo apenas com base nos sintomas clínicos (Busch, 1983). No entanto, a presença frequente de hemorragias subcutâneas em redor da boca e na cavidade oral (o que dá o nome à doença), bem como no opérculo, hemorragias no intestino posterior, hipertrofia do baço e um material amarelado saindo pelo ânus podem ter algum valor diagnóstico (Thoesen, 1994). É importante notar, todavia, que as características hemorragias na boca e no opérculo não se observam sempre, pelo que a ausência da clássica "boca vermelha" não exclui a possibilidade de infecção por *Y. ruckeri* (Frerichs *et al.*, 1985; Sparboe *et al.*, 1986; Barja & Toranzo, 1988; Romalde, 1992; Furones *et al.*, 1993; Inglis *et al.*, 1993; Thoesen, 1994).

Nas infecções crónicas, os peixes afectados encontram-se escurecidos e letárgicos, e é frequente a ocorrência de exoftalmia, a qual pode ser unilateral ou, mais geralmente, bilateral; é comum observarem-se, também, hemorragias na íris. Pode ocorrer a ruptura dos olhos, resultando numa cegueira permanente e numa consequente astenia progressiva por falta de ingestão de alimento. Pode ocorrer uma petequiação

cutânea, mas a pele permanece intacta. Podem observar-se hemorragias petequiais na superfície e no interior das vísceras e na musculatura (Busch, 1983; Lesel *et al.*, 1983; Dalsgaard *et al.*, 1984; Giorgetti *et al.*, 1985; Meier, 1986; Barja & Toranzo, 1988; Austin & Allen-Austin, 1993; Furones *et al.*, 1993; Inglis *et al.*, 1993; Thoesen, 1994).

Outros sintomas frequentes incluem inflamação e erosão dos maxilares e do palato, hemorragias na base e entre os raios das barbatanas e à volta do ânus, e modificações patológicas do intestino (especialmente da parte posterior), o qual se torna inflamado, flácido, translúcido e hemorrágico, sofrendo, ainda, uma distensão provocada pela acumulação de um material mucóide e sero-sanguíneo, de côr amarelada, que consiste em restos necróticos da mucosa intestinal fortemente contaminados com a bactéria (Busch, 1978; Barja & Toranzo, 1988; Austin & Allen-Austin, 1993). Busch (1978) afirma que estas modificações patológicas observadas no intestino posterior constituem, provavelmente, o sintoma clínico mais significativo para o diagnóstico de ERM.

Consideram-se potencialmente susceptíveis à ERM todos os salmonídeos, tendo já sido feitos isolamentos de *Y. ruckeri* a partir de, para além de truta arco-íris, várias outras espécies do género *Oncorhynchus*, *Salvelinus fontinalis*, *S. namaycush*, *Salmo salar* e *S. trutta* (Barja & Toranzo, 1988; Romalde, 1992; Inglis *et al.*, 1993; Thoesen, 1994). No entanto, esta bactéria tem sido isolada também de várias espécies de peixes não salmonídeos, incluindo *Carassius auratus* (McArdle & Dooley-Martyn, 1985), *Acipenser baeri* (Vuillaume *et al.*, 1987), *Lota lota* (Dwilow *et al.*, 1987), *Pimephales promelas* (Michel *et al.*, 1986), *Coregonus* sp. (Rintamäki *et al.*, 1986), *Micropterus salmoides*, *Scophthalmus maximus*, e outros (Romalde, 1992; Austin & Allen-Austin, 1993; Inglis *et al.*, 1993; Thoesen, 1994). Outras espécies, nomeadamente de invertebrados aquáticos, de aves e de mamíferos podem, igualmente, ser portadores de grandes números de células de *Y. ruckeri* (Willumsen, 1989; Romalde, 1992; Furones *et al.*, 1993; Inglis *et al.*, 1993; Thoesen, 1994).

Por enquanto, a doença tem constituido um problema grave principalmente em truta arco-íris, embora tenham ocorrido epizootias em populações de truta comum, de salmão do Atlântico e de outras espécies de peixes salmonídeos (Austin & Allen-Austin, 1993).

Desde a sua detecção inicial no vale de Hagerman, Idaho (USA) a ERM estendeu-se rapidamente a todos os locais dos Estados Unidos da América onde era cultivada truta arco-íris (Bullock & Snieszko, 1979) e ao Canadá (Stevenson & Daly, 1982). A Austrália, a Europa e a África consideravam-se livres de *Y. ruckeri* até que começam a ser referenciadas numerosas epizootias causadas por esta bactéria em

países como a Austrália (Bullock *et al.*, 1978; Llewellyn, 1980), Itália (Busch, 1978; Giorgetti *et al.*, 1985), Noruega (Richards & Roberts, 1978, *in* Barja & Toranzo, 1988) França (Lesel *et al.*, 1983), Inglaterra (Roberts, 1983), Alemanha (Fuhrmann *et al.*, 1983), Dinamarca (Dalsgaard *et al.*, 1984), Suiça (Meier, 1986), Finlândia (Rintamäki *et al.*, 1986; Valtonen *et al.*, 1992), Espanha (De La Cruz *et al.*, 1987) e África do Sul (Bragg & Henton, 1986). O primeiro isolamento de *Y. ruckeri* em Portugal foi efectuado recentemente, dentro do âmbito do trabalho conducente a esta dissertação (Sousa *et al.*, 1994).

Uma outra doença, conhecida como a "Doença dos Pontos Hemorrágicos de Salmonídeos" ("Salmonid Blood Spot", SBS), cujos principais sintomas eram a presença de pontos hemorrágicos nos olhos e hemorragias na musculatura, foi descrita em salmonídeos (*Salvelinus fontinalis* e *Salmo salar*) cultivados na Austrália. A bactéria responsável por esta doença mostrou semelhanças com *Y. ruckeri* e com *Serratia liquefaciens* (Llewellyn, 1980). Stevenson & Airdrie (1984a) confirmaram esta bactéria como *Y. ruckeri*.

1.5.2.3. Descrição do Agente Etiológico

As células de *Y. ruckeri* são bacilos, rectilíneos ou ligeiramente encurvados (Ross *et al.*, 1966; Austin & Allen-Austin, 1993), tendo, em média, 1,5-3 μm de comprimento e 0,5-1 μm de largura, embora se possam observar formas filamentosas em culturas velhas (mais de 48 horas a 25 °C) (Ross *et al.*, 1966; Romalde, 1992; Austin & Allen-Austin, 1993; Furones *et al.*, 1993) ou mesmo em culturas menos velhas, em algumas estirpes (Austin *et al.*, 1982). Bullock *et al.* (1978) encontraram, entre as 18 estirpes que estudaram, uma morfologia celular mais ou menos uniforme, independentemente da origem geográfica e da espécie de isolamento. Pelo contrário, Austin *et al.* (1982) e Davies & Frerichs (1989) observaram marcadas diferenças morfológicas entre estirpes de *Y. ruckeri*, mas não detectaram qualquer correlação entre as diferenças morfológicas e a composição do meio de cultura, a idade da cultura ou características bioquímicas das estirpes.

A maior parte das estirpes de *Y. ruckeri* é móvel, geralmente através de 7-8 flagelos com disposição perítrica, embora Austin *et al.* (1982) refiram diferenças neste número, que varia de 3-4 nas células mais pequenas até 12 nos bacilos mais longos. Esta mobilidade depende da temperatura de incubação, sendo as culturas em fase logarítmica móveis entre 18 e 27 °C, embora a temperatura óptima seja de 22-25 °C; porém, a 9 °C os flagelos podem estar presentes mas não serem funcionais, estando ausentes a 35 °C (O'Leary *et al.*, 1979; Romalde, 1992; Austin & Allen-Austin, 1993; Furones *et al.*, 1993; Inglis *et al.*, 1993).

Todavia, não é raro isolarem-se estirpes de *Y. ruckeri* imóveis (Davies & Frerichs, 1989; Austin & Allen-Austin, 1993; Furones *et al.*, 1993). Davies & Frerichs (1989) verificaram que 95 % das estirpes norte americanas que estudaram eram móveis, enquanto que a mobilidade entre as estirpes europeias era de apenas 79 %. Os autores verificaram, ainda, que todas as estirpes europeias imóveis (24) eram originárias do Reino Unido e da Noruega. Posteriormente, estirpes imóveis foram também isoladas na Alemanha (Klein *et al.*, 1994). Apenas com muito poucas excepções, as estirpes imóveis são, também, incapazes de hidrolisar o Tween 80 (Davies & Frerichs, 1989; Klein *et al.*, 1994), o que levou Davies & Frerichs (1989) a concluír que as estirpes imóveis/Tween 80 negativas constituiam um grupo claramente definido, designando-as como *Y. ruckeri* biótipo 2. Klein *et al.* (1994) consideraram, por sua vez, que "o novo biótipo 2 de *Y. ruckeri* descrito por Davies & Frerichs (1989) preliminarmente para o Reino Unido e para a Noruega também pode ser isolado na Alemanha e pode, igualmente, ocorrer noutros países europeus".

As características bioquímicas de *Y. ruckeri* foram descritas por vários autores (Ross *et al.*, 1966; Ewing *et al.*, 1978; Bullock *et al.*, 1978; O'Leary *et al.*, 1979; Stevenson & Daly, 1982) e recolhidas em várias revisões (Krieg & Holt, 1984; Romalde, 1992; Austin & Allen-Austin, 1993; Furones *et al.*, 1993; Thoesen, 1994). Trata-se de um bacilo Gram e oxidase negativo, fermentador da glucose, lisina e ornitina descarboxilases positivo, cujas estirpes são homogéneas em quase todas as reacções bioquímicas, havendo muito poucas excepções, que não são significativas (Romalde, 1992; Austin & Allen-Austin, 1993; Inglis *et al.*, 1993). No entanto, podem encontrar-se reacções variáveis nos seguintes testes bioquímicos: vermelho de metilo, Voges-Proskauer, desidrolase da arginina, descarboxilase da lisina, e fermentação da lactose. Algumas destas variações podem ser causadas por diferentes temperaturas de incubação e diferentes metodologias utilizadas (Ewing *et al.*, 1978; Busch, 1983; Pyle *et al.*, 1987, Romalde, 1992; Inglis *et al.*, 1993). Por exemplo, muitas estirpes de *Y. ruckeri* podem produzir gás da fermentação da glucose quando incubadas a 18 °C, mas deixam de o fazer se a temperatura de incubação for de 25 °C (De Grandis *et al.*, 1988).

Uma outra característica variável em *Y. ruckeri* é a fermentação do sorbitol. O'Leary (1977, *in* Romalde, 1992) sugeriu que uma reacção positiva neste teste era indicativa das estirpes do serótipo II. No entanto, têm sido isoladas várias estirpes sorbitol positivas que não pertencem a este serótipo (algumas pertencem, inclusivé, ao serótipo I), de modo que o resultado do teste de fermentação do sorbitol não constitui indicação do serótipo das estirpes, embora seja, de qualquer modo, um critério diferenciador de biótipos (Stevenson & Airdrie, 1984a; Romalde, 1992; Inglis *et al.*,

1993). Segundo Barja & Toranzo (1988), "na actualidade, reconhecem-se dois biótipos baseados na fermentação do sorbitol, pertencendo as estirpes mais patogénicas ao biótipo I (sorbitol negativas)". De acordo com Inglis *et al.* (1993), cerca de 32 % das estirpes de *Y. ruckeri* fermentam o sorbitol. Os autores afirmam, ainda, que reacções positivas nos testes de fermentação da L-arabinose, da L-ramnose ou da L-xilose podem ser usadas para excluír claramente uma determinada estirpe da espécie *Y. ruckeri*.

Embora fenotipicamente homogénea, a espécie *Y. ruckeri* apresenta uma diversidade serológica considerável que permite as principais subdivisões intraespecíficas. As primeiras estirpes isoladas eram uniformes nas suas reacções serológicas (Ross *et al.*, 1966; Ewing *et al.*, 1978), sendo reconhecido apenas o serótipo original (serótipo I ou "Hagerman"). O'Leary (1977, *in* O'Leary *et al.*, 1979) descreveu um novo serótipo, fermentador de sorbitol (serótipo II ou O'Leary), e Bullock *et al.* (1978) isolaram uma estirpe australiana correspondente a uma terceira variedade serológica (serótipo III ou Australiano). Estes autores demonstraram a presença de um antigénio comum aos três serótipos, embora estando também presentes antigénios particulares a cada serótipo. A bactéria, também australiana, responsável pela doença dos Pontos Hemorrágicos de Salmonídeos ("Salmonid Blood Spot", SBS; Llewellyn, 1980) foi "classificada" no serótipo I' por apresentar uma homologia parcial com o serótipo I mas ser incapaz de absorver completamente o anti-soro contra o serótipo I. Mais tarde, foi incluída no serótipo III (De Grandis *et al.*, 1988).

Stevenson & Airdrie (1984a) designaram 2 novos serótipos (IV e V), mas, posteriormente, De Grandis *et al.* (1988) demonstraram, por estudos de hibridação de DNA, que as estirpes do "serótipo IV" não pertenciam a *Y. ruckeri*. Finalmente, Daly *et al.* (1986) encontraram uma nova variedade serológica (serótipo VI) desta bactéria. Estes autores também detectaram uma estirpe fermentadora do sorbitol, do serótipo III, que constituiu a primeira referência deste serótipo fora da Austrália.

Assim, com base nos estudos serológicos utilizando células intactas são reconhecidos cinco serótipos (I, II, III, V e VI), sendo o serótipo I (Hagerman; estirpes geralmente sorbitol negativas) o mais comum e mais virulento (Romalde, 1992; Austin & Allen-Austin, 1993; Inglis *et al.*, 1993; Furones *et al.*, 1993; Romalde *et al.*, 1993).

A tipagem serológica utilizando células intactas baseia-se, dentro das *Enterobacteriaceae*, no reconhecimento combinado de várias estruturas antigénicas associadas à superfície celular, incluindo antigénios somáticos ou antigénios O (LPS), antigénios flagelares (H) e antigénios capsulares (K); devido à abundância e à localização dos lipopolissacarídeos (LPS), os antigénios O constituem o antigénio

superficial mais importante em muitas bactérias Gram negativas, e são a base para esquemas detalhados de serotipagem (Inglis *et al.*, 1993). Os LPS extraídos de *Y. ruckeri* (tal como de outras bactérias) podem ser analisados através da comparação dos padrões obtidos por electroforese em geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) (incluindo geles corados pela prata e "western blots"): as estirpes com o mesmo antigénio O devem apresentar o mesmo padrão de bandas (Inglis *et al.*, 1993). Esta técnica foi usada por Pyle & Schill (1985, *in* Pyle *et al.*, 1987) no estudo das variações antigénicas entre estirpes fermentadoras do sorbitol anteriormente descritas como pertencendo ao serótipo II; os autores identificaram nestas (17) estirpes quatro serótipos-O ("O-serotypes"), que designaram como serótipos 2, 4, 5 e 6. No entanto, Inglis *et al.* (1993) afirmam que entre estas 17 estirpes podem ter sido incluidas algumas estirpes fermentadoras do sorbitol pertencentes aos serótipos III, V ou VI. Por outro lado, Pyle *et al.* (1987) usaram um teste de imunofluorescência indirecta (iFAT) para a detecção de antigénios celulares, tendo distinguido pelo menos seis serótipos (1, 2, 3, 4, 5 e 6) entre 79 estirpes de *Y. ruckeri* de origens americana e australiana.

Tal como Pyle & Schill, também Flett (1989, *in* Inglis *et al.*, 1993) estabeleceu um agrupamento serológico com base na análise dos lipopolissacarídeos. A autora verificou que as estirpes pertencentes aos serótipos I e III possuíam perfis de LPS semelhantes, observáveis quer nos geles corados pela prata, quer nos "immunoblots" utilizando anti-soros contra células intactas dos serótipos I ou III. Isto é indicativo da presença de um antigénio O (LPS) comum, e a autora reuniu os serótipos I e III no serótipo O:1. No entanto, uma vez que os serótipos I e III podem ser distinguidos através de soros absorvidos, devem existir outros antigénios (talvez proteínas da membrana externa ou antigénios flagelares) que não sejam comuns; até que esses antigénios sejam identificados, é conveniente reter a divisão do serótipo O:1 nos serótipos I e III, pois parece haver alguma especificidade na distribuição geográfica ou nos hospedeiros para o serótipo III (Willumsen, 1989; Inglis *et al.*, 1993); Inglis *et al.* (1993) afirmam que em truta arco-íris têm sido isoladas mais frequentemente estirpes do serótipo I, enquanto que em salmão do Atlântico têm sido detectadas maioritariamente estirpes do serótipo III. O serótipo II inclui estirpes com três padrões de LPS distintos, que Flett (1989, *in* Romalde, 1992) designou como serótipos O:2 (estirpes mais frequentemente isoladas de salmão "chinook"), O:3 e O:4, enquanto que os serótipos V e VI foram designados como O:5 e O:6 pela mesma autora. Os padrões de LPS do serótipo O:4 de Flett eram semelhantes aos do O:2 nos geles corados pela prata, mas não interagiam com os soros anti serótipo II nos "immunoblots", embora células do serótipo O:4 tratadas pelo calor fossem aglutinadas por estes soros. Também o grupo O:6 apresentava um padrão de LPS semelhante ao do grupo O:3, mas não reagia nos "immunoblots" com os anti-soros preparados contra as outras estirpes

representativas. Finalmente, as estirpes do serótipo O:5 apresentavam padrões de LPS semelhantes, mas não idênticos, aos do serótipo O:1; tinham menos bandas, especialmente na região de pesos moleculares mais elevados, e as reacções nos "immunoblots" não eram totalmente recíprocas, pois os soros anti-serótipo III não reagiam com o serótipo O:5 (Inglis *et al.*, 1993). Segundo estes autores, os LPS das estirpes O:5 podem possuir alguns açúcares ou epítopos em comum com as estirpes do serótipo O:1, mas em arranjos ou em proporções diferentes.

Davies (1990, *in* Romalde, 1992) sugeriu outro esquema de serotipagem. Realizando um estudo serológico com 131 estirpes de *Y. ruckeri* com origens geográficas diferentes, o autor não encontrou distinção entre os serótipos I e III de Stevenson & Daly (1982) e Daly *et al.* (1986), de modo que incluíu ambos no serótipo O:1, enquanto que os seus serótipos O:2, O:5, O:6 e O:7 correspondem, respectivamente, aos serótipos II, V, VI e "não tipado". Davies sugeriu, ainda, que o serótipo III descrito por Bullock *et al.* (1978) é um mutante do serótipo I e que, portanto, o serótipo III (ou O:3) não existiria (Romalde, 1992). Romalde (1992) apresenta uma tabela em que efectua a correspondência entre os serótipos descritos pelos vários autores.

Davies (1991) efectuou uma análise combinada de biótipos (biótipos 1 e 2 de Davies & Frerichs, 1989, sendo o biótipo 2 constituido pelas estirpes imóveis e incapazes de hidrolizar o Tween 20 e oTween 80), serótipos (serótipos O:1, O:2, O:5, O:6 e O:7) e "OMP-types" (tipos de padrão de proteínas de membrana externa) (tipos 1, 2, 3, 4 e 5 determinados pelo autor), com a finalidade de identificar grupos clonais e demonstrar a relação existente entre diferentes estirpes (135) de *Y. ruckeri*. O autor verificou, por exemplo, que as estirpes do serótipo O:1 podiam ser subdivididas em seis grupos clonais, dois dos quais (clone 2, formado por 24 estirpes do biótipo 2 isoladas apenas no Reino Unido, e clone 5, constituido por 55 estirpes isoladas em vários países europeus, excluindo o Reino Unido, e 6 isoladas na América do Norte, todas do biótipo 1) eram responsáveis pela maior parte das epizootias de ERM na Europa e representavam 79% das estirpes isoladas neste continente. Por outro lado, a inclusão da tipagem através dos padrões de proteínas de membrana externa ("OMP-types") permitiu distinguir entre estirpes do biótipo 2 (imóveis e Tween 80 negativas) isoladas no Reino Unido e na Noruega, as quais eram consideradas iguais quando eram usados apenas métodos serológicos clássicos e bioquímicos. Davies (1991) demonstrou, pois, a "utilidade da combinação destes três tipos de tipagem para os estudos epidemiológicos de *Y. ruckeri*".

Um outro esquema de serotipagem foi proposto por Romalde *et al.* (1993). Os autores estudaram os perfis de LPS e de proteínas de membrana (proteínas totais e proteínas de membrana externa), e respectivos "immunoblots", de 53 estirpes de *Y. ruckeri* com origem em diversas áreas geográficas e diversas espécies de peixes (para além de uma estirpe ambiental, isolada de água, e outra isolada de um mamífero). Estas estirpes eram representativas dos 5 serótipos inicialmente descritos utilizando células bacterianas intactas (serótipos I, II, III, V e VI). As diferenças nos perfis de LPS foram observadas nas distâncias entre bandas e na posição do "core" (banda que migra mais), tendo os autores verificado que as estirpes do serótipo I (todas as espanholas e as estirpes de referência pertencentes a este serótipo) apresentavam o mesmo perfil entre si, o qual era praticamente idêntico ao das estirpes do serótipo III; as estirpes do serótipo II apresentavam três padrões, apenas ligeiramente diferentes entre si, mas marcadamente distintos dos outros serótipos; os padrões das estirpes dos serótipos V e VI apresentavam menos bandas do que os outros serótipos, e as distâncias entre bandas eram, também, diferentes. Nos "immunoblots" dos LPS, foi observada uma forte relação entre os serótipos I e III, usando anti-soros desenvolvidos contra qualquer um destes dois serótipos; por outro lado, nenhum dos outros serótipos reagiu com estes anti-soros.

A análise das proteínas totais e das proteínas de membrana externa proporcionaram a Romalde *et al.* (1993) resultados similares aos que os autores obtiveram com a análise dos LPS. Assim, embora todos os serótipos revelassem possuir um número considerável de bandas comuns, foi possível distinguir perfis muito semelhantes entre as estirpes dos serótipos I e III, enquanto que entre as estirpes do serótipo II foram encontrados 3 perfis diferentes, apenas com diferenças mínimas entre si. Os serótipos V e VI apresentavam perfis específicos. Nos "immunoblots" das proteínas Romalde *et al.* (1993) obtiveram resultados que apoiaram totalmente os dos "immunoblots" dos LPS.

Os resultados obtidos nas análises dos perfis de LPS e de proteínas, e respectivos "immunoblots", juntamente com os resultados de ensaios de microaglutinação usando anti-soros absorvidos, permitiram a Romalde *et al.* (1993) propôr o seguinte esquema de serotipagem:

- os serótipos I e III são reunidos no serótipo O1 devido ao elevado grau de similaridade observado, tanto nos padrões de LPS e de proteínas como nos testes serológicos; no entanto, os autores reconhecem dois subgrupos que apresentam pequenas diferenças entre si, tais como na fermentação do sorbitol, no conteúdo

plasmídico e em algumas bandas nos perfis de proteínas de membrana. Estes dois subgrupos são denominados O1a (anterior serótipo I) e O1b (anterior serótipo III);

- o serótipo II é denominado O2, e simultaneamente dividido em três subgrupos (O2a, O2b e O2c) com base nos diferentes (embora muito parecidos) padrões de LPS e de proteínas, sendo predominante o subgrupo O2b; devido ao facto de os subgrupos O2a e O2c serem constituidos por muito poucas estirpes, os autores admitem que o possível aparecimento de novas estirpes destes subgrupos ajudará a confirmar mais claramente a subdivisão do serótipo O2;

- os serótipos V e VI, bem diferenciados um do outro e dos restantes, são denominados O3 e O4, respectivamente, para seguir uma ordem numérica lógica.

Romalde *et al.* (1993) apresentam, ainda, uma comparação entre o seu esquema de serotipagem e esquemas anteriores; nomeadamente, o seu esquema apoia o que foi apresentado por Flett, com algumas modificações, como a divisão do serótipo O1 em dois grupos (O1a e O1b). Por outro lado, estes autores, ao contrário de Davies, não detectaram diferentes perfis de proteínas de membrana externa em estirpes pertencentes ao mesmo serótipo-O, pelo que não estabeleceram qualquer classificação em "OMP-types".

Schill *et al.* (1984), baseando-se na análise isoenzimática dos produtos de 15 *loci* cromossómicos em 47 estirpes de *Y. ruckeri*, sugeriram que esta espécie apresenta pouca diversidade genética. Também os resultados de De Grandis *et al.* (1988) e de Romalde (1992) demonstram uma diversidade genética muito pequena dentro desta espécie bacteriana. No entanto, Inglis *et al.* (1993) encontraram algumas distinções genéticas entre estirpes desta bactéria, de diferentes serótipos, com base nos padrões de restrição com a enzima *Eco*RI. Embora a ribotipagem tenha sido usada, com sucesso, no estudo das variações genéticas intraespecíficas de algumas bactérias (Aznar *et al.*, 1992; Moyer *et al.*, 1992; Zhao *et al.*, 1992; Olsen & Larsen, 1993; Nielsen *et al.*, 1994; Pedersen *et al.*, 1994a; Hänninen *et al.*, 1995), tal estudo ainda não está referido para *Y. ruckeri*.

A maior parte (75%) das estirpes do serótipo I analisadas por De Grandis & Stevenson (1982) possuía um plasmídeo de elevado peso molecular (40-50 Mda; 88Kb), e um pequeno plasmídeo de 15-21 Kb. Também outros autores referem a existência de um plasmídeo de elevado peso molecular na maioria das estirpes deste serótipo, embora refiram tamanhos variáveis entre 40 e 78 Mda (Toranzo *et al.*, 1983a; Schill, 1987; Guilvout *et al.*, 1988); esta variabilidade nos pesos moleculares indicados pode dever-se, segundo Furones *et al.* (1993), à utilização de diferentes métodos de

isolamento e purificação destes fragmentos de DNA extracromossómico. Embora tenha sido sugerido que o plasmídeo de grande peso molecular observado em *Y. ruckeri* poderia ser homólogo do plasmídeo de cerca de 63 Kb (40-48 Mda), associado a virulência, encontrado noutras espécies de *Yersinia* (Portnoy & Falkow, 1981, *in* Romalde, 1992), estudos posteriores (De Grandis & Stevenson, 1982; Schill, 1987; Guilvout *et al.*, 1988; Furones *et al.*, 1993) demonstraram que tal homologia não existe. De acordo com Romalde *et al.* (1993), o plasmídeo de grande peso molecular (cerca de 50 Mda) é comum às estirpes dos serótipos I (O1a destes autores) e III (O1b), enquanto que o plasmídeo de cerca de 15 Mda estava presente apenas nas estirpes do serótipo I (O1a). As estirpes dos serótipos II e V (O2 e O3 de Romalde *et al.*, 1993, respectivamente) apresentam uma grande variedade de perfis plasmídicos, nomeadamente com plasmídeos de pesos moleculares mais baixos, enquanto que no serótipo VI foi encontrado um único plasmídeo, com cerca de 6,3 Kb (De Grandis & Stevenson, 1985; Inglis *et al.*, 1993; Furones *et al.*, 1993; Romalde *et al.*, 1993). Por outro lado, existem estirpes, dos serótipos I, II, III e V, que não possuem qualquer plasmídeo (De Grandis, 1987, *in* Inglis *et al.*, 1993). De Grandis & Stevenson (1985) observaram, em duas estirpes do serótipo I, a presença de um plasmídeo transferível, com 36 Mda (54 Kb), associado à resistência à tetraciclina e às sulfamidas; este plasmídeo não foi, porém, detectado por Romalde *et al.* (1993).

A tipagem de *Y. ruckeri* através da sensibilidade a bacteriófagos foi estudada por Stevenson & Airdrie (1984b), tendo os autores encontrado alguma potencialidade nesta técnica, especialmente no que se refere ao bacteriófago YerA41, que lisou 34 das 35 estirpes do serótipo I testadas mas foi inactivo relativamente a 15 estirpes de outros três serótipos (I', II e V).

A maior parte das epizootias de ERM tem sido causada por estirpes sorbitol negativas do serótipo I, embora algumas tenham sido provocadas por estirpes sorbitol positivas (Bullock *et al.*, 1978; Valtonen *et al.*, 1992; Austin & Allen-Austin, 1993; Furones *et al.*, 1993; Inglis *et al.*, 1993). Porém, Pyle *et al.* (1987) concluíram que as estirpes sorbitol positivas podem ser tão virulentas como as sorbitol negativas. Por outro lado, também estirpes do serótipo II têm sido associadas com epizootias de ERM (Cipriano *et al.*, 1986, 1987; Austin & Allen-Austin, 1993; Inglis *et al.*, 1993), apesar de as estirpes do serótipo I serem consideradas como as mais patogénicas para truta arco-íris, seguindo-se as do serótipo II e, depois, as do serótipo III (Austin & Allen-Austin, 1993; Furones *et al.*, 1993; Inglis *et al.*, 1993). Bullock *et al.* (1983) referem LD_{50} de 3,0 X 10^5 células/ml para o serótipo I e de 1,0 X 10^7 células/ml para o serótipo II (o valor para o serótipo III não foi determinado).

Por outro lado, a maior parte das estirpes europeias pertence ao serótipo O1, tendo sido isoladas algumas estirpes do serótipo O2 apenas no Reino Unido e nos países Bálticos (Romalde *et al.*, 1993); esta observação está de acordo com as de Daly *et al.* (1986) e de Davies & Frerichs (1989), embora estes autores tenham usado uma nomenclatura diferente para estes serótipos. Por sua vez, Inglis *et al.* (1993) chamam a atenção para o facto de as estirpes dos serótipos O:5 e O:6 no esquema de Flett (O3 e O4 no esquema de Romalde *et al.*, 1993) apenas terem sido isoladas na América do Norte.

1.5.2.4. Diagnóstico de Infecção e Isolamento de *Y. ruckeri*

O diagnóstico é baseado no isolamento e na identificação de *Y. ruckeri*.

Y. ruckeri cresce bem nos meios de cultura gerais usados rotineiramente em bacteriologia, tais como TSA ou BHIA; por vezes, também é usado Agar-Sangue. Esta bactéria pode ser recuperada com relativa facilidade de órgãos internos, nomeadamente do rim, seguindo-se uma incubação a 20-25 °C durante 24-48 horas. Normalmente, as colónias de *Y. ruckeri* em TSA ou BHIA são lisas, circulares, com bordos inteiros, têm 1-3 mm de diâmetro e côr beje-esbranquiçada (Austin & Allen-Austin, 1993; Furones *et al.*, 1993).

A detecção de *Y. ruckeri* em peixes é melhorada através de um enriquecimento prévio à sementeira em meio sólido. Neste enriquecimento, as amostras de tecidos devem ser semeadas em TSB ou BHI e incubadas a 18 °C durante 2 dias, antes de serem semeadas em meio sólido (Austin & Allen-Austin, 1993). Segundo estes autores, uma combinação de enriquecimentos em meio líquido e de amostragens do coração, do fígado e do baço, para além do rim, tornam os métodos de cultura muito eficazes na detecção desta, como de outras, bactérias. Para a detecção de infecções assintomáticas (em princípio, mais frequentes em peixes de tamanho superior a 12 cm) devem analisar-se amostras do intestino (Barja & Toranzo, 1988).

Waltman & Shotts (1984) desenvolveram um meio (SW) selectivo/diferencial para *Y. ruckeri*, o qual contém Tween 80, sacarose e azul de bromotimol. A distinção de *Y. ruckeri* neste meio baseia-se na capacidade desta bactéria de hidrolisar o Tween 80 e na sua incapacidade de fermentar a sacarose. As colónias desta bactéria no meio SW são pequenas e aparecem de côr verde pálido (devido à não fermentação da sacarose) e circundadas por uma zona de hidrólise do Tween 80 (esta hidrólise é visualizada pela formação de um halo de deposição de complexos oleato-cálcio à volta da colónia, pelo que é necessária a presença de $CaCl_2$ no meio). Para os seus autores, o meio SW tem, ainda, as vantagens de ser tão sensível como o Agar de MacConkey e

como o TSA para o crescimento de *Y. ruckeri*, ser barato e fácil de preparar. No entanto, Hastings & Bruno (1985) e Rodgers & Hudson (1985) referem sérias limitações do meio SW na detecção da maior parte das estirpes de *Y. ruckeri* isoladas no Reino Unido (biótipo 2 de Davies & Frerichs, 1989, isto é, estirpes imóveis e Tween-negativas), as quais não aparecem com o halo de precipitação de sais de cálcio e apresentam uma débil modificação da côr, para além de afirmarem que este meio se revelou menos satisfatório do que o TSA para a detecção desta bactéria. No entanto, numa publicação posterior àquela em que o meio SW foi descrito, Shotts (1991, *in* Furones *et al.*, 1993) revelou um erro de impressão no artigo original (Waltman & Shotts, 1984), onde, em vez de uma concentração de 0,003 g de azul de bromotimol por litro, deveria estar 0,03 g/l deste indicador. Embora este erro de impressão possa ter originado as pequenas modificações da côr das colónias observadas por Hastings & Bruno (1985) e por Rodgers & Hudson (1985) permanece válida a objecção de que nem todas as estirpes de *Y. ruckeri* hidrolizam o Tween 80 e, portanto, as interpretações dos resultados obtidos terão de ser feitas com muito cuidado. O uso do meio SW deu, todavia, muito bons resultados na detecção de *Y. ruckeri* efectuada por Romalde *et al.* (1994a), o que os autores atribuiram ao facto de em Espanha, tal como no resto da Europa (à excepção do Reino Unido) e na América do Norte, a maior parte das estirpes desta espécie serem capazes de hidrolisar o Tween (todas as estirpes que os autores isolaram pertenciam ao serótipo O1a de Romalde *et al.*, 1993).

Rodgers (1992) desenvolveu outro meio (ROD; Agar Ribose Ornitina Desoxicolato) selectivo/diferencial para a detecção desta mesma espécie bacteriana. Este meio contém, para além de outros constituintes, ribose, ornitina, maltose, desoxicolato de sódio, vermelho de fenol como indicador de pH e SDS como agente antimicrobiano. Quando crescem neste meio, as estirpes de *Y. ruckeri* pertencentes aos serótipos O1 (incluindo os dois biótipos de Davies & Frerichs, 1989) e O6 de Davies (I, III e VI da classificação clássica; O1a, O1b e O4 de Romalde *et al.*, 1993) formam colónias amarelas num fundo vermelho com depósitos cristalinos que se difundem para o agar circundante após 72-96 horas de incubação a 26 °C; uma incubação por um período de tempo superior, de até 10 dias, resulta no aumento da intensidade da côr dos depósitos, e na viragem da côr do meio, que também se torna amarelo. A fermentação inicial da ribose, por estas bactérias, faz baixar o valor do pH de 7,4 para aproximadamente 6,8 nas primeiras horas de incubação; esta reacção é seguida pela descarboxilação da ornitina, que estabiliza o pH e permite, mesmo, uma ligeira subida deste, antes de uma nova descida (devida à fermentação da maltose), para cerca de 5,0, após alguns dias de incubação. A este valor de pH, o vermelho de fenol vira para amarelo e o desoxicolato de sódio precipita à volta das colónias bacterianas. As estirpes de *Y. ruckeri* pertencentes aos restantes serótipos, porém, não produziram o

depósito amarelo no agar à volta das colónias, embora estas adquirissem uma coloração amarela pálida.

O meio ROD melhorou a detecção de *Y. ruckeri* em material fecal e permitiu um estudo mais detalhado da epidemiologia da ERM, tendo o seu uso regular em duas pisciculturas inglesas permitido o isolamento desta bactéria, nas próprias pisciculturas, 4-6 semanas antes da ocorrência de infecção clínica aguda. Este meio também se mostrou útil para o isolamento de *Y. ruckeri* de amostras de água do rio.

O crescimento de *A. hydrophila* e de outras bactérias Gram negativas (não identificadas) foi reduzido relativamente ao verificado em TSA, enquanto que o crescimento das *Pseudomonas* sp. foi eliminado. No entanto, o crescimento das *Enterobacteriaceae* não foi significativamente diferente nos dois meios.

O facto de o meio ROD permitir diferenciar ambos os biótipos (Davies & Frerichs, 1989) do serótipo O1 indica a sua utilidade potencial, não apenas no Reino Unido, mas também noutros países onde predomina este serótipo, particularmente no continente europeu, onde estas estirpes são responsáveis por 91% das epizootias de ERM (Rodgers, 1992).

O sistema miniaturizado API 20E, desenvolvido para uso em medicina humana, tem sido usado em muitos estudos de *Y. ruckeri*, com uma modificação das condições de incubação (temperatura e tempo) (Rintamaki *et al.*, 1986; Dear, 1988; Davies & Frerichs, 1989; Romalde & Toranzo, 1991; Romalde, 1992; Furones *et al.*, 1993; Santos *et al.*, 1993). Embora este sistema seja rápido e conveniente para a identificação de *Y. ruckeri*, é necessária uma interpretação cuidadosa dos perfis resultantes, uma vez que algumas reacções diferem das obtidas com testes convencionais (Stevenson & Daly, 1982; Davies & Frerichs, 1989; Dear, 1988; Romalde & Toranzo, 1991; Romalde, 1992; Furones *et al.*, 1993). Falsos resultados negativos têm sido obtidos nos testes de utilização do citrato, da hidrólise da gelatina e da descarboxilase da lisina, Voges-Proskauer, fermentação do sorbitol; falsos resultados positivos podem ocorrer nos testes da descarboxilase da lisina, fermentação do sorbitol, inositol e amigdalina, e Voges Proskauer (Romalde & Toranzo, 1991; Romalde, 1992; Furones *et al.*, 1993; Santos *et al.*, 1993). Por outro lado, vários perfis API 20E que têm sido obtidos por diferentes autores com estirpes de *Y. ruckeri* não estão codificados no índice API, ou estão citados neste índice como correspondentes a outra espécie bacteriana. Vários autores indicam listas de perfis possíveis de *Y. ruckeri*, alguns dos quais não estão incluídos no índice ou estão codificados como pertencentes a outras espécies (Stevenson & Daly, 1982; Romalde & Toranzo, 1991; Romalde, 1992; Furones *et al.*, 1993; Santos *et al.*, 1993).

Vários autores têm utilizado com sucesso técnicas serológicas para a detecção e o diagnóstico de infecções assintomáticas (Johnson *et al.*, 1974; Busch & Lingg, 1975; Hansen & Lingg, 1976), particularmente a técnica de imunofluorescência indirecta (iFAT) (Johnson *et al.*, 1974) e os testes de aglutinação com partículas inertes (latex) (Hansen & Lingg, 1976). As técnicas de imunofluorescência (FAT) podem ser realizadas em esfregaços de tecidos (nomeadamente renal ou hepático) ou em esfregaços preparados a partir de uma cultura bacteriana em placa; no entanto, apesar de serem rápidas, estas técnicas são susceptíveis à ocorrência de fluorescência não específica e a reacções cruzadas que podem levar a identificações erróneas na ausência de outros testes confirmativos (Busch, 1983; Furones *et al.*, 1993).

Austin *et al.* (1986), utilizaram a técnica ELISA com anticorpos monoclonais, tendo demonstrado a sua utilidade para o diagnóstico de *Y. ruckeri*, tanto em peixes infectados experimentalmente em laboratório como em amostras testadas no campo (o que foi possível através do desenvolvimento de "palitos de poliestireno" como fase sólida do antigénio). Este facto, juntamente com a elevada sensibilidade da técnica (10^2 bactérias /ml), aumenta grandemente a possibilidade da sua utilização nas próprias pisciculturas. No entanto, a técnica permite apenas o reconhecimento de casos clínicos da doença, não permitindo a detecção de casos de infecção subclínica ou de portadores assintomáticos. Esta falta de sensibilidade pode constituir uma das razões porque a técnica ELISA não é mais usada no diagnóstico "no campo" (Romalde, 1992; Furones *et al.*, 1993).

1.5.2.5. Epizootiologia

As epizootias de ERM apresentam uma correlação com a estação do ano, com a temperatura da água, com o tamanho dos peixes e com o nível de stress a que estes são sujeitos (Busch, 1978, 1983; Rodgers, 1991; Austin & Allen-Austin, 1993).

Em truta arco-íris, embora a doença possa afectar exemplares de qualquer tamanho, ela ocorre mais frequentemente em exemplares de 6-8 cm, enquanto que os indivíduos maiores (12,5 cm ou mais) sofrem formas mais crónicas e menos severas de ERM (Busch & Lingg, 1975; Austin & Allen-Austin, 1993; Furones *et al.*, 1993; Thoesen, 1994).

A forma aguda da doença pode ter um curso rápido, demorando 4-10 dias. Nestas epizootias, as perdas podem atingir 30-70 % da população, dependendo do tamanho dos peixes, da temperatura da água, do nível de stress e da susceptibilidade relativa. Em infecções subagudas, a mortalidade pode atingir 10-50 % da população, mas ao longo de um período de 2 a 6 meses (Busch, 1978, 1983; Furones *et al.*, 1993).

Por outro lado, o tempo de incubação até ao aparecimento da primeira mortalidade por ERM é inversamente proporcional à temperatura da água, sendo de 5-7 dias a 15 °C; em peixes previamente expostos a *Y. ruckeri*, a mortalidade pode começar dentro de 3-5 dias se os peixes estão sujeitos a condições ambientais desfavoráveis (Busch, 1978; Furones *et al.*, 1993). Para além de poder surgir nestas formas de curso mais rápido, a ERM pode também causar baixos níveis de mortalidade sustentada (da ordem de 10%) ao longo de vários meses. Esta forma crónica da doença pode resultar em epizootias agudas se os peixes forem sujeitos a stress (especialmente se a temperatura da água é superior a 13 °C), quer por manuseamento (incluindo a simples movimentação de portadores assintomáticos), quer por condições ambientais adversas como densidades populacionais elevadas, água pouco oxigenada, temperaturas variáveis, sólidos em suspensão, elevados níveis de amónia ou exposição a metais pesados (Busch, 1978, 1983; Meier, 1986; Dear, 1988; Austin *et al.*, 1986; Rodgers, 1991; Furones *et al.*, 1993; Thoesen, 1994).

A severidade da doença é máxima quando a temperatura da água é de 15-18 °C, diminuindo consideravelmente quando a temperatura desce para valores inferiores a 10 °C (Austin & Allen-Austin, 1993). A maioria das epizootias tem lugar a temperaturas de 11-18 °C, encontrando-se a forma crónica geralmente entre 8 e 11 °C (Romalde, 1992). Busch (1978) correlacionou as diferentes formas de ERM com as estações do ano e a temperatura da água. Assim, as infecções agudas teriam lugar na Primavera e no início do Verão (aquando da subida da temperatura), com mortalidades de 50-70%, e afectando principalmente os alevins, enquanto que no Outono e no Inverno (descida da temperatura) as infecções seriam subagudas e afectariam juvenis, provocando mortalidades entre 10 e 50%. As infecções crónicas, embora com níveis de mortalidade muito baixos, podem causar perdas económicas muito elevadas, por afectarem peixes de tamanho comercializável.

Durante uma série de 12 amostragens mensais efectuadas em duas truticulturas galegas, Romalde *et al.* (1994a) detectaram um nível de infecção crónico, com picos de detecção de *Y. ruckeri* nos períodos de fim da Primavera-início do Verão (meses de Maio e Junho) e Outono (meses de Setembro e Outubro). Também Rodgers (1991) refere que várias truticulturas britânicas têm sofrido epizootias de ERM todos os anos desde a sua confirmação inicial, e que estas epizootias ocorrem principalmente entre os meses de Abril e de Setembro. Por outro lado, Romalde *et al.* (1994a) verificaram que o aumento dos números de *Y. ruckeri* detectados nas amostras de água e de sedimento coincidiu com o isolamento da bactéria a partir de peixes, aparentemente saudáveis, amostrados em diversos tanques das truticulturas.

A transmissão da doença ocorre horizontalmente, através da água. Embora *Y. ruckeri* possa ser isolada facilmente dos reprodutores infectados aquando da desova, a sua transmissão vertical ainda não foi demonstrada, e essa possibilidade parece ser praticamente nula quando, após a fertilização, se procede à desinfecção dos ovos com iodóforos (Busch, 1983; Romalde, 1992; Furones *et al.*, 1993).

O principal reservatório de *Y. ruckeri* parece ser constituido pelos peixes portadores assintomáticos (Busch, 1983). Busch & Lingg (1975) conseguiram estabelecer o estado de portador assintomático em trutas arco-íris, quer através de imersão quer de injecção intraperitoneal; ambos os métodos produziram infecção em todos os peixes aos 21 dias. Durante os primeiros 30-60 dias, foi facilmente isolada a bactéria de todos os tecidos indicadores (rim, fígado, baço e intestino posterior), mesmo dos peixes sem sintomas de doença. Entre 60 e 65 dias após a infecção, este microrganismo foi detectado no intestino posterior de 50-75% dos sobreviventes, permanecendo os peixes assintomáticos infectados durante mais de 102 dias (tempo de duração das experiências). Os autores observaram a ocorrência de um ciclo regular, de 30-40 dias de duração, na libertação de *Y. ruckeri* do intestino dos peixes que tinham sido infectados por injecção intraperitoneal; esta libertação precedia o reaparecimento dos sintomas da doença e da mortalidade em 3-5 dias. Como a periodicidade deste ciclo era alterada por variações sazonais na temperatura da água, factores de carga, manipulação dos peixes e outros factores de stress para estes, o significado deste ciclo não é claro (Busch & Lingg, 1975). No entanto, o fenómeno cíclico é frequentemente referido para explicar flutuações na prevalência de *Y. ruckeri* em grupos de peixes analisados periodicamente (Bruno & Munro, 1989). A mortalidade cíclica sazonal em populações com infecções crónicas de ERM também tem sido referido mesmo após tratamentos com antibióticos (Furones *et al.*, 1993).

Num estudo laboratorial, Hunter *et al.* (1980) demonstraram que os peixes portadores constituem uma importante fonte de infecção quando se encontram em condições que lhes provocam stress. As trutas (*Salmo gairdneri*) portadoras de *Y. ruckeri* que os autores sujeitaram a stress térmico (elevando a temperatura para 25 °C) transmitiram a bactéria a exemplares saudáveis, ao contrário do que se verificou com trutas portadoras que não foram submetidas ao stress. Segundo Furones *et al.* (1993), a temperatura de 25 °C reflete uma situação artificial, e consideram que teria sido útil a comparação dos dados obtidos com elevações da temperatura para valores mais naturais (15-20 °C).

Outros possíveis reservatórios de *Y. ruckeri* podem ser outros animais nos quais esta bactéria tem sido encontrada em grandes números. Estes possíveis disseminadores

da ERM incluem peixes selvagens (Willumsen, 1989) ou ornamentais (McArdle & Dooley-Martyn, 1985; Austin & Allen-Austin, 1993), invertebrados aquáticos entre os quais o caranguejo do rio (Austin & Allen-Austin, 1993) e, mesmo, animais terrestres, nomeadamente aves e mamíferos (Stevenson & Daly, 1982; Willumsen, 1989; Romalde, 1992; Austin & Allen-Austin, 1993; Furones *et al.*, 1993).

"Subsiste alguma controvérsia sobre alguns aspectos da ecologia de *Y. ruckeri*, que tem sido alternadamente considerada, por um lado, bem adaptada como uma bactéria saprófita aquática normal ou, por outro lado, incapaz de viver livremente na água por extensos períodos de tempo apesar de poder sobreviver durante 2 meses no sedimento" (Austin & Allen-Austin, 1993). No entanto, outras experiências referidas por estes autores demonstraram que este microrganismo foi capaz de sobreviver durante 4 meses em água com salinidades entre 0 e 20‰ (a sobrevivência em água do mar era menor), o que implica que *Y. ruckeri* é capaz de sobreviver na coluna de água (doce) durante um longo período de tempo após a ocorrência de uma epizootia de ERM. É interessante notar que Romalde *et al.* (1994a) isolaram *Y. ruckeri* num local de um rio situado 15 Km a jusante de uma truticultura, o que levou os autores a especular que, por um lado, a bactéria poderia ser uma espécie nativa, encontrada no rio em condições naturais, que infecta os peixes das instalações aquícolas através da água que entra nestas, ou, por outro lado, a presença desta espécie bacteriana no rio resulta da introdução nestas instalações de trutas sem um controle sanitário adequado. Estes autores concluem que o seu trabalho demonstrou que a presença de *Y. ruckeri* na água e no sedimento se estendeu ao longo de todo o ano de amostragens e, consequentemente, existe um risco de epizootias quando ocorrem as temperaturas e/ou condições de stress que favorecem o desenvolvimento do microrganismo. No entanto, Busch (1983) e Thoesen (1994) não consideram que *Y. ruckeri* tenha uma ocorrência ubíqua. Barja & Toranzo (1988) admitem que esta bactéria seja habitante do tubo digestivo dos peixes, do qual é expulso para o meio ambiente através das fezes.

Também outros trabalhos demonstraram a sobrevivência de *Y. ruckeri* por um período superior a 4 meses, quer em água doce quer em sedimento, sendo a sobrevivência claramente menor em água salgada (Romalde, 1992; Romalde *et al.*, 1994b). Por outro lado, a bactéria persistiu durante mais tempo no sedimento do que na água observando-se em todos os sistemas experimentais utilizados pelos autores uma relação inversa entre temperatura e sobrevivência. Wedemeyer & Nelson (1977) demonstraram que este microrganismo podia sobreviver em água doce por períodos prolongados, chegando mesmo a multiplicar-se.

A sobrevivência é definida como "a manutenção da viabilidade sob condições adversas" (Romalde, 1992). Entre estas condições adversas encontra-se o fenómeno de "starvation", isto é, a manutenção em concentrações de nutrientes limitantes. Romalde (1992) e Romalde *et al.* (1994b) demonstraram a existência em *Y. ruckeri* de um estado de dormência (isto é, células viáveis mas não cultiváveis em meios convencionais) observado na água de lago e de estuário (no sedimento de todos os locais e na água do rio a 6° C os autores observaram uma situação de sobrevivência a longo termo), no qual a bactéria foi capaz de permanecer durante vários meses em condições de limitação de nutrientes. Neste estado dormente, as células diminuiram o seu tamanho até cerca de um terço do original, mas não foram observadas alterações nas actividades enzimáticas, nos padrões de LPS e de proteínas de membrana ou no conteúdo plasmídico. *Y. ruckeri*, tal como outras bactérias capazes de entrar num estado de dormência, quando se encontra em condições de "starvation" é sensível a meios com elevado teor de nutrientes, facto que impossibilita a sua recuperação nos meios de cultura comerciais (Romalde, 1992). No entanto, este estado dormente pôde ser recuperado em meio de cultura empobrecido (diluído), e, por outro lado, a adição aos microcosmos de meio de cultura fresco (TSC) proporciona facilmente a recuperação da bactéria em meios de cultura comerciais (Romalde, 1992; Romalde *et al.*, 1994b). Curiosamente, estes autores demonstraram que *Y. ruckeri* neste estado dormente mantém a sua virulência, com uma LD_{50} semelhante à da estirpe original. Pelo contrário, em *Aeromonas salmonicida* a capacidade de causar doença perde-se quando as células entram neste estado (Rose *et al.*, 1990; Effendi & Austin, 1995b).

1.5.2.6. Controle

1.5.2.6.1. Quimioterapia

As quinolonas (ácido oxolínico, ácido nalidixico, flumequina) são referidas como os compostos antimicrobianos mais eficazes contra esta espécie bacteriana (Lesel *et al.*, 1983; Rodgers & Austin, 1983; De Grandis & Stevenson, 1985; Ceschia *et al.*, 1987; Romalde, 1992; Toranzo *et al.*, 1992; Furones *et al.*, 1993). Por outro lado, a quinolona fluorada enrofloxacina revelou-se, em experiências laboratoriais, ainda mais eficaz no controle de *Y. ruckeri* do que o ácido oxolínico (Bowser & House, 1990).

Outras substâncias antimicrobianas muito eficazes contra *Y. ruckeri* são as sulfamidas potenciadas e as tetraciclinas (Post, 1981; Busch, 1983; Bosse & Post, 1983; Bullock *et al.*, 1983; Romalde, 1992; Toranzo *et al.*, 1992; Austin & Allen-Austin, 1993), embora Barja & Toranzo (1988) refiram que as estirpes desta bactéria

podem exibir uma resistência às tetraciclinas (bem como ao cloranfenicol) maior do que outras bactérias Gram negativas. Furones *et al.* (1993) apresentam um quadro-resumo das medidas profiláticas e terapêuticas que aconselham contra a ERM; as substâncias antimicrobianas aconselhadas são ácido oxolínico, sulfamida potenciada e oxitetraciclina.

O controle da ERM tem sido conseguido, ainda, com outros agentes quimioterápicos, como trimetoprim, sulfamidas, cloranfenicol, gentamicina, eritromicina, neomicina, furazolidona e nitrofurantoína (Busch, 1983; De Grandis & Stevenson, 1985; Ceschia *et al.*, 1987; Romalde, 1992; Austin & Allen-Austin, 1993; Furones *et al.*, 1993).

Ledo *et al.* (1987) detectaram resitências aos nitrofuranos, ao cloranfenicol e à tetraciclina, enquanto que Furones *et al.* (1993) referem a existência, em algumas regiões dos Estados Unidos da América, nas quais a ERM é enzoótica, de estirpes de *Y. ruckeri* totalmente resistentes à sulfamerazina e à oxitetraciclina. Por outro lado, De Grandis & Stevenson (1985) detectaram, em duas estirpes desta bactéria, um plasmídeo (de 36 Mda) que conferia resistência às tetraciclinas e às sulfamidas, o qual era transferível a *Escherichia coli* e a outras estirpes de *Y. ruckeri*.

1.5.2.6.2. Vacinas

A ERM foi a primeira doença de peixes contra a qual se desenvolveu uma bacterina prática e disponível comercialmente, mas, apesar disso, ainda se desconhecem a natureza do efeito protector e os mecanismos pelos quais a vacina é incorporada pelos peixes (Busch, 1983; Romalde, 1992; Austin & Allen-Austin, 1993; Furones *et al.*, 1993).

A primeira vacina contra a ERM foi uma bacterina oral desenvolvida por Klontz em 1963, a qual foi melhorada por Ross & Klontz (1965), utilizando células bacterianas completas inactivadas com fenol e incorporadas na dieta. Posteriormente, outros autores testaram o potencial protector de bacterinas, administradas por via oral ou por injecção subcutânea (Anderson & Ross, 1972; Anderson & Nelson, 1974; Amend *et al.*, 1983).

O uso de vacinas comerciais a partir de finais da década de 1970 permitiu que a ERM fosse largamente controlada, embora continuem a ocorrer epizootias da doença (Newman, 1993). Segundo este autor, alguns resultados negativos que têm sido referidos em vacinações contra esta doença devem-se, em larga medida, ao uso das vacinas em ambientes adversos (por exemplo com temperaturas da água demasiado

baixas) ou em populações de peixes sob marcadas condições de stress. Várias vacinas comerciais foram desenvolvidas (Tebbit *et al.*, 1981, *in* Newman, 1993; Johnson *et al.*, 1982; Newman & Majnarich, 1982; Johnson & Amend, 1983a, b; Cossarini-Dunier, 1986). Embora inicialmente estas vacinas, que consistiam em culturas líquidas formolizadas do serótipo I (Hagerman), fossem administradas mediante a técnica de infiltração hiperosmótica, trabalhos subsequentes demonstraram que a entrada de antigénios nos peixes ocorre em quantidades adequadas sem ser necessário o tratamento prévio destes com a solução hiperosmótica, a qual, só por si, causa frequentemente mortalidade e provoca grande stress (Anderson *et al.*, 1979; Antipa *et al.*, 1980; Romalde, 1992; Furones *et al.*, 1993; Newman, 1993).

As vacinas actualmente disponíveis comercialmente são todas bacterinas constituidas por células inteiras (Newman, 1993). Por outro lado, ao contrário do que foi referido por O'Leary *et al.* (1982) (que concluiram que as vacinas produzidas com estirpes do serótipo I apenas conferiam protecção contra estirpes do mesmo serótipo, enquanto que as vacinas produzidas com estirpes do serótipo II ou com estirpes de ambos os serótipos simultaneamente proporcionavam protecção contra a infecção por qualquer serótipo), Newman (1993) afirma que "felizmente, todas as vacinas actuais conferem uma protecção cruzada, possibilitando o uso de uma bacterina de um único serótipo".

Nos últimos anos, a investigação no campo da vacinação centra-se no estudo de novas formulações utilizando diferentes componentes antigénicos das células (como LPS e proteínas de membrana), ou, mesmo, produtos extracelulares, e não células inteiras (Romalde, 1992; Inglis *et al.*, 1993).

1.5.3. VÍRUS DA NECROSE PANCREÁTICA INFECCIOSA ("Infectious Pancreatic Necrosis Virus"; IPNV)

1.5.3.1. Considerações Históricas, Hospedeiros e Distribuição Geográfica

Wolf (1988) refere algumas "doenças" descritas muito tempo antes de ser isolado, pela primeira vez, o vírus da Necrose Pancreática Infecciosa, as quais podem constituir as primeiras descrições desta mesma doença. Um relatório da Comissão de Conservação do Estado de New York, em 1923, menciona uma "Doença do Rodopio" ("whirling disease") observada em trutas jovens de uma estação aquícola do mesmo Estado. Mais tarde, o termo "enterite aguda" foi usado para descrever uma situação patológica observada nalguns lotes de trutas jovens que tinham acabado de iniciar a sua alimentação, e que estava associada a um aumento na mortalidade. O exame

bacteriológico não revelou a presença de qualquer bactéria associada a esta condição, mas observou-se que um protozoário, *Hexamita* (ou *Octomitus*, como foi chamado na altura) era abundante no tubo digestivo desses peixes, o qual foi considerado como o agente etiológico da doença. Todavia, M'Gonigle (1941, *in* Wolf, 1988) demonstrou que a "enterite aguda", acompanhada pelo comportamento característico (rodopio) e pelo aumento da mortalidade, ocorria mesmo quando o protozoário não estava presente. Assim, M'Gonigle considerou que a doença (a que ele chamou "enterite catarral aguda") era devida a factores nutricionais ou a práticas de alimentação incorrectas.

Wood *et al.* (1955, *in* Wolf, 1988) descreveram, em alevins de *Salvelinus fontinalis* (em West Virginia, USA), uma doença, claramente infecciosa, que tinha as características da "enterite catarral aguda"; com base no principal sintoma histopatológico observado, esta doença foi chamada "Necrose Pancreática Infecciosa", sendo postulada pelos autores uma etiologia viral.

Acompanhando o desenvolvimento dos métodos de cultura de células, Wolf & Dunbar (1957, *in* Wolf, 1988) publicaram procedimentos para a cultura de tecidos de truta, e, no mesmo ano, conseguiram efectuar o primeiro isolamento do vírus. Em 1958, Wolf *et al.* (*in* Wolf, 1988) comunicaram o isolamento do vírus da necrose pancreática infecciosa (IPNV) - o primeiro vírus de peixes a ser cultivado *in vitro*. O relatório final sobre este primeiro isolamento do IPNV foi publicado em 1960 (Wolf *et al.*, *in* Wolf, 1988).

Posteriormente clonado, o vírus foi, em 1963, depositado na "American Type Culture Collection" (ATCC) como o protótipo IPNV estirpe VR-299 (Wolf, 1988).

A primeira detecção de IPN fora dos Estados Unidos da América ocorreu em 1965, em França: Besse & Kinkelin (1965, *in* Ledo, 1990) reconheceram a doença mediante técnicas histológicas em alevins de truta arco-íris; no entanto, estes IPNV europeus foram isolados nos Estados Unidos, nesse mesmo ano, por Wolf, a partir de amostras enviadas em glicerol. Wolf & Quimby (1971, *in* Wolf, 1988) demonstraram que estes IPNV europeus diferiam serologicamente da estirpe VR-299, e na Dinamarca, Vestergard-Jorgensen & Grauballe (1971, *in* Wolf, 1988) isolaram duas estirpes de IPNV, a que chamaram Sp e Ab, sendo este último o menos virulento.

Desde o seu primeiro isolamento por Wolf & Dunbar, tem sido isolada uma grande variedade de estirpes de vírus IPN e IPN-"like" (semelhante a IPN), de peixes, salmonídeos e não-salmonídeos, de Agnatas (*Lampetra fluviatilis*), de crustáceos e de moluscos aquáticos (Wolf, 1988; McAllister, 1988; Ledo, 1990). Rivas *et al.* (1993)

isolaram vírus IPN-"like" de moluscos e de amostras de sedimento, os quais constituem, assim, importantes reservatórios destes vírus no meio marinho; estes autores demonstraram, também, que estes agentes virais podem sobreviver em alimento (preparado com peixes, nomeadamente *Ammodytes* sp. e *Micromesistius poutassou*) usado nas pisciculturas, o que pode constituir um importante factor na disseminação do vírus através da sua ingestão.

O conjunto destas estirpes, com a sua diversidade de hospedeiros e patogenicidade, é conhecido como "Birnavírus aquáticos" (vírus aquáticos pertencentes à família *Birnaviridae*). As diferentes estirpes são classificadas como IPNV ou IPNV-"like" segundo a sua relação antigénica com os serótipos clássicos do vírus IPN (VR-299, Sp e Ab) e segundo a sua patogenicidade para salmonídeos (Hill, 1982; McAllister, 1988).

1.5.3.2. Necrose Pancreática Infecciosa (IPN)

A Necrose Pancreática Infecciosa é uma doença viral aguda de trutas (e outros salmonídeos) jovens (Wolf, 1988; McAllister, 1988). Nos peixes desta família (*Salmonidae*), as infecções agudas por este vírus (da família *Birnaviridae*) ocorrem em exemplares com 1-4 meses de idade, e podem resultar em mortalidades acumuladas próximas dos 100%; os exemplares mais velhos, porém, podem sofrer infecção subclínica, com mortalidade negligenciável. Muitos dos sobreviventes à infecção tornam-se portadores assintomáticos dos vírus, tornando-se reservatórios da infecção, quer para a sua própria geração (transmissão horizontal), quer para as gerações seguintes (transmissão vertical/horizontal); assim, este vírus pode permanecer durante anos nos portadores e/ou no meio ambiente (Hill, 1982; Thoesen, 1994; Romalde & Toranzo, 1995). Este é o vírus que tem uma maior resistência nos ambientes naturais, tanto em água doce como marinha (Barja *et al.*, 1983; Romalde & Toranzo, 1995).

A letalidade desta doença é, portanto, claramente dependente da idade dos exemplares afectados, o que é documentado por um número considerável de estudos; embora tenham sido observados casos de mortalidades entre trutas mais velhas, estes casos são raros (Hill, 1982; Wolf, 1988).

Outros factores que influenciam os efeitos da infecção incluem as condições ambientais (por exemplo, a temperatura da água), a condição fisiológica do hospedeiro e os factores de stress a que este está sujeito, e a estirpe do vírus responsável pela infecção (Hill, 1982; Wolf, 1988; McAllister, 1988; Thoesen, 1994). Assim, a temperatura influi tanto na replicação do vírus como na resposta do hospedeiro à infecção (McAllister; 1988); o autor, referindo trabalhos que documentaram os efeitos

da temperatura sobre a mortalidade induzida pelo vírus IPN, afirma que: os níveis altos de mortalidade rápida ocorriam a temperaturas de 10 °C a 14 °C; altos níveis de mortalidade, mas lenta, eram observados a 6 °C; a temperaturas superiores a 14 °C, o nível de mortalidade era significativamente reduzido. Os peixes sujeitos a um stress nutricional, ambiental ou fisiológico, são mais susceptíveis à infecção e doença do que peixes livres de qualquer factor de stress (McAllister,1988; Thoesen; 1994); Thoesen (1994) afirma, inclusivé, que o stress constitui o factor que desencadeia as raras epizootias de IPNV que têm sido observadas em populações com portadores do vírus. Por outro lado, nem todas as estirpes do vírus IPN são igualmente virulentas - de um modo geral, de entre os serótipos mais importantes, as estirpes de VR-299 e Sp são virulentas, enquanto que as do serótipo Ab são pouco ou nada virulentas (McAllister, 1988).

A transmissão horizontal do vírus ocorre através do tubo digestivo (embora o vírus entre em contacto com os peixes susceptíveis também através das brânquias e poros da linha lateral) (Ledo, 1990). A transmissão deste vírus pode, também, ocorrer através dos ovos (transmissão vertical), o que está documentado há já longo tempo (Fijan & Giorgetti, 1978; Hill, 1982; Ledo, 1990; Ledo *et al*, 1990b; Bootland *et al.*, 1991).

Embora haja uma variedade de sintomas clínicos e de modificações histopatológicas que podem ocorrer em peixes infectados, nenhum distingue decisivamente a IPN de outras doenças de etiologia viral (Thoesen, 1994). No entanto, Wolf (1988) refere que a primeira indicação de uma epizootia em trutas jovens é, geralmente, um aumento súbito na mortalidade, sendo comum a morte preferencial dos alevins maiores e mais robustos.

a) Comportamento - nesta doença, o comportamento mais característico dos alevins infectados é uma natação errática, girando lentamente sobre o seu eixo longitudinal ou rodopiando violentamente. Este comportamento pode constituir um sintoma passageiro (o indivíduo pode vir a recuperar), mas é mais comum que seja um sintoma terminal. Convém lembrar que este comportamento se observa igualmente noutras doenças. Os exemplares afectados podem, também, ser encontrados no fundo (ou contra a rede de saída da água do tanque) respirando rápida e superficialmente. Também este sintoma pode ser encontrado em exemplares em fase terminal ou em exemplares que acabam por recuperar (Wolf, 1988; Ledo, 1990; Thoesen, 1994; Romalde & Toranzo, 1995);

b) Sintomas externos - os sintomas externos incluem, geralmente, um escurecimento generalizado (pelo menos em trutas), exoftalmia (suave a moderada), distensão

abdominal e, ocasionalmente, hemorragias na zona ventral, incluindo nas barbatanas ventrais. As brânquias encontram-se, tipicamente, pálidas. É frequente que exemplares afectados arrastem excreções anais longas, delgadas e esbranquiçadas, semelhantes a alimento mal digerido (Wolf, 1988; Ledo, 1990; Thoesen, 1994; Romalde & Toranzo, 1995);

c) Sintomas internos - internamente, observa-se palidez da generalidade dos órgãos internos (nomeadamente fígado, baço, rins e coração) e o tubo digestivo encontra-se sem alimento mas cheio de um material mucóide. Tipicamente, nos alevins não são observadas petéquias, embora em exemplares mais velhos estas hemorragias sejam, por vezes, observadas. A cavidade geral pode conter fluido ascítico (McKnight & Roberts, 1976; Wolf, 1988; Ledo, 1990; Thoesen, 1994). No entanto, Romalde & Toranzo (1995) afirmam que, internamente, embora muitos órgãos estejam afectados, predominam as petéquias hemorrágicas no pâncreas e nos tecidos pilóricos.

Entre as modificações histopatológicas provocadas pela IPN, como o nome da doença indica, observa-se uma marcada necrose pancreática, que é particularmente evidente nas células dos ácinos (esta necrose pode atingir virtualmente todo o pâncreas ou restringir-se a pequenas áreas deste órgão, e é caracterizada por picnose, cariorrexis e inclusões basófilas intracitoplasmáticas que constituem produtos de destruição celular e não inclusões virais). No entanto, também outros órgãos podem apresentar modificações histopatológicas importantes. É o que ocorre no tubo digestivo (onde particularmente a mucosa intestinal pode sofrer uma necrose extensiva, de modo que o epitélio intestinal descamado, associado ao muco, produz um exsudado catarral esbranquiçado), nos rins (onde o tecido excretor pode apresentar congestão dos glomérulos, edema e destruição ou descamação do epitélio tubular, enquanto que o tecido hematopoiético pode, igualmente, sofrer modificações degenerativas), no fígado (onde tem sido observada congestão e necrose do tecido hepático), no baço e no encéfalo (onde têm sido detectadas lesões desmielinizantes com inflamação e hemorragias) (McKnight & Roberts, 1976; Wolf, 1988; Ledo, 1990; Thoesen, 1994).

1.5.3.3. Caracterização do Agente Etiológico (IPNV e IPNV-"like")

O IPNV é o mais estudado de todos os vírus de peixes (Wolf, 1988). Trata-se de vírus com uma única cápside, de simetria icosaédrica, sem envoltura lipoproteica, cujo diâmetro é de aproximadamente 60 nm (este é o valor citado mais frequentemente, embora, por vezes, seja indicado um diâmetro que varia entre 55 e 75 nm); a cápside possui 92 capsómeros (McAllister, 1988; Wolf, 1988; Ledo, 1990).

O genoma consiste em dois segmentos de RNA bicatenário, o que coloca este vírus como membro da família *Birnaviridae* (MacDonald & Yamamoto, 1977; Wolf, 1988). O peso molecular do ácido nucleico é de 2,1-2,5 X 10^6 daltons (d) para o segmento maior e de 1,9-2,3 X 10^6 d para o menor. Sano *et al.* (1992) demonstraram que o segmento maior (segmento A) é o responsável pela virulência de algumas estirpes (serótipo VR-299, nomeadamente) em alevins de truta arco-íris. Dopazo (1991) comparou os padrões de RNA das estirpes mais conhecidas do IPNV (VR-299, Ab e Sp), confirmando as observações de outros autores. Dopazo (1991) observou uma ligeira diferença entre os padrões de RNA dos três serótipos referidos, embora estes sejam muito semelhantes: o serótipo Sp apresenta um perfil mais curto (o peso molecular do segmento B é maior do que nos outros dois serótipos) e mais estreito (é menor a diferença entre os pesos moleculares dos dois segmentos) do que VR-299 e Ab; o padrão mais longo correspondeu ao serótipo Ab. O conteúdo do RNA viral em guanina-citosina é de 54% (McDonald *et al.*, 1977, *in* Wolf, 1988).

Como IPNV é um vírus não envolto, é estável ao tratamento com clorofórmio ou éter, aos ácidos e ao glicerol, e relativamente estável ao calor (McAllister, 1988; Wolf, 1988; Ledo, 1990; Dopazo, 1991). Sobrevive durante longos períodos de tempo sob uma grande variedade de condições naturais e laboratoriais: quando mantido em PBS ou meio de cultura celular, a 4 °C, conserva a sua infectividade durante 4 meses, perdendo apenas 3 logaritmos do título original ao fim de um ano; a esta mesma temperatura, o vírus é menos estável em água doce (perde 2 logaritmos da sua infectividade em 3 meses) do que em água salgada (onde a perda de título é praticamente nula no mesmo intervalo de tempo) (Dopazo, 1991). Também pode ser conservado durante longos períodos de tempo a temperaturas de -20 °C ou inferiores, sendo o mais estável dos vírus de peixes e podendo, inclusivé, ser facilmente liofilizado; Wolf (1988) refere que homogeneizou volumes iguais de vísceras infectadas e solução salina tamponada de Hanks ("Hanks' Balanced Salt Solution"; "Hanks' BSS"), tendo armazenado amostras múltiplas a -20 °C; após 3 anos, o título era de 10^8 $TCID_{50}$/ml e, 19 anos depois, ainda era de 5,7 X 10^6 PFU/ml, apesar de, entretanto, terem ocorrido duas falhas de corrente que provocaram a fusão das amostras; McAllister (1988) referem várias condições de conservação do vírus, entre as quais o armazenamento a -70 °C (observando-se uma perda de 1 logaritmo de infectividade por ano).

O IPNV é geralmente detectado em culturas celulares, nas quais é capaz de se replicar e provocar o aparecimento de efeito citopático (ECP). As linhas celulares mais frequentemente usadas para a replicação deste vírus são RTG-2 ("Rainbow Trout Gonad") e CHSE-214 ("Chinook Salmon Embryo"), ambas altamente susceptíveis a

todas as estirpes conhecidas do vírus (Ledo, 1990; Dopazo, 1991). Outras linhas celulares, como BF-2 (células fibroblásticas de pedúnculo de "bluegill", *Lepomis macrochirus*), EPC ("Epitelioma Papulosum Cyprini";), FHM (linha epitelial obtida a partir de tronco caudal de "Fathead Minnow", *Pimephales promelas*), BB (linha epitelial obtida de tronco caudal de "Brown Bullhead", *Ictalurus nebulosus*), entre outras, têm sido referidas como susceptíveis a pelo menos algumas estirpes do IPNV; no entanto, as linhas EPC e FHM não são susceptíveis ao serótipo Ab deste vírus (Wolf, 1988; Ledo, 1990; Dopazo, 1991).

O ECP característico do IPNV, em culturas da linha CHSE-214 foi descrito por Dopazo (1991), e consiste numa deformação celular que provoca o alongamento das células até que estas adquirem um aspecto fusiforme; a interdigitação entre células vivas e células mortas provoca a formação de margens difusas nas placas de lise, pelo que estas não se apresentam tão bem definidas, como ocorre com outros vírus; o ECP estende-se rapidamente, provocando a lise e libertação das células do tapete (monocamada). Wolf (1988) descreve as características das placas de lise celular em culturas da linha RTG-2, afirmando que estas características podem ser utilizadas (embora apenas nesta linha celular) para obter uma identificação presumível de IPNV; essas características são um retículo de células mortas alongadas e retraídas e margens grosseiramente estreladas, a partir das quais as células vivas radiam para o interior da placa.

A gama de temperaturas para o crescimento do IPNV é de 4 °C a mais de 30 °C; o vírus replica bem entre 10 °C e 26 °C, e pobremente a temperaturas inferiores a 10 °C; porém, para que as estirpes isoladas de salmonídeos cresçam a temperaturas iguais ou superiores a 30 °C, é conveniente que se proceda a uma adaptação (pequeno aumento da temperatura em cada passagem) (Wolf, 1988; Dopazo, 1991); as estirpes isoladas de não-salmonídeos têm uma maior capacidade de crescerem a temperaturas iguais ou superiores a 30 °C (McAllister, 1988).

O vírus começa a detectar-se, na cultura celular infectada, à 5ª hora após a infecção, a 24 °C; são necessárias 8 horas, a 15 °C, mas aumenta a produção final de partículas virais (Wolf, 1988). O mesmo autor refere que, em culturas da linha celular RTG-2, foi observado ECP após 9 horas de incubação a 26 °C e após 18 horas a 20 °C, mas não após vários dias a 4 °C.

A serologia constitui um dos aspectos mais complicados do conhecimento do IPNV. Trata-se de um vírus heterogéneo, havendo algum grau de reactividade cruzada entre todas as estirpes isoladas até agora. Após o isolamento da estirpe norte americana (serótipo VR-299), dois outros serótipos foram reconhecidos na Europa - os serótipos

Ab e Sp -, isolados pela primeira vez, respectivamente, em Abild e Spjarup, duas aldeias dinamarquesas (Wolf, 1988).

Estes três serótipos - VR-299, Ab e Sp - foram reconhecidos com base nos títulos de neutralização recíproca com anti-soros produzidos em coelhos; eles são conhecidos, também, como serótipos 1 (VR-299), 2 (Ab) e 3 (Sp), constituindo os serótipos básicos, tradicionais (McAllister, 1988; Wolf, 1988; Caswell-Reno *et al.*, 1989). O serótipo VR-299 (ou 1) é designado por alguns autores como West Buxton (WB) (Caswell-Reno *et al.*, 1989).

As maiores dificuldades na investigação serológica dos vírus IPN e IPN-"like" começaram a aumentar à medida que eram isoladas mais estirpes, as quais se procurava incorporar num dos três serótipos tradicionais estabelecidos; isto levou a que os resultados obtidos por diferentes autores raramente fossem coincidentes, de modo que, se uma nova estirpe era considerada, por um determinado autor, próxima de um dos serótipos estabelecidos, outro autor aproximava-a, quase invariavelmente, de outro dos serótipos tradicionais (Underwood et al., 1977; Wolf, 1988; Ledo, 1990; Kusuda *et al.*, 1993).

Por outro lado, em 1983, Hill & Way apresentaram, na "First Conference of the European Association of Fish Pathologists", evidência da existência de 6 novos serótipos, propondo que estes, juntamente com os três inicialmente descritos, constituissem um serogrupo principal (Serogrupo A ou Serogrupo I), enquanto que algumas outras estirpes, entretanto identificadas, constituiriam um outro serótipo (Serótipo TV), incluido num segundo serogrupo, menos importante e não relacionado com o primeiro em testes de seroneutralização (Serogrupo B ou Serogrupo II) (Caswell-Reno *et al.*, 1989; Chi *et al.*, 1991; Dopazo, 1991; Melby *et al.*, 1994); este serótipo TV foi isolado na Europa, a partir de *Tellina tenuis* (Underwood *et al.*, 1977). Posteriormente, isolaram-se estirpes do serogrupo B de uma grande variedade de moluscos marinhos e de três espécies de peixes, dois não-salmonídeos (*Cyprinus carpio* e *Limanda limanda*) e um salmonídeo (*Salvelinus fontinalis*) (Ledo, 1990).

Os 6 serótipos propostos para, juntamente com Vr-299 (ou 1; ou WB), Ab (ou 2) e Sp (ou 3), integrarem o serogrupo A (ou I) foram designados como:

- Hecht (He), com origem na Europa, e isolado de lúcio (*Esox lucio*) (Ahne, 1978, *in* Dopazo, 1991);

- Tellina (Te), com origem europeia, e isolado de *Tellina tenuis* (Hill, 1976, *in* Dopazo, 1991);

- Jasper (Ja), com origem no Canadá, e isolado de trutas (*Oncorhynchus mykiss* e *Salvelinus fontinalis*) (Yamamoto, 1974, *in* Dopazo, 1991);

- Canadá 1 (C1), também de origem canadiana, foi isolado de *Salmo salar* (McDonald & Mitarbeiter, ?, *in* Dopazo, 1991);

- Canadá 2 (C2), igualmente com origem neste país, e foi isolado de *Oncorhynchus mykiss* (McDonald & Mitarbeiter, ?, *in* Dopazo, 1991);

- Canadá 3 (C3), ainda originado no Canadá, e isolado de truta lacustre (*Salmo trutta lacustris*) (McDonald & Mitarbeiter, ?, *in* Dopazo, 1991).

Relativamente ao serogrupo A, praticamente todas as estirpes isoladas nos Estados Unidos da América pertencem ao serótipo VR-299, enquanto que no Canadá existem pelo menos 4 serótipos (Ja, C1, C2 e C3) e na Europa igualmente 4 (Ab, Sp, He e Te). Embora a maior parte das estirpes asiáticas pertença ao serótipo VR-299 (estirpes isoladas principalmente de salmonídeos) ou ao serótipo Ab (isolados principalmente de não-salmonídeos, incluindo moluscos e crustáceos), para além de algumas estirpes do serótipo Sp (Lo *et al.*, 1988; Caswell-Reno *et al.*, 1989; Hsu *et al.*, 1989; Lipipun *et al.*, 1989; Chi *et al.*, 1991; Chou *et al.*, 1993), vários trabalhos têm demonstrado que um número considerável de estirpes isoladas neste continente não pode ser incluído em qualquer destes três serótipos (Lipipun *et al.*, 1989; Chi *et al.*, 1991; Kusuda *et al.*, 1993). A estirpe isolada no Chile (McAllister & Reyes, 1984) é indistinguível de estirpes pertencentes ao serótipo VR-299, com base nas análises electroforéticas das proteínas e do RNA, o que está de acordo com a teoria de que este vírus foi introduzido no Chile a partir dos Estados Unidos da América (Espinoza *et al.*, 1985).

Um novo serótipo foi, entretanto, isolado na Noruega, o qual foi designado como Serótipo N1 (Christie *et al.*, 1988, *in* Romalde & Toranzo, 1995; Christie & Havarstein, 1988). Esta estirpe original foi isolada de salmão atlântico (*Salmo salar*) espécie em que provocou elevadas mortalidades; por esta razão, foi encarado como um sério problema na cultura de espécies marinhas (Christie *et al.*, 1988, *in* Ledo, 1990). Mais tarde, este serótipo foi detectado, também, em alevins de peixes planos (*Scophthalmus maximus* e *Hipoglossus hipoglossus*), e em vieiras (*Pecten maximus*) cultivadas em zonas próximas de pisciculturas norueguesas (Mortensen *et al.*, 1990), pelo que poderá tratar-se de um serótipo especialmente adaptado ao meio marinho (Ledo, 1990; Toranzo, 1990).

Os serótipos incluídos no serogrupo A são, por vezes, chamados serótipos A1 a A9 (Christie & Havarstein, 1988; Kelly & Nielsen, 1993). Christie & Havarstein (1988) propõem que o serótipo N1 seja incluído neste serogrupo, com a designação de serogrupo A10 (o 10° serótipo do serogrupo A). Ainda segundo estes autores, o serótipo N1 (ou A10) tem mais semelhanças estruturais com os serótipos americanos (Vr-299 e Ja) do que com os outros serótipos europeus (Ab e Sp). No entanto, trabalhos posteriores (Melby *et al.*, 1994; Ross & Munro, 1995) sugerem que as estirpes de N1 pertencem ao serótipo Sp.

1.5.3.4. Diagnóstico de IPN e Identificação do IPNV

Os sintomas clínicos e as modificações histopatológicas associados à IPN são variáveis, não podendo ser usados para um diagnóstico, presumível ou definitivo, ou, ainda, para distinguir esta de outras doenças com etiologia viral; do mesmo modo, a ausência de sintomas clínicos não é indicativa da ausência de IPNV nos peixes, pelo que é necessário proceder a uma análise virológica, seja para o diagnóstico de IPN, seja para a inspecção dos "stocks" de peixes (Thoesen, 1994).

Para proceder à detecção do vírus, após uma correcta amostragem da população, é necessário amplificar o vírus que eventualmente exista na amostra através da inoculação em culturas celulares adequadas. Finalmente, é necessário identificar o vírus acabado de amplificar, o que, normalmente, se faz por métodos serológicos.

As linhas celulares recomendadas para o isolamento do IPNV (qualquer serótipo) são RTG-2 ou CHSE-214, devido à sua longa história de susceptibilidade a este vírus e à sua resposta lítica (formação de ECP, com características próprias); outras linhas celulares como, por exemplo, BF-2 ou FHM, são usadas por alguns autores, mas algumas culturas destas linhas perderam a capacidade de desenvolver ECP, para além do facto de algumas estirpes do vírus (por exemplo, o serótipo Ab) não se replicarem na linha FHM (Wolf, 1988).

Idealmente, devem ser inoculadas em linhas celulares duas ou mais diluições da amostra a analisar, quer se trate de um trabalho de diagnóstico, quer unicamente de detecção do vírus (Wolf, 1988). Uma razão para esta sugestão é a descoberta (Nicholson & Dexter, 1975) de que não foi observado ECP quando as culturas celulares foram inoculadas com homogeneizados de tecidos diluidos 1:10, mas que aquele era claramente evidente quando as diluições inoculadas eram de 1:1000 ou superiores; os autores postularam uma possível interferência homóloga. No entanto, esta observação de Nicholson & Dexter (1975) pode ter sido devida a uma inibição provocada por extractos tecidulares; para evitar este tipo de problema, Sanz & Coll

(1992) aconselham uma diluição de 1:100 ou superior. Outra razão para o uso de diluições múltiplas como inóculos consiste no facto de ser frequentemente necessário quantificar o vírus isolado e, assim, ser capaz de decidir se ele está a causar mortalidade ou se está, apenas, presente; mesmo em sistemas de cultura não óptimos, em casos em que o IPNV é a causa da mortalidade, encontram-se entre 10^6 e 10^9 unidades infecciosas por grama de tecido (Wolf, 1988). A titulação efectuada aquando do isolamento é simples e eficaz, se for usado material plástico de microcultura (Wolf, 1988).

Seja para detecção ou para diagnóstico, os métodos serológicos proporcionam os meios melhores e mais usados na identificação do IPNV; em Biologia Molecular, no entanto, usam-se as características fenotípicas e as análises do genoma e dos perfis de proteínas virais (Wolf, 1988). Por outro lado, se, em alguns casos, apenas interessa assegurar que se trata de IPNV e não de outro vírus de peixes, os estudos de epizootiologia podem requerer a identificação do vírus até um grupo mais restrito, como o serótipo. De acordo com estas diferentes necessidades, os métodos serológicos diferem em sensibilidade, especificidade, equipamentos e tempo necessários para a sua realização (Wolf, 1988).

Para o diagnóstico de doenças de etiologia viral podem utilizar-se métodos que medem a resposta específica do hospedeiro (medição das respostas imunológicas, humoral ou celular), mas, geralmente, usam-se métodos que medem a presença do próprio vírus.

A identificação de vírus por métodos serológicos baseia-se na detecção da presença de proteínas virais, e exige a obtenção de anticorpos específicos, os quais podem ser policlonais ("Polyclonal Antibodies"; PAb) ou monoclonais ("Monoclonal Antibodies"; MAb).

Os métodos imunológicos de detecção de vírus utilizam uma fase sólida, variável de acordo com o método particular, à qual se adsorve o vírus. Este é, de seguida, tratado com uma suspensão de anticorpos (PAb ou MAb) específicos contra ele, os quais estão conjugados com um corante fluorescente, como a fluoresceína (Imunofluorescência), ou com uma enzima (por exemplo, fosfatase alcalina, β-galactosidase ou peroxidase) capaz de, na presença de um substrato adequado, provocar o desenvolvimento de uma coloração observável à vista desarmada (Métodos Directos); nos Métodos Indirectos, utiliza-se um segundo anticorpo, que se vai ligar ao anticorpo anti-viral (o corante fluorescente ou a enzima está conjugado com o segundo anticorpo utilizado). Sanz & Coll (1992) ilustram uma variante a estes métodos (chamada Métodos "Sandwich"; ou Métodos de Duplo Anticorpo), que difere dos

anteriores unicamente pelo facto de se adsorver à fase sólida, não o vírus, mas um anticorpo ao qual ele se vai ligar. A fase sólida pode ser constituída por células ou tecidos infectados (Imunofluorescência ou Imunoperoxidade), membranas de nitrocelulose ou papel de filtro especial (Imunodot) ou cavidades de microtitulação (Ensaio de Imunoadsorção Enzimática; "Enzyme-Lynked Immunosorbent Assay, ELISA) (Toranzo, 1990; Sanz & Coll, 1992).

Hattori *et al.* (1984) utilizaram a técnica ELISA ("Sandwich") e anticorpos policlonais para detectar IPNV, serótipo VR-299. Em culturas celulares, o limite mínimo de detecção desta técnica foi de $10^{3,5}$ $TCID_{50}$/g de peixe; os autores detectaram o vírus, também, em homogeneizados tecidulares de peixes mortos e moribundos. Por outro lado, Ledo *et al.* (1990a) efectuaram um estudo de comparação entre a técnica ELISA ("Sandwich"; técnica do duplo anticorpo), utilizando anticorpos monoclonais, e o método de inoculação em culturas celulares no diagnóstico do IPNV usando amostras de tecidos de salmonídeos com diferentes níveis de infecção com este vírus. Estes autores concluíram que a técnica ELISA, quando utilizada para analisar directamente os homogeneizados tecidulares, tem uma baixa sensibilidade (pois não detectaram o vírus em qualquer dos peixes, independentemente do grau de infecção destes). No entanto, a técnica mostrou-se muito útil quando utilizada em conjunto com o método de inoculação em culturas celulares: após a amplificação do número de partículas virais na cultura celular, a aplicação de teste ELISA aos sobrenadantes destas primeiras passagens em culturas foi eficaz na detecção do IPNV (recorde-se que é necessário efectuar duas passagens em culturas celulares para concluír o diagnóstico da presença de vírus); inclusivé, o diagnóstico viral pode ser obtido antes do aparecimento do efeito citopático. Deste modo, segundo os autores, a aplicação das duas técnicas em conjunto permite um rápido e óptimo diagnóstico do vírus IPN.

Caswell-Reno *et al.* (1989) prepararam um grupo de anticorpos monoclonais, que usaram no desenvolvimento de um teste imunodot para a rápida identificação, e serotipagem presumível, de birnavírus aquáticos. Um destes MAb (AS-1) reconheceu um epítopo reactivo comum ao serogrupo A, pelo que pode ser usado para a identificação de todos os Birnavírus aquáticos pertencentes a este serogrupo (que é o predominante em todo o mundo). Os outros MAb exibiram especificidades mais restritas (e variáveis, desde MAb que reagiam com quase todas as estirpes testadas, até outros específicos de um ou dois serótipos), de modo que, pelos padrões de reactividade das estirpes do vírus com o conjunto dos 11 MAb utilizados, era possível chegar a uma identificação presumível do serótipo de cada uma dessas estirpes do IPNV (a única excepção consistiu no facto de dois serótipos canadianos, C2 e C3, possuirem o mesmo padrão de reactividade com o conjunto dos MAb utilizado).

Segundo os autores, este método é rápido (os resultados são obtidos dentro de cerca de 6 horas, das quais apenas duas de trabalho laboratorial) sem que seja necessário um equipamento especial; por outro lado, a especificidade e disponibilidade destes MAb, combinadas com a simplicidade do teste imunodot, farão deste sistema um importante sistema de investigação e de diagnóstico de doenças de animais aquáticos.

O uso de métodos de diagnóstico rápidos e sensíveis é importantíssimo quando se pretende evitar a disseminação dos vírus causadores de doenças, uma vez que não existem vacinas disponíveis para prevenir estas doenças - métodos rápidos são necessários durante a fase aguda da doença, enquanto que a detecção dos vírus em exemplares portadores assintomáticos requer métodos de diagnóstico altamente sensíveis (Sanz & Coll, 1992).

Nos últimos anos têm vindo a desenvolver-se técnicas moleculares, como, por exemplo, a amplificação dos genomas virais pela técnica da reacção em cadeia da polimerase (PCR), e sua detecção por HYBRELISA, que consiste na hibridação do produto da amplificação com uma sonda imobilizada em placas de microtitulação (Sanz & Coll, 1992).

1.5.3.5. Controle

A medida de controle da IPN mais eficaz e mais económica continua a ser a prevenção do contacto entre o vírus e o hospedeiro - é fundamental reconhecer as origens do IPNV e evitá-las, e, também, dispôr de instalações completamente livres do vírus, incluindo na água utilizada (Wolf, 1988; Hetrick, 1989; Ledo, 1990). Wolf (1988) refere, inclusivé, um procedimento que permitiu a selecção de uma população de trutas sem IPNV a partir de um "stock" inicial portador do vírus. Este tipo de procedimento pode ser muito importante em "stocks" de trutas com características genéticas benéficas, como, por exemplo, a resistência à furunculose. No entanto, Wolf (1988) afirma que, na prática, em especial em unidades comerciais em que a IPN não pode ser evitada, as perdas económicas podem ser minimizadas através da previsão da mortalidade que irá ocorrer e consequente incubação de um número superior de ovos que compense as perdas previstas; alternativamente, é sugerida a incubação das trutas jovens em condições livres do vírus e a sua transferência para condições mais expostas apenas depois de terem atingido uma idade mais resistente.

A erradicação é recomendada por Wolf (1988) quando uma epizootia ocorre numa unidade que possa ser tratada sem riscos de recontaminação. Neste caso, deve ser determinada a extensão da existência de IPNV em todos os lotes presentes e os peixes retirados para o mercado ou destruidos; todas as instalações, equipamentos de

manuseamento dos peixes (redes, etc.) e objectos usados pelo pessoal (botas, impermeáveis, etc.) devem ser limpos e descontaminados.

Relativamente ao uso da quimioterapia no controle da IPN, Hill (1982) e Wolf (1988) referem o uso de iodeto de polivinilipirrolidona (PVP) com algum sucesso. De acordo com Ledo (1990), um tratamento adequado dos ovos com iodóforos poderia prevenir a propagação do IPNV por esta via, embora a eficácia deste tratamento não possa considerar-se absoluta. Também uma outra droga - o nucleósido sintético Ribavarina ou Virazole (1-D-ribofluoranosil-1,2,4-triazole-3-carboxamida) - foi utilizada, com sucesso, *in vitro* (Hill, 1982; Wolf, 1988). Quando adicionada (na quantidade de 10µg/ml) imediatamente antes ou dentro de algumas horas após a infecção, inibiu a replicação do IPNV em culturas das linhas RTG-2 e CHSE-214. No entanto, doses de 400 µg/ml adicionadas à água de tanques com alevins de trutas infectados com este vírus não promoveram reduções apreciáveis na mortalidade. Deste modo, a pouca eficiência, aliada ao elevado custo, tornam pouco práticas as aplicações desta droga em aquacultura.

Segundo Wolf (1988), a manutenção a temperaturas relativamente baixas parece poder constituir uma alternativa para tentar reduzir os possíveis efeitos da IPN; no entanto, embora os resultados de experiências referidas pelo autor indiquem uma clara redução na mortalidade em trutas mantidas a 4,5 °C, eles são contraditórios relativamente à manutenção às temperaturas de 6 °C e 10 °C. Pelo contrário, Ledo (1990) refere que o aquecimento e manutenção da temperatura da água acima de 16 °C pode moderar a mortalidade devida a IPN. Também Barja & Toranzo (1989), que verificaram que o IPNV tem a sua maior estabilidade em água de estuário (10 ‰) a 15 °C e que a elevação da temperatura exerce um efeito drástico sobre essa estabilidade, sugeriram que a manipulação da temperatura da água poderia utilizar-se como método de controle da IPN; no entanto, os autores advertem que, embora a elevação da temperatura altere o desenvolvimento da doença, não elimina o estado de portador assintomático do vírus.

II. OBJECTIVOS

II. OBJECTIVOS

O grande desenvolvimento da aquacultura em Portugal, especialmente desde a adesão do país à Comunidade Económica Europeia, em 1986, não tem sido acompanhado por um desenvolvimento correspondente nos estudos da patologia das espécies que são cultivadas intensivamente, seja em água doce, seja no meio marinho.

Com o presente trabalho, realizado em colaboração estreita com o Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Faculdade de Biologia, Universidade de Santiago de Compostela (Espanha), procurámos contribuír para a colmatação de algumas das lacunas existentes na microbiologia associada a unidades de cultura intensiva de espécies piscícolas. Os estudos foram efectuados em duas truticulturas do Norte de Portugal (localizadas em diferentes bacias hidrográficas e com ambientes envolventes diversos, decorrentes da localização de uma delas junto de um pequeno rio, do qual recebe, e ao qual devolve, a água que utiliza, enquanto que a outra está situada numa albufeira). Os estudos realizados tiveram os seguintes objectivos principais:

* Identificação dos grupos bacterianos e virais encontrados nos órgãos internos dos peixes cultivados, aparentemente saudáveis e apresentando algum sintoma de doença, e sua variação ao longo do tempo.

* Identificação dos principais grupos bacterianos encontrados no meio ambiente (água e sedimento) das instalações das duas unidades e do rio, sua distribuição espácio-temporal, e sua comparação com os grupos encontrados nos peixes (cultivados, aparentemente saudáveis e doentes, e selvagens).

* Determinação dos grupos bacterianos e virais existentes em peixes selvagens capturados nas imediações das duas truticulturas, e sua comparação com os resultados obtidos com os peixes cultivados.

* Caracterização fenotípica, serológica e molecular de bactérias e vírus responsáveis por doenças de declaração obrigatória isolados nas amostras estudadas.

* Avaliação e comparação do estado sanitário das duas truticulturas, tendo em conta a aparente quase inexistência de agentes etiológicos de doenças de declaração obrigatória em Portugal.

III. ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO EM DUAS TRUTICULTURAS PORTUGUESAS E CARACTERIZAÇÃO DOS AGENTES ETIOLÓGICOS DE DOENÇAS DE DECLARAÇÃO OBRIGATÓRIA

3.1. ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO BACTERIANO

III. ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO EM DUAS TRUTICULTURAS PORTUGUESAS E CARACTERIZAÇÃO DOS AGENTES ETIOLÓGICOS DE DOENÇAS DE DECLARAÇÃO OBRIGATÓRIA

3.1. ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO BACTERIANO

3.1.1. MATERIAL E MÉTODOS

3.1.1.1. Zonas de amostragem

As amostras analisadas no presente trabalho foram recolhidas em duas truticulturas do norte de Portugal.

A truticultura A está situada junto de um pequeno rio, do qual recebe a água, pertencente à bacia hidrográfica do rio Douro. Nesta unidade aquícola são cultivados exemplares de truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, e de truta comum, *Salmo trutta*, em tanques de cimento e de terra. Estes exemplares permanecem nas instalações da truticultura durante toda a sua vida, incluindo, portanto, a reprodução e a incubação dos ovos. Os peixes produzidos destinam-se à venda ao público ou a repovoamentos de alguns cursos de água ou albufeiras, sendo conservada na truticultura uma população de reprodutores para cada uma das duas espécies.

A truticultura B localiza-se numa albufeira da bacia hidrográfica do rio Cávado, sendo cultivados, exclusivamente, exemplares de truta arco-íris, em jaulas flutuantes. Esta unidade procede unicamente à produção de trutas para venda ao público. Os alevins provêm, predominantemente, de uma outra exploração piscícola, situada na bacia hidrográfica do rio Douro, e destinada principalmente à manutenção de reprodutores e à reprodução.

3.1.1.2. Amostras de peixes

Em cada uma das truticulturas, A e B, foram recolhidas amostras mensais de peixes, ao longo de um período de 1 ano (de Janeiro a Dezembro de 1993).

Cada amostra consistiu em trutas, sem qualquer sintoma de doença evidente, de 3 tanques ou jaulas (5-7 trutas de cada tanque ou jaula); nas amostragens em que foram observados peixes com algum(ns) sintoma(s) de doença, procedeu-se à recolha de alguns indivíduos com esse(s) sintoma(s) (5-6 se se tratava de uma sintomatologia comum a todos os indivíduos; 10-15 exemplares quando os sintomas variavam consideravelmente de indivíduo para indivíduo). Sempre que possível, foram também

amostrados peixes selvagens. No rio contíguo à truticultura A, estes peixes selvagens foram capturados por pesca eléctrica, pertencendo às seguintes espécies: truta comum, boga (*Chondrostoma polylepis*) e escalo (*Leuciscus cephalus*); para além destas, foi capturada uma truta arco-íris (Tabela 3.1.1). Na albufeira, os peixes selvagens foram capturados usando redes de emalhar, e, à excepção de uma truta arco-íris, foram bogas todos os exemplares amostrados (Tabela 3.1.2).

Todos os peixes foram mantidos vivos, em bidões de 50 litros, até ao seu processamento.

As tabelas 3.1.1, 3.1.2 e 3.1.3 resumem os números de peixes amostrados ao longo do presente estudo, e indicam os respectivos pesos máximo, médio e mínimo.

3.1.1.3. Amostras Ambientais

Simultaneamente com as amostras de peixes, foram recolhidas, dos mesmos tanques ou jaulas, amostras de água e de sedimento. Adicionalmente, estas mesmas amostragens ambientais foram efectuadas em dois locais do rio adjacente à truticultura A, um junto à entrada de água nesta unidade, e o outro junto à saída desta, novamente para o rio.

Todas as amostras de água foram recolhidas em frascos esterilizados de 100ml, cerca de 15 cm abaixo da superfície, e transportados para o laboratório dentro de recipientes isotérmicos, sendo mantidos no frigorífico (4°C) até ao seu processamento, no dia seguinte.

As amostras de sedimento foram recolhidas, também, em frascos esterilizados de 100ml. Na truticultura A, essa recolha foi efectuada directamente do fundo do rio ou dos tanques de terra, enquanto que na truticultura B o sedimento foi retirado do fundo da albufeira situado directamente por baixo de cada uma das três jaulas escolhidas para a amostragem de peixes, com a ajuda de uma draga. As condições de transporte e manutenção das amostras de sedimento, até ao seu processamento, foram idênticas às referidas para as amostras de água.

3.1.1.4. Parâmetros Físico-Químicos

Paralelamente à recolha de amostras, foram determinados, em todos os locais de amostragem, os valores dos seguintes parâmetros físico-químicos da água: temperatura, pH (com um eléctrodo apropriado), oxigénio dissolvido (método de Winkler), dureza (usando um "kit" comercial) e amónia (método de Koroleff). Na tabela 3.1.4 são indicados os valores mensais extremos destes parâmetros.

Tabela 3.1.1 - Amostragem de peixes cultivados na truticultura A, e de peixes selvagens capturados no rio adjacente a esta, e respectivos pesos máximo, médio e mínimo.

	NÚMERO	PESO MÁXIMO (g)	PESO MÉDIO (g)	PESO MÍNIMO (g)
Peixes cultivados				
1) Truta arco-íris				
-- saudáveis	159	254	107,2	8
-- doentes	2	385	246	107
Total	161	385	115,3	8
2) Truta comum				
-- saudáveis	92	289	111,3	20
-- doentes	19	228	142,3	70
Total	111	289	120,4	20
Total de peixes cultivados	272	385	118,6	8
Peixes selvagens (todos saudáveis)				
1) Truta arco-íris	1	33	33	33
2) Truta comum	79	344	57,3	4
3) Boga	62	171	40,3	3
4) Escalo	40	43	18,1	3
Total de peixes selvagens	182	344	44,3	3
Total de peixes amostrados	454	385	85,7	3

Tabela 3.1.2 - Amostragem de peixes cultivados na truticultura B e de peixes selvagens capturados na albufeira, e respectivos pesos máximo, médio e mínimo.

	NÚMERO	PESO MÁXIMO (g)	PESO MÉDIO (g)	PESO MÍNIMO (g)
Peixes cultivados				
Truta arco-íris				
-- saudáveis	224	914	163,1	22
-- doentes	51	1033	403,8	109
Total	275	1033	207,7	22
Total de peixes cultivados	275	1033	207,7	22
Peixes selvagens (todos saudáveis)				
1) Truta arco-íris	1	368	368	368
2) Boga	111	366	213,6	114
Total de peixes selvagens	112	368	214,9	114
Total de peixes amostrados	387	1033	209,8	22

Tabela 3.1.3 - Total de peixes, cultivados (truticulturas A e B) e selvagens (rio e albufeira), amostrados ao longo do presente estudo.

	NÚMERO	PESO MÁXIMO (g)	PESO MÉDIO (g)	PESO MÍNIMO (g)
Peixes cultivados				
1) Truta arco-íris				
-- saudáveis	383	914	143,1	8
-- doentes	53	1033	397,8	107
Total	436	1033	176,7	8
2) Truta comum				
-- saudáveis	92	289	111,3	20
-- doentes	19	228	142,3	70
Total	111	289	120,4	20
Total de peixes cultivados	547	1033	168,1	8
Peixes selvagens (todos saudáveis)				
1) Truta arco-íris	2	368	200,5	33
2) Truta comum	79	344	57,3	4
3) Boga	173	366	151,5	3
4) Escalo	40	43	18,1	3
Total de peixes selvagens	294	368	111,3	3
Total de peixes amostrados	841	1033	147,7	3

Tabela 3.1.4 - Valores dos parâmetros físico-químicos da água determinados nos locais de amostragem (Truticulturas A e B), ao longo dos 12 meses.

TRUTIC. **A**	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
T (ºC)	4-5	6-8	5	7-9	12-13	15-16	15-18,5	17-18,5	11,5-13,5	10,5-11,5	8-9	7
Dureza ppm $CaCO_3$	20	20	24	20	15	23	--	35	30	30	20	25
pH	6,0-6,2	6,3-6,8	6,4-6,5	6,2-6,4	6,1-6,7	6,1-6,5	6,0-6,3	6,1-6,6	6,0-6,2	6,5-6,9	6,3-6,5	6,2-6,5
O_2 (mg/l)	12,7-13,5	11,6-12,8	11,7-13,5	9,5-12,2	7,4-10,3	5,1-10,2	8,2-9,7	5,0-8,7	6,0-9,5	7,4-10,3	9,7-10,9	9,6-11,0
Amónia (mg/l)	0-0,13	0-0,15	0-0,11	0-0,23	0-0,34	0-0,22	0-0,17	0-0,33	0-0,19	0-0,11	0-0,17	0-0,13

TRUTIC. **B**	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
T (ºC)	10	10	12	14	13,5	19,5	22	22	17	16	13,5	12
Dureza ppm $CaCO_3$	0-3	0-3	0-3	0-3	0-3	0-3	0-3	0-3	0-3	0-3	0-3	0-3
pH	5,5	6,8-6,9	7,1-7,4	--	6,6-6,8	6,0-6,7	6,5-7,0	6,6-6,8	7,1	6,6-6,9	6,0-6,3	6,2-6,7
O_2 (mg/l)	10,1-11,2	10,0-10,2	7,1-7,8	--	7,6-10,7	8,0-9,8	6,7-9,3	7,1-7,8	4,8-5,4	7,2-7,9	8,5-8,7	--
Amónia (mg/l)	0,09-0,13	0,12-0,16	0,3-0,32	0,06-0,27	0,05-0,12	0,09-0,19	0,02-0,11	0,06	0,14	0,08-0,14	0,06	0,09-0,12

T - temperatura; O_2 - oxigénio dissolvido.

3.1.1.5. Processamento das amostras para isolamento e contagem de colónias bacterianas

3.1.1.5.1. Peixes

O processamento dos peixes para estudo bacteriológico iniciou-se pela observação externa, no sentido de detectar a presença de lesões externas e fazer a sua caracterização. Os peixes que apresentavam este tipo de lesões eram processados em separado daqueles que apresentavam um aspecto externo saudável.

Antes de iniciar a dissecção de cada peixe, a sua superfície ventral era limpa com papel absorvente, para retirar o excesso de muco, e, de seguida, era desinfectada com etanol. Utilizando material de dissecção esterilizado por imersão em etanol seguida de passagem pela chama, era efectuada cuidadosamente a dissecção e, assepticamente, procedia-se à sementeira de porções de fígado e de rim em meios de cultura apropriados, nomeadamente: Agar Cérebro-Coração (BHIA; "Brain-Heart Infusion Agar"), Agar SW (Waltman & Shotts, 1984; Hastings & Bruno, 1985), que é um meio diferencial para *Yersinia ruckeri*, Agar de Anacker e Ordal modificado (MAOA; Toranzo & Barja, 1993a) e Agar Song, para o possível isolamento de *Flexibacter* / *Cytophaga*. Foram, igualmente, feitos dois esfregaços do rim de cada peixe, para posterior processamento, no sentido de uma eventual detecção de *Renibacterium salmoninarum*.

Sempre que um peixe amostrado apresentava lesões externas ulceradas, procedia-se, adicionalmente, à sementeira de material dessas lesões em placas com os mesmos meios de cultura.

3.1.1.5.2. Água e Sedimento

As amostras de água e de sedimento foram, inicialmente, submetidas, assepticamente, a diluições decimais seriadas, em água destilada estéril. De seguida, procedeu-se, igualmente em condições de assepsia, ao espalhamento de 1ml de cada uma destas diluições numa placa de cada um dos meios de cultura utilizados também no estudo bacteriológico dos peixes (BHIA, SW, MAOA e Song).

3.1.1.6. Isolamento de Bactérias

Todas as placas de BHIA e SW foram incubadas a 22-25°C durante 48-72 horas. As placas com MAOA e Song foram-no a 18°C, durante 7 dias.

Após este tempo de incubação, procedeu-se, nas placas de BHIA, à contagem do número total de colónias, bem como do número de colónias de cada um dos tipos morfológicos presentes, o que permitiu determinar a percentagem de cada tipo de colónia presente na amostra; estas contagens foram efectuadas, para cada amostra de água ou de sedimento, nas placas em que o número total de colónias estava compreendido entre 30 e 300.

De seguida, foi efectuado o isolamento de uma colónia representativa de cada um destes tipos morfológicos, semeando uma pequena porção da colónia em nova placa de BHIA. Este procedimento era repetido, se necessário, até à obtenção de uma cultura pura de cada um dos tipos morfológicos referidos.

Nas placas de SW, foram efectuadas as contagens do número total de colónias presentes e do número de colónias de cor verde (sacarose negativas), oxidase negativas e apresentando um halo de precipitação do Tween 80 (presumíveis *Y. ruckeri*); era, assim, determinada a percentagem de presumíveis *Y. ruckeri* presentes. Estas últimas colónias eram isoladas, procedendo-se posteriormente à sua identificação.

Nas placas de MAOA e de Song, eram procuradas colónias pigmentadas de bactérias filamentosas, que, posteriormente, eram isoladas para posterior identificação.

Todas as estirpes bacterianas isoladas ao longo das 12 amostragens mensais, independentemente da sua origem e grupo taxonómico, foram conservadas, a 15°C, em Motility Stock Medium (MSM: Bacto casitona, 10g; Extracto de levedura, 3g; NaCl, 5g; Agar, 3g; Água destilada, 1000 ml), e congeladas a -80°C em Caldo Tripticase Soja (TSB; Oxoid) suplementado com 15% de glicerina.

3.1.1.7. Caracterização Fenotípica de Bactérias

Uma vez obtidas as culturas puras, era feita a caracterização morfológica, fisiológica e bioquímica das bactérias isoladas, sendo a posição taxonómica destas determinada segundo os esquemas de Austin & Allen-Austin (1993), Board *et al.* (1992), Holt *et al.* (1994), Thoesen (1994) e Smibert & Krieg (1994). Para esta caracterização morfológica, fisiológica e bioquímica, foram utilizados os sistemas miniaturizados API 20E e API 20NE (bioMérieux), sendo os resultados obtidos registados após 48 horas de incubação a 22-25°C, bem como os seguintes métodos convencionais (Austin & Allen-Austin, 1993; Board *et al.*, 1992; Romalde, 1992; Smibert & Krieg, 1994):

Forma e Mobilidade - por observação directa ao microscópio (ampliação 400X - 1000X) de uma gota de uma cultura em meio líquido ("Brain-Heart Infusion; BHI) em fase exponencial; esta observação era feita preferentemente junto a bolhas de ar ou junto do bordo da lamela;

Reacção Gram - por espalhamento de uma pequena porção de uma cultura em meio sólido sobre uma gota de KOH a 3% (método de Buck, 1982). No entanto, foi efectuada a coloração de Gram (Austin & Allen-Austin, 1993) de um dos esfregaços do rim de cada peixe analisado, para a pesquisa de *Renibacterium salmoninarum*;

Oxidase - colocando uma porção de uma colónia bem isolada, proveniente de uma cultura fresca em placa, sobre papel de filtro previamente impregnado com uma solução aquosa a 1% de tetrametil-p-fenilenediamina. O desenvolvimento imediato (menos de 10-15 segundos) de uma coloração violeta indica a presença da enzima citocromo-oxidase;

Catalase - recolhendo, com um instrumento não metálico, uma colónia, bem isolada, de uma cultura fresca da bactéria em BHIA, e suspendendo-a em peróxido de hidrogénio (H_2O_2) a 3%, numa placa de Petri esterilizada. A formação de bolhas gasosas é indicadora da presença da enzima;

Oxidação/Fermentação (O/F) - utilizando o meio basal de Hugh & Leifson (Smibert & Krieg, 1994) (Difco), suplementado com glucose a uma concentração final de 1%. Cada estirpe bacteriana era inoculada em dois tubos com este meio semi-sólido, com uma pipeta Pasteur, sendo um deles colocado em condições de anaerobiose através da deposição de uma camada (cerca de 1cm de espessura) de parafina líquida estéril. Também eram incubados dois tubos controle: um com o mesmo meio, mas sem glucose; o segundo, contendo a glucose, mas não tendo sido inoculado com a bactéria. Após o período de incubação, os resultados eram interpretados do seguinte modo: a) se apenas o tubo sem parafina era acidificado (cor amarela), o metabolismo da bactéria era considerado como sendo oxidativo (reacção O); b) se ambos os tubos desenvolviam a cor amarela (sofriam acidificação), então a bactéria era considerada como sendo capaz de fermentar o açúcar (reacção F); c) se nenhum dos tubos era acidificado, a bactéria era considerada como sendo incapaz de catabolizar a glucose;

Descarboxilação de aminoácidos - utilizando o meio base de Moeller (Smibert & Krieg, 1994), suplementado com os aminoácidos L-arginina, L-lisina e L-ornitina a uma concentração final de 1%. A presença de turvação, acompanhada de alcalinização do meio, após um período de incubação de 48 horas a 22-25°C (em anaerobiose)

indicam a presença das enzimas arginina deidrolase, lisina-descarboxilase e ornitina-descarboxilase, respectivamente. Quando este método dava resultados duvidosos quanto à presença, na estirpe bacteriana em estudo, da enzima arginina-deidrolase, (especialmente com bactérias identificadas como pertencentes ao género *Pseudomonas*, ou taxonomicamente próximas dele) era inoculado o meio semi-sólido de Thornley contendo arginina, sendo uma modificação da cor, de amarelo-alaranjado para vermelho, indicadora da presença da referida enzima (Smibert & Krieg, 1994);

Utilização de açúcares e poli-álcoois - utilizando o meio basal de Hugh Leifson (meio O/F) suplementado com o açúcar ou álcool correspondente, a uma concentração final de 1%; foi estudada a utilização de glucose, manitol, inositol, sorbitol, ramnose, sacarose, melibiose, amigdalina e arabinose;

Hidrólise da gelatina - usando placas, com meio sólido (Neopeptona, 4g/l; Extracto de levedura, 1g/l; Agar, 15g/l) suplementado com 0,4% de gelatina. Após o período de incubação, procedia-se à revelação com $HgCl_2$ a 15% em HCl concentrado (20%, vol/vol); um teste positivo é indicado por zonas claras à volta das colónias;

Utilização de citrato - utilizando o meio de Simmons. O aparecimento de uma cor azul intensa , passado o período de incubação, é indicador de um resultado positivo;

Produção de indol - em caldo triptona a 1%, suplementado com 0,1% de L-triptofano. Após a incubação, juntar algumas gotas do reagente de Kovacs (Smibert & Krieg, 1994); a formação de um anel de cor vermelha na parte superior do tubo indica que a estirpe em causa é capaz de produzir indol a partir do triptofano;

A sensibilidade de várias estirpes a diferentes agentes quimioterápicos foi testada utilizando a técnica de difusão em placa, em Agar de Mueller-Hinton (MHA; Difco). Os inóculos consistindo em suspensões de aproximadamente 10^9 bactérias/ml foram espalhados uniformemente em placas de MHA usando zaragatoas estéreis, deixando-se absorver durante 15 minutos. Decorrido este tempo, colocaram-se cuidadosamente os discos comerciais contendo os seguintes agentes quimioterápicos, nas quantidades indicadas: agente vibriostático O/129 (150 μg), penicilina G (10 unidades), ampicilina (10 μg), tetraciclina (30 μg), oxitetraciclina (30 μg), cloranfenicol (30 μg), estreptomicina (10 μg), novobiocina (30 μg), nitrofurantoína (300 μg), trimetoprim-sulfametoxazol (TMX-SMX; 25 μg), ácido oxolínico (2 μg), enrofloxacina (5 μg), norfloxacina (10 μg), colistina (10 μg) e cefalotina (30 μg). O aparecimento de halos de inibição à volta dos discos, após 48 horas de incubação a

22°C, foi considerado indicativo da sensibilidade da estirpe em estudo ao agente quimioterápico considerado.

3.1.1.8. Testes serológicos de aglutinação

De entre as estirpes isoladas ao longo deste trabalho, as presumíveis *Y. ruckeri* e *A. salmonicida* foram submetidas a um teste serológico de aglutinação sobre uma lâmina de vidro, usando anti-soros apropriados: anti-*Y. ruckeri*, serótipos O1 a O4 (Romalde *et al.*, 1993) e anti-*A. salmonicida*. Este teste foi realizado usando células bacterianas intactas e, também, os antigénios somáticos (antigénios "O"), segundo a metodologia de Toranzo *et al.* (1987), que se descreve em seguida:

3.1.1.8.1. Preparação dos antigénios (células intactas)

As culturas das estirpes bacterianas a testar foram obtidas em placas de BHIA, após incubação a 25°C, durante 24-48 horas. Em seguida, procedeu-se à suspensão de uma porção de cada uma destas culturas em PBS, de modo a obter-se uma concentração de cerca de 10^9 células/ml (por comparação com a turvação do tubo 3 da escala de McFarland); estas suspensões de células foram usadas como antigénios nos testes de aglutinação.

3.1.1.8.2. Preparação dos antigénios somáticos (antigénios "O")

As culturas das estirpes bacterianas a testar foram obtidas do mesmo modo que na preparação das suspensões de células intactas. Foi, então, suspensa em PBS (pH 7,2) uma porção de cada cultura. As células bacterianas foram lavadas, por centrifugação, e ressuspendidas em PBS, sendo sujeitas, de seguida, a uma fervura a 100°C durante 1 hora. Por fim, as células foram recolhidas, de novo por centrifugação, e ressuspendidas em PBS, de modo a obter-se uma densidade adequada (tubo 3 da escala de McFarland); estas suspensões foram usadas como antigénios somáticos termo-estáveis (antigénios "O") nos testes de aglutinação.

3.1.1.8.3. Realização dos testes de aglutinação

Os testes de aglutinação foram realizados misturando, sobre uma lâmina de vidro, volumes iguais da suspensão de antigénio e do anti-soro.

Uma aglutinação clara e imediata foi considerada como uma reacção positiva, enquanto que uma aglutinação débil e tardia (observada após vários minutos) foi considerada como uma reacção negativa.

Em todos os testes de aglutinação foram utilizados, como controles negativos, misturas das soluções de antigénios com soro não imune ou com PBS.

3.1.1.9. Imunofluorescência Directa (pesquisa de *Renibacterium salmoninarum*)

Um dos esfregaços do rim de cada peixe, realizados e fixados pelo calor imediatamente após a análise bacteriológica, foi submetido a uma técnica de imunofluorescência directa (FAT), utilizando um soro específico contra *R. salmoninarum*, marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC), de acordo com o protocolo apresentado em anexo (Bandín, 1992; Bandín *et al.*, 1989; Thoesen, 1994). A observação das preparações obtidas é feita num microscópio de fluorescência, utilizando a objectiva de imersão (1000X).

3.1.2. RESULTADOS

3.1.2.1. Peixes

Nas figuras 3.1.1 a 3.1.5 estão ilustradas as percentagens dos peixes amostrados que abrigavam pelo menos uma estirpe bacteriana nos seus órgãos internos.

No que se refere aos peixes cultivados com aparência saudável (Figuras 3.1.1 e 3.1.3), é notória, na truticultura A (Figura 3.1.1), a existência de amostragens (Fevereiro e Outubro) nas quais não foi detectada qualquer bactéria. Além disso, em Janeiro não foi isolada nenhuma estirpe bacteriana das trutas comuns amostradas, o mesmo acontecendo, no caso das trutas arco-íris, nos meses de Junho, Julho e Setembro. Por outro lado, na truticultura B (Figura 3.1.3), todas as amostragens de trutas cultivadas aparentemente saudáveis proporcionaram o isolamento de bactérias.

Se atentarmos nestas percentagens de peixes saudáveis infectados por bactérias, podemos observar que, em ambas as truticulturas, algumas amostragens apresentaram valores particularmente elevados, enquanto que estes se revelaram baixos nas restantes. Assim, na truticultura B, os valores encontrados nas amostragens de Janeiro, Julho, Outubro e Novembro foram sempre superiores a 50%, enquanto que nos restantes meses nunca atingiram 30%. Na truticultura A, curiosamente, verificou-se que, de entre as amostragens em que foram isoladas bactérias, a maioria revelou percentagens de peixes infectados iguais ou superiores a 50%. Assim, relativamente às trutas arco-íris, estes valores elevados ocorreram em Março, Agosto, Novembro e Dezembro, enquanto que, para a truta comum, o mesmo aconteceu em Março, Abril, Julho, Novembro e Dezembro.

Na truticultura A ocorreu uma epizootia de furunculose, a qual afectou quase exclusivamente a população de truta comum. De facto, todos os exemplares que foram amostrados apresentando sintomas da doença (particularmente lesões cutâneas, ulceradas ou não) abrigavam nos seus órgãos internos e em todas as suas lesões cutâneas grande número de bactérias (*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*). Pelo contrário, apenas um exemplar de truta arco-íris foi observado com sintomas de furunculose. O estudo bacteriológico confirmou tratar-se desta doença, pois dos seus órgãos internos e lesões cutâneas foram obtidas culturas puras de *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*.

Durante esta epizootia de furunculose, a mortalidade atingiu um máximo de cerca de trinta trutas por dia (exclusivamente truta comum) durante aproximadamente uma semana. O tratamento foi efectuado com furazolidona (5,2 gramas por cada 100

Kg de peixe vivo), durante oito dias. Este antibiótico era fornecido misturado com o alimento, usando óleo de cozinha como ligante. Como consequência deste tratamento, a mortalidade desapareceu, reaparecendo, todavia, cerca de uma semana mais tarde (10 trutas comuns por dia). Por esta razão, o tratamento com furazolidona foi repetido.

De entre os sintomas observados nas trutas atingidas por esta doença, os mais comuns eram a corrosão de barbatanas e a presença de furúnculos. Foi, também, observada a presença, em alguns exemplares, de lesões resultantes da ulceração de furúnculos. A sementeira em BHIA de uma porção do líquido encontrado no interior dos furúnculos resultou, invariavelmente, no crescimento de colónias de *A. salmonicida* em números muito grandes; também das lesões ulceradas foi isolada esta bactéria, embora em culturas mistas e em menores números.

Para além desta epizootia de furunculose, apenas em Novembro foram observadas trutas com algum sintoma de doença, na truticultura A. Os sintomas mais comuns eram uma opacidade ocular e um aspecto fortemente asténico, sendo observados unicamente entre os reprodutores. É interessante notar que estes sintomas, igualmente associados às trutas maiores, foram observados, também, em diferentes amostragens efectuadas na truticultura B, como será referido mais adiante. Uma truta arco-íris (385g; 35cm) com aspecto asténico foi recolhida moribunda e transportada para o laboratório num recipiente isotérmico, envolta em gelo. A análise bacteriológica deste exemplar permitiu o isolamento de *Y. ruckeri*, serótipo O1, quer do fígado, quer do rim. Esta bactéria foi obtida em culturas mistas com outras Enterobactérias (que também foram isoladas dos olhos), *Aeromonas* móveis e Bacilos Gram + (estes também foram isolados dos olhos e do baço).

Na truticultura B, embora não tenha ocorrido qualquer epizootia durante o presente estudo, foram observadas, e amostradas, trutas com sintomas de doença em oito das doze amostragens mensais (Janeiro, Fevereiro, Junho, Julho, Agosto, Outubro, Novembro e Dezembro).

A comparação das percentagens de trutas doentes infectadas com bactérias (Figura 3.1.4) com as mesmas percentagens relativas às trutas com aspecto saudável (Figura 3.1.3) torna claro que, à excepção das amostragens de Janeiro e Fevereiro, os valores obtidos foram consideravelmente superiores nas trutas doentes. Curiosamente, na amostragem de Janeiro, esta percentagem foi nitidamente mais elevada nas trutas aparentemente saudáveis, enquanto que, em Fevereiro, os valores encontrados são bastante semelhantes. Este facto sugere que os sintomas de doença observados tinham uma etiologia não bacteriana ou, alternativamente, que o eventual agente etiológico

bacteriano envolvido não era susceptível de ser isolado através da metodologia utilizada.

De facto, o sintoma largamente predominante nestas duas amostragens de Janeiro e Fevereiro era a presença de lesões do tipo "sunburn" no dorso da cabeça. Alguma mortalidade acompanhou estes sintomas em Janeiro, mas não em Fevereiro. É interessante notar que, em Janeiro, foi observada e amostrada uma truta apresentando no flanco uma lesão, ulcerada, muito profunda; dos órgãos internos deste exemplar foram obtidas culturas puras de *Y. ruckeri*, serótipo O1.

Um outro facto curioso é o de apenas as trutas maiores (mais de 200g) serem atingidas pelos sintomas de doença, não apenas nas duas amostragens iniciais, já referidas, mas também em todas as subsequentes. Nestas últimas, os sintomas de doença observados foram bastante variados, mas os mais frequentes eram a opacidade ocular e o aspecto fortemente asténico, já referidos a propósito da truticultura A; outros sintomas, igualmente bastante observados, eram a corrosão, parcial ou total, de barbatanas e a presença de hemorragias nestas e/ou nos maxilares.

Nestas seis amostragens (Junho, Julho, Agosto, Outubro, Novembro e Dezembro), as percentagens de trutas doentes infectadas com bactérias eram bastante elevadas, sempre superiores a 60% (Figura 3.1.4). Em todas as amostragens em que estes sintomas foram observados verificou-se a existência de mortalidade apreciável, a qual atingiu um máximo de cerca de 250 Kg de truta por dia. Este nível máximo de mortalidade manteve-se ao longo dos meses de Julho e Agosto, período durante o qual a temperatura da água se situou em valores muito elevados (22°C) e, numa tentativa de os baixar um pouco, era feita a circulação da água, que era bombeada de uma profundidade de 6-7 metros e provinha à temperatura de 19°C em Julho e 18°C em Agosto. De referir, também, que a mortalidade ocorria mais ou menos uniformemente em todas as classes etárias presentes, o que sugere um papel da temperatura como elemento importante desta mortalidade.

Em Novembro, embora o sintoma de doença mais observado tenha sido, também, a opacidade ocular, o aspecto asténico era pouco comum; igualmente bastante frequente, neste mês, foi a presença de exoftalmia (por vezes, faltava um dos olhos).

Nestas trutas doentes (amostragens de Junho, Julho, Agosto, Outubro, Novembro e Dezembro), nunca foi possível associar a presença de uma determinada espécie bacteriana com um determinado sintoma ou conjunto de sintomas de doença. Isto, provavelmente, ficou a dever-se ao facto de, quase sempre, as estirpes bacterianas isoladas o terem sido em culturas mistas. No entanto, a observação, em alguns dos

exemplares doentes, de hemorragias nos maxilares constituiu um sintoma indiciador da presença de *Y. ruckeri*. Também nas amostragens de Janeiro e Fevereiro se verificou o que acaba de ser referido para as restantes amostragens em que foram detectadas, e amostradas, trutas com sintomas de doença; no entanto, foram obtidas culturas puras de *Y. ruckeri* de um exemplar amostrado em Janeiro.

Apesar de nunca ter sido possível associar a presença de uma determinada espécie bacteriana com um determinado sintoma ou conjunto de sintomas em qualquer das amostragens em que a opacidade ocular era muito frequente, é importante referir o isolamento de várias estirpes de *Y. ruckeri* (serótipo O1) associadas com estes problemas. Assim, em Junho, foram isoladas várias estirpes desta bactéria de várias trutas doentes (em cultura mista com uma *Aeromonas* móvel); no entanto, nesta amostragem, foi isolada uma outra estirpe de *Y. ruckeri* (que parece ser exactamente igual) de uma truta, bastante menor (56 g), pertencente a um lote de trutas aparentemente saudáveis, no qual (lote) foi detectada, também, a presença do Vírus da Necrose Pancreática Infecciosa (IPNV) (ver capítulo 3.3). Ainda de uma truta aparentemente saudável foi isolada, em Julho, uma estirpe de *Y. ruckeri* serótipo O3. Também em Outubro foram isoladas várias estirpes de *Y. ruckeri*, serótipo O1, de trutas com sintomas de doença. É interessante notar que estas são estirpes imóveis (a 22°C e a 37°C; após crescimento em meio sólido, BHIA, ou em meio líquido, BHI) e não são capazes de precipitar o Tween 80 no meio SW, tendo sido encontradas em números muito elevados. Curiosamente, estas estirpes imóveis foram isoladas em culturas mistas com *Aeromonas* móveis (poucas colónias) e, principalmente, com outra Enterobactéria, também incapaz de precipitar o Tween 80, que estava presente em números muito grandes (esta era, também, Arg -, Lis +, Orn + e sorbitol -, como as *Y. ruckeri*; no entanto, ao contrário destas, era móvel). O facto de esta Enterobactéria apresentar as características que foram indicadas torna-a uma presumível *Y. ruckeri*, pelo que se procedeu ao seu estudo serológico. No entanto, este estudo não confirmou tratar-se de *Y. ruckeri*, o mesmo acontecendo com o sistema miniaturizado API20E (perfil 4745000; não codificado). De referir, também, que esta Enterobactéria "não codificada" e estas *Y. ruckeri* imóveis foram isoladas de trutas com o referido aspecto asténico (uma delas apresentava, igualmente, uma deformação na região caudal), sendo o rim e os olhos os órgãos onde elas eram particularmente abundantes (muito poucas colónias, quer de uma, quer de outra, foram obtidas do fígado).

As figuras 3.1.2 e 3.1.5 ilustram, para cada espécie de peixes selvagens amostrados, as percentagens de exemplares que estavam infectados com, pelo menos, uma estirpe bacteriana. Assim, entre os peixes capturados no rio adjacente à truticultura A (Figura 3.1.2), obtiveram-se valores mais elevados no caso da truta

comum, espécie para a qual foram encontradas percentagens de exemplares infectados com bactérias relativamente elevadas. De facto, em todas as sete amostragens realizadas foi possível isolar estirpes bacterianas dos órgãos internos de trutas comuns e, ainda, em 4 destas amostragens, obtiveram-se percentagens de trutas infectadas superiores a 50%, sendo estes valores inferiores a 20% apenas nos meses de Agosto e Setembro. Em relação às bogas, verificou-se que, na amostragem de Dezembro, não foi isolada qualquer estirpe bacteriana, e, por outro lado, apenas em Fevereiro e em Março as percentagens de bogas infectadas foi superior a 40%. Finalmente, nos escalos não foram encontradas bactérias na amostragem de Setembro, e apenas em Março, Abril e Dezembro mais de 40% dos escalos amostrados abrigavam pelo menos uma estirpe bacteriana nos seus órgãos internos. São particularmente dignas de nota as percentagens destes peixes selvagens obtidas nos meses de Março, Abril e Dezembro (truta comum) e Março (boga e escalo). De facto, nestas amostragens, os valores obtidos foram sempre iguais ou superiores a 80%, especialmente em Março, mês em que, para as três espécies, os valores obtidos se situaram muito próximo dos 100%.

Entre os peixes selvagens capturados na albufeira onde se situa a truticultura B (Figura 3.1.5) observou-se uma maior proximidade nas percentagens de exemplares infectados com bactérias obtidas ao longo dos seis meses de amostragens. Estes valores foram, de um modo geral, relativamente baixos, apenas ultrapassando os 40% em Julho e Novembro.

É importante referir, ainda, que não foi detectada qualquer estirpe de *Y. ruckeri* ou *A. salmonicida* (nem de qualquer outro agente etiológico, bacteriano ou viral, de uma doença de declaração obrigatória) em nenhum dos peixes selvagens amostrados, quer na truticultura A, quer na truticultura B.

Já foram referidas as estirpes bacterianas (*Y. ruckeri* e *A. salmonicida*) causadoras de doenças de declaração obrigatória que foram isoladas ao longo destas doze amostragens mensais. A totalidade dos grupos bacterianos detectados nos ógãos internos dos peixes (cultivados e selvagens) examinados neste trabalho é indicada nas figuras 3.1.6 a 3.1.18. As figuras 3.1.6, 3.1.7, 3.1.13 e 3.1.14 resumem os totais dos grupos bacterianos isolados de cada espécie de peixes analisada, enquanto que as figuras 3.1.8 a 3.1.12 e 3.1.15 a 3.1.18 mostram, igualmente para cada espécie de peixe analisada, as estirpes bacterianas isoladas em cada amostragem mensal. Na tabela 3.1.5 é apresentado um resumo dos grupos bacterianos encontrados nos peixes analisados neste estudo; nesta tabela estão, igualmente, incluidas as percentagens em que cada um desses grupos foi detectado.

Assim, as figuras 3.1.6 e 3.1.7, e a tabela 3.1.5, tornam evidente o predomínio de *Flavobacterium* entre os grupos bacterianos detectados, quer nas duas espécies de peixes cultivados na truticultura A (Figura 3.1.6), quer nas três espécies de peixes selvagens capturados no rio adjacente a esta truticultura (Figura 3.1.7). (Notar que, neste rio, foi, igualmente, capturado um exemplar de truta arco-íris, obviamente proveniente da truticultura, no qual, no entanto, não foi detectada qualquer bactéria.) De facto, as estirpes de *Flavobacterium* constituiram mais de 40% das estirpes isoladas de cada uma das espécies de peixes cultivadas (Figura 3.1.6), e mais de 30% de cada uma das espécies selvagens (Figura 3.1.7). Entre os peixes cultivados, o grupo *Pseudomonas-Xanthomonas* foi o segundo mais abundante (23% do total), no caso da truta comum, ao qual se seguiram as Enterobactérias (cerca de 15%); outros grupos representados, embora em menores proporções, foram *Acinetobacter-Moraxella*, Bacilos Gram + e *Staphylococcus-Micrococcus*. Nas trutas arco-íris, para além da já referida predominância nítida de *Flavobacterium*, foram detectados *Pseudomonas-Xanthomonas*, *Acinetobacter-Moraxella*, Bacilos Gram +, *Staphylococcus-Micrococcus*, Enterobactérias e *Aeromonas* móveis em percentagens consideravelmente menores. Estes dois grupos de bactérias fermentativas, todavia, foram detectados em percentagens muito pequenas. Entre os peixes selvagens (Figura 3.1.7), igualmente para além do predomínio absoluto de *Flavobacterium*, são, também, os grupos *Pseudomonas-Xanthomonas* e *Acinetobacter-Moraxella* que estão mais representados. No entanto, as Enterobactérias e *Aeromonas* móveis apresentam-se em percentagens semelhantes (cerca de 15%), no caso da boga, enquanto que, no caso da truta comum, são apenas as *Aeromonas* móveis que estão representadas nesta percentagem. Por outro lado, curiosamente, verificou-se que de todas as espécies de peixes saudáveis amostrados na truticultura A (cultivados) ou no rio junto dela (selvagens) foram isoladas estirpes representantes dos mesmos grupos bacterianos (Figuras 3.1.6 e 3.1.7).

Tabela 3.1.5 - Resumo dos resultados qualitativos e quantitativos da análise bacteriológica de peixes, efectuada a longo de 1 ano nas truticulturas A e B.

Truticultura **A**	ESPÉCIE	Nº de amostragens com bactérias/Nº total de amostragens	Nº de peixes analisados	Percentagem de peixes infectados	GRUPOS BACTERIANOS DETECTADOS
PEIXES CULTIVADOS	TRUTA ARCO-ÍRIS				
	- Saudáveis	7/12	159	25	*Flavobacterium* (45) *Acinetobacter-Moraxella* (14) *Pseudomonas-Xanthomonas* (12) *Staphylococcus-Micrococcus* (11) Bacilos Gram + (11) *Aeromonas* móveis (5) *Enterobacteriaceae* (3)
	- Doentes	2/2	2	100	*Aeromonas salmonicida* (20) **a** *Aeromonas* móveis (20) **b** *Yersinia ruckeri* (20) **b** *Enterobacteriaceae* (20) **b** Bacilos Gram + (20) **b**

Tabela 3.1.5 - (Continuação).

Truticultura **A**	ESPÉCIE	Nº de amostragens com bactérias/Nº total de amostragens	Nº de peixes analisados	Percentagem de peixes infectados	GRUPOS BACTERIANOS DETECTADOS
	TRUTA COMUM				
	- Saudáveis	8/11	92	30	*Flavobacterium* (40) *Pseudomonas-Xanthomonas* (23) *Enterobacteriaceae* (15) Bacilos Gram + (10) *Acinetobacter-Moraxella* (8) *Staphylococcus-Micrococcus* (4)
	- Doentes	1/1	19	100	*Aeromonas salmonicida* (95) **a b** *Aeromonas* móveis (5) **b**
PEIXES SELVAGENS :	- Truta arco-íris - Truta comum - Boga - Escalo	7/7	182	26	*Flavobacterium* (36) *Acinetobacter-Moraxella* (17) *Pseudomonas-Xanthomonas* (16) *Aeromonas* móveis (12) Bacilos Gram + (8) *Enterobacteriaceae* (7) *Staphylococcus-Micrococcus* (4)

Tabela 3.1.5 - (Continuação).

Truticultura **B**	ESPÉCIE	Nº de amostragens com bactérias/Nº total de amostragens	Nº de peixes analisados	Percentagem de peixes infectados	GRUPOS BACTERIANOS DETECTADOS
PEIXES CULTIVADOS	TRUTA ARCO-ÍRIS				
	- Saudáveis	12/12	224	28	*Pseudomonas-Xanthomonas* (20) *Enterobacteriaceae* (20) *Flavobacterium* (15) Bacilos Gram + (15) *Aeromonas* móveis (14) *Acinetobacter-Moraxella* (10) *Staphylococcus-Micrococcus* (3) *Yersinia ruckeri* (3)
	- Doentes	8/8	51	78	*Flavobacterium* (23) **b** *Enterobacteriaceae* (20) **b** *Aeromonas* móveis (18) **b** *Acinetobacter-Moraxella* (11) **b** *Pseudomonas-Xanthomonas* (8) **b** Bacilos Gram + (7) **b** *Yersinia ruckeri* (7) **c b** *Staphylococcus-Micrococcus* (6) **b**
PEIXES SELVAGENS :	- Truta arco-íris - Boga	6/6	112	20	*Acinetobacter-Moraxella* (24) *Enterobacteriaceae* (21) *Aeromonas* móveis (17) *Pseudomonas-Xanthomonas* (14) *Flavobacterium* (13) Bacilos Gram + (11)

a - Em cultura pura (epizootia de furunculose).
b - Em cultura mista
c - Em cultura pura (de um exemplar)

O grande predomínio de *Flavobacterium* nos peixes aparentemente saudáveis, cultivados na truticultura A, é confirmado pela observação das figuras 3.1.8 e 3.1.9 (devido ao pequeno número de estirpes bacterianas detectadas em cada amostragem nos órgãos internos dos peixes, nestas figuras, bem como nas figuras seguintes referentes ao mesmo tipo de resultados, são indicados os números de estirpes isoladas, e não as respectivas percentagens). Assim, este grupo bacteriano foi o mais abundante nas trutas arco-íris (Figura 3.1.8) nos meses de Março, Agosto, Novembro (em que foi, inclusivé, o único grupo isolado) e Dezembro; nas trutas comuns, predominou nos meses de Julho, Novembro e Dezembro, sendo em Março o grupo mais abundante juntamente com *Pseudomonas-Xanthomonas*. No entanto, houve meses em que outros grupos foram os mais abundantes, como aconteceu em Maio (em ambas as espécies de peixes cultivados observou-se o predomínio de *Staphylococcus-Micrococcus*) e, nas trutas comuns, também em Abril (predomínio de *Acinetobacter-Moraxella*). As amostragens que não revelaram um predomínio nítido de nenhum grupo bacteriano foram as de Janeiro e Abril (trutas arco-íris) e Agosto e Setembro (trutas comuns). De notar, também, que os resultados do exame bacteriológico foram negativos (não foram isoladas bactérias) em várias amostragens: Fevereiro, Junho, Julho, Setembro e Outubro, nas trutas arco-íris; Janeiro, Fevereiro e Outubro, nas trutas comuns. Em relação às bactérias fermentativas, é notório o seu isolamento esporádico nas trutas arco-íris, pois apenas foram detectadas em Março (*Enterobacteriaceae*) e Agosto (*Aeromonas* móveis), o que corresponde a um predomínio muito acentuado de bactérias oxidativas. Nas trutas comuns, as bactérias fermentativas isoladas (em Março, Abril, Julho, Setembro e Novembro) foram unicamente *Enterobacteriaceae*.

Um predomínio de bactérias oxidativas foi observado, também, em todas as espécies de peixes selvagens (figuras 3.1.10, 3.1.11 e 3.1.12), sendo mais acentuado na truta comum e no escalo. No entanto, curiosamente, nos meses de Julho e Agosto foi muito frequente o predomínio das bactérias fermentativas: nas trutas comuns, estas foram as únicas isoladas em Julho (com maior abundância de *Aeromonas* móveis); nas bogas, em ambos os meses, apenas foram isoladas *Aeromonas* móveis; nos escalos, foi, também, este grupo bacteriano o único detectado na amostragem de Agosto. Para além destes dois meses, foram isoladas bactérias fermentativas em Março e Setembro, nas bogas, e, no caso dos escalos, em Abril. Foram detectadas bactérias nos órgãos internos das trutas comuns em todas as sete amostragens realizadas; *Flavobacterium* foi o grupo mais abundante em Março, Abril, e Dezembro, enquanto que *Pseudomonas-Xanthomonas* predominou em Fevereiro, o mesmo acontecendo com os Bacilos Gram + na amostragem de Agosto, isto para além do predomínio, já referido, das *Aeromonas* móveis em Julho. Na amostragem de Setembro não foi observado o

predomínio de qualquer grupo bacteriano. Nas bogas, não foram detectadas bactérias na amostragem de Dezembro, enquanto que, em Setembro, não foi observado um predomínio de qualquer dos grupos bacterianos presentes. Em Março e Abril foi *Flavobacterium* o grupo mais abundante, o mesmo acontecendo com *Staphylococcus-Micrococcus* em Fevereiro e com as *Aeromonas* móveis nas amostragens de Julho e Agosto. Quanto aos escalos, não foi observado o predomínio de qualquer grupo na amostragem de Fevereiro, e, em Setembro, não foi isolada qualquer estirpe bacteriana. Nos restantes meses, observou-se um predomínio de *Flavobacterium* em Março e Abril, de *Aeromonas* móveis em Agosto e de *Acinetobacter-Moraxella* em Dezembro. Particularmente digno de nota, entre estes resultados, é, também, o facto de *Flavobacterium* ter sido o grupo predominante, nas três espécies de peixes selvagens, em Março e Abril.

Entre as bactérias detectadas nos órgãos internos das trutas arco-íris, aparentemente saudáveis, cultivadas na truticultura B (figura 3.1.13 e tabela 3.1.5), não foi observado um predomínio claro de nenhum grupo bacteriano. Verificou-se a presença de vários grupos, nomeadamente *Pseudomonas-Xanthomonas*, *Flavobacterium*, Bacilos Gram +, Enterobactérias e *Aeromonas* móveis, todos em percentagens de 15-20%; também *Acinetobacter-Moraxella* estava representado, constituindo 10% do total das estirpes isoladas. É importante referir a ocorrência de *Y. ruckeri* entre estas trutas aparentemente saudáveis, embora em pequena percentagem (3%), tal como *Staphylococcus-Micrococcus*. Como já foi referido, esta estirpe de *Y. ruckeri* foi isolada de uma truta pertencente a um lote do qual foi isolado, simultaneamente, IPNV (ver capítulo 3.3 desta dissertação). Assim, estes dois agentes etiológicos de doenças de declaração obrigatória coexistiam num lote de peixes sem qualquer sintoma de doença, ilustrando bem a condição de portadores assintomáticos, particularmente perigosa em aquacultura, uma vez que facilita muito a disseminação dos microrganismos patogénicos (Furones *et al.*, 1993; Austin & Allen-Austin, 1993).

Na figura 3.1.15 estão ilustradas as estirpes bacterianas isoladas destas trutas aparentemente saudáveis, em cada uma das amostragens mensais. Verifica-se que, em todas estas amostragens, foram detectadas bactérias, sendo o grupo mais abundante variável de mês para mês. Assim, as *Aeromonas* móveis constituiram o único grupo detectado na amostragem de Janeiro, o mesmo acontecendo com os Bacilos Gram + em Setembro; em Junho e Julho, o grupo mais abundante foi o das Enterobactérias, enquanto que, em Agosto, predominaram os Bacilos Gram +; nas amostragens de Novembro e Dezembro, apenas foram isoladas estirpes de *Pseudomonas-Xanthomonas* e de *Flavobacterium*, sendo o primeiro grupo o predominante em ambos os meses. Em Fevereiro, Março, Abril, Maio e Outubro não houve um predomínio claro de nenhum

grupo bacteriano. Note-se que, para além da detecção, em Junho, de *Y. ruckeri* (serótipo O1) associada a IPNV, em trutas aparentemente saudáveis, foi, também, isolada uma outra estirpe desta espécie bacteriana, na amostragem de Julho, do rim de uma truta (85 g) igualmente com aspecto saudável; no entanto, esta estirpe pertence ao serótipo O3 (Romalde *et al.*, 1993). Estas duas amostragens (Junho e Julho) foram, ainda, aquelas nas quais foram detectadas as maiores proporções de bactérias fermentativas (*Enterobacteriaceae* e *Aeromonas* móveis).

As figuras 3.1.13 e 3.1.16, e a tabela 3.1.5, indicam os grupos bacterianos detectados nas trutas arco-íris, da truticultura B, que apresentavam algum sintoma de doença (os sintomas observados já foram referidos anteriormente). Nestes exemplares, verifica-se que os grupos bacterianos mais abundantes são *Flavobacterium*, *Enterobacteriaceae* e *Aeromonas* móveis; no entanto, também estão representados os grupos *Pseudomonas-Xanthomonas*, *Acinetobacter-Moraxella*, *Staphylococcus-Micrococcus*, Bacilos Gram + e *Y. ruckeri* (Figura 3.1.13 e Tabela 3.1.5). Nas amostragens de Janeiro, Fevereiro e, curiosamente, também em Junho, não foi observado um predomínio claro de nenhum grupo bacteriano, embora em Janeiro e em Junho tenham sido isoladas estirpes de *Y. ruckeri*, como já foi referido anteriormente. Em Julho, o grupo mais abundante foi *Acinetobacter-Moraxella*, enquanto que *Flavobacterium* o foi nas amostragens de Agosto e Novembro. Em Outubro, embora não tenha sido detectada uma predominância clara de um determinado grupo, foram isoladas várias estirpes de *Flavobacterium* e de cada um dos grupos de bactérias fermentativas: *Y. ruckeri* (já referido anteriormente), outras Enterobactérias e *Aeromonas* móveis. Embora, em Dezembro, também não tenha sido muito nítido o predomínio de um determinado grupo bacteriano, ainda assim as bactérias fermentativas (*Enterobacteriaceae* e *Aeromonas* móveis) foram detectadas em maior número do que qualquer dos restantes grupos (figura 3.1.16).

Curiosamente, não foi detectada qualquer estirpe de *Renibacterium salmoninarum* nem de *Flexibacter/Cytophaga* em nenhum dos peixes, cultivados ou selvagens, analisados neste estudo. De facto, seria de esperar a obtenção de algumas estirpes de *Flexibacter/Cytophaga*, pelo menos na truticultura B, pois, aquando de uma epizootia ocorrida na exploração piscícola que produz os alevins para esta truticultura, pudemos observar, ao microscópio óptico, a existência de números muitíssimo grandes de bactérias filamentosas no material retirado de lesões cutâneas de trutas arco-íris (reprodutoras) que apresentavam sintomas típicos de uma bacteriose provocada por microrganismos deste grupo. Como já foi referido, os únicos agentes bacterianos causadores de doenças de declaração obrigatória que foram detectados durante este estudo foram *A. salmonicida*, na truticultura A, e *Y. ruckeri*, em ambas as truticulturas.

Os grupos bacterianos detectados nos órgãos internos dos peixes selvagens capturados na albufeira em que se situa a truticultura B são indicados nas figuras 3.1.14, 3.1.17 e 3.1.18, e na tabela 3.1.5. A truta arco-íris, capturada em Julho, corresponde, certamente, a um dos exemplares que escapou da truticultura, tendo sido detectadas, nos seus órgãos internos, duas estirpes bacterianas, uma de *Acinetobacter-Moraxella* e outra de uma *Enterobacteriaceae* (Figuras 3.1.14 e 3.1.17). Nas bogas, o grupo predominante foi *Acinetobacter-Moraxella*, embora os grupos de bactérias fermentativas (*Enterobacteriaceae* e *Aeromonas* móveis) e *Pseudomonas-Xanthomonas* tenham sido detectados em percentagens não muito inferiores. Foram, ainda, isoladas, das bogas, estirpes de *Flavobacterium* e de Bacilos Gram +. Se atentarmos na distribuição de todas as estirpes isoladas destas bogas (Figura 3.1.18), observaremos o predomínio de *Flavobacterium* na amostragem de Março (estando *Acinetobacter-Moraxella*, também, numa proporção bastante elevada), *Pseudomonas-Xanthomonas* em Abril e *Acinetobacter-Moraxella* em Novembro. Em Julho e Agosto, porém, foram as *Aeromonas* móveis as mais abundantes. Em Dezembro, não houve um predomínio de nunhum grupo bacteriano, embora os mais representados nestes peixes tenham sido *Pseudomonas-Xanthomonas*, *Flavobacterium* e *Enterobacteriaceae*. É importante referir, ainda, que as *Aeromonas* móveis isoladas em Julho foram obtidas em culturas puras e em culturas mistas com cada um dos outros três grupos (*Acinetobacter-Moraxella*, Bacilos Gram + e *Enterobacteriaceae*) e que, em Dezembro, este mesmo grupo foi detectado, igualmente, em cultura pura. No entanto, nenhum destes peixes apresentava qualquer sintoma evidente de doença.

Nos peixes selvagens capturados nesta albufeira não foram detectados *Y. ruckeri*, *A. salmonicida* ou qualquer outro agente etiológico, bacteriano ou viral, de qualquer doença de declaração obrigatória. Curiosamente, também não foi isolada, destes peixes, qualquer estirpe de *Staphylococcus-Micrococcus*.

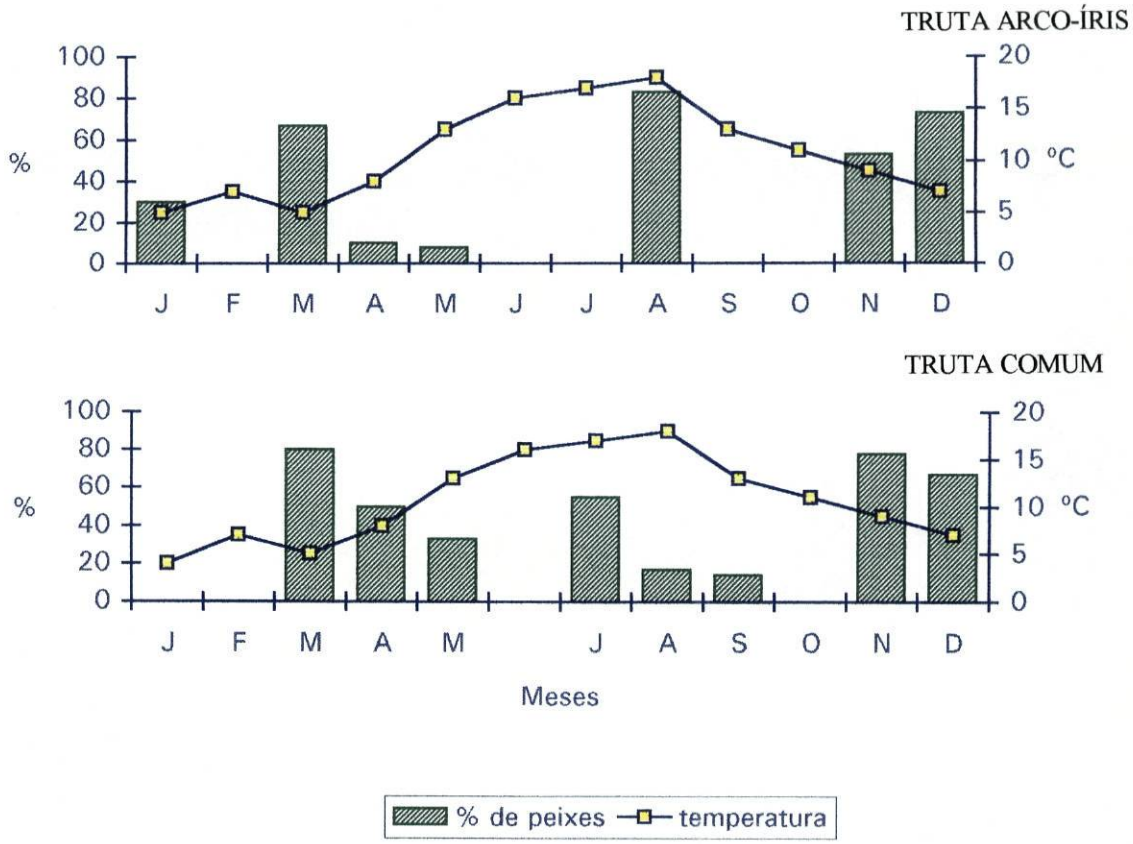


Fig. 3.1.1 - Percentagem dos peixes cultivados, aparentemente saudáveis, amostrados na truticultura A, de cujos órgãos internos foi possível isolar pelo menos uma estirpe bacteriana. Em Junho, não foi efectuada amostragem de truta comum, pelo que a letra correspondente a este mês foi omitida do respectivo gráfico.

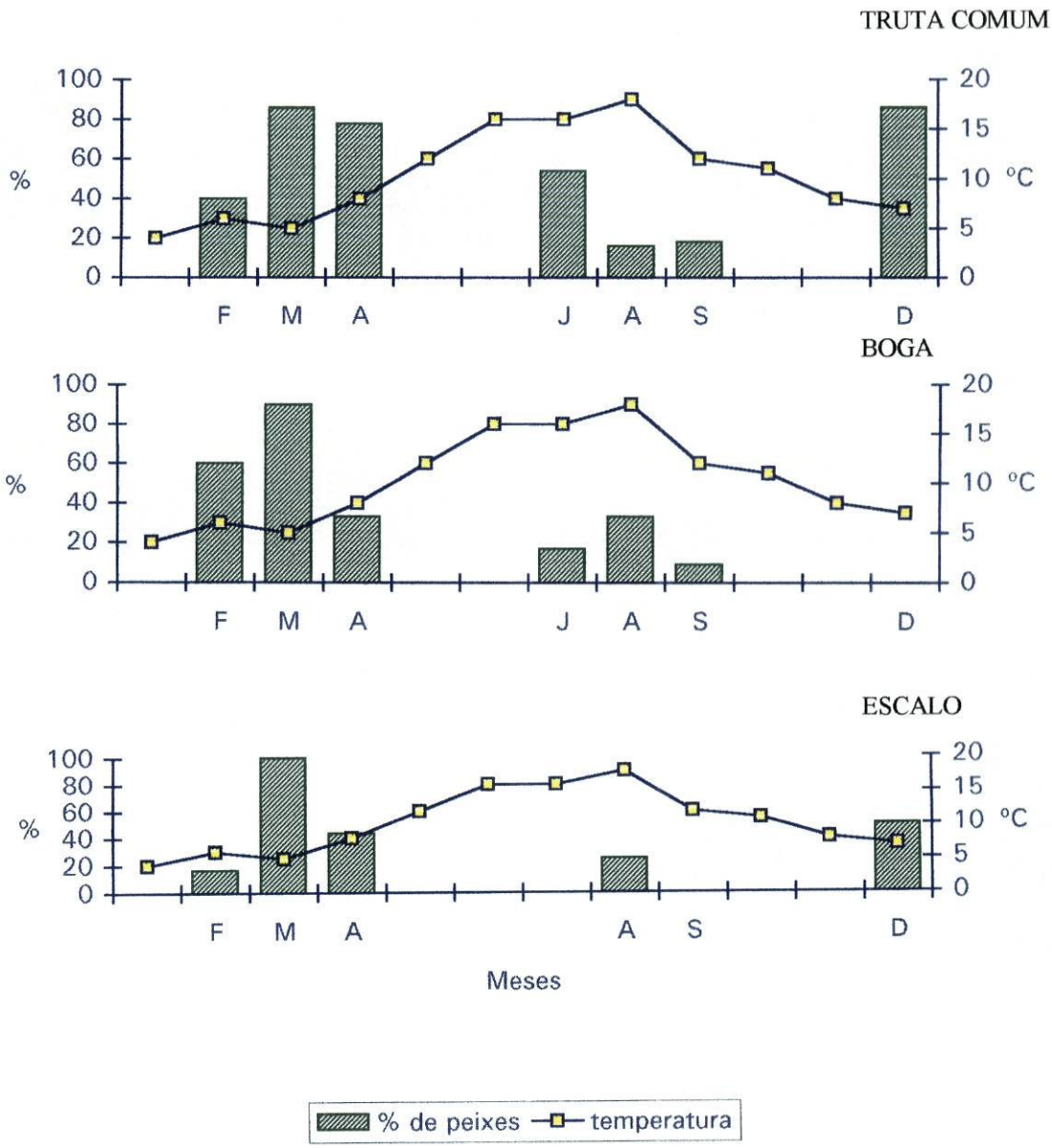


Fig. 3.1.2 - Percentagem dos peixes selvagens, todos aparentemente saudáveis, capturados no rio adjacente à truticultura A, de cujos órgãos internos foi possível isolar pelo menos uma estirpe bacteriana. Em Janeiro, Maio, Junho, Outubro e Novembro não foram amostrados peixes selvagens, pelo que as letras correspondentes a estes meses foram omitidas dos gráficos. A omissão da letra correspondente ao mês de Julho, no gráfico relativo ao escalo, deve-se ao facto de, nesta amostragem, apenas terem sido capturados exemplares de truta comum e boga.

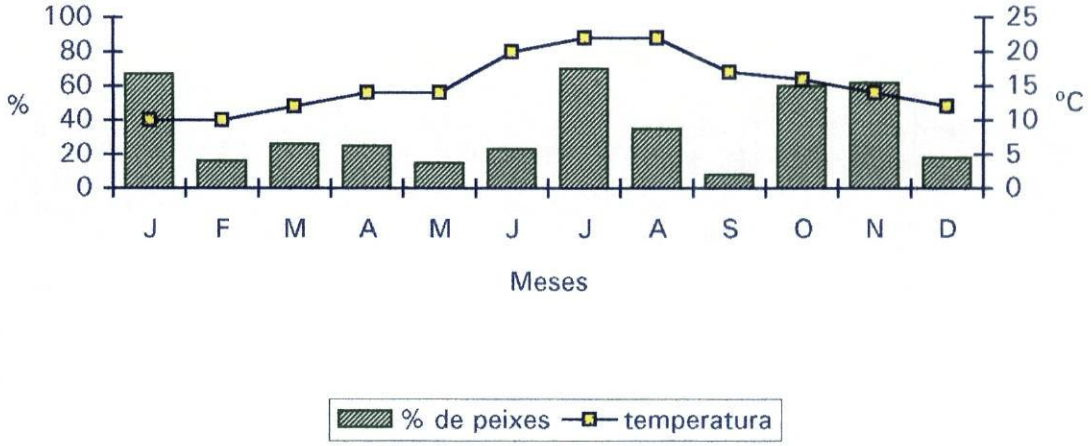


Fig. 3.1.3 - Percentagem das trutas arco-íris cultivadas, aparentemente saudáveis, amostradas na truticultura B, de cujos órgãos internos foi possível isolar pelo menos uma estirpe bacteriana.

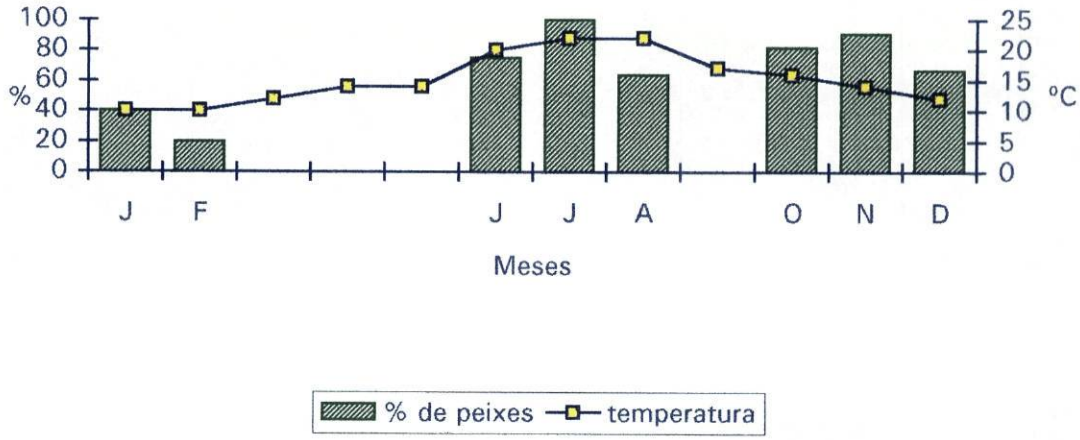


Fig. 3.1.4 - Percentagem das trutas arco-íris cultivadas, apresentando sintomas de doença, amostradas na truticultura B, de cujos órgãos internos foi possível isolar pelo menos uma estirpe bacteriana. Nos meses de Março, Abril, Maio e Setembro não foram amostradas (nem observadas) trutas doentes, pelo que as letras correspondentes a estes meses foram omitidas no gráfico.

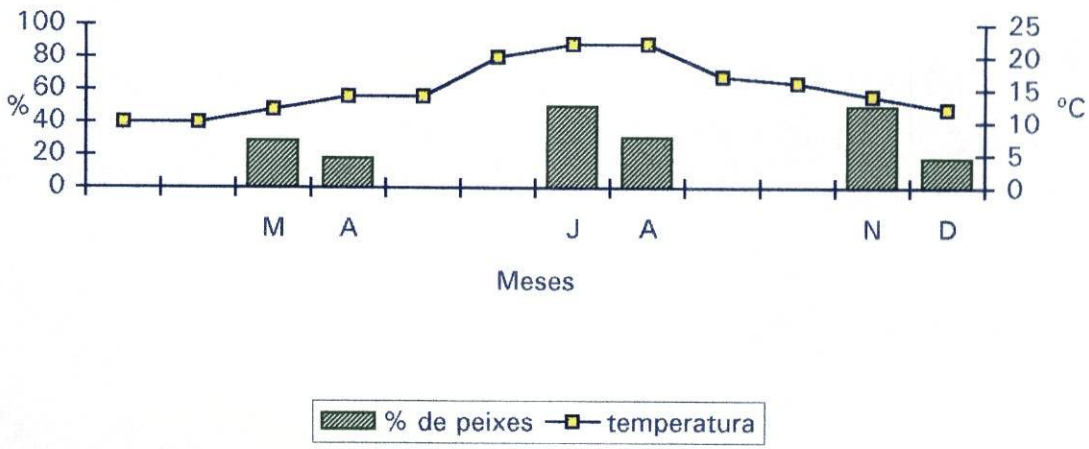


Fig. 3.1.5 - Percentagem das bogas capturadas na albufeira em que está situada a truticultura B (todas aparentemente saudáveis), de cujos órgãos internos foi possível isolar pelo menos uma estirpe bacteriana. Nos meses de Janeiro, Fevereiro, Maio, Junho, Setembro e Outubro não foram amostrados peixes selvagens, pelo que as letras correspondentes a estes meses foram omitidas no gráfico.

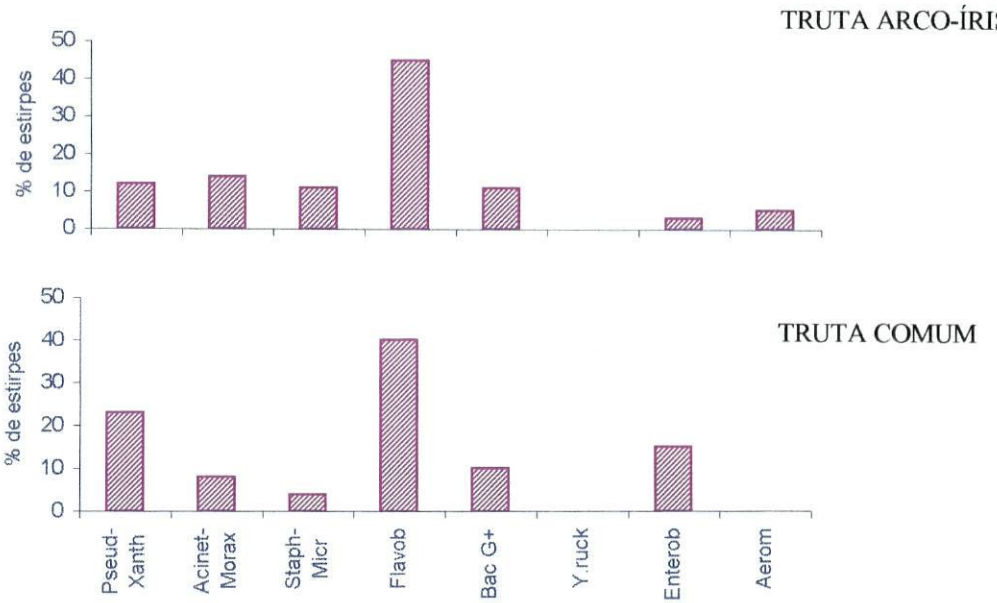


Fig. 3.1.6 - Comparação da diversidade microbiana detectada nos órgãos internos dos peixes cultivados, aparentemente saudáveis, amostrados na truticultura A. Pseud-Xanth: *Pseudomonas-Xanthomonas*; Acinet-Morax: *Acinetobacter-Moraxella*; Staph-Micr: *Staphylococcus-Micrococcus*; Flavob: *Flavobacterium*; Bac G+: Bacilos Gram +; Y.ruck: *Yersinia ruckeri*; Enterob: outras *Enterobacteriaceae*; Aerom: *Aeromonas* móveis.

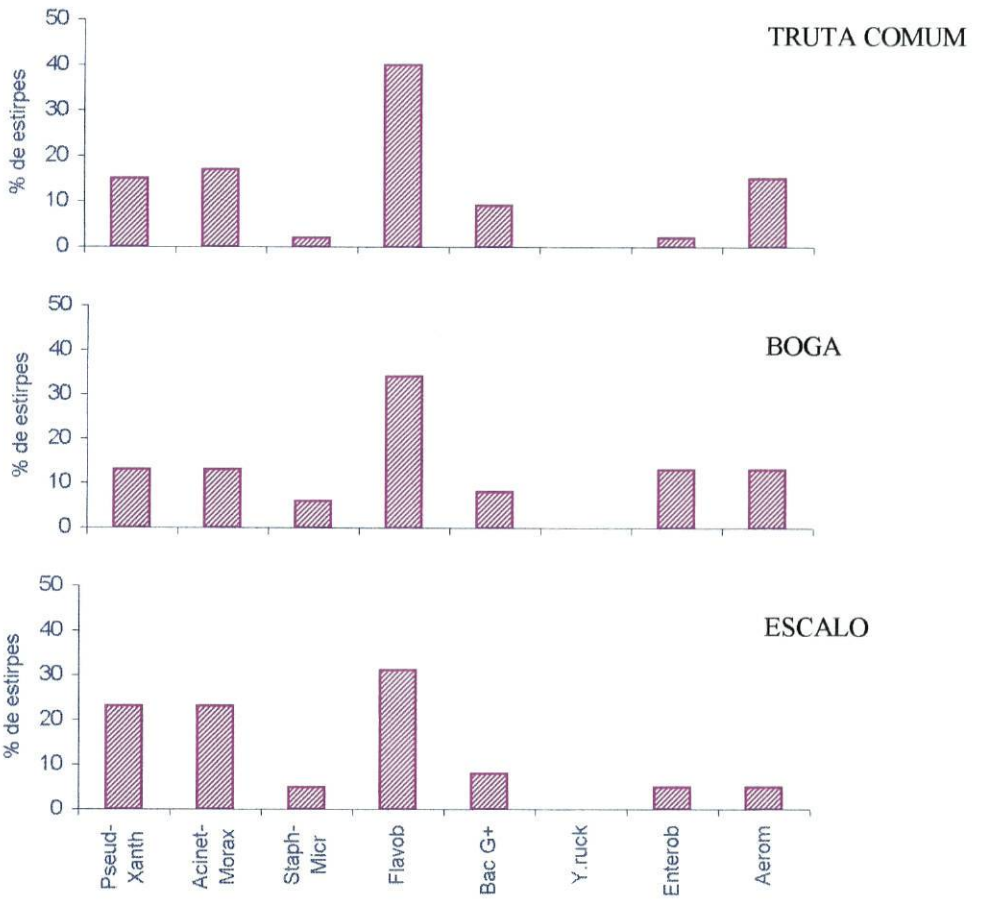


Fig. 3.1.7 - Comparação da diversidade microbiana detectada nos órgãos internos dos peixes selvagens, todos aparentemente saudáveis, capturados no rio adjacente à truticultura A. Pseud-Xanth: *Pseudomonas-Xanthomonas*; Acinet-Morax: *Acinetobacter-Moraxella*; Staph-Micr: *Staphylococcus-Micrococcus*; Flavob: *Flavobacterium*; Bac G+: Bacilos Gram +; Y.ruck: *Yersinia ruckeri*; Enterob: outras *Enterobacteriaceae*; Aerom: *Aeromonas* móveis.

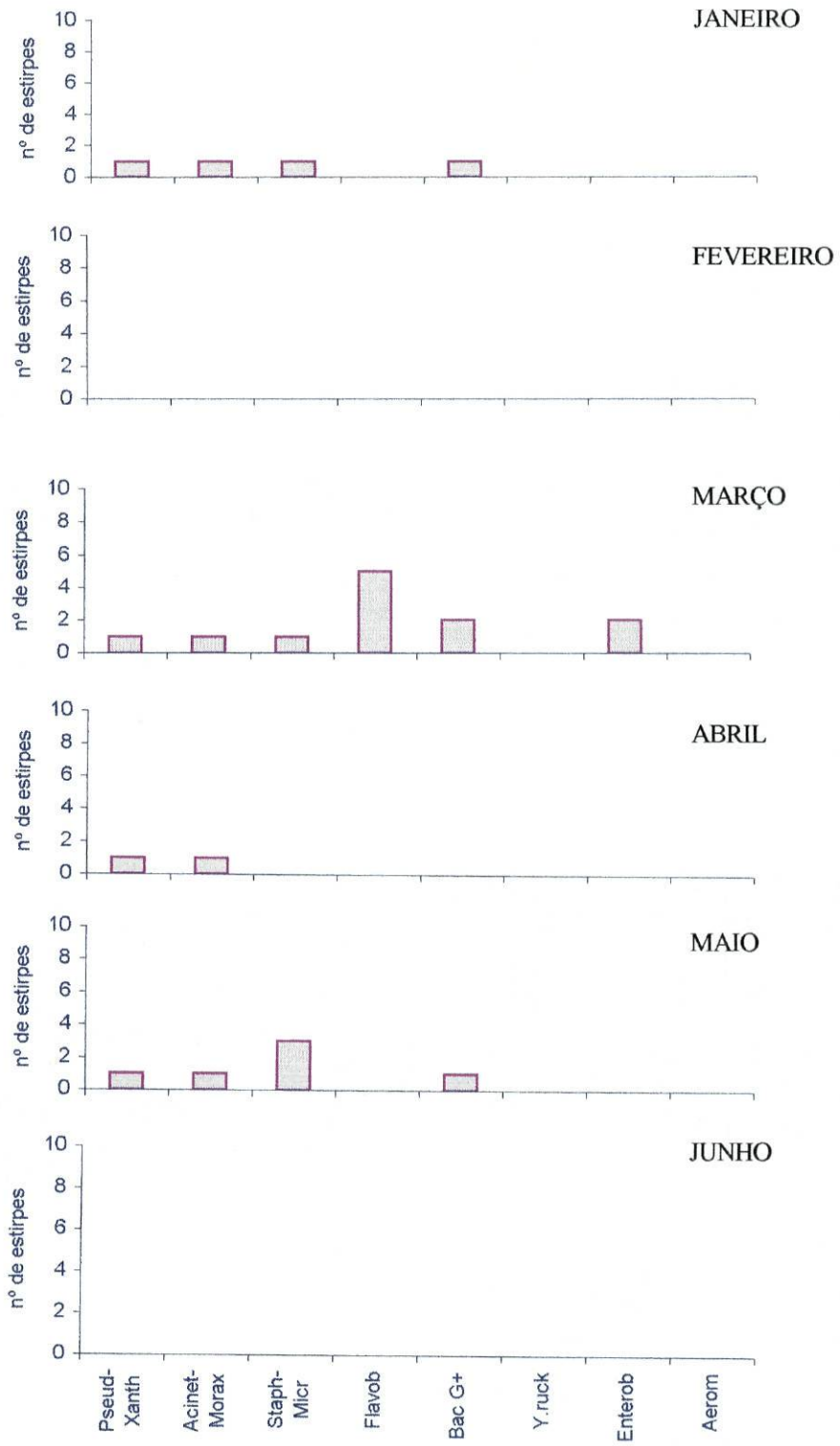


Fig. 3.1.8 - Comparação da diversidade microbiana detectada nos órgãos internos de trutas arco-íris aparentemente saudáveis, da truticultura A, ao longo das 12 amostragens mensais efectuadas. Pseud-Xanth: *Pseudomonas-Xanthomonas*; Acinet-Morax: *Acinetobacter-Moraxella*; Staph-Micr: *Staphylococcus-Micrococcus*; Flavob: *Flavobacterium*; Bac G+: Bacilos Gram +; Y.ruck: *Yersinia ruckeri*; Enterob: outras *Enterobacteriaceae*; Aerom: *Aeromonas* móveis.

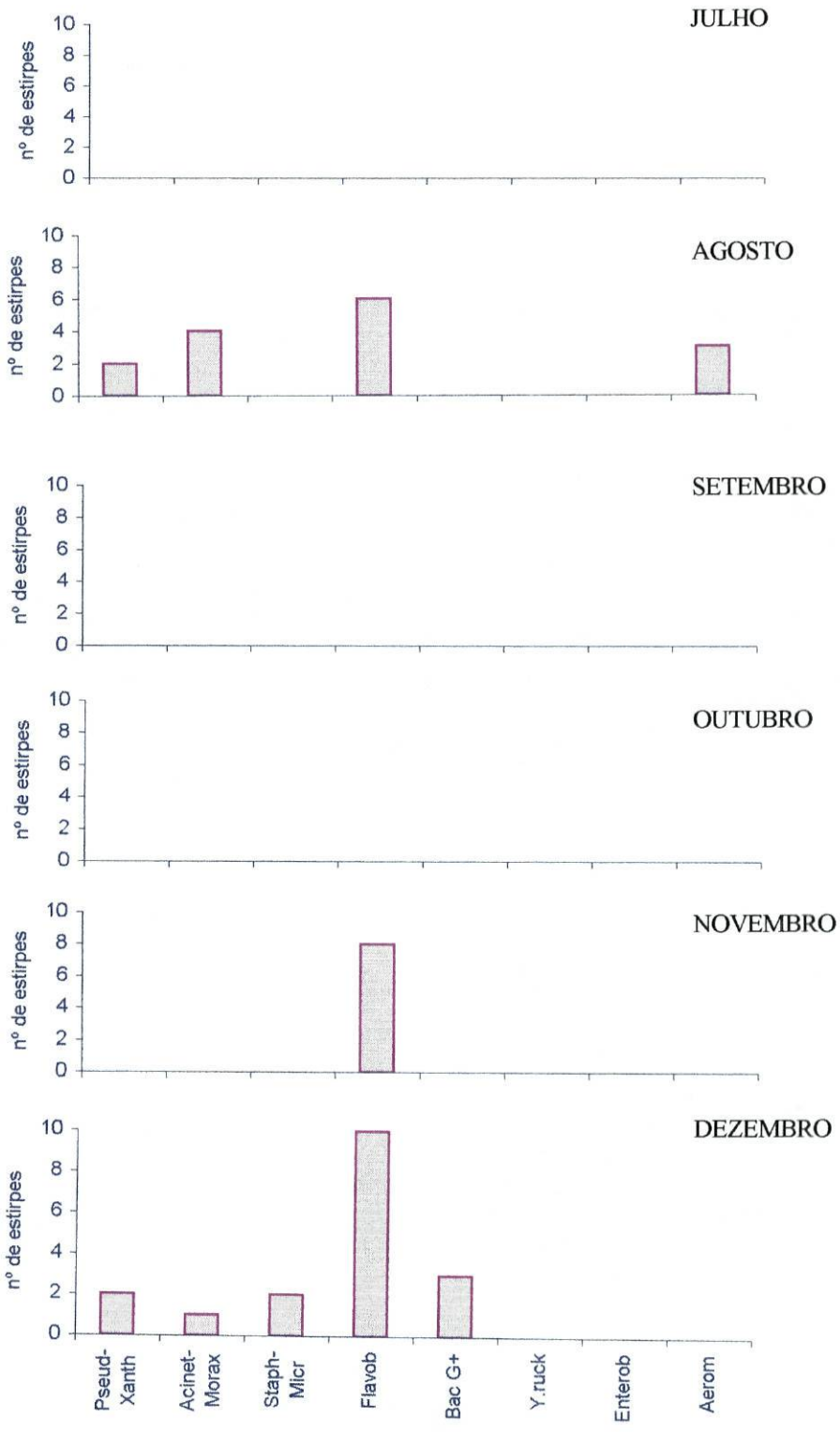


Fig. 3.1.8 - Continuação

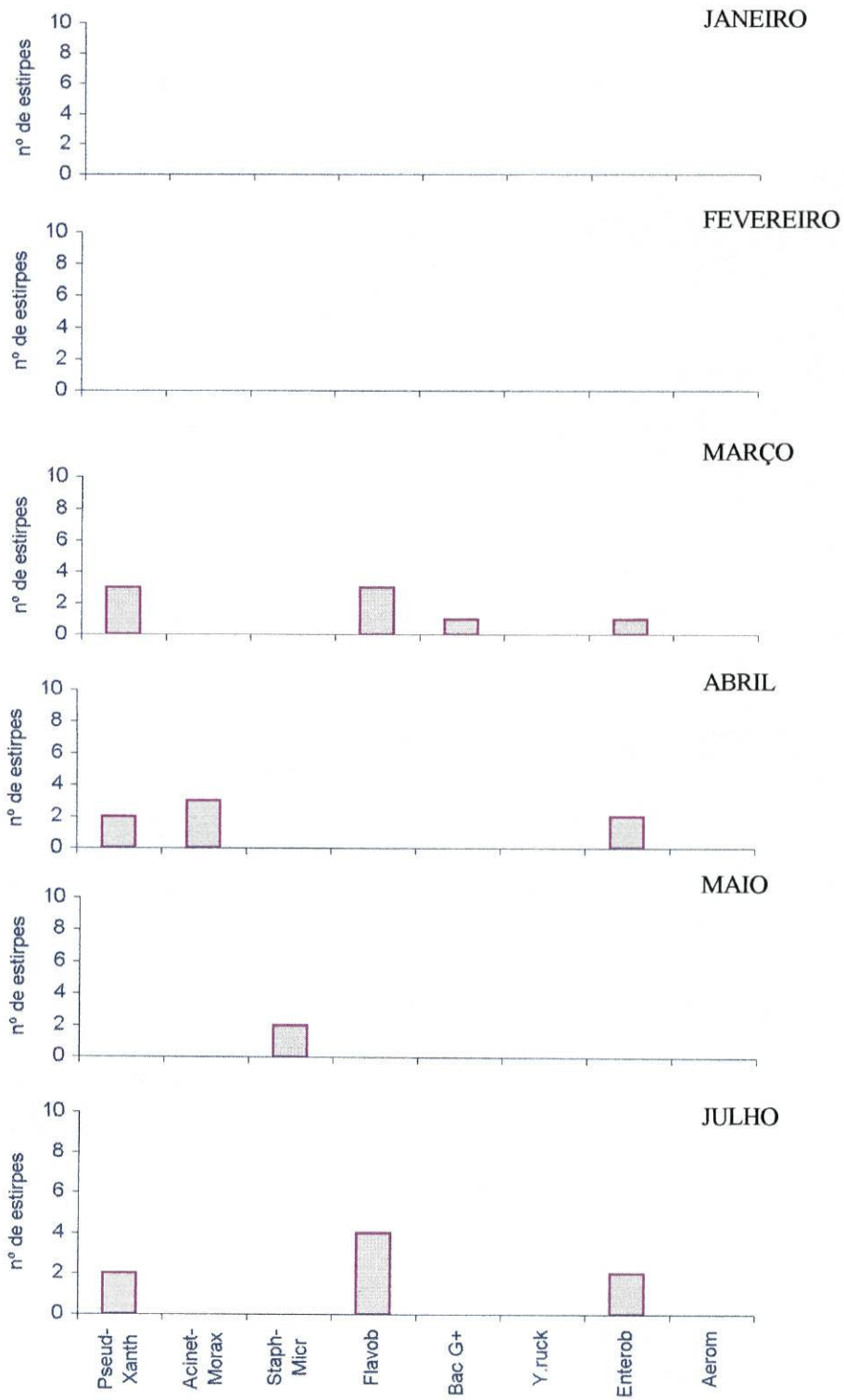


Fig. 3.1.9 - Comparação da diversidade microbiana detectada nos órgãos internos de trutas comuns aparentemente saudáveis, da truticultura A, ao longo das 11 amostragens mensais efectuadas (em Junho, não foram amostradas trutas comuns). Pseud-Xanth: *Pseudomonas-Xanthomonas*; Acinet-Morax: *Acinetobacter-Moraxella*; Staph-Micr: *Staphylococcus-Micrococcus*; Flavob: *Flavobacterium*; Bac G+: Bacilos Gram +; Y.ruck: *Yersinia ruckeri*; Enterob: outras *Enterobacteriaceae*; Aerom: *Aeromonas* móveis.

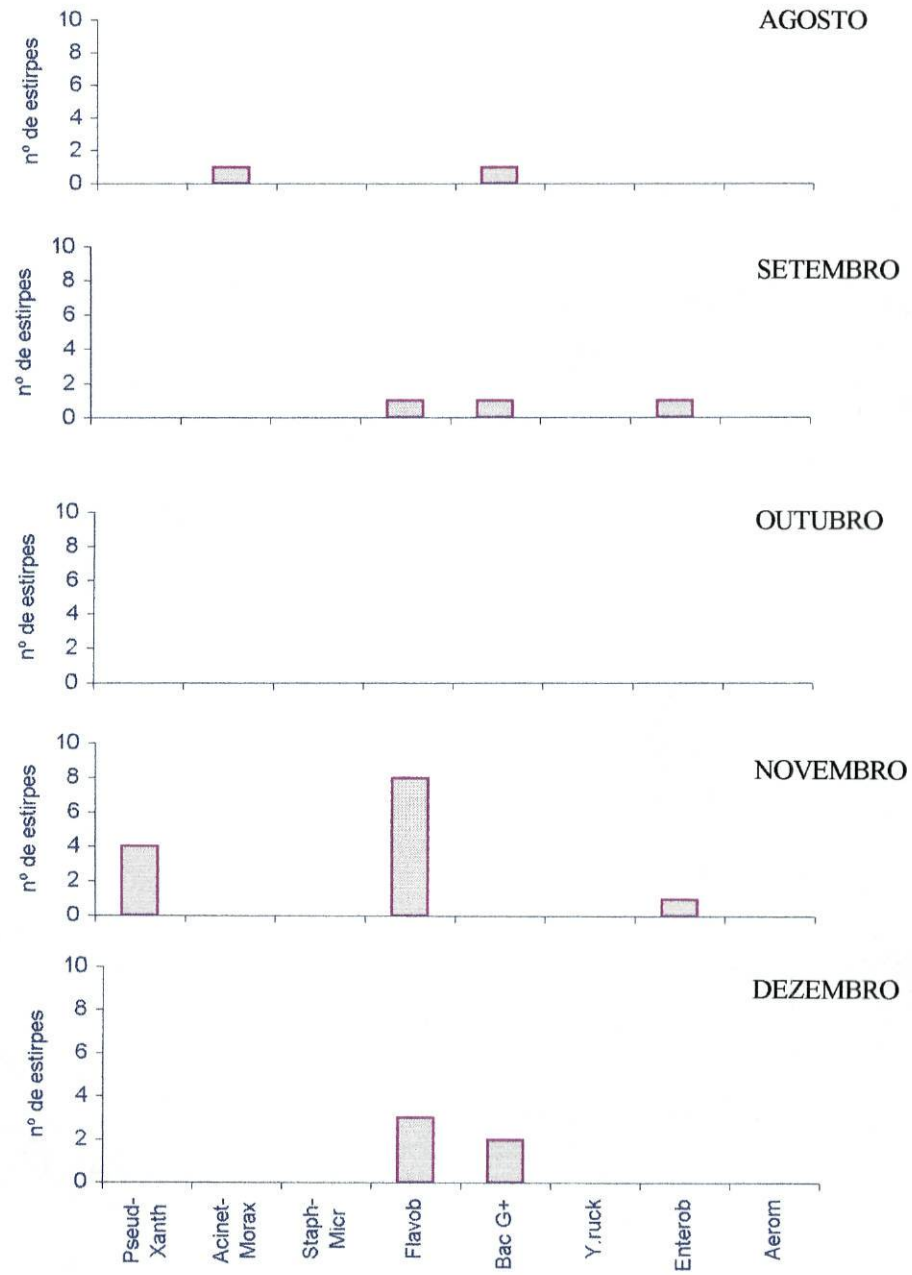


Fig. 3.1.9 - Continuação

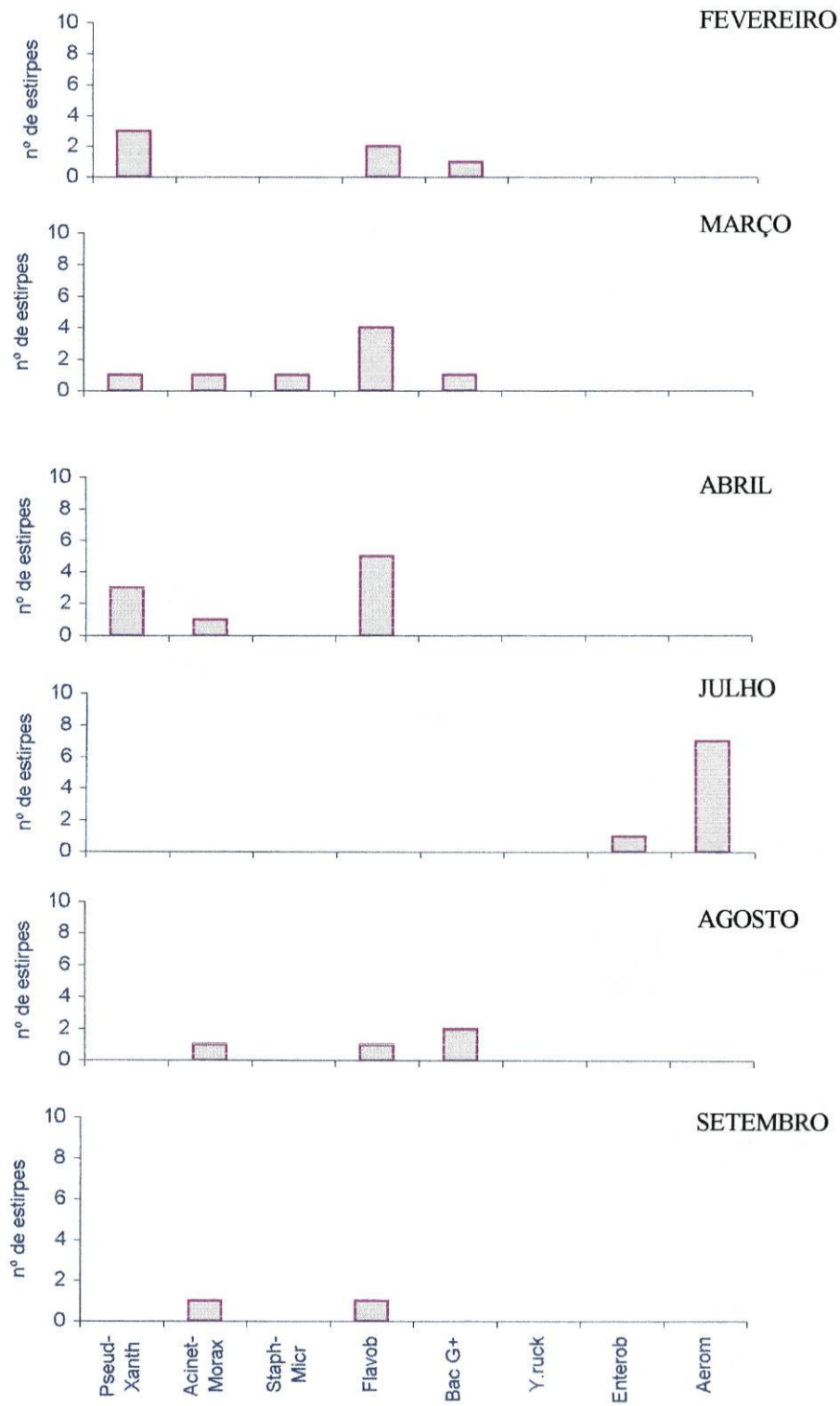


Fig. 3.1.10 - Comparação da diversidade microbiana detectada nos órgãos internos de trutas comuns selvagens (todas aparentemente saudáveis), capturadas no rio adjacente à truticultura A, ao longo das amostragens mensais efectuadas. Pseud-Xanth: *Pseudomonas-Xanthomonas*; Acinet-Morax: *Acinetobacter-Moraxella*; Staph-Micr: *Staphylococcus-Micrococcus*; Flavob: *Flavobacterium*; Bac G+: Bacilos Gram +; Y.ruck: *Yersinia ruckeri*; Enterob: outras *Enterobacteriaceae*; Aerom: *Aeromonas* móveis.

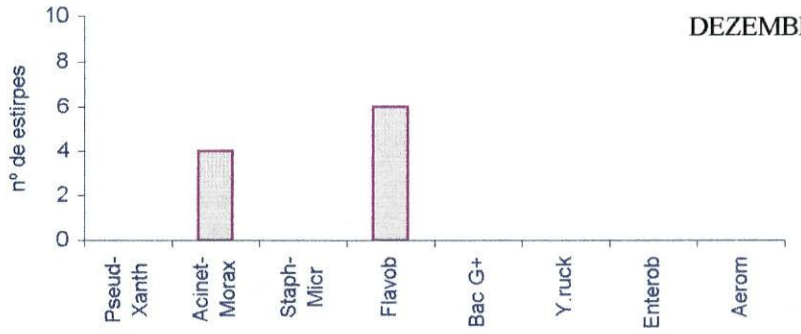


Fig. 3.1.10 - Continuação

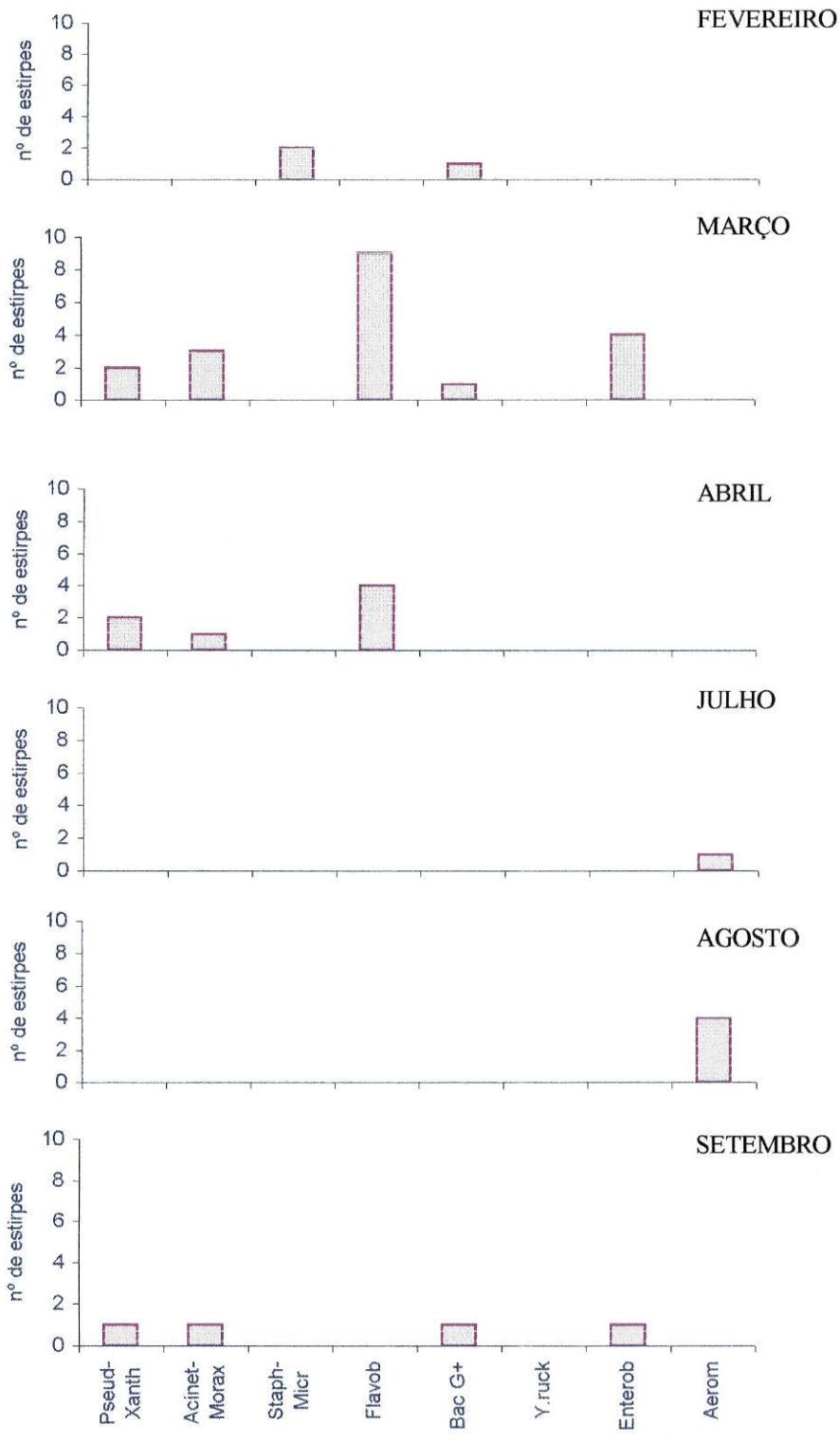


Fig. 3.1.11 - Comparação da diversidade microbiana detectada nos órgãos internos das bogas (todas aparentemente saudáveis), capturadas no rio adjacente à truticultura A, ao longo das amostragens mensais efectuadas. Pseud-Xanth: *Pseudomonas-Xanthomonas*; Acinet-Morax: *Acinetobacter-Moraxella*; Staph-Micr: *Staphylococcus-Micrococcus*; Flavob: *Flavobacterium*; Bac G+: Bacilos Gram +; Y.ruck: *Yersinia ruckeri*; Enterob: outras *Enterobacteriaceae*; Aerom: *Aeromonas* móveis. Em Dezembro, embora tenha sido realizada a amostragem, não foi detectada qualquer estirpe bacteriana.

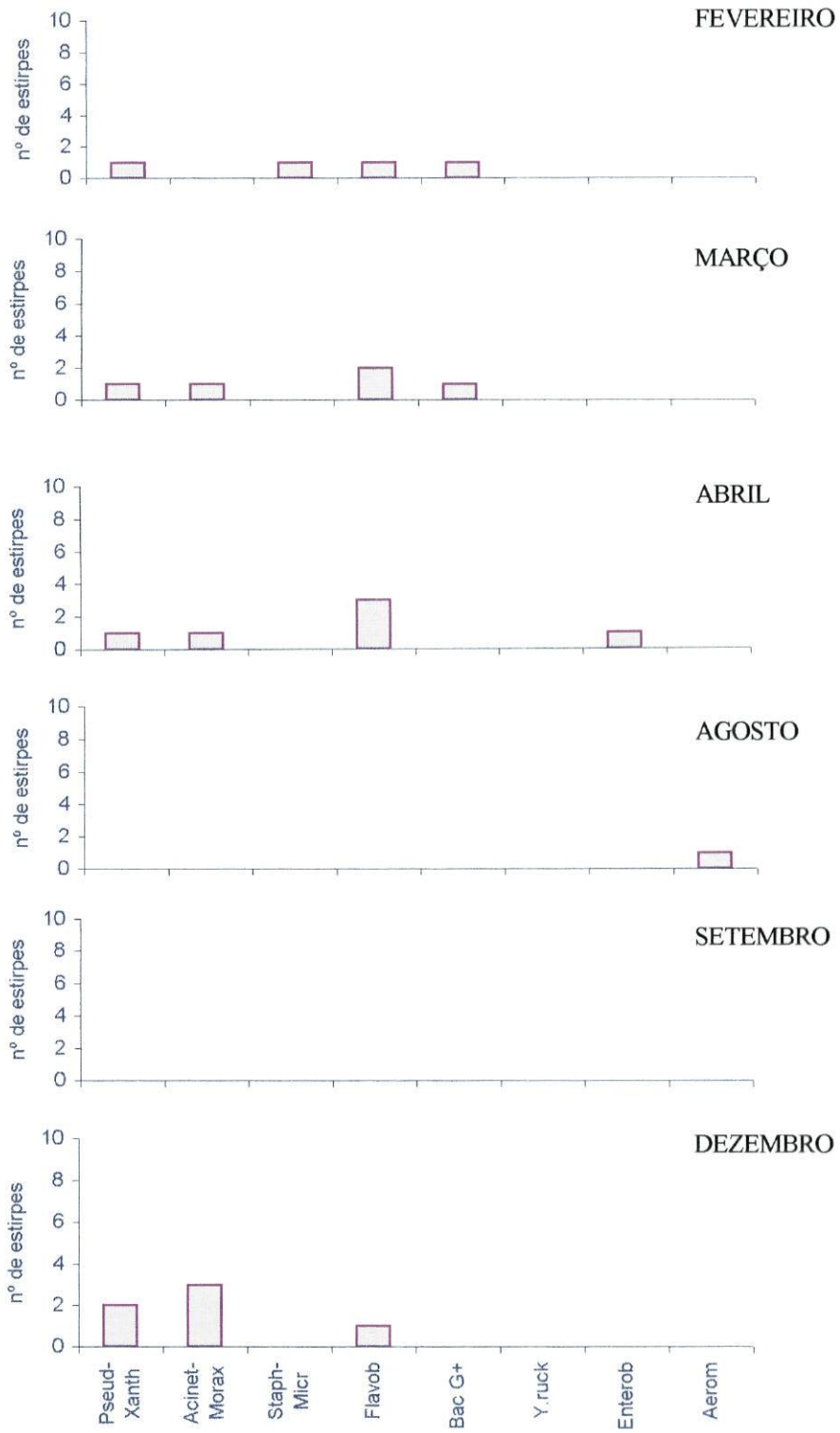


Fig. 3.1.12 - Comparação da diversidade microbiana detectada nos órgãos internos dos escalos (todos aparentemente saudáveis), capturadas no rio adjacente à truticultura A, ao longo das amostragens mensais efectuadas. Na amostragem de Julho não foram capturados escalos. Pseud-Xanth: *Pseudomonas-Xanthomonas*; Acinet-Morax: *Acinetobacter-Moraxella*; Staph-Micr: *Staphylococcus-Micrococcus*; Flavob: *Flavobacterium*; Bac G+: Bacilos Gram +; Y.ruck: *Yersinia ruckeri*; Enterob: outras *Enterobacteriaceae*; Aerom: *Aeromonas* móveis.

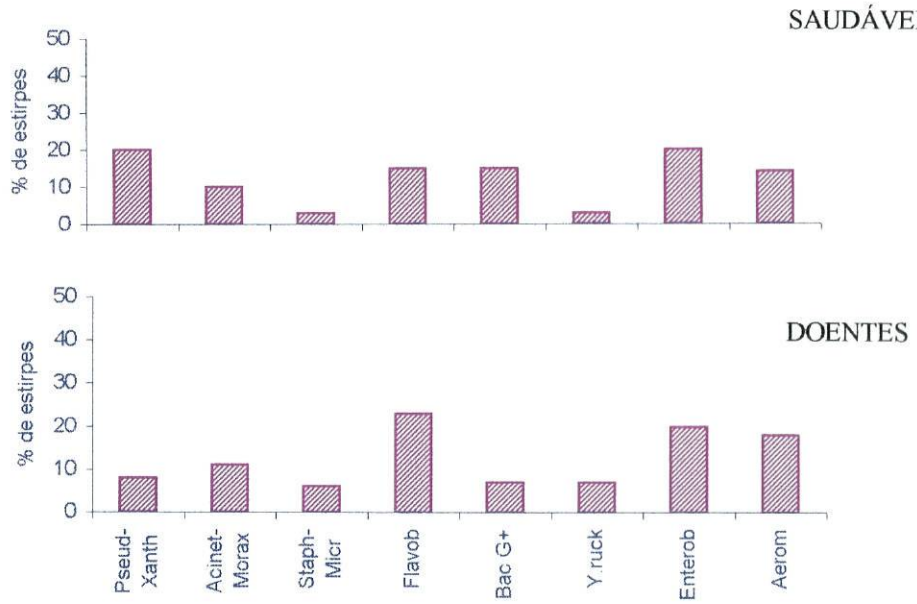


Fig. 3.1.13 - Comparação da diversidade microbiana detectada nos órgãos internos das trutas arco-íris amostradas na truticultura B. Pseud-Xanth: *Pseudomonas-Xanthomonas*; Acinet-Morax: *Acinetobacter-Moraxella*; Staph-Micr: *Staphylococcus-Micrococcus*; Flavob: *Flavobacterium*; Bac G+: Bacilos Gram +; Y.ruck: *Yersinia ruckeri*; Enterob: outras *Enterobacteriaceae*; Aerom: *Aeromonas* móveis.

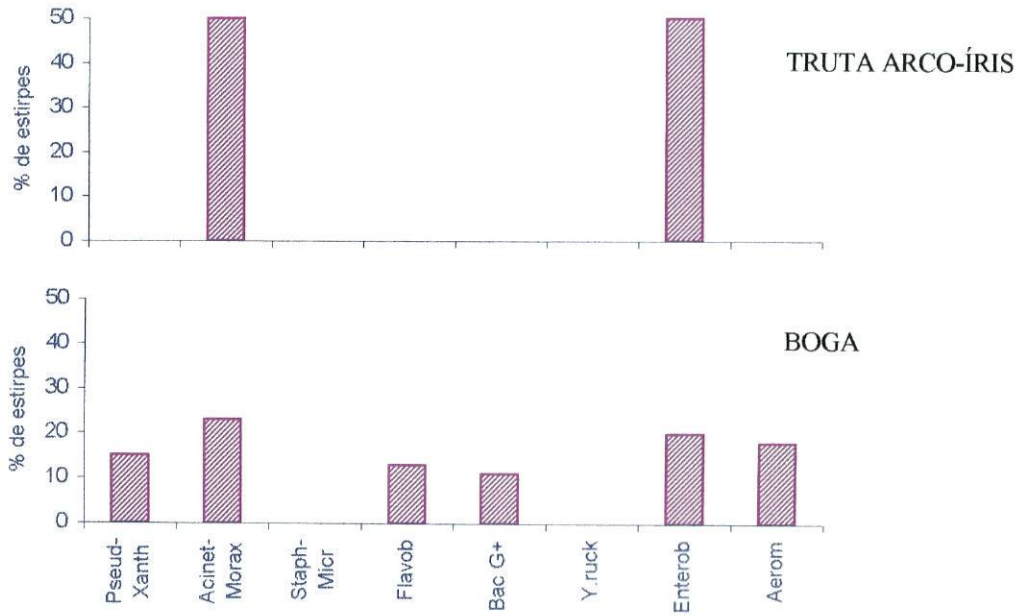


Fig. 3.1.14 - Comparação da diversidade microbiana detectada nos órgãos internos dos peixes selvagens, todos aparentemente saudáveis, capturados na albufeira onde está situada a truticultura B. Notar que, na albufeira, apenas foi capturada uma truta arco-íris, da qual foram isoladas apenas duas estirpes bacterianas. Pseud-Xanth: *Pseudomonas-Xanthomonas*; Acinet-Morax: *Acinetobacter-Moraxella*; Staph-Micr: *Staphylococcus-Micrococcus*; Flavob: *Flavobacterium*; Bac G+: Bacilos Gram +; Y.ruck: *Yersinia ruckeri*; Enterob: outras *Enterobacteriaceae*; Aerom: *Aeromonas* móveis.

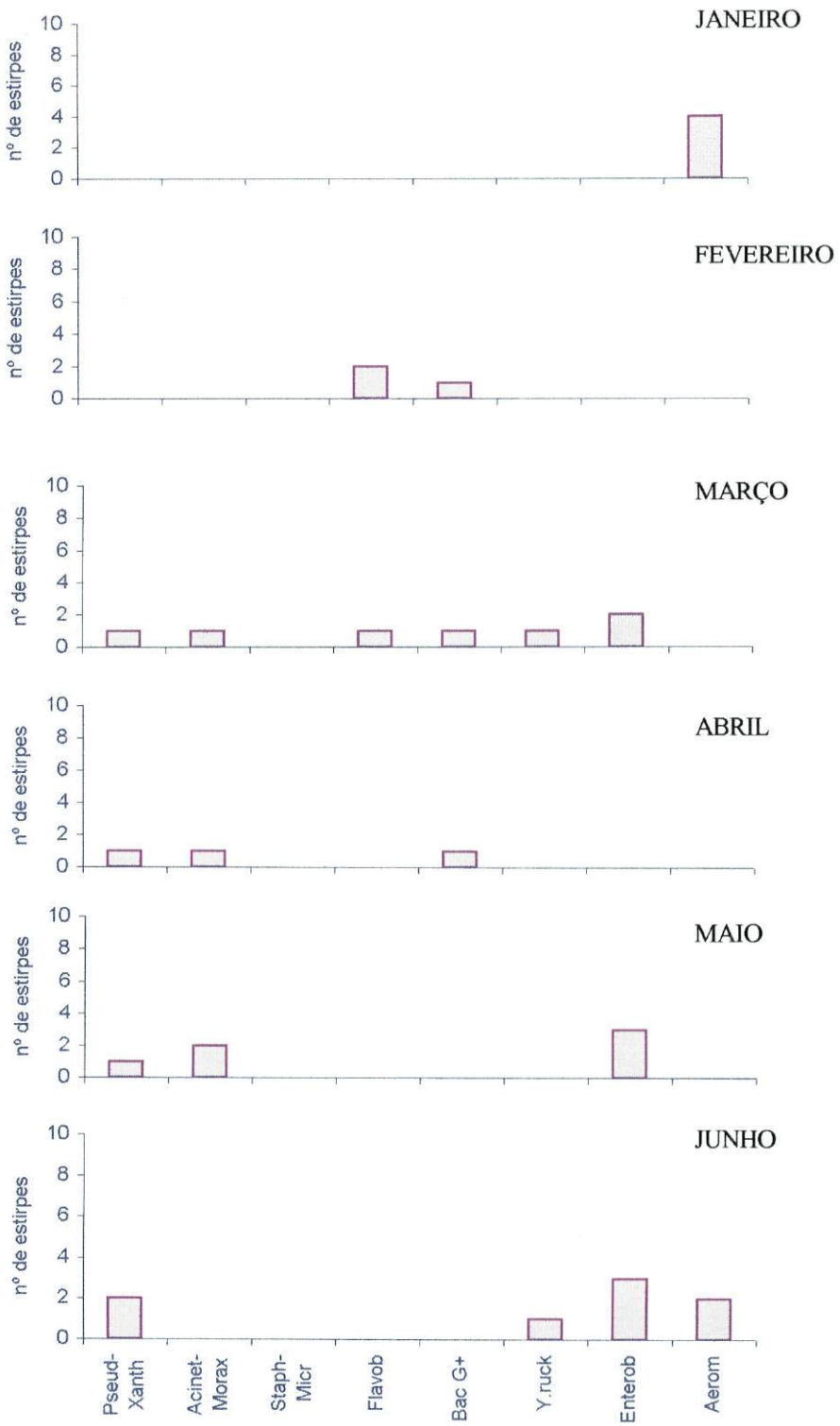


Fig. 3.1.15 - Comparação da diversidade microbiana detectada nos órgãos internos de trutas arco-íris aparentemente saudáveis, da truticultura B, ao longo das 12 amostragens mensais efectuadas. Pseud-Xanth: *Pseudomonas-Xanthomonas*; Acinet-Morax: *Acinetobacter-Moraxella*; Staph-Micr: *Staphylococcus-Micrococcus*; Flavob: *Flavobacterium*; Bac G+: Bacilos Gram +; Y.ruck: *Yersinia ruckeri*; Enterob: outras *Enterobacteriaceae*; Aerom: *Aeromonas* móveis.

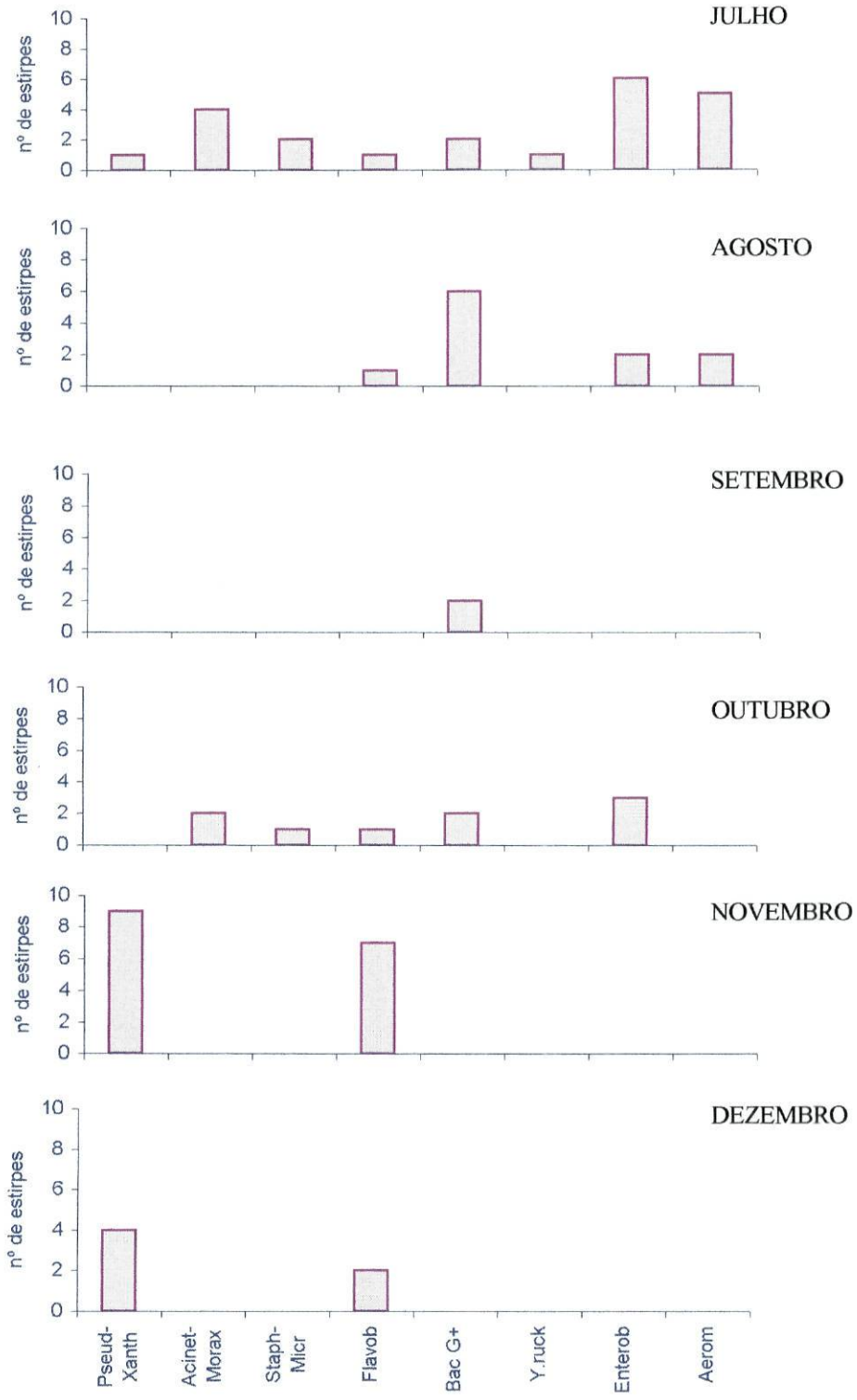


Fig. 3.1.15 - Continuação

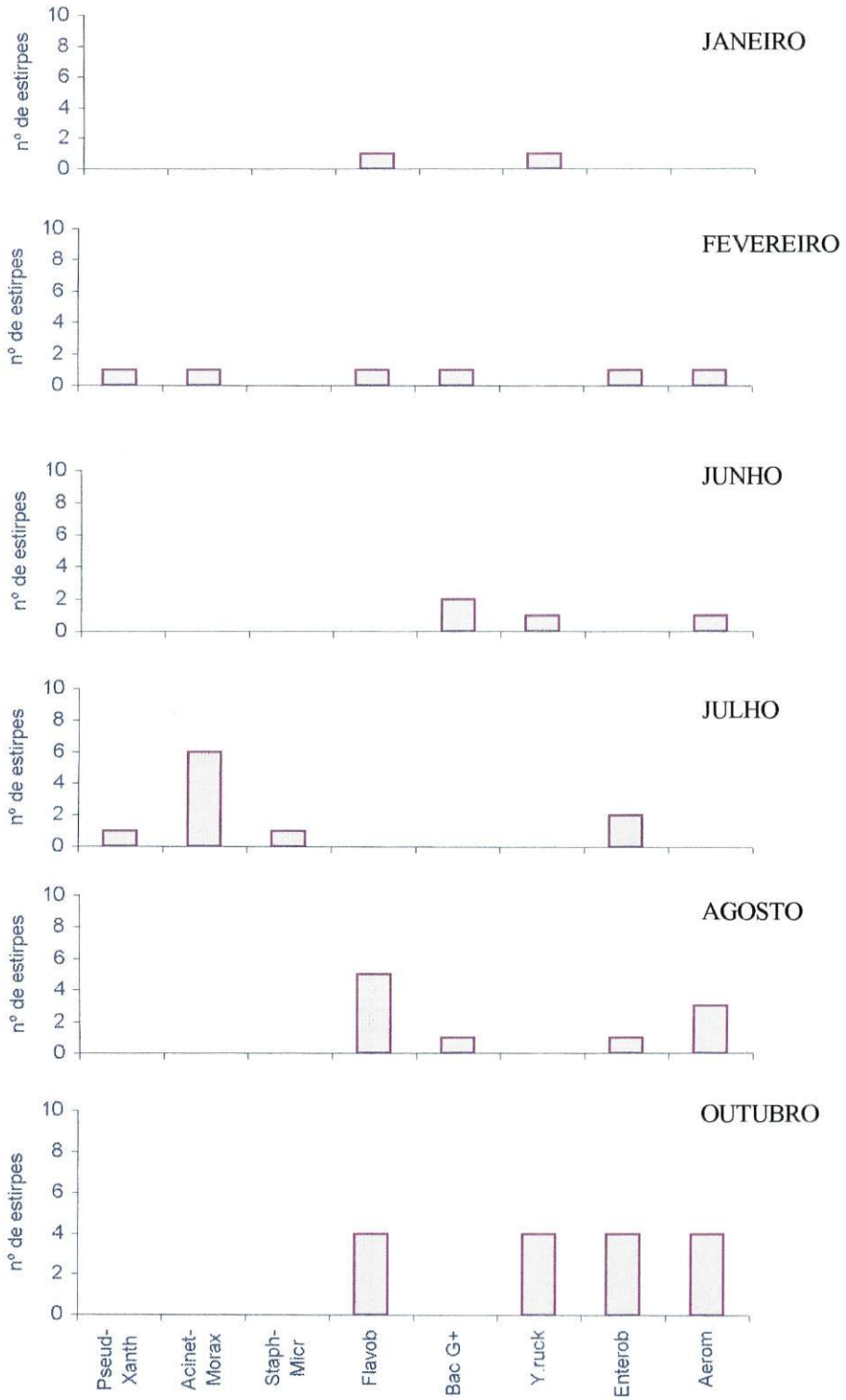


Fig. 3.1.16 - Comparação da diversidade microbiana detectada nos órgãos internos de trutas arco-íris doentes, da truticultura B, ao longo das amostragens mensais efectuadas. Pseud-Xanth: *Pseudomonas-Xanthomonas*; Acinet-Morax: *Acinetobacter-Moraxella*; Staph-Micr: *Staphylococcus-Micrococcus*; Flavob: *Flavobacterium*; Bac G+: Bacilos Gram +; Y.ruck: *Yersinia ruckeri*; Enterob: outras *Enterobacteriaceae*; Aerom: *Aeromonas* móveis.

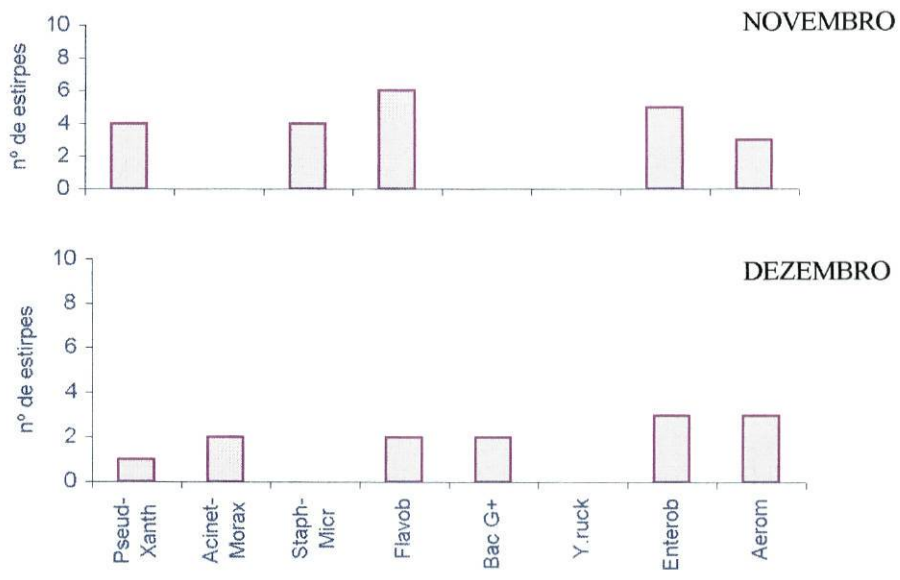


Fig. 3.1.16 - Continuação

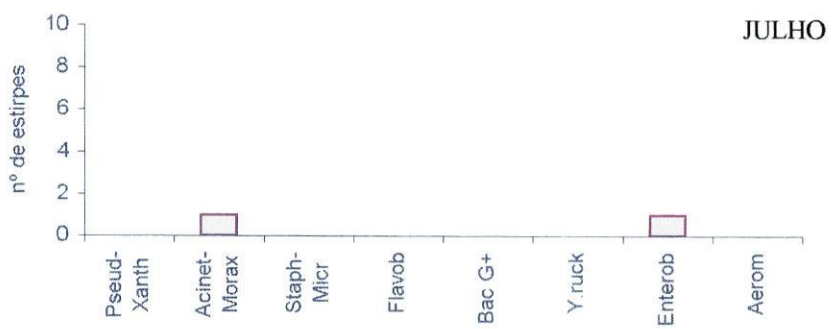


Fig. 3.1.17 - Comparação da diversidade microbiana detectada nos órgãos internos de uma truta arco íris selvagem (aparentemente saudável), capturada na albufeira onde se situa a truticultura B. Pseud-Xanth: *Pseudomonas-Xanthomonas*; Acinet-Morax: *Acinetobacter-Moraxella*; Staph-Micr: *Staphylococcus-Micrococcus*; Flavob: *Flavobacterium*; Bac G+: Bacilos Gram +; Y.ruck: *Yersinia ruckeri*; Enterob: outras *Enterobacteriaceae*; Aerom: *Aeromonas* móveis.

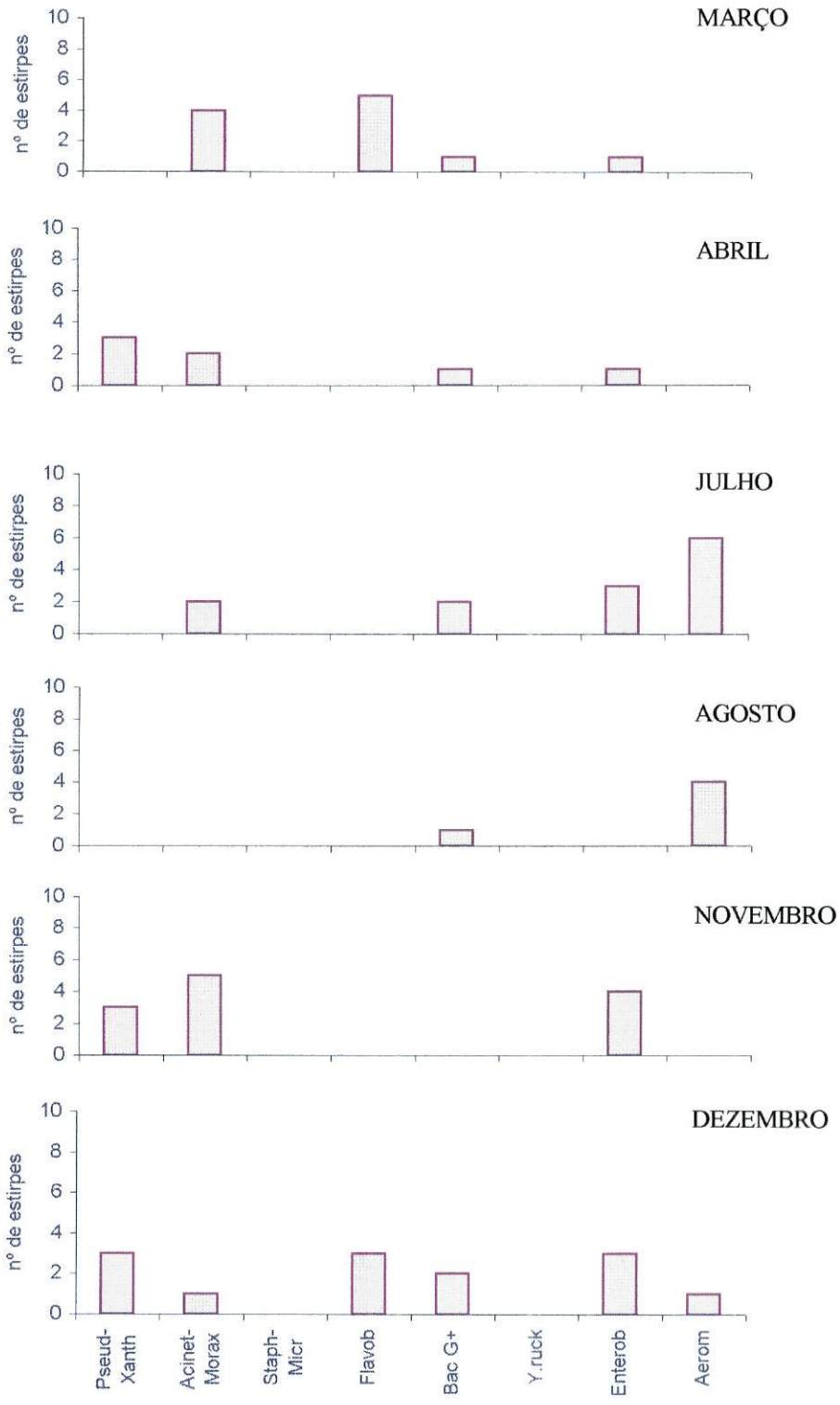


Fig. 3.1.18 - Comparação da diversidade microbiana detectada nos órgãos internos das bogas (todas aparentemente saudáveis), capturadas na albufeira onde se situa a truticultura B, ao longo das amostragens mensais efectuadas. Pseud-Xanth: *Pseudomonas-Xanthomonas*; Acinet-Morax: *Acinetobacter-Moraxella*; Staph-Micr: *Staphylococcus-Micrococcus*; Flavob: *Flavobacterium*; Bac G+: Bacilos Gram +; Y.ruck: *Yersinia ruckeri*; Enterob: outras *Enterobacteriaceae*; Aerom: *Aeromonas* móveis.

3.1.2.2. Água e Sedimento

Na tabela 3.1.6 são apresentados os resultados das contagens sazonais de colónias bacterianas, em meio BHIA, nas amostras de água e de sedimento, recolhidas nas duas truticulturas estudadas.

Na truticultura A, apesar de se ter observado uma relativamente grande variabilidade nos números de bactérias detectadas na água e no sedimento dos vários locais amostrados, verificou-se que, de um modo geral, as amostras de sedimento apresentaram números de bactérias superiores, em 1 logaritmo decimal (cerca de 10 vezes mais), ao das amostras de água.

No entanto, ao contrário do que seria de esperar, os números detectados na água foram, por vezes, superiores aos do sedimento, nomeadamente em Fevereiro, no local do rio situado junto da saída de água da truticultura, bem como na amostragem efectuada em Setembro no tanque 10 da truticultura; em Junho, o número de bactérias detectadas no sedimento deste mesmo tanque foi igual ao detectado na sua água e, ainda, consideravelmente inferior ao obtido para a água dos outros dois tanques da truticultura (tanques 1 e 4).

Igualmente difícil de explicar é o facto de, na amostragem de Setembro, o número de bactérias detectadas no sedimento do rio, junto da entrada de água para a truticultura, ter sido superior, em 1 ou 2 logaritmos decimais, respectivamente, ao do sedimento do tanque da truticultura e do rio, junto à saída desta.

Por outro lado, os resultados obtidos nestas contagens totais de bactérias da água e do sedimento da truticultura A e do rio adjacente a esta apresentaram flutuações, por vezes pronunciadas, sem que, no entanto, tenha sido possível detectar nestas flutuações um padrão claro ou tenha sido possível relacioná-las com variações em qualquer parâmetro ambiental.

Na truticultura B, verificou-se que, quase sempre, os números de bactérias detectadas nas amostras de água eram bastante pequenos, e inferiores em três logaritmos decimais aos encontrados no sedimento. As variações nos números de bactérias encontradas nas amostras de sedimento, e, em particular, os valores baixos observados em Janeiro ($5,7$ e $2,6 \times 10^3$) e em Agosto na jaula 1 ($2,2 \times 10^4$), poderão ser devidos aos diferentes tipos de sedimento amostrado, o qual foi muito mais arenoso nestes casos. Estas diferenças no sedimento amostrado ficaram a dever-se ao deslocamento da jangada flutuante, que se observou sempre que o nível da água da albufeira sofreu uma subida ou descida apreciável.

Tabela 3.1.6 - Resultados das contagens totais de bactérias nas amostragens sazonais de água e sedimento, em meio BHIA[1].

TRUTICULTURA A								
	Entrada[2]		Tanques[3]				Saída[2]	
	Água	Sed	AT1	AT4	AT10	ST10	Água	Sed
Janeiro	2,35	25,4	11,9	--	6	320	22,1	112
Fevereiro	--	34	3,6	4,2	1,4	200	65	18
Março	0,5	31	44	18	30	210	2	70
Abril	3,5	17	3,8	2,5	5	56	3	22
Maio	0,9	5	2,5	2,5	3,5	50	0,7	30
Junho	3,3	19	150	100	70	70	2	16
Julho	2,7	20	3,5	2,9	6,9	14,8	8,7	27
Agosto	13	43	22	21	40	54	30	72
Setembro	15	250	32,5	6,3	31	21	3,5	6
Outubro	5	73	13	16	83,5	565	--	--
Novembro	2,4	46	5,1	6,2	5,6	36	0,85	36,5
Dezembro	0,68	32	20	--	19,7	340	0,8	36

TRUTICULTURA B						
	AJ1[3]	AJ2[3]	AJ3[3]	SJ1[3]	SJ2[3]	SJ3[3]
Janeiro	1,9	--	0,23	5,7	2,6	--
Fevereiro	0,15	1,6	1,6	--	--	--
Março	0,2	0,43	0,45	680	990	800
Abril	0,11	0,35	0,27	--	--	--
Maio	0,21	0,42	0,55	140	120	120
Junho	1	1,24	2,5	420	360	720
Julho	0,6	0,5	1,7	270	--	--
Agosto	3	3,1	1,15	22	1000	1780
Setembro	1,67	0,75	0,76	--	--	--
Outubro	0,35	0,29	0,29	--	--	--
Novembro	0,26	0,29	0,55	--	--	--
Dezembro	--	--	0,6	--	810	960

[1] - Estes resultados estão expressos em Nº x 10^3 bactérias/ml.
[2] - Locais de amostragem situados no rio, junto da entrada e saída da truticultura, respectivamente.
[3] - A, água; S, sedimento; T, tanque; J, jaula flutuante (com o respectivo número).

Comparando os resultados obtidos nas duas truticulturas, é notório que os números de bactérias detectadas na água da truticultura A foram sempre superiores aos detectados na água da truticultura B, o inverso se verificando, geralmente, em relação ao sedimento. Esta situação poderá constituir um reflexo das condições de cultura das trutas nas duas unidades, pois o número muito mais elevado de trutas cultivadas na truticultura B (a uma densidade também muito superior à da truticultura A), que implica o fornecimento de grandes quantidades de alimento, e a própria construção da unidade (situada numa albufeira, pelo que o alimento não pode ser recolhido do fundo, tendo que ser consumido no momento em que é lançado à água pelo piscicultor), são factores que favorecem a deposição de grandes quantidades de matéria orgânica no sedimento; por outro lado, na truticultura B, a desinfecção da água é mais frequente (são usados formol, verde malaquite e cloramina T), mantendo, assim, baixos números de bactérias em suspensão.

A diversidade bacteriana detectada ao longo das amostragens mensais nas amostras de água e de sedimento está ilustrada nas figuras 3.1.19 a 3.1.26 para a truticultura A e locais do rio adjacente a esta, e nas figuras 3.1.27 a 3.1.32 para a truticultura B. Na tabela 3.1.7 é apresentado um resumo dos grupos bacterianos, e respectivas percentagens, encontrados nos diferentes locais de amostragem de cada uma das truticulturas estudadas.

O predomínio do grupo das *Aeromonas* móveis na água dos tanques da truticultura A parece evidente pela observação das figuras 3.1.19, 3.1.20 e 3.1.21. Assim, este grupo foi o mais abundante na água do tanque 1 (Figura 3.1.19) nos meses de Fevereiro, Abril, Maio, Julho, Setembro, Novembro e Dezembro; na água do tanque 4 (Figura 3.1.20) o mesmo se verificou em Maio, Setembro, Outubro e Novembro, enquanto que na água do tanque 10 (Figura 3.1.21) as *Aeromonas* móveis predominaram nos meses de Maio, Setembro, Outubro, Novembro e Dezembro.

Outros grupos bacterianos predominantes na água destes tanques, noutras amostragens, foram *Pseudomonas-Xanthomonas*, *Flavobacterium* e *Staphylococcus-Micrococcus*. Destes grupos, o primeiro foi o mais abundante na amostragem de Junho no tanque 1 (Figura 3.1.19), em Junho e Julho no tanque 4 (Figura 3.1.20), e em Abril, Junho e Julho no tanque 10 (Figura 3.1.21). O predomínio de *Flavobacterium* foi observado em Agosto e Outubro no tanque 1, enquanto que nos tanques 4 e 10 tal se verificou unicamente em Agosto. *Staphylococcus-Micrococcus* foi o grupo mais abundante apenas na amostragem de Abril no tanque 4. No entanto, houve algumas amostragens (Fevereiro e Março, ambas no tanque 10) em que não foi possível identificar a bactéria dominante.

No entanto, pela análise da tabela 3.1.7, podemos verificar que o grupo das *Aeromonas* móveis apenas foi o mais abundante, em termos globais, na água do tanque 10 e que, embora abundante nos outros dois tanques, foi, nestes, ultrapassado em percentagem pelas *Pseudomonas-Xanthomonas*. Estes dois grupos, juntamente com *Flavobacterium*, constituiram sempre, na água dos três tanques, mais de 75% das bactérias detectadas.

Digno de nota é, também, o facto de, em Abril, ter sido detectada *Y. ruckeri* (serótipo O1) na água do tanque 4, embora em pequena percentagem do total (5% do total nesta amostragem; 0,1% do total ao longo das 12 amostragens).

Tabela 3.1.7 - Resumo dos resultados qualitativos e quantitativos da análise bacteriológica de água e sedimento, efectuada ao longo de 1 ano nas truticulturas A e B.

TRUTICULTURA A	LOCAL DE AMOSTRAGEM	GRUPOS BACTERIANOS DETECTADOS (Percentagem)
Tanques	**AT1**	*Pseudomonas-Xanthomonas* (54) *Aeromonas* móveis (25) *Flavobacterium* (15,3) *Enterobacteriaceae* (1,5) *Staphylococcus-Micrococcus* (0,1) *Acinetobacter-Moraxella* (0,1) Outras (não identificadas) (4)
	AT4	*Pseudomonas-Xanthomonas* (47,4) *Aeromonas* móveis (31,5) *Flavobacterium* (8,5) Bacilos Gram + (4,4) *Enterobacteriaceae* (3,5) *Staphylococcus-Micrococcus* (0,6) *Acinetobacter-Moraxella* (0,5) *Yersinia ruckeri* (0,1) Outras (não identificadas) (3,5)
	AT10	*Aeromonas* móveis (39,6) *Pseudomonas-Xanthomonas* (25,6) *Flavobacterium* (12,7) *Enterobacteriaceae* (0,9) Bacilos Gram + (0,2) Outras (não identificadas) (21)
Rio	**ARE**	*Pseudomonas-Xanthomonas* (39,2) *Flavobacterium* (22) *Aeromonas* móveis (20,3) *Enterobacteriaceae* (1,1) *Staphylococcus-Micrococcus* (0,2) Outras (não identificadas) (17,2)
	ARS	*Acinetobacter-Moraxella* (29,7) *Enterobacteriaceae* (24,7) *Flavobacterium* (15,9) *Pseudomonas-Xanthomonas* (10,9) *Aeromonas* móveis (7,1) Bacilos Gram + (3,5) *Yersinia ruckeri* (0,2) *Staphylococcus-Micrococcus* (0,1) Outras (não identificadas) (7,9)

Tabela 3.1.7 - (Continuação).

TRUTICULTURA A	LOCAL DE AMOSTRAGEM	GRUPOS BACTERIANOS DETECTADOS (Percentagem)
Tanques	**ST10**	*Aeromonas* móveis (36) *Enterobacteriaceae* (22,8) *Pseudomonas-Xanthomonas* (14,2) Bacilos Gram + (10,9) *Staphylococcus-Micrococcus* (3,6) *Flavobacterium* (2) Outras (não identificadas) (10,5)
Rio	**SRE**	*Pseudomonas-Xanthomonas* (26,1) *Aeromonas* móveis (25,5) *Enterobacteriaceae* (24,7) *Flavobacterium* (6,6) Bacilos Gram + (2,4) *Acinetobacter-Moraxella* (0,8) *Staphylococcus-Micrococcus* (0,3) Outras (não identificadas) (13,6)
	SRS	*Pseudomonas-Xanthomonas* (39) *Aeromonas* móveis (28) *Flavobacterium* (15,4) Bacilos Gram + (0,6) *Enterobacteriaceae* (0,5) Outras (não identificadas) (16,5)

Tabela 3.1.7 - (Continuação).

TRUTICULTURA **B**	LOCAL DE AMOSTRAGEM	GRUPOS BACTERIANOS DETECTADOS (Percentagem)
Jaulas	**AJ1**	*Aeromonas* móveis (38,7) *Pseudomonas-Xanthomonas* (30,4) *Flavobacterium* (11,7) *Enterobacteriaceae* (9) *Acinetobacter-Moraxella* (4,3) Bacilos Gram + (1,9) Outras (não identificadas) (4)
	AJ2	*Pseudomonas-Xanthomonas* (34,8) *Aeromonas* móveis (25,2) *Enterobacteriaceae* (9,3) *Flavobacterium* (7,9) *Acinetobacter-Moraxella* (7) Bacilos Gram + (5) *Yersinia ruckeri* (2,3) Outras (não identificadas) (8,5)
	AJ3	*Aeromonas* móveis (47,8) *Flavobacterium* (15,2) *Enterobacteriaceae* (8,3) *Acinetobacter-Moraxella* (6,6) *Pseudomonas-Xanthomonas* (4,7) Bacilos Gram + (2,4) *Yersinia ruckeri* (0,5) Outras (não identificadas) (14,5)

Tabela 3.1.7 - (Continuação).

TRUTICULTURA B	LOCAL DE AMOSTRAGEM	GRUPOS BACTERIANOS DETECTADOS (Percentagem)
Jaulas	**SJ1**	*Aeromonas* móveis (30,3) *Yersinia ruckeri* (16) *Enterobacteriaceae* (11,7) *Flavobacterium* (9,1) *Pseudomonas-Xanthomonas* (1,8) *Acinetobacter-Moraxella* (0,9) Bacilos Gram + (0,4) Outras (não identificadas) (29,8)
	SJ2	*Aeromonas* móveis (40,7) *Yersinia ruckeri* (16,7) *Enterobacteriaceae* (15,1) Bacilos Gram + (4,4) *Acinetobacter-Moraxella* (1,5) *Flavobacterium* (0,9) Outras (não identificadas) (20,7)
	SJ3	*Aeromonas* móveis (45,6) *Enterobacteriaceae* (20,6) *Yersinia ruckeri* (16,6) *Acinetobacter-Moraxella* (3,9) Bacilos Gram + (3,5) *Flavobacterium* (3,4) Outras (não identificadas) (6,4)

AT1, AT4, AT10 - Água dos tanques nº 1, nº 4 e nº 10.
ARE, ARS - Água do Rio adjacente à truticultura, recolhida, respectivamente, junto da entrada e da saída desta.
ST10 - Sedimento do tanque nº 10.
SRE, SRS - Sedimento do Rio adjacente à truticultura, recolhida, respectivamente, junto da entrada e da saída desta.
AJ1, AJ2, AJ3 - Água das jaulas nº 1, nº 2 e nº 3
SJ1, SJ2, SJ3 - Sedimento das jaulas nº1, nº 2 e nº 3

Na água do rio foi mais frequente o predomínio de bactérias oxidativas, quer no local de amostragem situado junto da entrada de água para a truticultura (Figura 3.1.23), quer no situado junto da saída desta (Figura 3.1.25). Assim, no primeiro destes locais, observou-se o predomínio do grupo das *Pseudomonas-Xanthomonas* nas amostragens de Maio, Junho, Julho, Setembro e Outubro; inclusivé, em todas estas amostragens, excepto em Setembro, este grupo bacteriano constituiu mais de 70% do total de estirpes isoladas. Outras bactérias predominantes, noutras amostragens, foram: *Flavobacterium*, em Agosto, e *Aeromonas* móveis, em Novembro. Por outro lado, não foi possível identificar a maioria das estirpes isoladas em cada um dos restantes meses (Janeiro, Março, Abril e Dezembro). Junto da saída da truticultura, a água do rio apresentou uma comunidade bacteriana dominada pelo grupo das *Pseudomonas-Xanthomonas* em Janeiro, Maio e Junho; no entanto, neste local, observou-se uma maior variabilidade no grupo bacteriano dominante, sendo este o de *Acinetobacter-Moraxella* em Fevereiro, Bacilos Gram + em Julho, *Flavobacterium* em Agosto, e *Aeromonas* móveis em Abril, Setembro e Outubro. Também aqui houve amostragens em que não foi possível identificar o grupo bacteriano mais abundante (Março e Dezembro).

Considerando os resultados globais obtidos na água destes dois locais do rio (Tabela 3.1.7), verifica-se, no entanto, que os três grupos mais abundantes não são os mesmos. Assim, enquanto que, no local situado junto da entrada de água para a truticultura, estes três grupos dominantes são os mesmos observados nos tanques da truticultura (embora *Flavobacterium* se apresente, neste local do rio, em maior percentagem do que o grupo das *Aeromonas* móveis), no local junto da saída da truticultura observa-se que os dois grupos mais abundantes foram *Acinetobacter-Moraxella* e *Enterobacteriaceae*, aparecendo *Pseudomonas-Xanthomonas* e *Aeromonas* móveis em percentagens consideravelmente menores; apenas *Flavobacterium* se mantém entre os três grupos bacterianos mais abundantes na água deste local do rio.

De notar, ainda, o facto de, em Abril, ter sido detectada, embora em pequena percentagem (7% do total nesta amostragem; 0,2% do total ao longo das 12 amostragens), a presença de *Y. ruckeri* (serótipo O1) na água do rio junto da saída da truticultura, o que não constitui uma surpresa, uma vez que a mesma bactéria foi encontrada também na água do tanque 4, igualmente na amostragem de Abril.

No sedimento do tanque 10 (único tanque de que foi possível recolher sedimento na truticultura A), o grupo das *Aeromonas* móveis voltou a ter uma importância considerável, constituindo o grupo predominante nas amostragens de

Abril, Maio, Setembro, Outubro (juntamente com as *Enterobacteriaceae*) e Novembro (Figura 3.1.22). As *Aeromonas* móveis chegaram, mesmo, a ser o único grupo detectado na amostragem de Maio, enquanto que em Setembro e Novembro constituiram mais de 80% das estirpes bacterianas encontradas. Outros grupos dominantes, noutras amostragens, foram: Bacilos Gram + em Março, *Enterobacteriaceae* em Julho e Outubro (em Outubro, juntamente com as *Aeromonas* móveis), *Flavobacterium* em Agosto e *Pseudomonas-Xanthomonas* em Dezembro. Em Junho não foi possível identificar o grupo bacteriano mais abundante.

O predomínio das *Aeromonas* móveis no sedimento do tanque 10 é confirmado pela observação da tabela 3.1.7. Curiosamente, as *Enterobacteriaceae* apresentam-se, aqui, como o segundo grupo mais abundante, sendo o terceiro o das *Pseudomonas-Xanthomonas*, enquanto que *Flavobacterium* constituiu apenas 2% do total de bactérias no sedimento deste tanque.

Embora não tenha sido detectada *Y. ruckeri* no meio BHIA, observou-se a presença desta bactéria no sedimento do tanque 10 na amostragem de Setembro; esta presença foi detectada, em percentagem muito baixa (0,7%), no meio SW.

Relativamente à diversidade bacteriana encontrada no sedimento dos dois locais do rio amostrados, verificou-se um predomínio do grupo das *Pseudomonas-Xanthomonas*. Este grupo foi o mais abundante junto à entrada da truticultura (Figura 3.1.24) nas amostragens de Fevereiro, Março, Junho, Outubro e Novembro. Os grupos dominantes nas restantes amostragens de sedimento deste local do rio foram: Bacilos Gram + em Janeiro (juntamente com *Enterobacteriaceae*) e Dezembro; *Enterobacteriaceae* em Janeiro (juntamente com Bacilos Gram +) e Setembro; *Aeromonas* móveis em Maio, Julho e Agosto. Em Abril, não foi possível identificar o grupo dominante. No sedimento do rio junto da saída da truticultura (Figura 3.1.26), as *Pseudomonas-Xanthomonas* constituiram o grupo dominante em Janeiro, Março, Abril, Julho e Dezembro; outros grupos predominantes, noutras amostragens de sedimento deste local, foram: *Aeromonas* móveis em Maio, Junho, Setembro e Novembro; *Flavobacterium* em Agosto. Em Fevereiro não foi possível identificar o grupo mais abundante.

Em termos globais (Tabela 3.1.7), curiosamente, os dois grupos mais abundantes no sedimento dos dois locais do rio foram *Pseudomonas-Xanthomonas* e *Aeromonas* móveis. Recorde-se, porém, que, na água do local junto à saída da truticultura, nenhum destes grupos estava entre os três mais abundantes; também no local situado junto à entrada da unidade se observou uma diferença evidente nas proporções de *Flavobacterium* e de *Enterobacteriaceae* detectadas na água e no

sedimento, sendo o grupo de bactérias oxidativas muito mais abundante na água, enquanto que as Enterobactérias o eram no sedimento.

É interessante realçar o facto de que o grupo que mais vezes foi encontrado como predominante na água e no sedimento dos tanques da truticultura A foi o das *Aeromonas* móveis, enquanto que nos dois locais do rio foi mais frequente o domínio do grupo *Pseudomonas-Xanthomonas*, igualmente quer na água quer no sedimento. Por outro lado, houve também uma maior variabilidade no grupo predominante ao longo das amostragens efectuadas nestes dois locais do rio, comparativamente ao que ocorreu nos tanques da truticultura. Isto dever-se-á, muito provavelmente, à maior quantidade de matéria orgânica presente nos tanques da truticultura, devido a excessos de alimento, não utilizado, neles acumulados. Curiosamente, no entanto, a família *Enterobacteriaceae*, normalmente representada em números apreciáveis nos locais ricos em matéria orgânica, apenas esporadicamente constituiu o grupo dominante e, inclusivé, foi muito mais abundante no rio do que nos tanques da truticultura.

De realçar, ainda, o facto de a comunidade bacteriana do local do rio situado junto à saída da truticultura sofrer, provavelmente, a influência da comunidade microbiana detectada nesta, o que é evidenciado, especialmente, pelo isolamento de *Y. ruckeri* da sua água e da água de um dos tanques desta unidade (ver secção 3.1.3).

A observação das figuras 3.1.27 e 3.1.28 permite verificar que, na água das jaulas 1 e 2 da truticultura B, não houve um predomínio claro de qualquer grupo bacteriano ao longo das diferentes amostragens mensais realizadas. De facto, o grupo mais abundante em cada amostragem foi muito variável: *Pseudomonas-Xanthomonas* predominou em Janeiro, Abril e Outubro, na jaula 1, e em Abril e Agosto, na jaula 2; o predomínio de *Aeromonas* móveis ocorreu em Junho, Agosto e Setembro, na jaula 1, e Junho e Setembro, na jaula 2; *Flavobacterium* foi o grupo mais abundante em Maio, em ambas as jaulas; as *Enterobacteriaceae* predominaram em Julho, na jaula 1, e em Fevereiro e Julho, na jaula 2 (em Fevereiro e Março, na jaula 1, verificou-se, também, que as bactérias pertencentes a esta família predominaram juntamente com os bacilos Gram +); em Outubro, na jaula 2, predominaram os bacilos Gram + (sendo, como foi referido anteriormente, predominantes também em Fevereiro e Março, na jaula 1, embora juntamente com as *Enterobacteriaceae*); finalmente, na amostragem de Novembro, em ambas as jaulas, o grupo mais abundante foi *Acinetobacter-Moraxella*.

Na água da jaula 2 foi detectada, também, *Y. ruckeri*, na amostragem de Março, na qual foi, inclusivé, predominante (53% do total de bactérias isoladas).

Na água da jaula 3, as *Aeromonas* móveis constituiram o grupo bacteriano mais abundante em 6 das 12 amostragens mensais efectuadas (Janeiro, Fevereiro, Junho, Julho, Agosto e Setembro), enquanto que *Flavobacterium* predominou em Maio e Outubro. Outros grupos predominantes noutras amostragens foram *Pseudomonas-Xanthomonas* (Abril) e *Acinetobacter-Moraxella* (Novembro). Em Março e Dezembro não foi possível identificar o grupo dominante.

Também nesta jaula, e igualmente na amostragem de Março, foi detectada *Y. ruckeri*, embora em pequena percentagem do total (7%).

Em termos globais (Tabela 3.1.7), verificou-se um largo predomínio de *Aeromonas* móveis (o grupo mais abundante nas jaulas 1 e 3, e o segundo mais abundante na jaula 2), seguido das *Pseudomonas-Xanthomonas*, que predominaram na jaula 2 e constituiram o segundo grupo mais abundante na jaula 1 (curiosamente, na jaula 3, este grupo esteve representado numa percentagem muito pequena, aparecendo apenas como o quinto grupo em abundância).

Especialmente digno de nota é o facto de os grupos das *Aeromonas* móveis e das *Pseudomonas-Xanthomonas* constituirem 60-70% do total nas jaulas 1 e 2 e as *Aeromonas* móveis representarem, por si só, cerca de 50% do total na jaula 3, na qual o segundo grupo mais abundante, *Flavobacterium*, mal ultrapassa 15%. Por outro lado, *Y. ruckeri* representou cerca de 2% do total de bactérias detectadas na jaula 2, e cerca de 0,5% na jaula 3 (não tendo, no entanto, sido isolada da jaula 1).

Relativamente ao sedimento situado sob as jaulas da truticultura B (Figuras 3.1.30, 3.1.31 e 3.1.32, e Tabela 3.1.7), o facto mais evidente é o predomínio quase absoluto de bactérias fermentativas: *Enterobacteriaceae* em Janeiro e Maio (jaula 1), Janeiro, Maio e Dezembro (jaula 2) e Maio e Dezembro (jaula 3); *Aeromonas* móveis, em Junho, e Julho (jaula 1) e Junho e Agosto (jaulas 2 e 3). Por outro lado, não foi possível identificar a bactéria predominante na amostragem de Março, no sedimento sob a jaula 1. Em Agosto, neste mesmo local, os resultados obtidos indicam um predomínio de bactérias oxidativas (*Acinetobacter-Moraxella* e *Flavobacterium*), o que é difícil de explicar, tendo em conta a grande profundidade (38 metros) da qual foi retirado este sedimento.

A análise da tabela 3.1.7 confirma este predomínio muito acentuado de bactérias fermentativas, uma vez que os grupos mais abundantes (*Aeromonas* móveis, *Y. ruckeri* e *Enterobacteriaceae*) sob as três jaulas, em conjunto, constituem entre 58% (jaula 1) e 82,8% (jaula 3) do total de bactérias detectadas. Estes valores percentuais elevados devem-se, sobretudo, ao grupo das *Aeromonas* móveis, o qual se apresenta

sempre em percentagens próximas do dobro das observadas para o segundo grupo mais abundante. Por outro lado, é interessante constatar que *Y. ruckeri* constituiu o segundo grupo mais abundante no sedimento sob as jaulas 1 e 2, e o terceiro sob a jaula 3; curiosamente, a percentagem em que esta espécie bacteriana foi detectada foi sempre bastante próxima de 16% do total.

Os valores dos parâmetros físico-químicos encontrados, embora apresentando alguma variação ao longo do período de estudo (Tabela 3.1.4), situam-se dentro de limites que podem ser considerados como "normais" (Nisbet & Verneaux, 1970), pelo que, provavelmente, não exerceram uma grande influência sobre a composição, quer qualitativa, quer quantitativa, da comunidade microbiana dos locais amostrados.

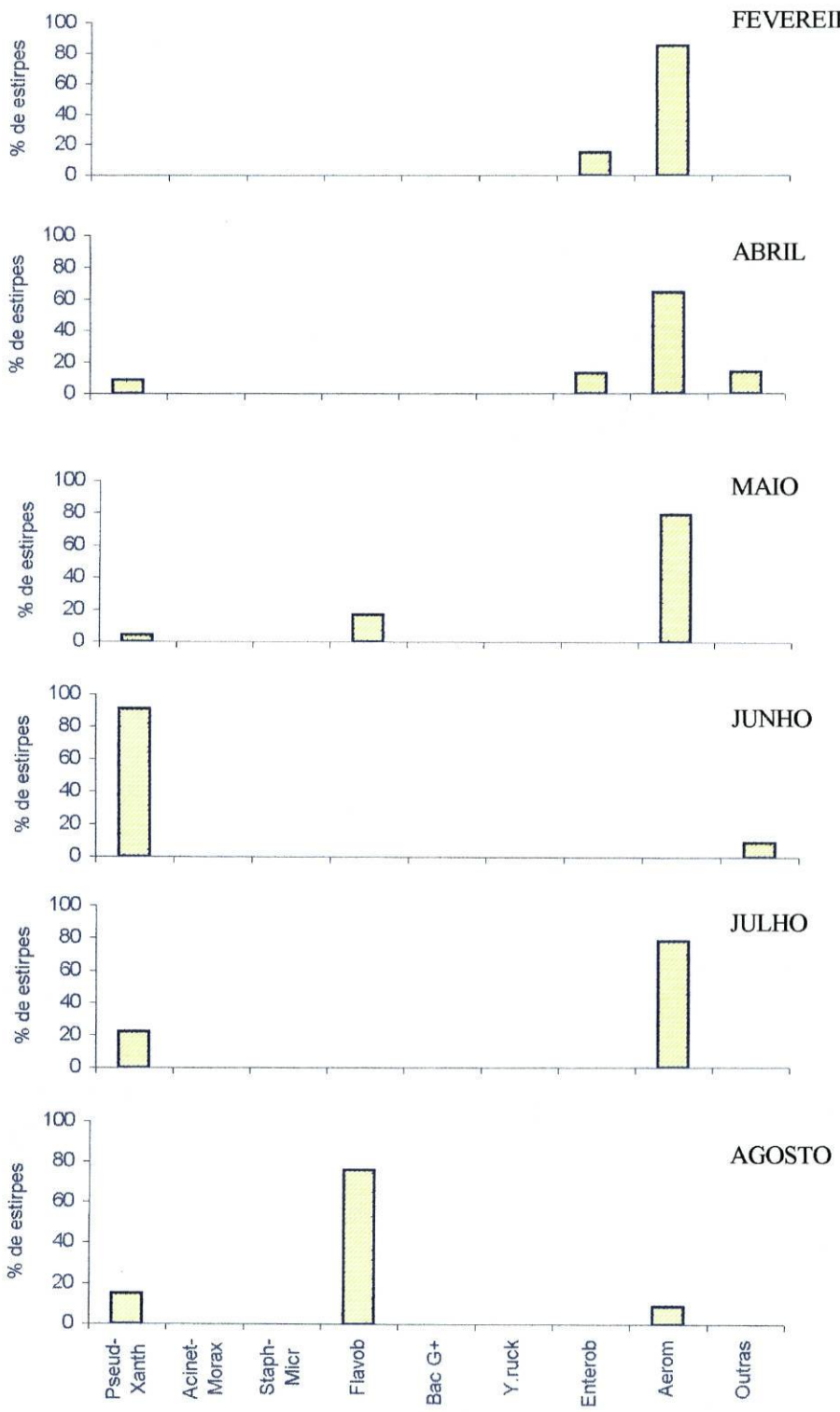


Fig. 3.1.19 - Comparação da diversidade microbiana detectada na água do Tanque 1 da Truticultura A, ao longo das amostragens mensais efectuadas. Pseud-Xanth: *Pseudomonas-Xanthomonas*; Acinet-Morax: *Acinetobacter-Moraxella*; Staph-Micr: *Staphylococcus-Micrococcus*; Flavob: *Flavobacterium*; Bac G+: Bacilos Gram +; Y.ruck: *Yersinia ruckeri*; Enterob: outras *Enterobacteriaceae*; Aerom: *Aeromonas* móveis; Outras: estirpes não identificadas.

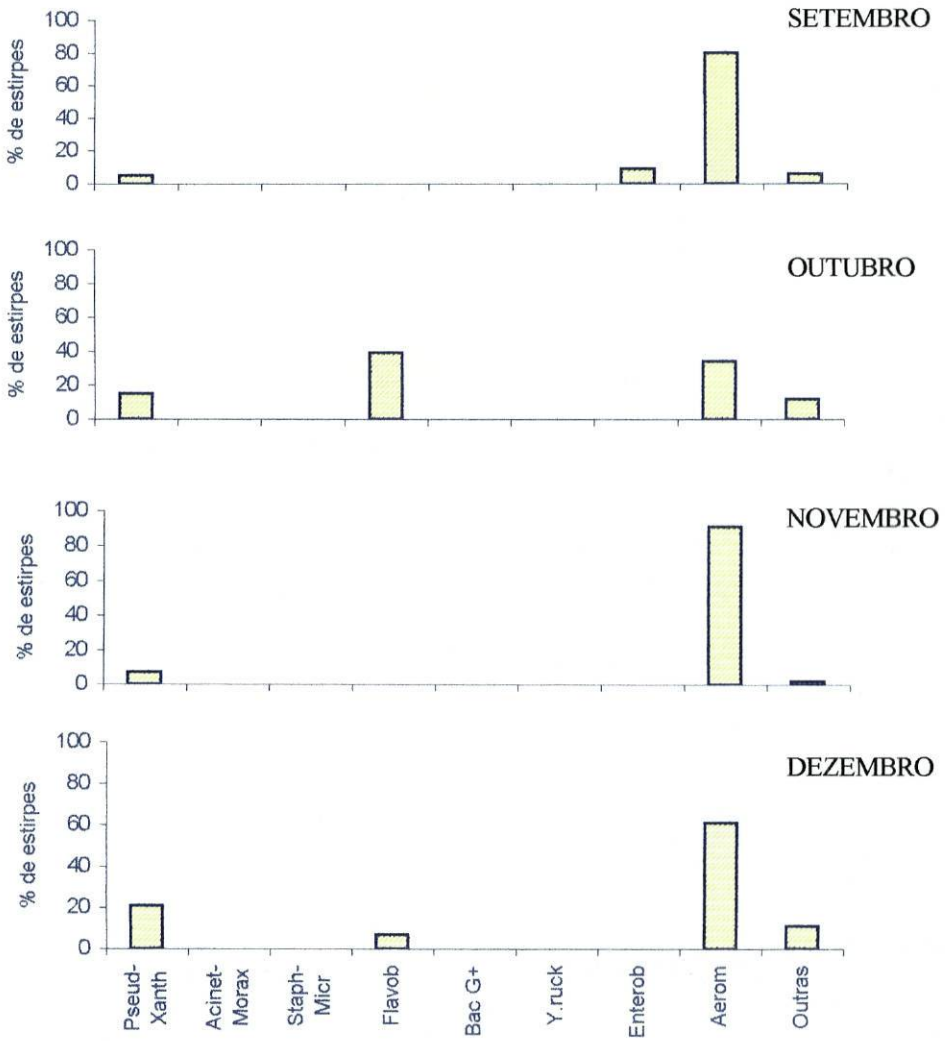


Fig. 3.1.19 - Continuação

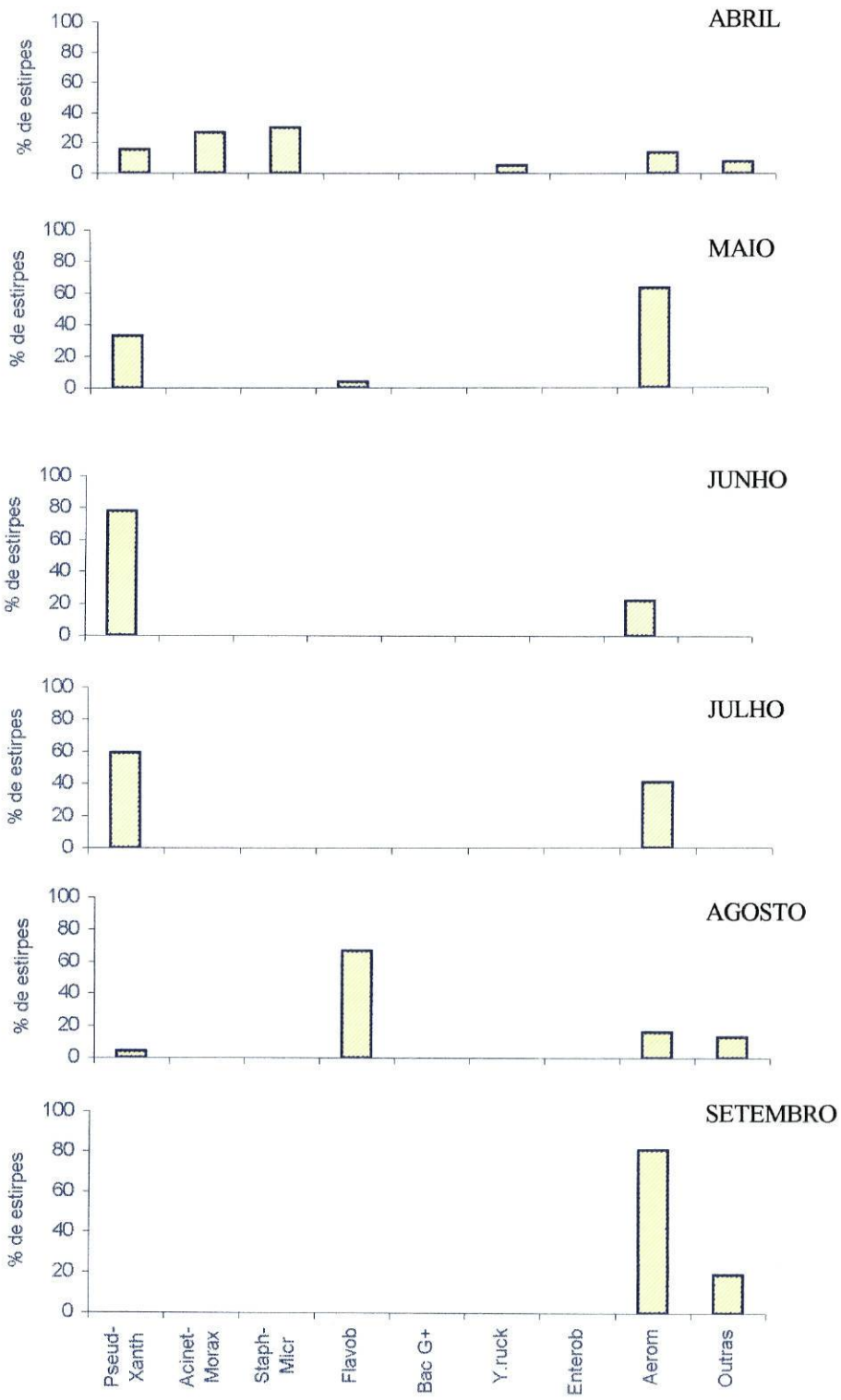


Fig. 3.1.20 - Comparação da diversidade microbiana detectada na água do Tanque 4 da Truticultura A, ao longo das amostragens mensais efectuadas. Pseud-Xanth: *Pseudomonas-Xanthomonas*; Acinet-Morax: *Acinetobacter-Moraxella*; Staph-Micr: *Staphylococcus-Micrococcus*; Flavob: *Flavobacterium*; Bac G+: Bacilos Gram +; Y.ruck: *Yersinia ruckeri*; Enterob: outras *Enterobacteriaceae*; Aerom: *Aeromonas* móveis; Outras: estirpes não identificadas.

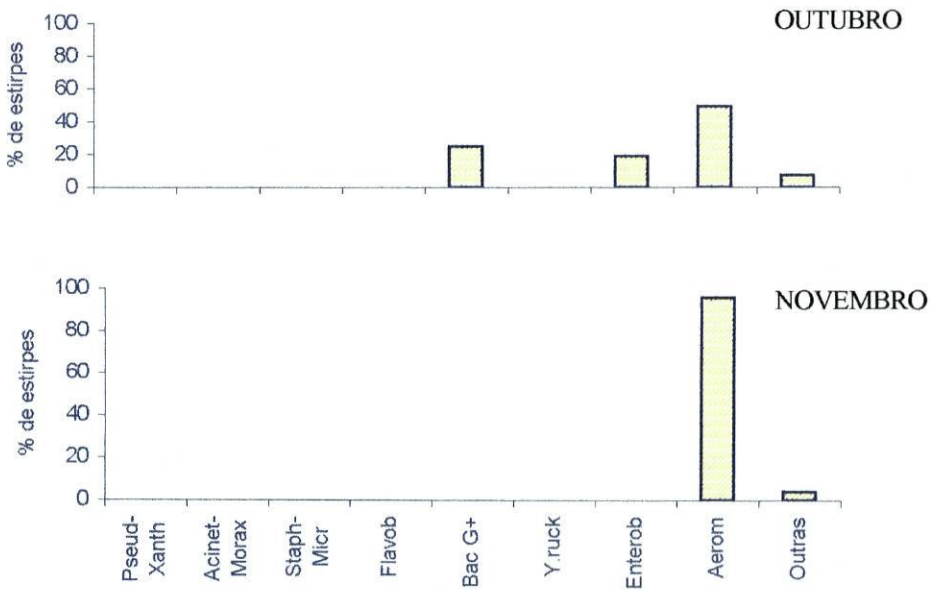


Fig. 3.1.20 - Continuação

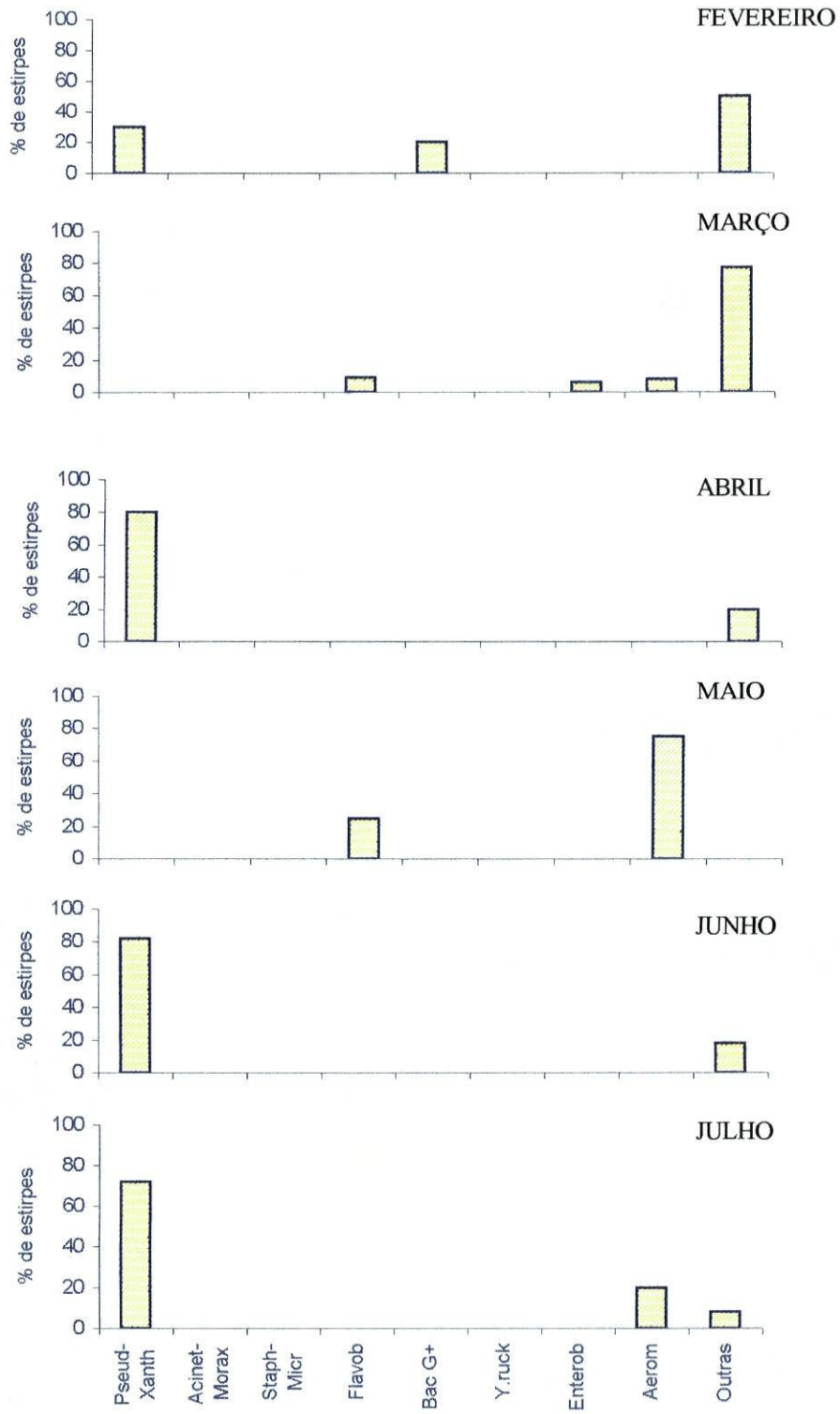


Fig. 3.1.21 - Comparação da diversidade microbiana detectada na água do Tanque 10 da Truticultura A, ao longo das amostragens mensais efectuadas. Pseud-Xanth: *Pseudomonas-Xanthomonas*; Acinet-Morax: *Acinetobacter-Moraxella*; Staph-Micr: *Staphylococcus-Micrococcus*; Flavob: *Flavobacterium*; Bac G+: Bacilos Gram +; Y.ruck: *Yersinia ruckeri*; Enterob: outras *Enterobacteriaceae*; Aerom: *Aeromonas* móveis; Outras: estirpes não identificadas.

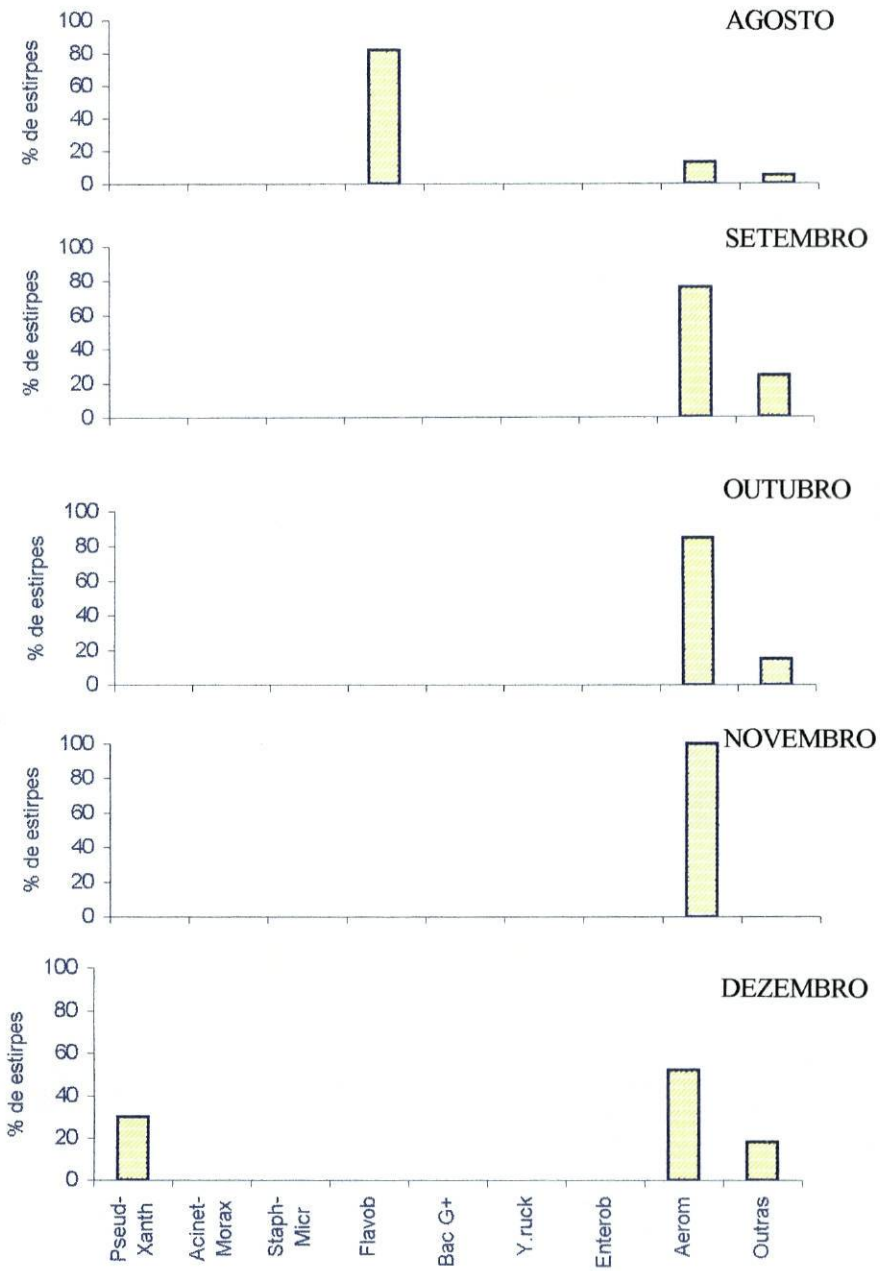


Fig. 3.1.21 - Continuação

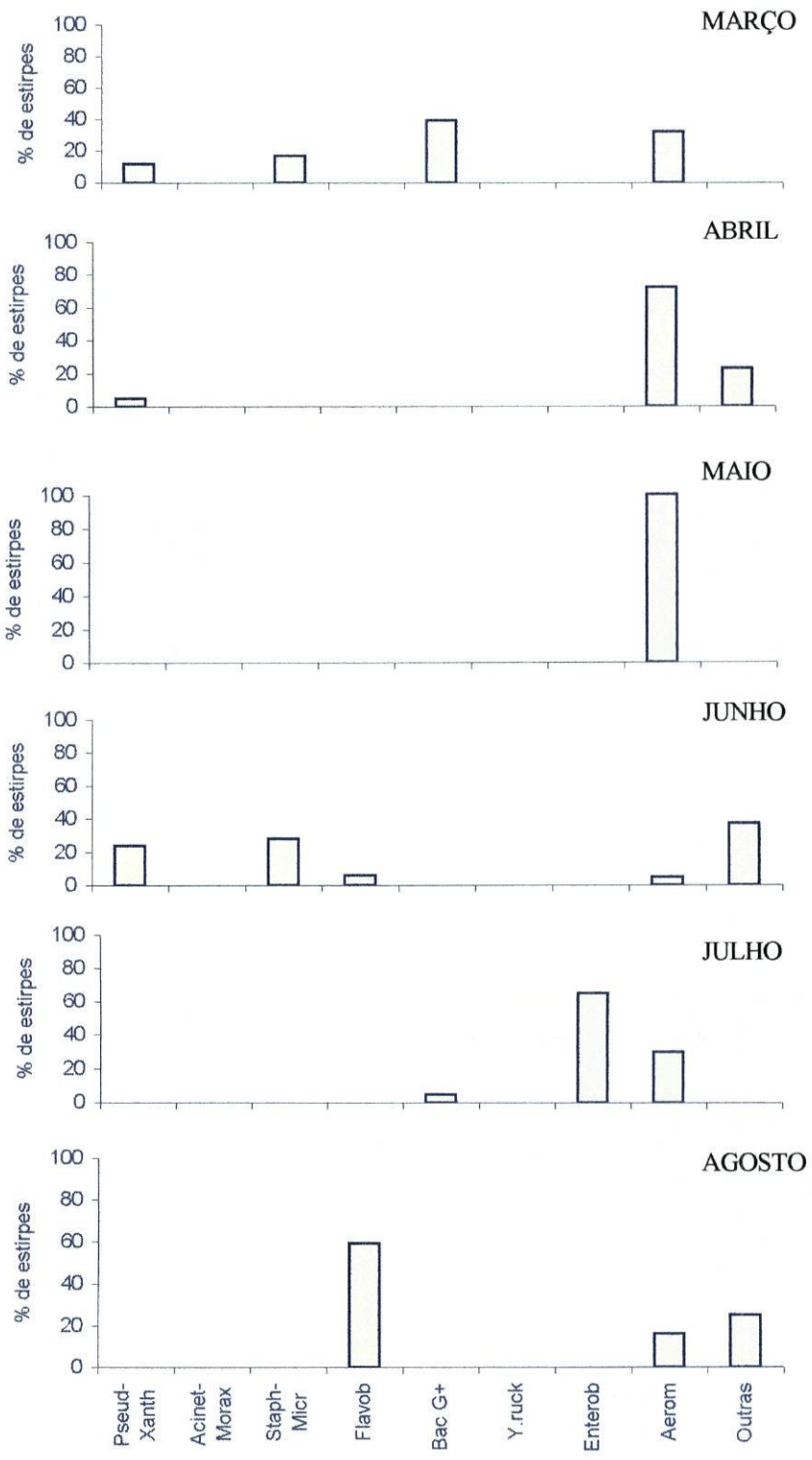


Fig. 3.1.22 - Comparação da diversidade microbiana detectada no sedimento do Tanque 10 da Truticultura A, ao longo das amostragens mensais efectuadas. Pseud-Xanth: *Pseudomonas-Xanthomonas*; Acinet-Morax: *Acinetobacter-Moraxella*; Staph-Micr: *Staphylococcus-Micrococcus*; Flavob: *Flavobacterium*; Bac G+: Bacilos Gram +; Y.ruck: *Yersinia ruckeri*; Enterob: outras *Enterobacteriaceae*; Aerom: *Aeromonas* móveis; Outras: estirpes não identificadas.

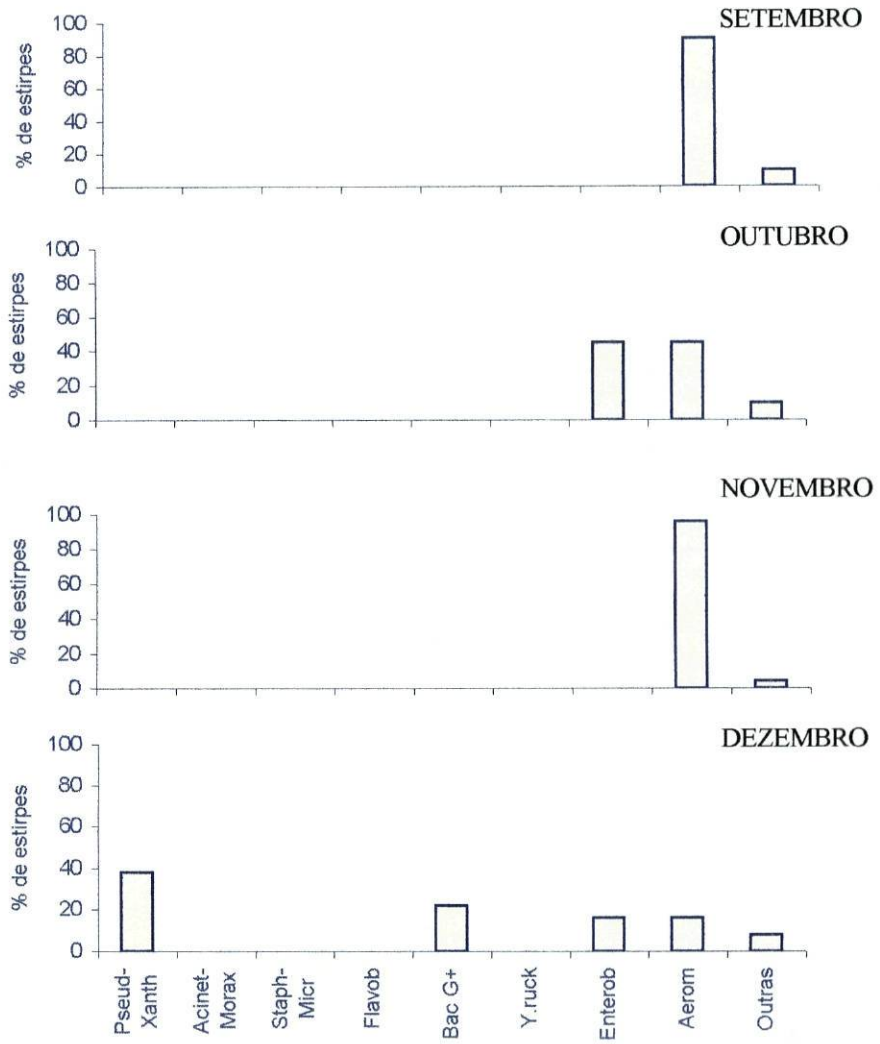


Fig. 3.1.22 - Continuação

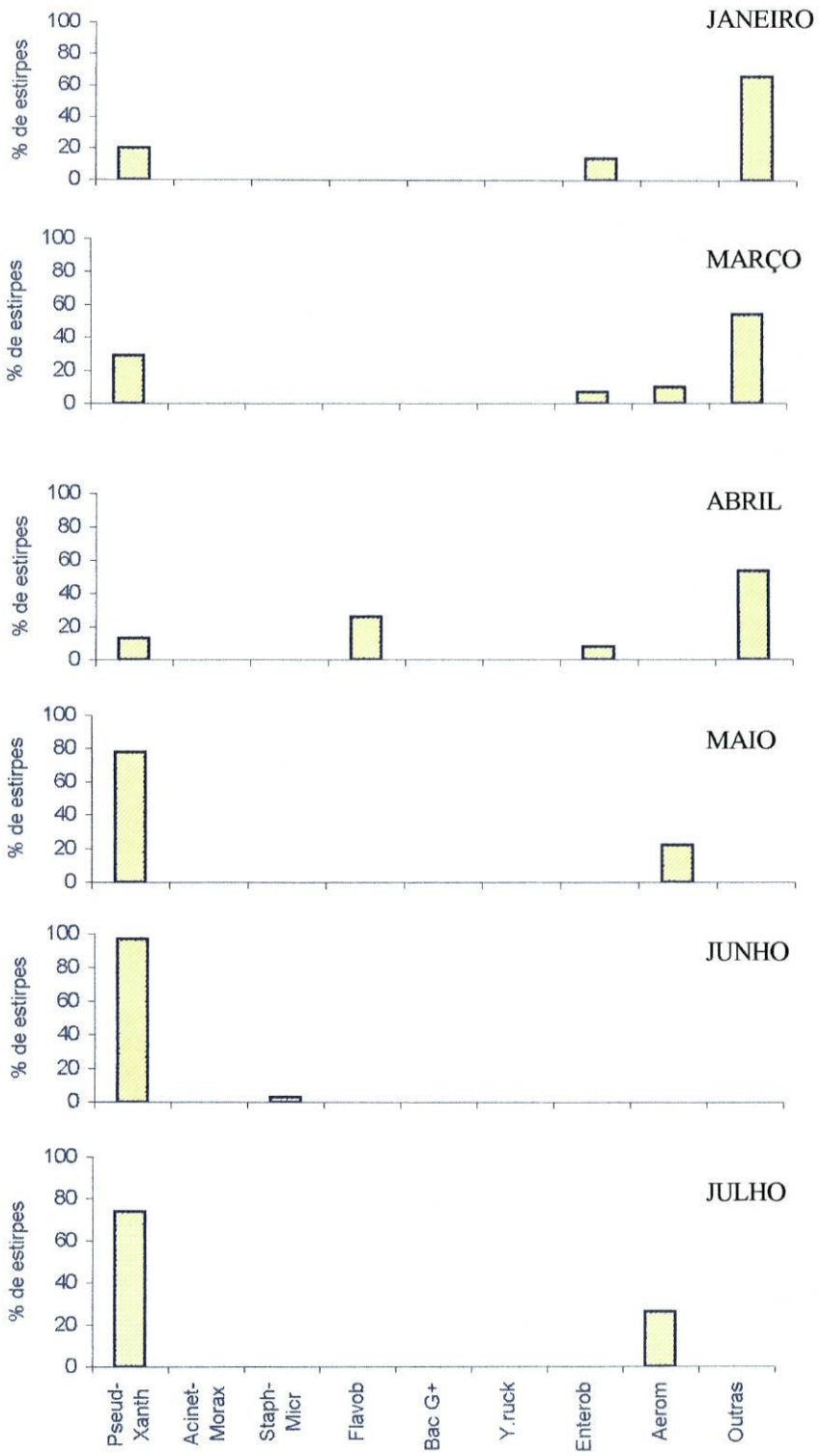


Fig. 3.1.23 - Comparação da diversidade microbiana detectada na água do rio, junto da entrada de água para a Truticultura A, ao longo das amostragens mensais efectuadas. Pseud-Xanth: *Pseudomonas-Xanthomonas*; Acinet-Morax: *Acinetobacter-Moraxella*; Staph-Micr: *Staphylococcus-Micrococcus*; Flavob: *Flavobacterium*; Bac G+: Bacilos Gram +; Y.ruck: *Yersinia ruckeri*; Enterob: outras *Enterobacteriaceae*; Aerom: *Aeromonas* móveis; Outras: estirpes não identificadas.

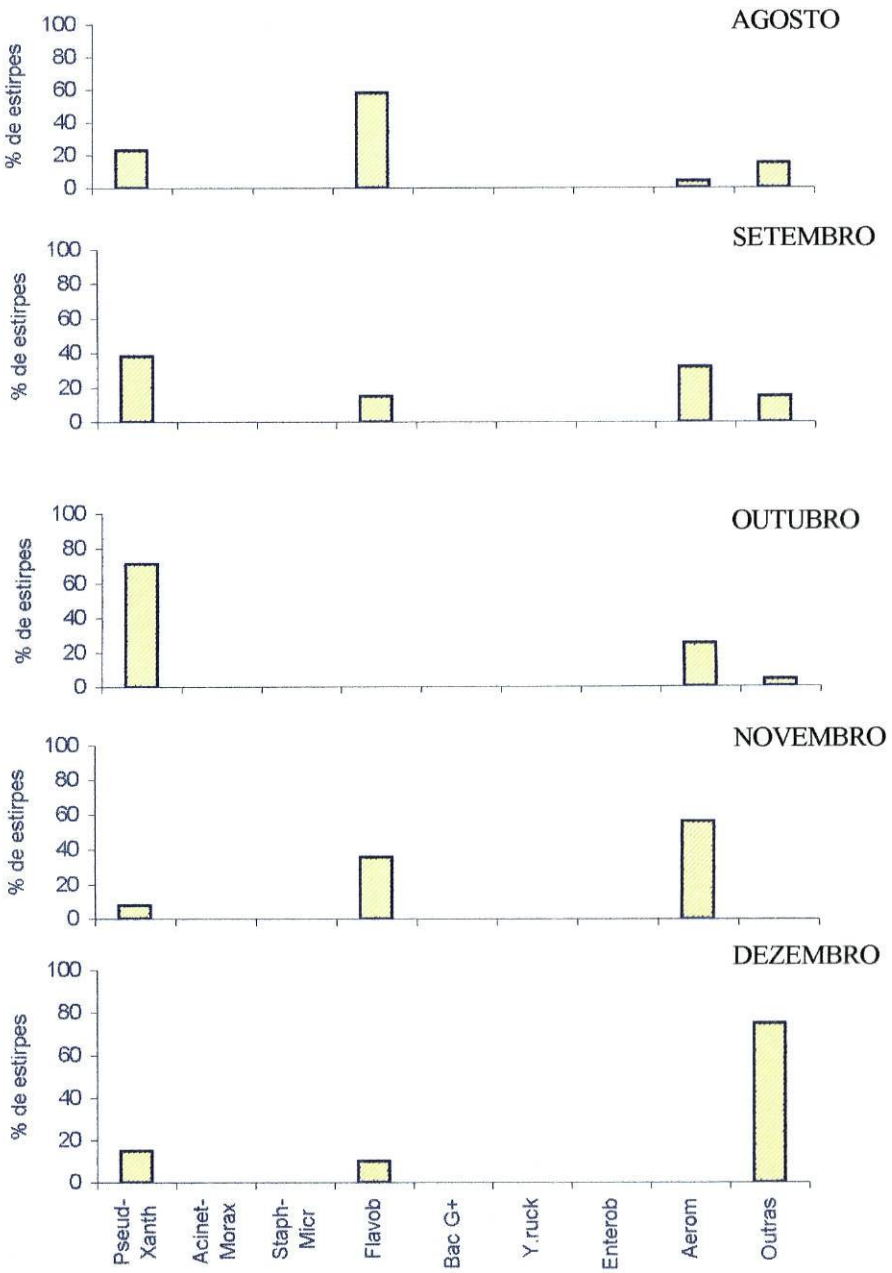


Fig. 3.1.23 - Continuação

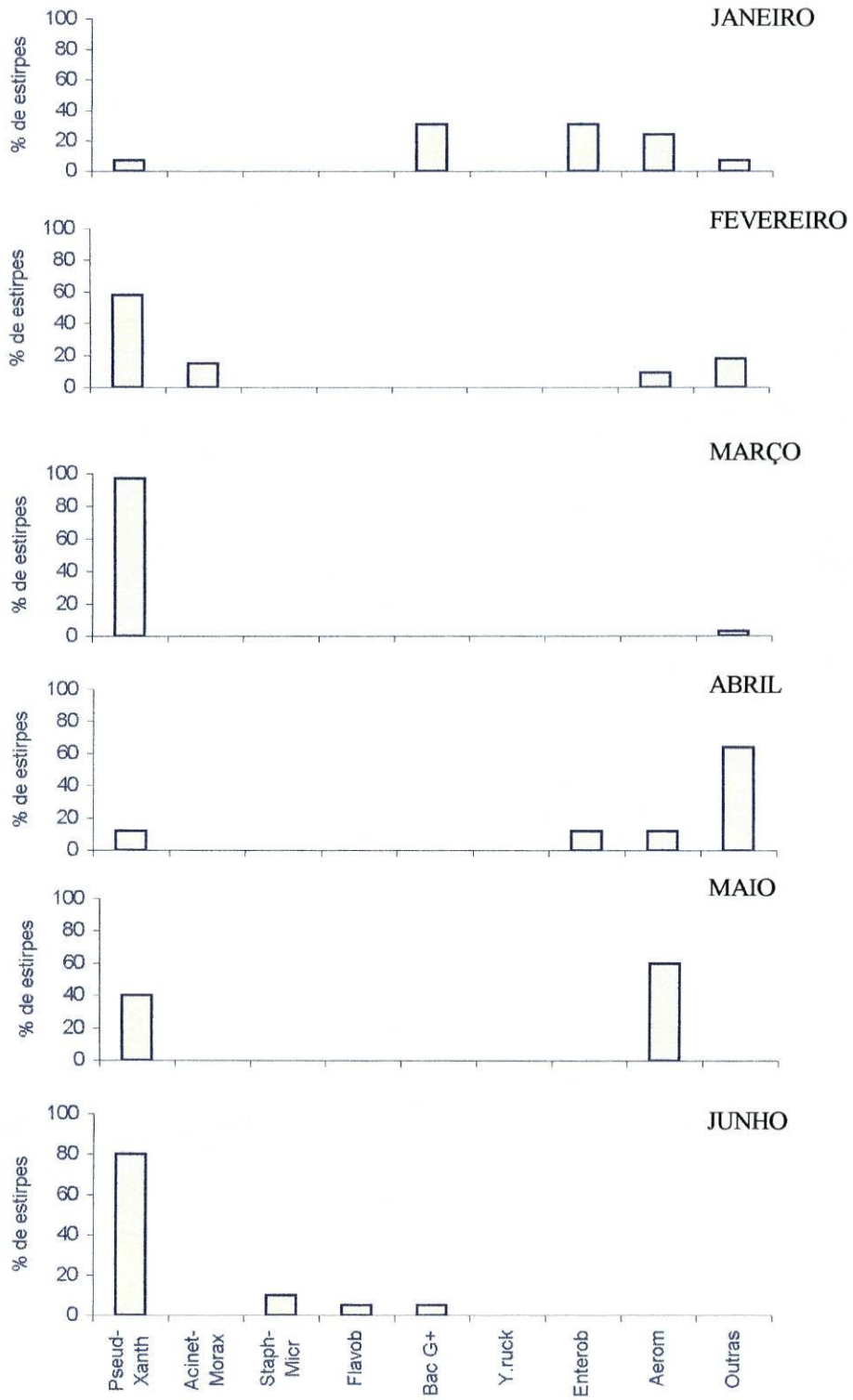


Fig. 3.1.24 - Comparação da diversidade microbiana detectada no sedimento do rio, junto da entrada de água para a Truticultura A, ao longo das amostragens mensais efectuadas. Pseud-Xanth: *Pseudomonas-Xanthomonas*; Acinet-Morax: *Acinetobacter-Moraxella*; Staph-Micr: *Staphylococcus-Micrococcus*; Flavob: *Flavobacterium*; Bac G+: Bacilos Gram +; Y.ruck: *Yersinia ruckeri*; Enterob: outras *Enterobacteriaceae*; Aerom: *Aeromonas* móveis; Outras: estirpes não identificadas.

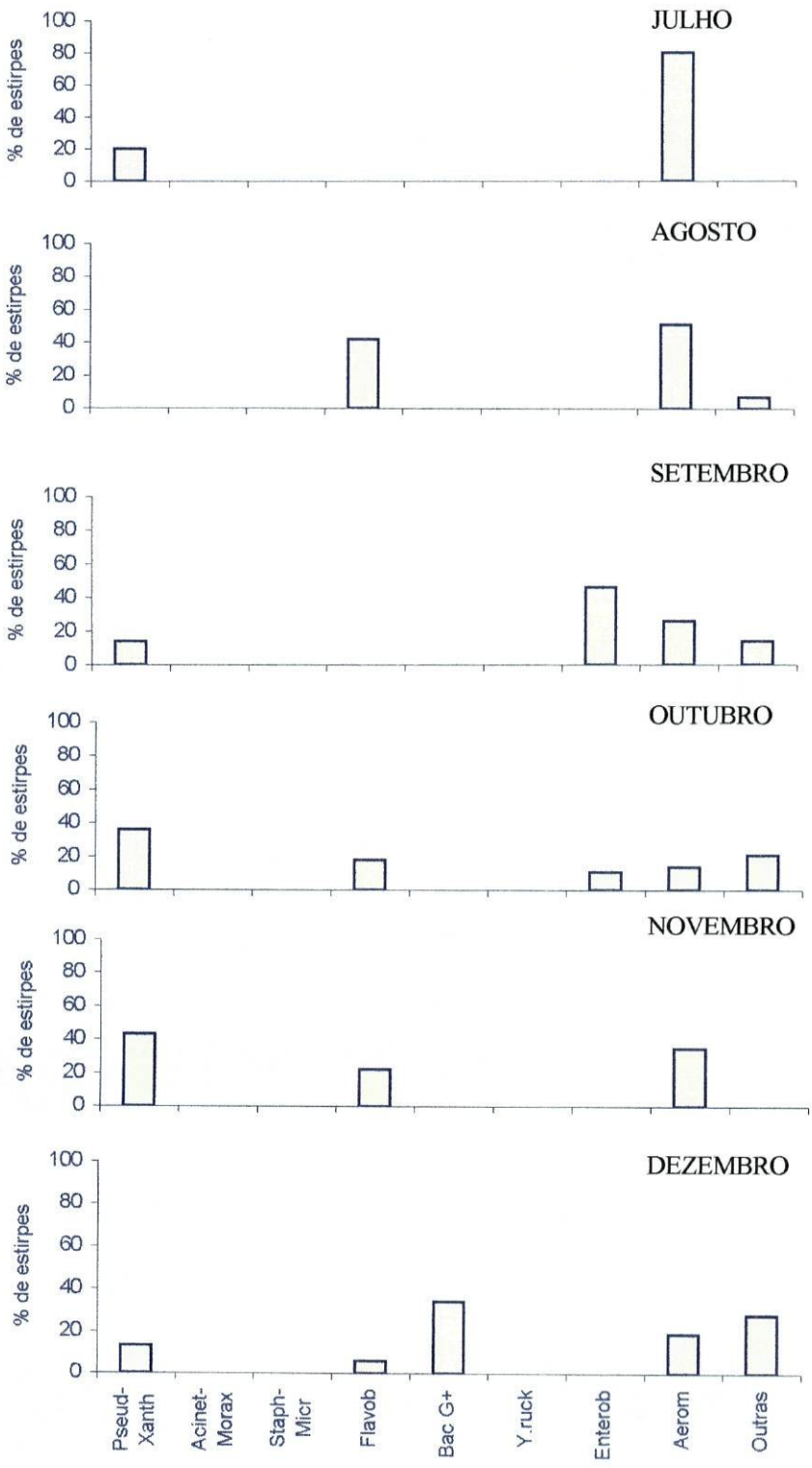


Fig. 3.1.24 - Continuação

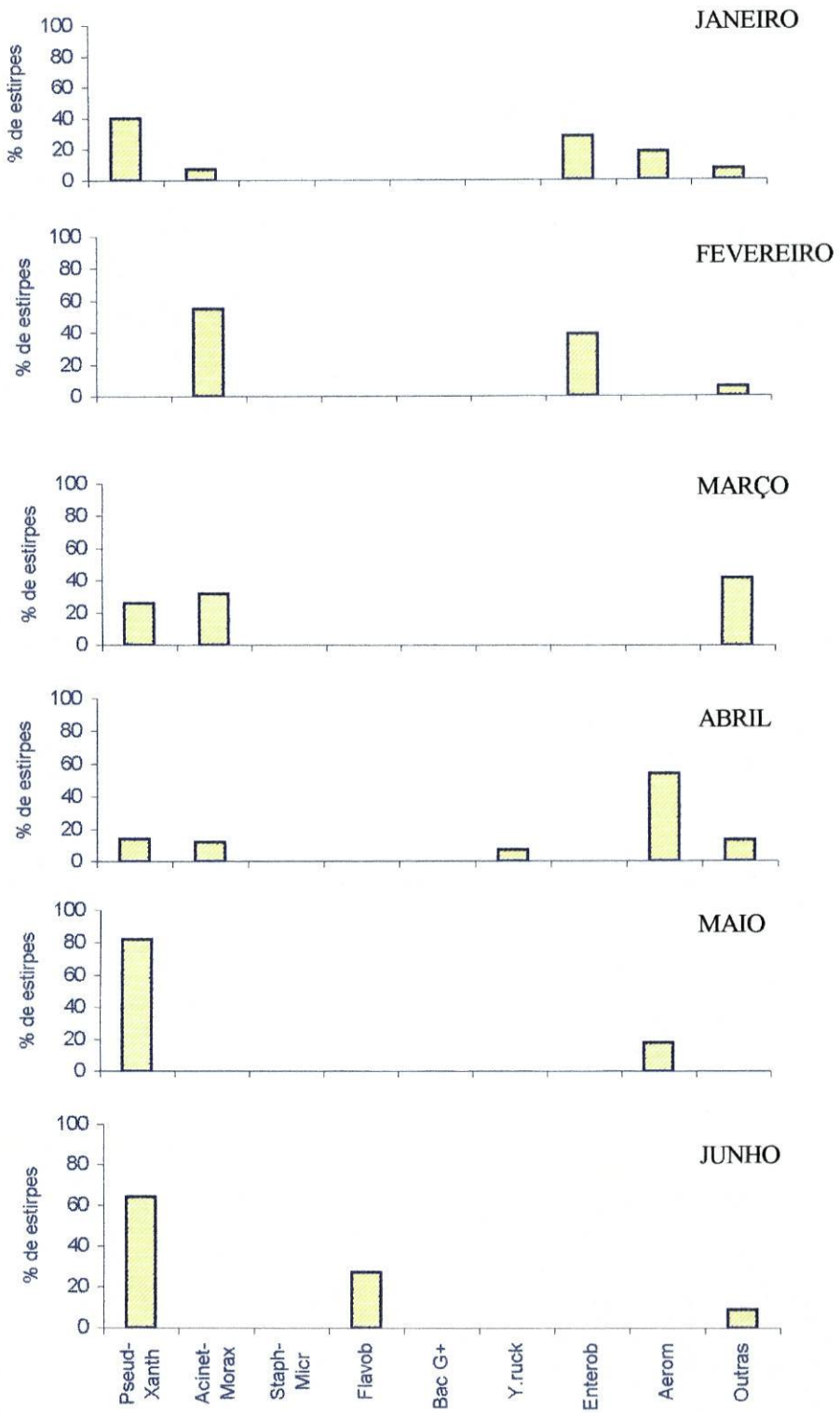


Fig. 3.1.25 - Comparação da diversidade microbiana detectada na água do rio, junto da saída de água da Truticultura A, ao longo das amostragens mensais efectuadas. Pseud-Xanth: *Pseudomonas-Xanthomonas*; Acinet-Morax: *Acinetobacter-Moraxella*; Staph-Micr: *Staphylococcus-Micrococcus*; Flavob: *Flavobacterium*; Bac G+: Bacilos Gram +; Y.ruck: *Yersinia ruckeri*; Enterob: outras *Enterobacteriaceae*; Aerom: *Aeromonas* móveis; Outras: estirpes não identificadas.

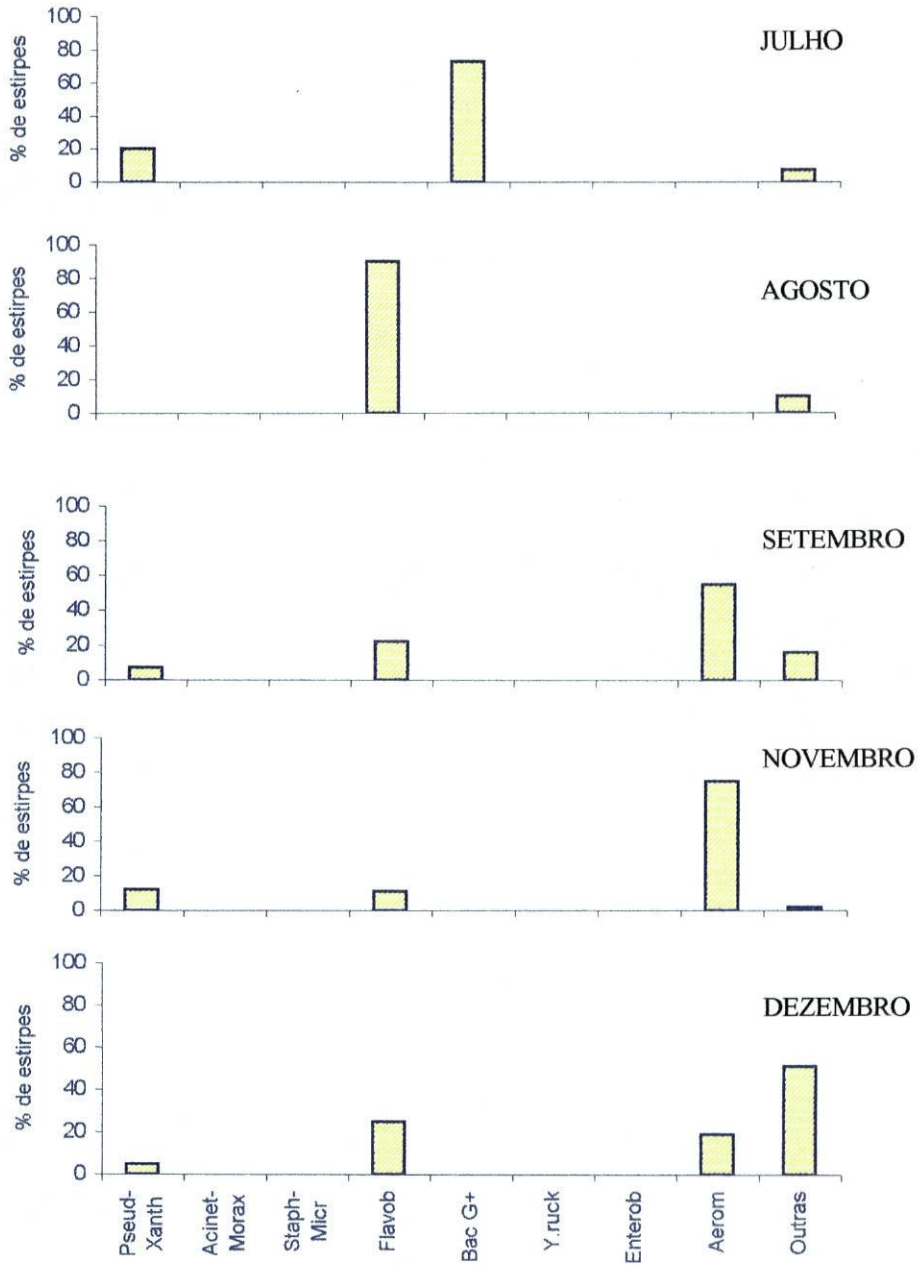


Fig. 3.1.25 - Continuação

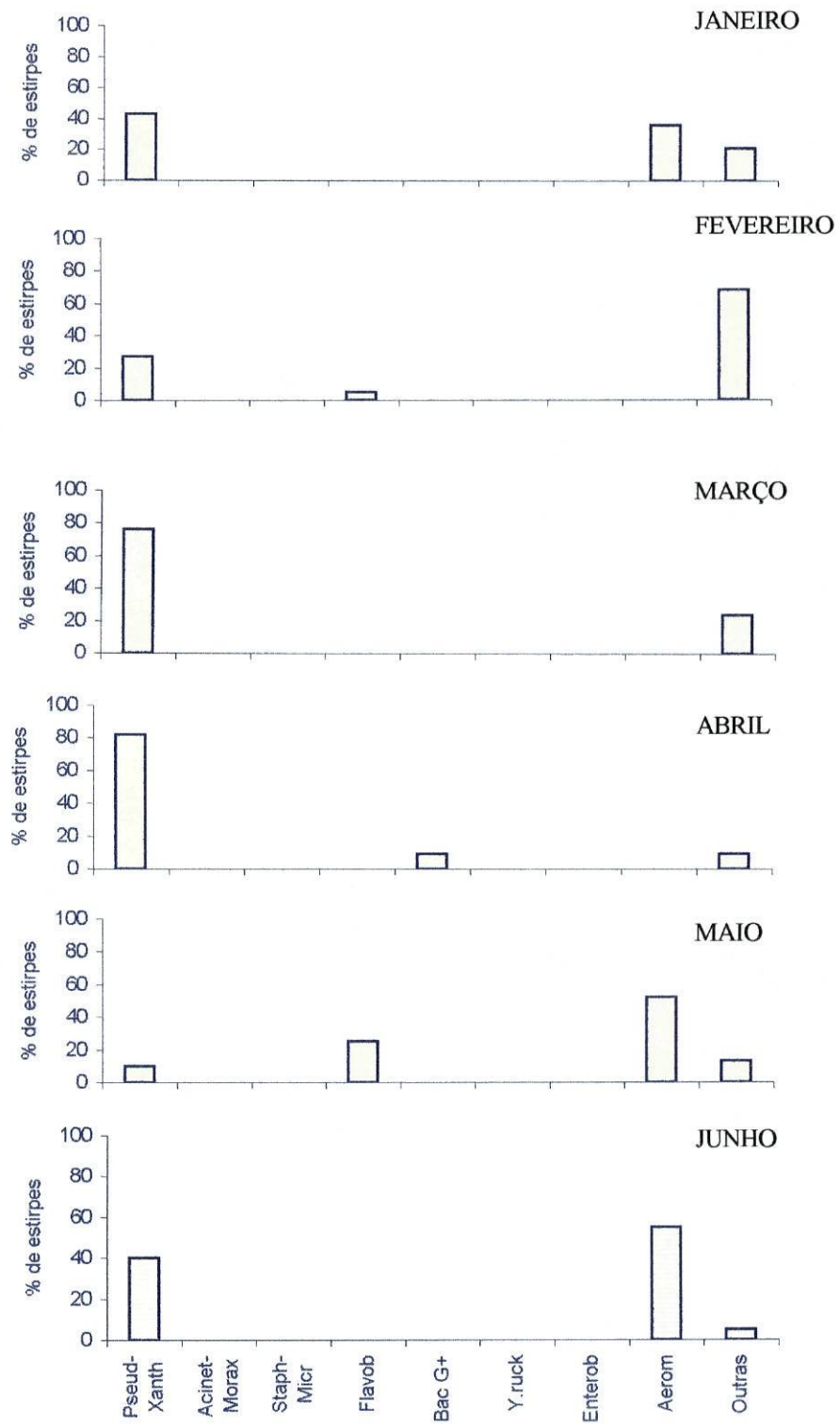


Fig. 3.1.26 - Comparação da diversidade microbiana detectada no sedimento do rio, junto da saída de água da Truticultura A, ao longo das amostragens mensais efectuadas. Pseud-Xanth: *Pseudomonas-Xanthomonas*; Acinet-Morax: *Acinetobacter-Moraxella*; Staph-Micr: *Staphylococcus-Micrococcus*; Flavob: *Flavobacterium*; Bac G+: Bacilos Gram +; Y.ruck: *Yersinia ruckeri*; Enterob: outras *Enterobacteriaceae*; Aerom: *Aeromonas* móveis; Outras: estirpes não identificadas.

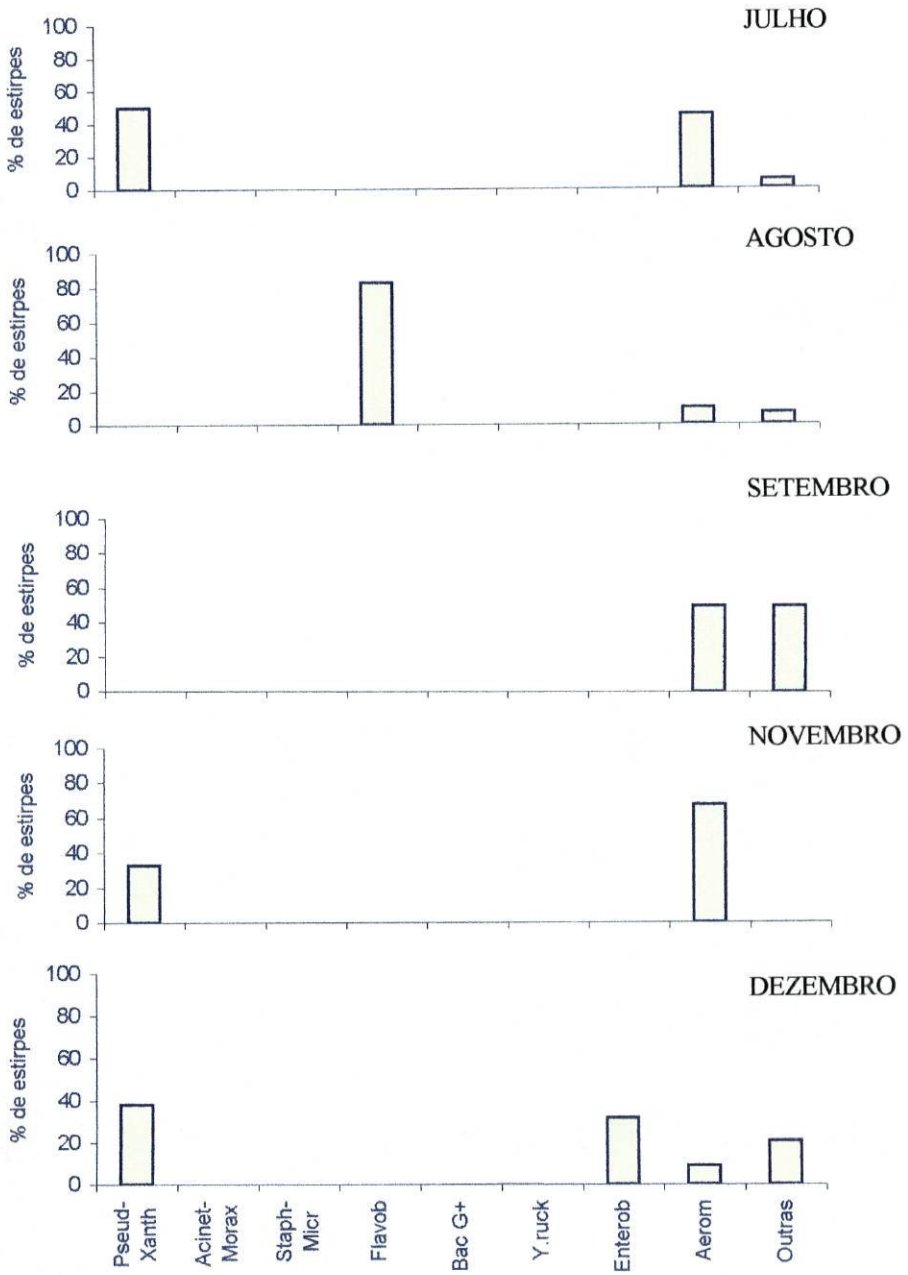


Fig. 3.1.26 - Continuação

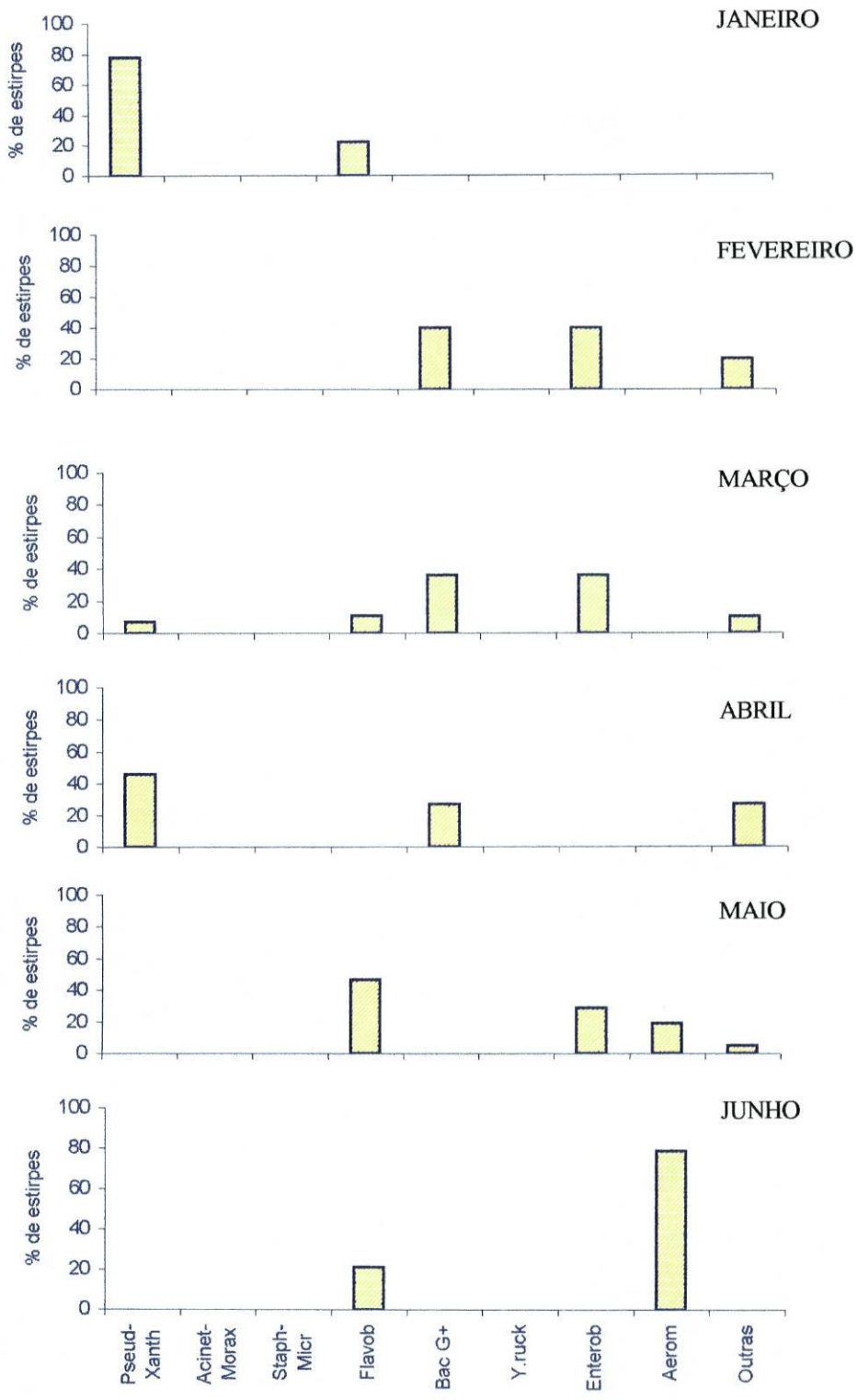


Fig. 3.1.27 - Comparação da diversidade microbiana detectada na água da jaula 1 da Truticultura B, ao longo das amostragens mensais efectuadas. Pseud-Xanth: *Pseudomonas-Xanthomonas*; Acinet-Morax: *Acinetobacter-Moraxella*; Staph-Micr: *Staphylococcus-Micrococcus*; Flavob: *Flavobacterium*; Bac G+: Bacilos Gram +; Y.ruck: *Yersinia ruckeri*; Enterob: outras *Enterobacteriaceae*; Aerom: *Aeromonas* móveis; Outras: estirpes não identificadas.

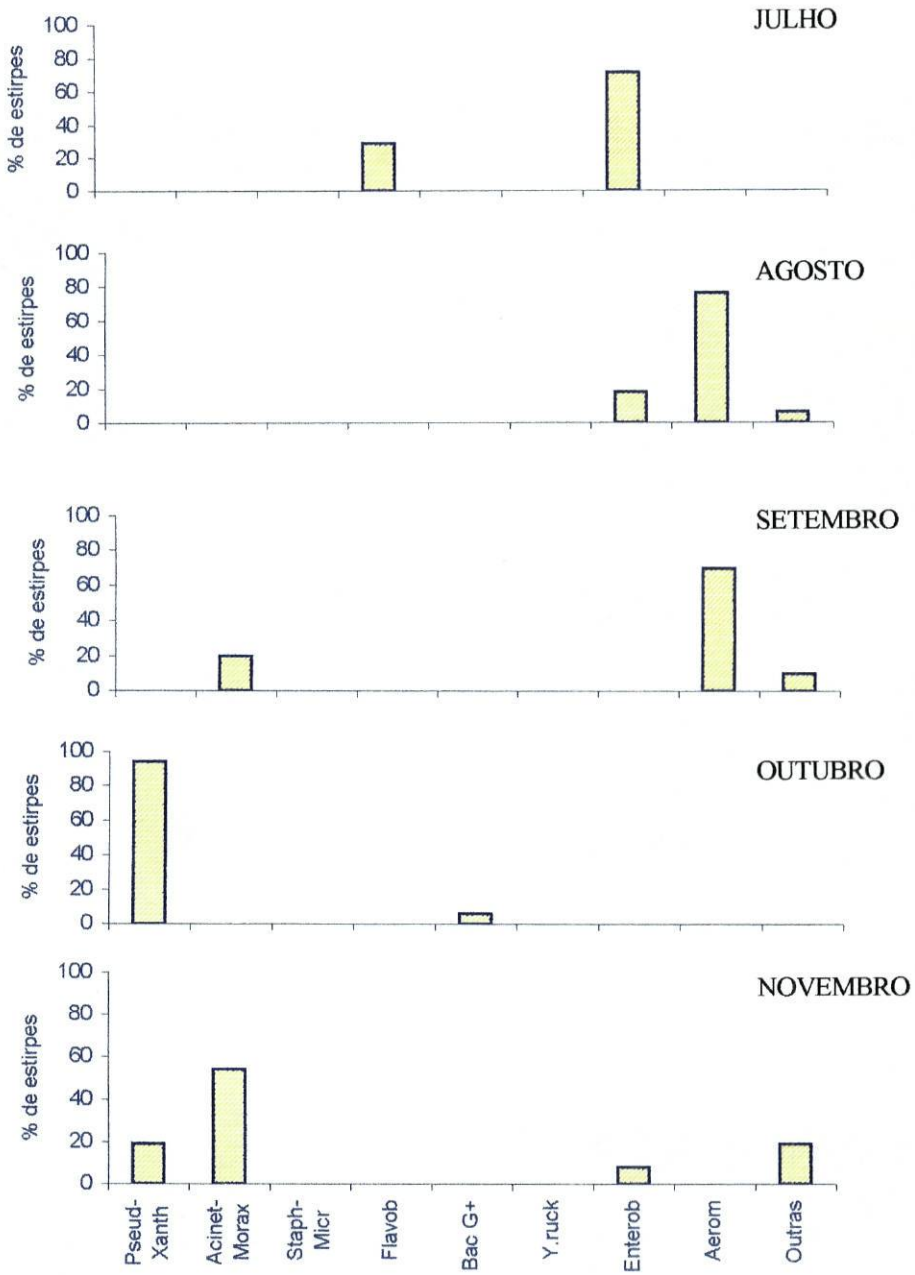


Fig. 3.1.27 - Continuação

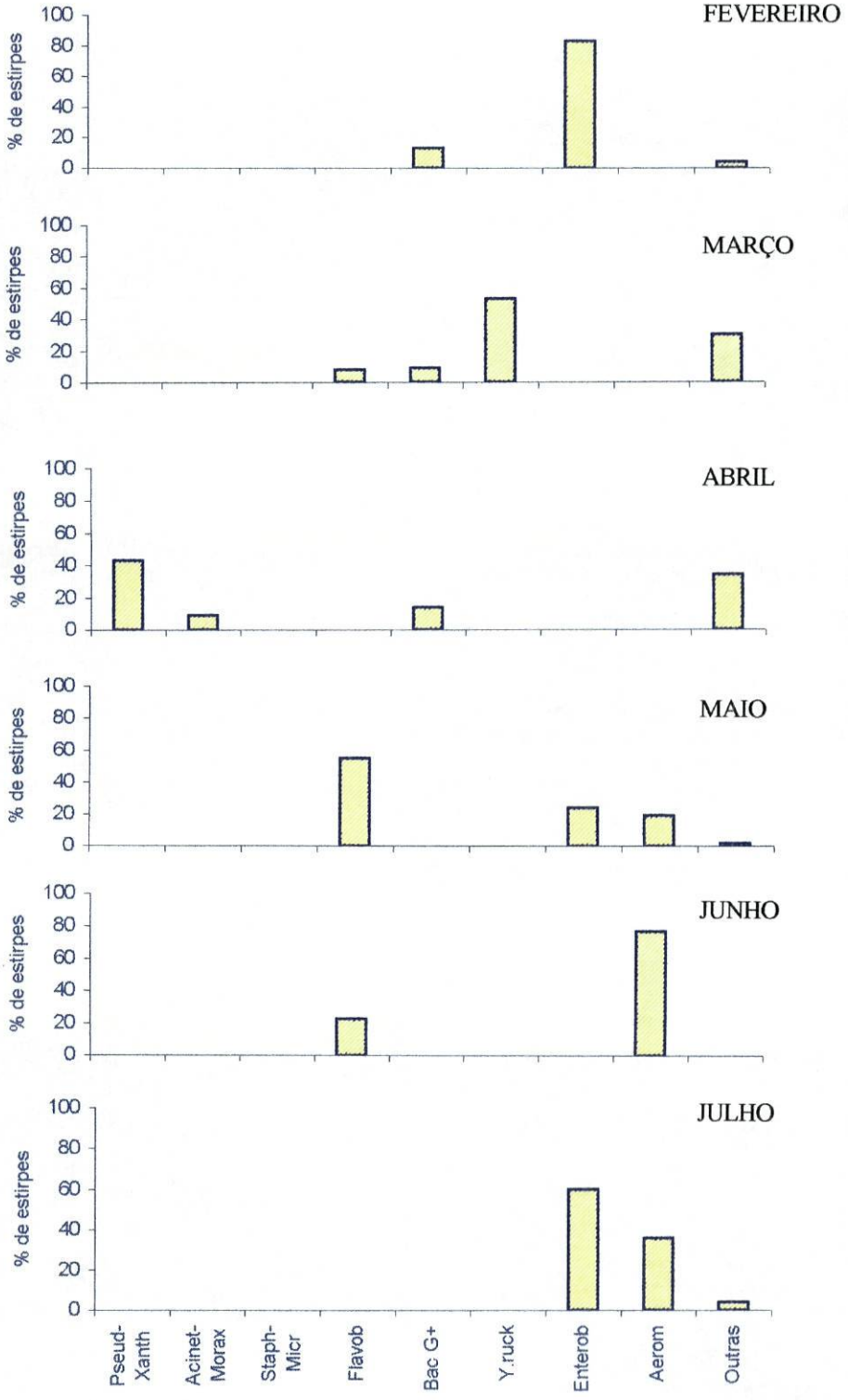


Fig. 3.1.28 - Comparação da diversidade microbiana detectada na água da jaula 2 da Truticultura B, ao longo das amostragens mensais efectuadas. Pseud-Xanth: *Pseudomonas-Xanthomonas*; Acinet-Morax: *Acinetobacter-Moraxella*; Staph-Micr: *Staphylococcus-Micrococcus*; Flavob: *Flavobacterium*; Bac G+: Bacilos Gram +; Y.ruck: *Yersinia ruckeri*; Enterob: outras *Enterobacteriaceae*; Aerom: *Aeromonas* móveis; Outras: estirpes não identificadas.

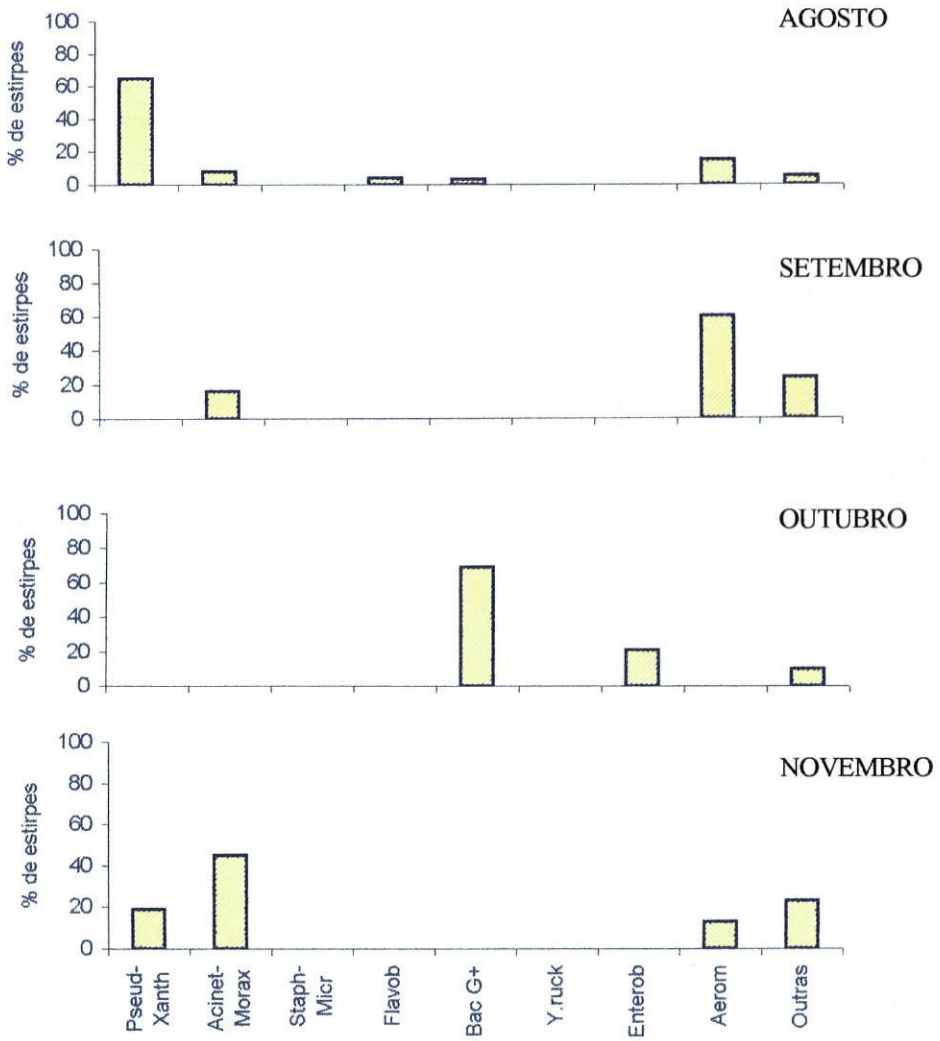


Fig. 3.1.28 - Continuação

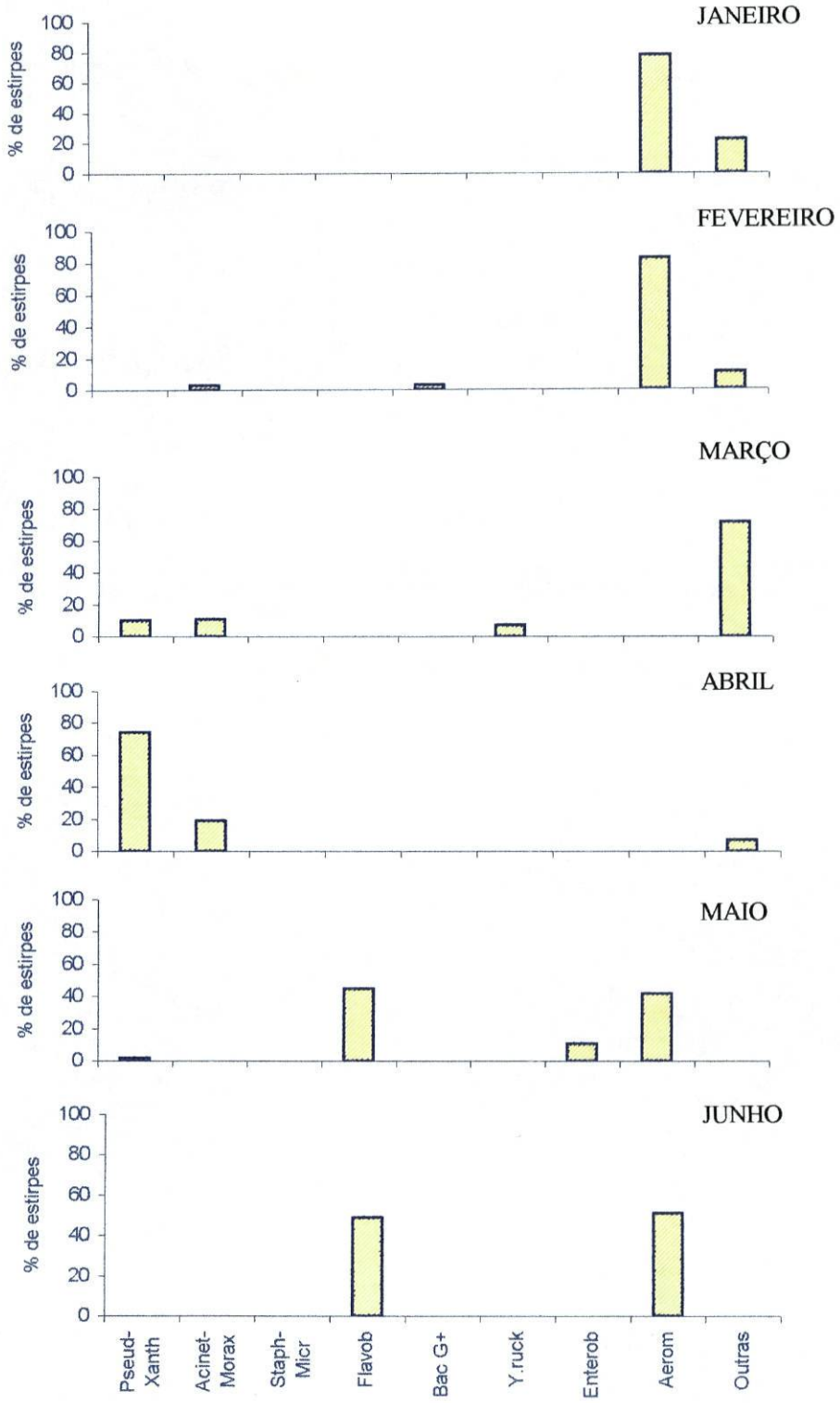


Fig. 3.1.29 - Comparação da diversidade microbiana detectada na água da jaula 3 da Truticultura B, ao longo das amostragens mensais efectuadas. Pseud-Xanth: *Pseudomonas-Xanthomonas*; Acinet-Morax: *Acinetobacter-Moraxella*; Staph-Micr: *Staphylococcus-Micrococcus*; Flavob: *Flavobacterium*; Bac G+: Bacilos Gram +; Y.ruck: *Yersinia ruckeri*; Enterob: outras *Enterobacteriaceae*; Aerom: *Aeromonas* móveis; Outras: estirpes não identificadas.

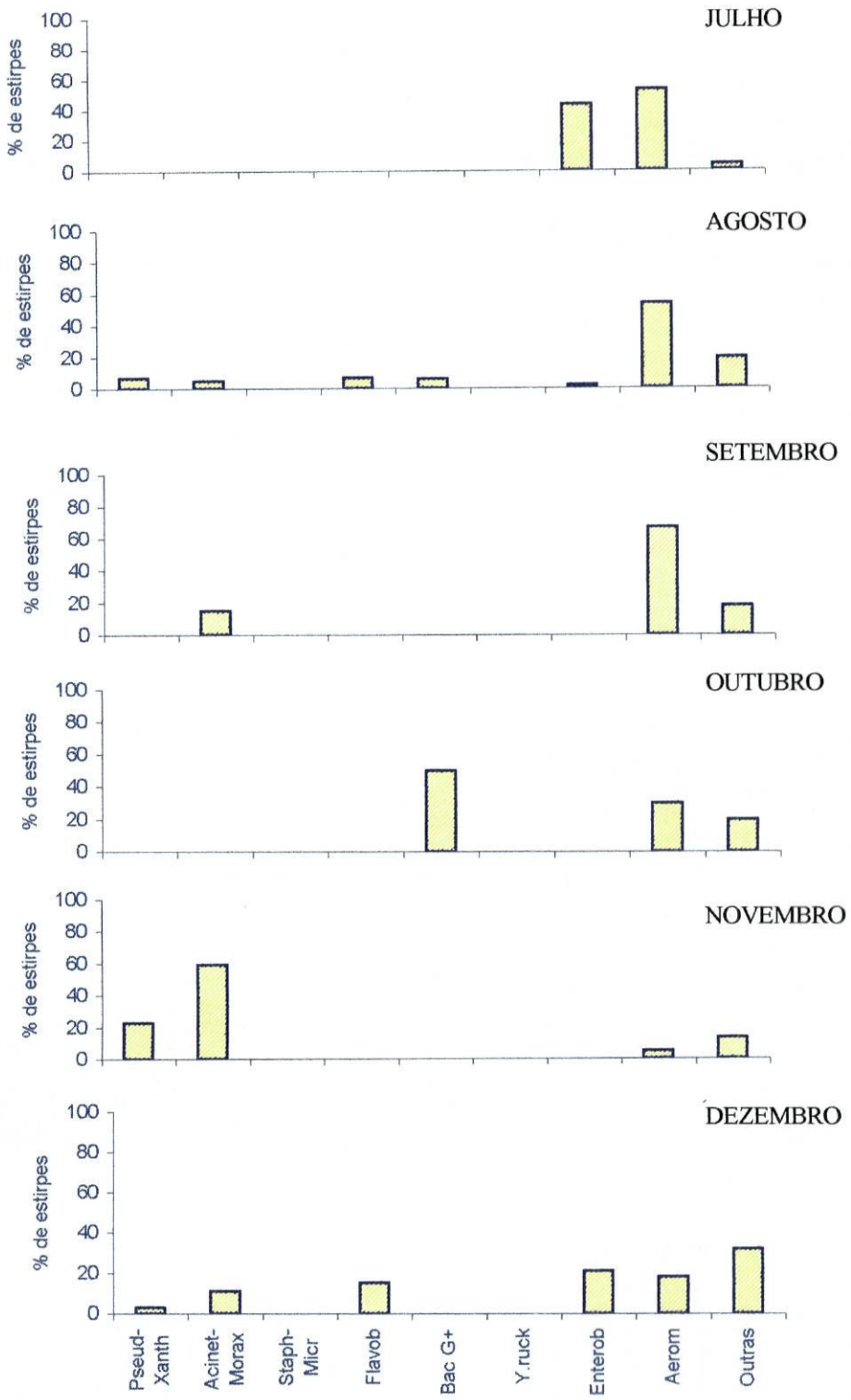


Fig. 3.1.29 - Continuação

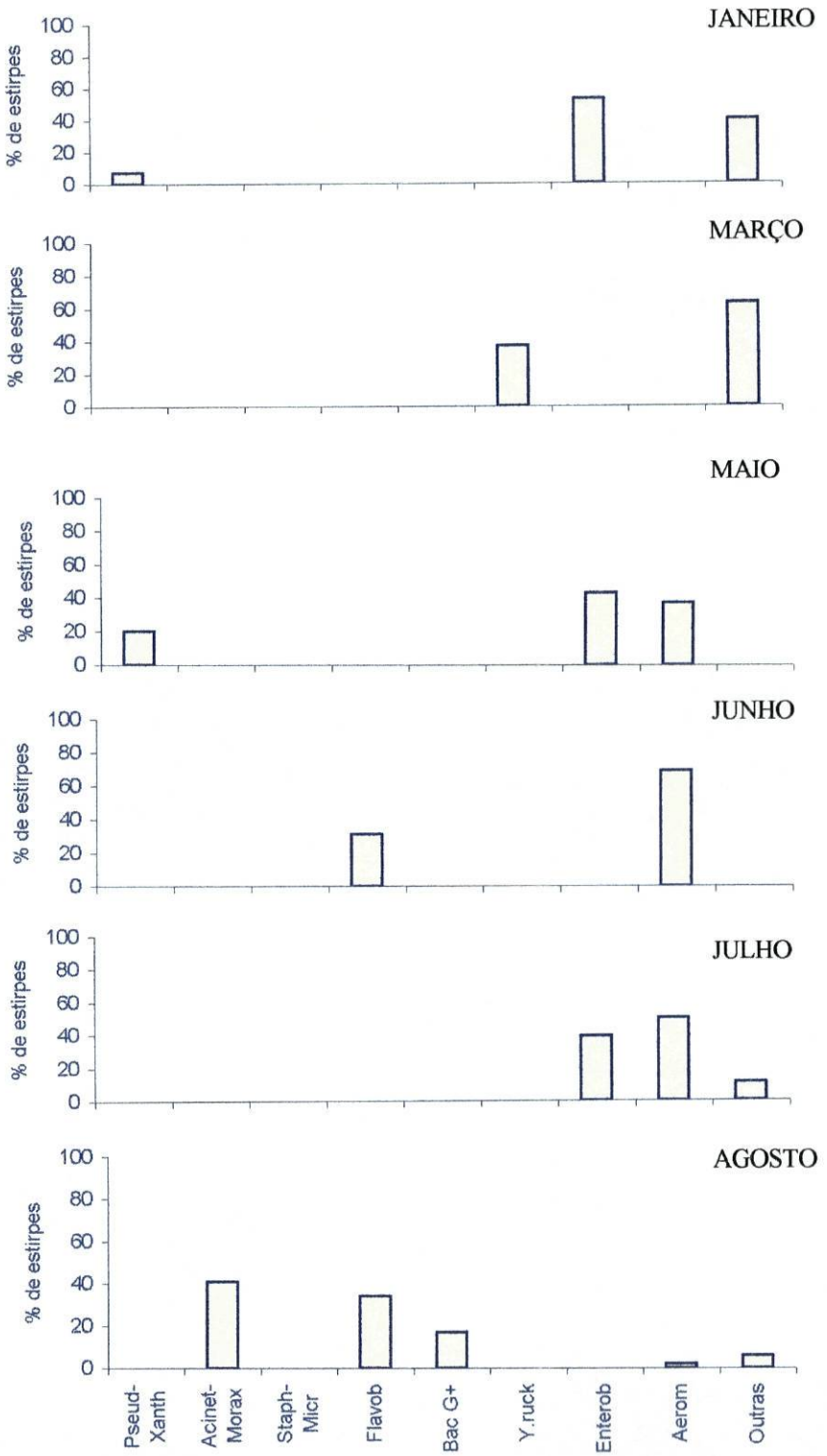


Fig. 3.1.30 - Comparação da diversidade microbiana detectada no sedimento por baixo da jaula 1 da Truticultura B, ao longo das amostragens mensais efectuadas. Pseud-Xanth: *Pseudomonas-Xanthomonas*; Acinet-Morax: *Acinetobacter-Moraxella*; Staph-Micr: *Staphylococcus-Micrococcus*; Flavob: *Flavobacterium*; Bac G+: Bacilos Gram +; Y.ruck: *Yersinia ruckeri*; Enterob: outras *Enterobacteriaceae*; Aerom: *Aeromonas* móveis; Outras: estirpes não identificadas.

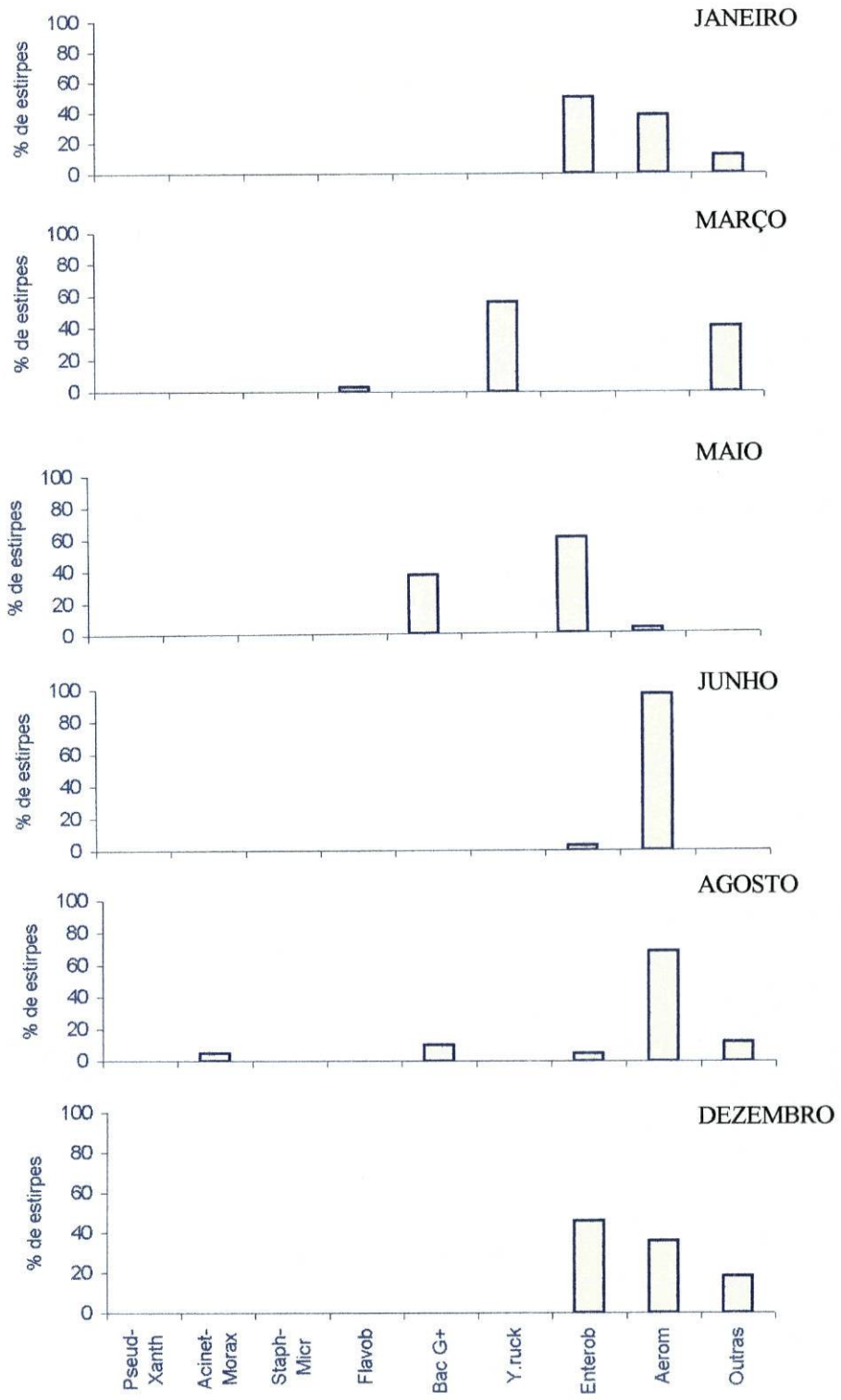


Fig. 3.1.31 - Comparação da diversidade microbiana detectada no sedimento por baixo da jaula 2 da Truticultura B, ao longo das amostragens mensais efectuadas. Pseud-Xanth: *Pseudomonas-Xanthomonas*; Acinet-Morax: *Acinetobacter-Moraxella*; Staph-Micr: *Staphylococcus-Micrococcus*; Flavob: *Flavobacterium*; Bac G+: Bacilos Gram +; Y.ruck: *Yersinia ruckeri*; Enterob: outras *Enterobacteriaceae*; Aerom: *Aeromonas* móveis; Outras: estirpes não identificadas.

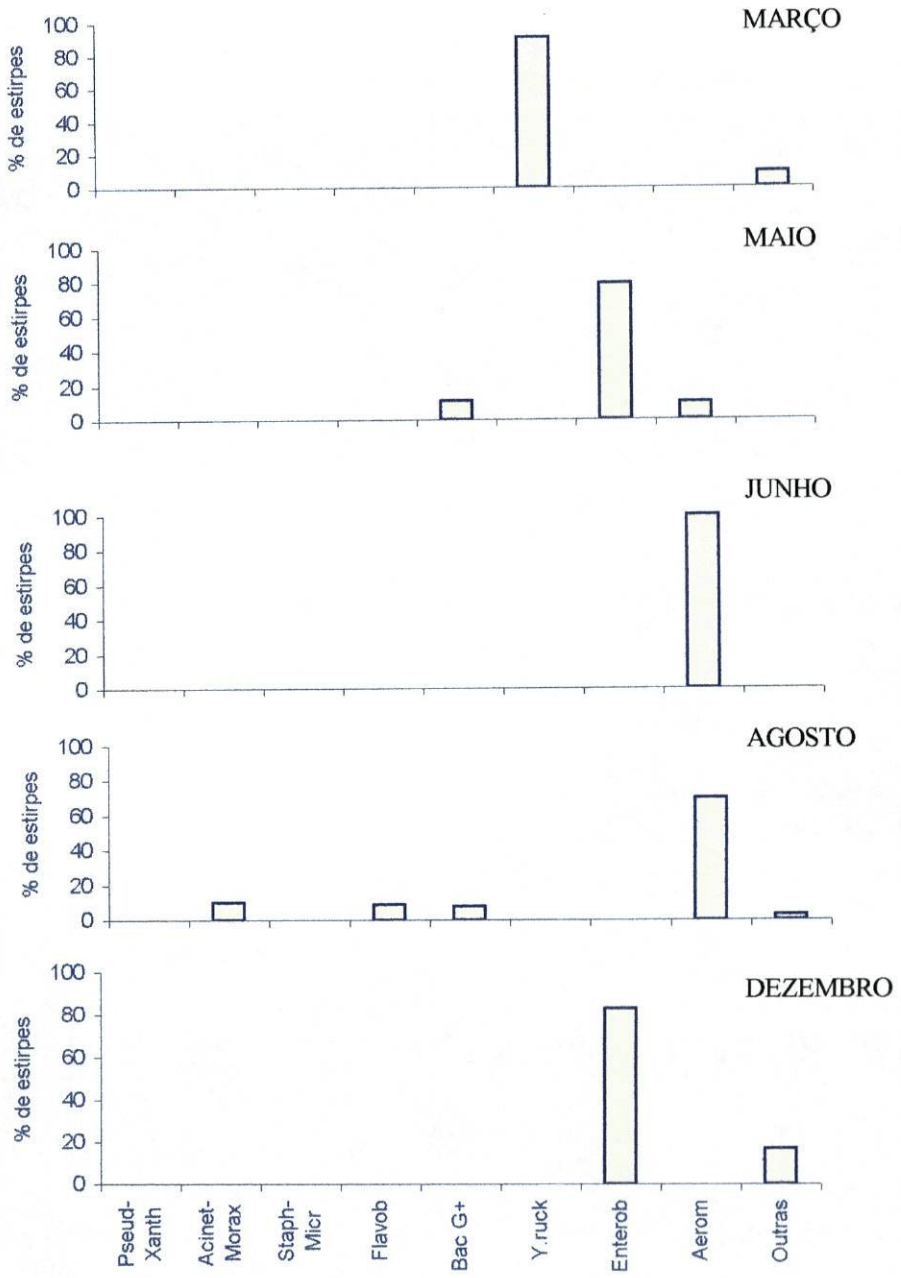


Fig. 3.1.32 - Comparação da diversidade microbiana detectada no sedimento por baixo da jaula 3 da Truticultura B, ao longo das amostragens mensais efectuadas. Pseud-Xanth: *Pseudomonas-Xanthomonas*; Acinet-Morax: *Acinetobacter-Moraxella*; Staph-Micr: *Staphylococcus-Micrococcus*; Flavob: *Flavobacterium*; Bac G+: Bacilos Gram +; Y.ruck: *Yersinia ruckeri*; Enterob: outras *Enterobacteriaceae*; Aerom: *Aeromonas* móveis; Outras: estirpes não identificadas.

3.1.2.3. Resistência/Sensibilidade a Substâncias Antibacterianas

Foram determinados os padrões de sensibilidade/resistência a substâncias antibacterianas das estirpes dos grupos bacterianos mais abundantes nas duas truticulturas estudadas, nomeadamente *Enterobacteriaceae*, *Aeromonas* móveis, *Flavobacterium* e *Pseudomonas-Xanthomonas*. Os resultados obtidos encontram-se resumidos nas tabelas 3.1.8 a 3.1.15.

O grupo das *Pseudomonas-Xanthomonas* apresenta uma considerável variabilidade de perfis de sensibilidade/resistência aos compostos antimicrobianos utilizados (Tabelas 3.1.8 e 3.1.9), não se observando um perfil claramente predominante nas estirpes deste grupo, sejam as isoladas na truticultura A (Tabela 3.1.8), sejam as da truticultura B (Tabela 3.1.9).

Na truticultura A, foram encontradas estirpes sensíveis a todos os antibióticos testados (10% das estirpes) ou resistentes apenas à ampicilina (10%), mas também se observaram resistências múltiplas, incluindo estirpes (10%) resistentes a todos estes compostos. O perfil mais comum (20% das estirpes) consistiu na resistência ao ácido oxolínico, ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, nitrofurantoína e trimetoprim-sulfametoxazol. Outros perfis de resistência múltipla incluiram resistências ao ácido oxolínico, nitrofurantoína e norfloxacina (10% das estirpes), ácido oxolínico, cloranfenicol, nitrofurantoína e oxitetraciclina (10%), ácido oxolínico, ampicilina, cloranfenicol, nitrofurantoína e trimetoprim-sulfametoxazol (10%), ácido oxolínico, estreptomicina, nitrofurantoína, norfloxacina e oxitetraciclina (10%) e, ainda, ácido oxolínico, ampicilina, cloranfenicol, estrepromicina, nitrofurantoína, oxitetraciclina e trimetoprim-sulfametoxazol (10%).

Na truticultura B, observaram-se resistências múltiplas ao ácido oxolínico, nitrofurantoína e norfloxacina (20% das estirpes), ácido oxolínico, ampicilina, cloranfenicol, nitrofurantoína e trimetoprim-sulfametoxazol (20%), ácido oxolínico, ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, nitrofurantoína, norfloxacina e trimetoprim-sulfametoxazol (20%), ácido oxolínico, ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, nitrofurantoína, oxitetraciclina e trimetoprim-sulfametoxazol (20%) e, ainda, ácido oxolínico, ampicilina, cloranfenicol, nitrofurantoína, norfloxacina, oxitetraciclina e trimetoprim-sulfametoxazol (20%).

Nenhum dos oito compostos antimicrobianos testados foi capaz de impedir o crescimento de todas as estirpes de *Pseudomonas-Xanthomonas* estudadas. Em ambas as truticulturas, o ácido oxolínico e a nitrofurantoína constituiram os antibióticos aos

Tabela 3.1.8 - Perfis de sensibilidade/resistência de estirpes de *Pseudomonas-Xanthomonas*, isoladas na Truticultura A, a diferentes compostos antimicrobianos.

OA 2	AM 10	C 30	S 10	FM 300	NOR 10	OT 30	SXT 25	% Estirpes
R	R	R	R	R	S	S	R	20
R	R	R	R	R	S	R	R	10
R	R	R	R	R	R	R	R	10
R	R	R	S	R	S	S	R	10
R	S	R	S	R	S	R	S	10
R	S	S	R	R	R	R	S	10
R	S	S	S	R	R	S	S	10
S	R	S	S	S	S	S	S	10
S	S	S	S	S	S	S	S	10
80% R	60% R	60% R	50% R	80% R	30% R	40% R	50% R	

OA (2) - ácido oxolínico, 2 μg; **AM (10)** - ampicilina, 10 μg; **C (30)** - cloranfenicol, 30 μg; **S (10)** - estreptomicina, 10 μg; **FM (300)** - nitrofurantoína, 300 μg; **NOR (10)** - norfloxacina, 10 μg; **OT (30)** - oxitetraciclina, 30 μg; **SXT (25)** - trimetoprim-sulfametoxazol, 25 μg.

Tabela 3.1.9 - Perfis de sensibilidade/resistência de estirpes de *Pseudomonas-Xanthomonas*, isoladas na Truticultura B, a diferentes compostos antimicrobianos.

OA 2	AM 10	C 30	S 10	FM 300	NOR 10	OT 30	SXT 25	% Estirpes
R	R	R	R	R	R	S	R	20
R	R	R	R	R	S	R	R	20
R	R	R	S	R	R	R	R	20
R	R	R	S	R	S	S	R	20
R	S	S	S	R	R	S	S	20
100% R	80% R	80% R	40% R	100% R	60% R	40% R	80% R	

OA (2) - ácido oxolínico, 2 μg; **AM (10)** - ampicilina, 10 μg; **C (30)** - cloranfenicol, 30 μg; **S (10)** - estreptomicina, 10 μg; **FM (300)** - nitrofurantoína, 300 μg; **NOR (10)** - norfloxacina, 10 μg; **OT (30)** - oxitetraciclina, 30 μg; **SXT (25)** - trimetoprim-sulfametoxazol, 25 μg.

quais se observou mais resistência (80% das estirpes da truticultura A, e 100% da truticultura B). Também à ampicilina e ao cloranfenicol se observou uma resistência bastante elevada (60% das estirpes na truticultura A e 80% na B); na truticultura B também se observou a resistência de 80% das estirpes ao trimetoprim-sulfametoxazol. Os antibióticos aos quais se verificou existirem menores resistências foram a oxitetraciclina (40% das estirpes, em ambas as truticulturas), a estreptomicina (40% na truticultura B e 50% na A) e a norfloxacina, na truticultura A (30% das estirpes); curiosamente, na truticultura B, observou-se o dobro da resistência a este agente antimicrobiano (60% de estirpes resistentes).

Em *Flavobacterium* observou-se, na truticultura A (Tabela 3.1.10), para além de um grande número de perfis de sensibilidade/resistência aos antibióticos, um perfil claramente mais abundante do que os restantes - uma resitência múltipla, ao ácido oxolínico, nitrofurantoína, norfloxacina e trimetoprim-sulfametoxazol (20% das estirpes). De resto, foram encontradas estirpes de *Flavobacterium* sensíveis a todos os antibióticos testados (4%), bem como resistentes a um (nitrofurantoína ou trimetoprim-sulfametoxazol; 4% das estirpes, em ambos os casos), a dois (nitrofurantoína e trimetoprim-sulfametoxazol, 10%; estreptomicina e norfloxacina, 4%; estreptomicina e trimetoprim-sulfametoxazol, 4%), a três (estreptomicina, nitrofurantoína e trimetoprim-sulfametoxazol, 4%), a quatro (estreptomicina, nitrofurantoína, norfloxacina e trimetoprim-sulfametoxazol, 4%; ácido oxolínico, nitrofurantoína, oxitetraciclina e trimetoprim-sulfametoxazol, 4%), a cinco (ácido oxolínico, nitrofurantoína, norfloxacina, oxitetraciclina e trimetoprim-sulfametoxazol, 7%; ampicilina, nitrofurantoína, norfloxacina, oxitetraciclina e trimetoprim-sulfametoxazol, 4%; ácido oxolínico, ampicilina, nitrofurantoína, norfloxacina e trimetoprim-sulfametoxazol, 4%), a seis (ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, nitrofurantoína, norfloxacina e oxitetraciclina, 4%; ácido oxolínico, ampicilina, estreptomicina, nitrofurantoína, norfloxacina e trimetoprim-sulfametoxazol, 4%; ácido oxolínico, ampicilina, estreptomicina, nitrofurantoína, norfloxacina e oxitetraciclina, 4%; ácido oxolínico, ampicilina, nitrofurantoína, norfloxacina, oxitetraciclina e trimetoprim-sulfametoxazol, 4%) ou a sete (ácido oxolínico, ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, nitrofurantoína, norfloxacina e oxitetraciclina, 7%) dos compostos antimicrobianos usados.

Na truticultura B (Tabela 3.1.11), também se observou entre as estirpes de *Flavobacterium* um grande número de perfis de sensibilidade/resistência aos antibióticos. Contudo, o predomínio de qualquer desses perfis não foi nítido.

Tabela 3.1.10 - Perfis de sensibilidade/resistência de estirpes de *Flavobacterium*, isoladas na Truticultura A, a diferentes compostos antimicrobianos.

OA 2	**AM** 10	**C** 30	**S** 10	**FM** 300	**NOR** 10	**OT** 30	**SXT** 25	**% Estirpes**
R	S	S	S	R	R	S	R	20
S	S	S	S	R	S	S	R	10
R	S	S	S	R	R	R	R	7
R	R	R	R	R	R	R	S	7
S	S	S	S	S	S	S	S	4
S	S	S	S	R	S	S	S	4
S	S	S	S	S	S	S	R	4
S	S	S	R	S	R	S	S	4
S	S	S	R	S	S	S	R	4
S	S	S	R	R	S	S	R	4
S	S	S	R	R	R	S	R	4
R	S	S	S	R	S	R	R	4
S	R	S	S	R	R	R	R	4
R	R	S	S	R	R	S	R	4
S	R	R	R	R	R	R	S	4
R	R	S	R	R	R	S	R	4
R	R	S	R	R	R	R	S	4
R	R	S	S	R	R	R	R	4
56% R	30% R	11% R	33% R	85% R	67% R	33% R	74% R	

OA (2) - ácido oxolínico, 2 µg; **AM (10)** - ampicilina, 10 µg; **C (30)** - cloranfenicol, 30 µg; **S (10)** - estreptomicina, 10 µg; **FM (300)** - nitrofurantoína, 300 µg; **NOR (10)** - norfloxacina, 10 µg; **OT (30)** - oxitetraciclina, 30 µg; **SXT (25)** - trimetoprim-sulfametoxazol, 25 µg.

Tabela 3.1.11 - Perfis de sensibilidade/resistência de estirpes de *Flavobacterium*, isoladas na Truticultura B, a diferentes compostos antimicrobianos.

OA 2	**AM** 10	**C** 30	**S** 10	**FM** 300	**NOR** 10	**OT** 30	**SXT** 25	**% Estirpes**
S	R	R	R	R	S	S	R	13
S	S	S	S	R	S	S	R	9
R	R	R	R	R	S	R	R	9
R	R	R	R	R	R	S	R	9
S	S	S	S	S	S	S	S	5
S	S	S	S	R	S	S	S	5
S	S	S	S	S	R	S	R	5
S	S	S	R	S	S	S	R	5
S	R	S	R	S	S	S	S	5
R	S	S	S	S	R	S	R	5
S	R	R	S	R	S	S	R	5
R	R	S	R	R	S	R	S	5
R	R	R	S	S	R	S	R	5
R	R	R	S	R	R	S	R	5
R	R	R	S	R	R	R	R	5
R	R	R	R	R	R	R	S	5
48% R	67% R	57% R	52% R	71% R	38% R	24% R	76% R	

OA (2) - ácido oxolínico, 2 µg; **AM (10)** - ampicilina, 10 µg; **C (30)** - cloranfenicol, 30 µg; **S (10)** - estreptomicina, 10 µg; **FM (300)** - nitrofurantoína, 300 µg; **NOR (10)** - norfloxacina, 10 µg; **OT (30)** - oxitetraciclina, 30 µg; **SXT (25)** - trimetoprim-sulfametoxazol, 25 µg.

Detectaram-se estirpes sensíveis a todos os antibióticos testados (5% das estirpes) ou resistentes a apenas um deles (nitrofurantoína, 5%), mas também se observaram resistências a dois (nitrofurantoína e trimetoprim-sulfametoxazol, 9%; norfloxacina e trimetoprim-sulfametoxazol, 5%; estreptomicina e trimetoprim-sulfametoxazol, 5%; ampicilina e estreptomicina, 5%), a três (ácido oxolínico, norfloxacina e trimetoprim-sulfametoxazol, 5%), a quatro (ampicilina, cloranfenicol, nitrofurantoína e trimetoprim-sulfametoxazol, 5%), a cinco (ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, nitrofurantoína e trimetoprim-sulfametoxazol, 13%; ácido oxolínico, ampicilina, estreptomicina, nitrofurantoína e oxitetraciclina, 5%; ácido oxolínico, ampicilina, cloranfenicol, norfloxacina e trimetoprim-sulfametoxazol, 5%), a seis (ácido oxolínico, ampicilina, cloranfenicol, nitrofurantoína, norfloxacina e trimetoprim-sulfametoxazol, 5%) e a sete (ácido oxolínico, ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, nitrofurantoína, oxitetraciclina e trimetoprim-sulfametoxazol, 9%; ácido oxolínico, ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, nitrofurantoína, norfloxacina e trimetoprim-sulfametoxazol, 9%; ácido oxolínico, ampicilina, cloranfenicol, nitrofurantoína, norfloxacina, oxitetraciclina e trimetoprim-sulfametoxazol, 5%; ácido oxolínico, ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, nitrofurantoína, norfloxacina e oxitetraciclina, 5%).

Os antibióticos aos quais foram observadas maiores percentagens de resistências entre as estirpes de *Flavobacterium* foram, em ambas as truticulturas, a nitrofurantoína (85% na truticultura A e 71% na B) e o trimetoprim-sulfametoxazol (74% e 76%, respectivamente). Quanto aos restantes antibióticos, as percentagens de resistência encontradas foram, em geral, bastante diferentes nas duas instalações aquícolas. Por exemplo, observou-se uma maior resistência às quinolonas na truticultura A (67% de estirpes resistentes à norfloxacina e 56% ao ácido oxolínico) do que na B (38% e 48%, respectivamente); curiosamente, na truticultura A observou-se uma maior percentagem de resistência à norfloxacina do que ao ácido oxolínico. O cloranfenicol constituiu o composto antimicrobiano ao qual foram detectadas menos resistências na truticultura A (apenas 11% das estirpes), enquanto que, na B, a percentagem de estirpes resistentes foi de 57%. Também as percentagens de estirpes resistentes à ampicilina foram consideravelmente diferentes nas duas truticulturas (30% na A e 67% na B). A estreptomicina e a oxitetraciclina (ambas com 33% de estirpes resistentes na truticultura A) apresentaram percentagens de resistência consideravelmente diferentes na truticultura B (52% e 24%, respectivamente).

Na família *Enterobacteriaceae* foi encontrado, na truticultura A (Tabela 3.1.12), um perfil claramente predominante (resistência à estreptomicina e à nitrofurantoína; 56% das estirpes). Outros perfis incluiram resistências à ampicilina,

estreptomicina e nitrofurantoína (22% das estirpes), à ampicilina e à nitrofurantoína (11%) e, ainda, à ampicilina, ao cloranfenicol e à nitrofurantoína (11%).

Na truticultura B (Tabela 3.1.13), os dois perfis mais frequentes incluiram resistências a dois antibióticos (ampicilina e nitrofurantoína, 26% das estirpes; estreptomicina e nitrofurantoína, 19%). Outros perfis consistiram em resistências a dois (ampicilina e estreptomicina, 7%), a três (ácido oxolínico, ampicilina e nitrofurantoína, 13%; ampicilina, cloranfenicol e nitrofurantoína, 7%; ampicilina, estreptomicina e nitrofurantoína, 7%), a quatro (ácido oxolínico, ampicilina, estreptomicina e nitrofurantoína, 7%), a cinco (ácido oxolínico, ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina e nitrofurantoína, 7%) e a seis (ácido oxolínico, ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, nitrofurantoína e oxitetraciclina, 7%) dos oito antibióticos utilizados.

A nitrofurantoína constituiu, também nesta família, o antibiótico ao qual se observou uma maior percentagem de resistências (100% das estirpes na truticultura A e 93% na B). Também à ampicilina (44% na truticultura A e 80% na B) e à estreptomicina (78% na truticultura A e 53% na B) foram observadas percentagens de resistência bastante elevadas. Percentagens bastante menores foram observadas, na truticultura B, em relação ao ácido oxolínico (33% das estirpes), ao cloranfenicol (20%) e à oxitetraciclina (7%), bem como, na truticultura A, ao cloranfenicol (11%). Por outro lado, não foi encontrada qualquer estirpe resistente ao ácido oxolínico (na truticultura A) nem à norfloxacina ou ao trimetoprim-sulfametoxazol (ambas as truticulturas).

No grupo das *Aeromonas* móveis, é evidente o predomínio das estirpes resistentes apenas à ampicilina. Este predomínio é notório, quer na truticultura A (Tabela 3.1.14), onde este perfil é comum a 47% das estirpes, quer na truticultura B (Tabela 3.1.15), na qual esta percentagem é de 44%. Porém, nesta última truticultura, é evidente, também, a elevada frequência de estirpes resistentes à ampicilina e à estreptomicina (29%).

Outros perfis de resistência/sensibilidade no grupo das *Aeromonas* móveis incluem, na truticultura A, resistências a dois antibióticos (ampicilina e oxitetraciclina, 8%; ampicilina e nitrofurantoína, 5%; ampicilina e estreptomicina, 2%), a três (ácido oxolínico, ampicilina e oxitetraciclina, 9%; ácido oxolínico, ampicilina e nitrofurantoína, 2%), a quatro (ácido oxolínico, ampicilina, cloranfenicol e oxitetraciclina, 9%; ácido oxolínico, ampicilina, estreptomicina e norfloxacina, 2%; ampicilina, estreptomicina, nitrofurantoína e trimetoprim-sulfametoxazol, 2%; ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina e oxitetraciclina, 2%), a cinco (ácido

Tabela 3.1.12 - Perfis de sensibilidade/resistência de estirpes de *Enterobacteriaceae*, isoladas na Truticultura A, a diferentes compostos antimicrobianos.

OA 2	**AM** 10	**C** 30	**S** 10	**FM** 300	**NOR** 10	**OT** 30	**SXT** 25	**% Estirpes**
S	S	S	R	R	S	S	S	56
S	R	S	R	R	S	S	S	22
S	R	R	S	R	S	S	S	11
S	R	S	S	R	S	S	S	11
0% R	44% R	11% R	78% R	100% R	0% R	0% R	0% R	

OA (2) - ácido oxolínico, 2 μg; **AM (10)** - ampicilina, 10 μg; **C (30)** - cloranfenicol, 30 μg; **S (10)** - estreptomicina, 10 μg; **FM (300)** - nitrofurantoína, 300 μg; **NOR (10)** - norfloxacina, 10 μg; **OT (30)** - oxitetraciclina, 30 μg; **SXT (25)** - trimetoprim-sulfametoxazol, 25 μg.

Tabela 3.1.13 - Perfis de sensibilidade/resistência de estirpes de *Enterobacteriaceae*, isoladas na Truticultura B, a diferentes compostos antimicrobianos.

OA 2	**AM** 10	**C** 30	**S** 10	**FM** 300	**NOR** 10	**OT** 30	**SXT** 25	**% Estirpes**
S	R	S	S	R	S	S	S	26
S	S	S	R	R	S	S	S	19
R	R	S	S	R	S	S	S	13
S	R	R	S	R	S	S	S	7
S	R	S	R	R	S	S	S	7
S	R	S	R	S	S	S	S	7
R	R	R	R	R	S	R	S	7
R	R	S	R	R	S	S	S	7
R	R	R	R	R	S	S	S	7
33% R	80% R	20% R	53% R	93% R	0% R	7% R	0% R	

OA (2) - ácido oxolínico, 2 μg; **AM (10)** - ampicilina, 10 μg; **C (30)** - cloranfenicol, 30 μg; **S (10)** - estreptomicina, 10 μg; **FM (300)** - nitrofurantoína, 300 μg; **NOR (10)** - norfloxacina, 10 μg; **OT (30)** - oxitetraciclina, 30 μg; **SXT (25)** - trimetoprim-sulfametoxazol, 25 μg.

Tabela 3.1.14 - Perfis de sensibilidade/resistência de estirpes de *Aeromonas* móveis, isoladas na Truticultura A, a diferentes compostos antimicrobianos.

OA 2	**AM** 10	**C** 30	**S** 10	**FM** 300	**NOR** 10	**OT** 30	**SXT** 25	**% Estirpes**
S	R	S	S	S	S	S	S	47
R	R	S	S	S	S	R	S	9
R	R	R	S	S	S	R	S	9
S	R	S	S	S	S	R	S	8
S	R	S	S	R	S	S	S	5
R	R	S	R	S	R	S	S	2
R	R	S	S	R	S	S	S	2
S	R	S	R	R	S	S	R	2
S	R	S	R	S	S	S	S	2
R	R	S	S	R	S	R	R	2
R	R	R	R	R	S	S	R	2
R	R	S	R	S	R	S	R	2
R	R	R	R	S	S	R	S	2
R	R	S	R	S	R	R	R	2
S	R	R	R	S	S	R	S	2
S	R	R	R	R	S	R	S	2
33% R	100% R	18% R	20% R	16% R	7% R	36% R	11% R	

OA (2) - ácido oxolínico, 2 µg; **AM (10)** - ampicilina, 10 µg; **C (30)** - cloranfenicol, 30 µg; **S (10)** - estreptomicina, 10 µg; **FM (300)** - nitrofurantoína, 300 µg; **NOR (10)** - norfloxacina, 10 µg; **OT (30)** - oxitetraciclina, 30 µg; **SXT (25)** - trimetoprim-sulfametoxazol, 25 µg.

Tabela 3.1.15 - Perfis de sensibilidade/resistência de estirpes de *Aeromonas* móveis, isoladas na Truticultura B, a diferentes compostos antimicrobianos.

OA 2	**AM** 10	**C** 30	**S** 10	**FM** 300	**NOR** 10	**OT** 30	**SXT** 25	**% Estirpes**
S	R	S	S	S	S	S	S	44
S	R	S	R	S	S	S	S	29
S	R	S	S	S	S	R	S	6
S	R	S	R	R	S	S	S	6
S	R	S	R	S	S	R	S	6
S	R	S	R	S	S	S	R	3
R	R	S	R	S	S	S	S	3
R	R	S	R	S	S	R	S	3
6% R	100% R	0% R	59% R	6% R	0% R	18% R	3% R	

OA (2) - ácido oxolínico, 2 µg; **AM (10)** - ampicilina, 10 µg; **C (30)** - cloranfenicol, 30 µg; **S (10)** - estreptomicina, 10 µg; **FM (300)** - nitrofurantoína, 300 µg; **NOR (10)** - norfloxacina, 10 µg; **OT (30)** - oxitetraciclina, 30 µg; **SXT (25)** - trimetoprim-sulfametoxazol, 25 µg.

oxolínico, ampicilina, nitrofurantoína, oxitetraciclina e trimetoprim-sulfametoxazol, 2%; ácido oxolínico, ampicilina, estreptomicina, norfloxacina e trimetoprim-sulfametoxazol, 2%; ácido oxolínico, ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina e oxitetraciclina, 2%; ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, nitrofurantoína e oxitetraciclina, 2%) e a seis (ácido oxolínico, ampicilina, estreptomicina, norfloxacina, oxitetraciclina e trimetoprim-sulfametoxazol, 2%; ácido oxolínico, ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, nitrofurantoína e trimetoprim-sulfametoxazol, 2%). Na truticultura B, para além dos dois perfis predominantes, já referidos, foram encontradas estirpes resistentes a dois antibióticos (ampicilina e oxitetraciclina, 6%), a três (ampicilina, estreptomicina e nitrofurantoína, 6%; ampicilina, estreptomicina e oxitetraciclina, 6%; ampicilina, estreptomicina e trimetoprim-sulfametoxazol, 3%; ácido oxolínico, ampicilina e estreptomicina, 3%) e a quatro (ácido oxolínico, ampicilina, estreptomicina e oxitetraciclina, 3%).

Ao considerarmos as percentagens de estirpes de *Aeromonas* móveis resistentes a cada um dos antibióticos utilizados, é particularmente digna de nota, na truticultura B, a elevada percentagem de resistência (59%) à estreptomicina, enquanto que à oxitetraciclina (18%), ao ácido oxolínico e à nitrofurantoína (6%) e, ainda, ao trimetoprim-sulfametoxazol (3%), as percentagens de resistência foram consideravelmente inferiores; ainda nesta truticultura, não foi encontrada qualquer estirpe resistente ao cloranfenicol ou à norfloxacina. Na truticultura A, foram detectadas estirpes resistentes a todos os compostos antimicrobianos testados; 36% das estirpes revelaram-se resistentes à oxitetraciclina, 33% ao ácido oxolínico, 20% à estreptomicina, 18% ao cloranfenicol, 16% à nitrofurantoína, 11% ao trimetoprim-sulfametoxazol e, finalmente, apenas 7% à norfloxacina. O facto de todas as estirpes deste grupo serem resistentes à ampicilina não constitui surpresa, pois esta é uma característica de quase todas as bactérias do género *Aeromonas*.

3.1.3. DISCUSSÃO

Embora no presente trabalho não tenha sido analisada a comunidade bacteriana associada ao tegumento, às brânquias e ao tubo digestivo dos peixes, mas sim, principalmente, aos seus órgãos internos (fígado, rim e baço, e, por vezes, olho e lesões cutâneas), bem como as comunidades bacterianas presentes na água e no sedimento dos locais de amostragem de peixes, os grupos bacterianos encontrados são, em geral, similares aos referidos na generalidade dos trabalhos publicados anteriormente sobre peixes de água doce (Horsley, 1973; Sugita *et al.*, 1985; Sakata, 1989; Nieto *et al.*, 1984; Toranzo *et al.*, 1985; Cahill, 1990).

Assim, na truticultura A, e em termos globais , o facto mais evidente é, por um lado, o predomínio de *Flavobacterium* em todos os peixes, quer cultivados (ambas as espécies), quer selvagens (Tabelas 3.1.4 e 3.1.6, e Figuras 3.1.6 e 3.1.7); por outro lado, este grupo bacteriano não foi o mais abundante na água nem no sedimento de qualquer dos locais amostrados, dentro da truticultura ou no rio. O inverso ocorreu, porém, com os grupos *Pseudomonas-Xanthomonas* e *Aeromonas* móveis, os quais tiveram um predomínio absoluto na água dos três tanques da truticultura e no sedimento dos dois locais de amostragem situados no rio; também no sedimento do tanque 10 da truticultura e na água do rio do local situado junto da entrada para a truticultura, estes grupos foram os primeiro e terceiro mais abundantes.

O grupo das *Enterobacteriaceae* foi detectado em percentagens muito variáveis, quer nos peixes (onde atingiu um máximo de 15% das estirpes isoladas nas trutas comuns cultivadas, sendo, aqui, o terceiro grupo mais abundante, e um mínimo nas trutas arco-íris cultivadas, onde foi o grupo menos abundante, representando apenas 3% do total de bactérias isoladas), quer nas amostras ambientais (sendo o segundo grupo mais abundante no sedimento, onde representou 22,8% do total de estirpes isoladas, enquanto que, na água, constituiu apenas o quarto grupo mais abundante nos tanques 1 e 10, com 1,5% e 0,9% do total, respectivamente, não sendo detectado na água do tanque 4). Também o grupo *Acinetobacter-Moraxella* não demonstrou um padrão muito regular nas percentagens em que foi detectado; no entanto, e à excepção de ter constituido o grupo mais abundante na água do local do rio situado junto da saída da truticultura (29,7% do total), parece ter sido mais frequente nos peixes (segundo grupo mais abundante nas trutas arco-íris cultivadas e nos peixes selvagens, constituindo, respectivamente, 14% e 17% do total de estirpes isoladas; e quinto mais abundante nas trutas comuns cultivadas, representando 8% do total) do que no meio ambiente (não foi detectado na água nem no sedimento dos tanques da truticultura, e,

no rio, apenas foi detectado no sedimento do local situado junto à entrada da truticultura, onde, porém, representou unicamente 0,8% das estirpes isoladas).

A comparação dos grupos bacterianos predominantes, em cada espécie de peixe, ao longo das amostragens mensais, permite, portanto, concluir que, de um modo geral, os grupos detectados nos órgãos internos dos peixes não reflectem os grupos predominantes na água ou no sedimento, sendo *Flavobacterium* muito mais frequente nos peixes do que nas amostras ambientais. Apenas em Agosto foi observada uma concordância no grupo dominante (*Flavobacterium*) nas amostras de água e de sedimento e nas trutas arco-íris (mas não nas trutas comuns) da truticultura; no entanto, o grupo *Acinetobacter-Moraxella*, segundo mais abundante nas trutas arco-íris (4 estirpes isoladas), nem sequer foi detectado em qualquer das amostras ambientais. Por outro lado, embora as *Aeromonas* móveis tenham sido tão frequentemente isoladas da água e do sedimento (muitas vezes como o grupo mais abundante) não foi isolada nenhuma estirpe deste grupo de qualquer das duas espécies de peixes cultivados nesta truticultura. Os grupos das *Pseudomonas-Xanthomonas* e, em menor escala, das *Enterobacteriaceae*, foram isolados frequentemente, quer dos peixes cultivados, quer da água e do sedimento da truticultura, embora não tenha sido possível detectar uma correlação nítida entre a abundância de cada um destes grupos nos peixes e nas amostras ambientais.

De facto, embora vários dos trabalhos consultados (Horsley, 1973; Sugita *et al.*, 1985; Sakata, 1989) refiram que a comunidade bacteriana das superfícies externas dos peixes, bem como do seu tubo digestivo, reflete aquela que existe no seu meio ambiente (água e sedimento dos locais onde eles vivem) e, inclusivé, no seu alimento, são vários os factores que podem contribuir para que os grupos bacterianos isolados dos órgãos internos destes vertebrados sejam quantitativa e qualitativamente bastante diversos dos ambientais: o alimento fornecido constitui uma fonte preferencial de determinado(s) grupo(s) bacteriano(s) (Nieto *et al.*, 1984; Cahill, 1990; Inglis *et al.*, 1993); a existência de condições limitativas, como acidez e bílis, no tubo digestivo (Cahill, 1990); a existência de lisozima e de imunoglobulinas no muco presente nas brânquias, no tegumento e no tubo digestivo dos peixes, as quais actuam como mecanismos de defesa contra bactérias (Peleteiro & Richards, 1985; Lindsay, 1986; Cahill, 1990); o uso de antibióticos (Austin & Al-Zahrani, 1988; Cahill, 1990).

Por outro lado, estudos referidos por Cahill (1990) levaram os seus autores a concluir que, se a identificação das bactérias isoladas for efectuada até ao nível específico ou, até, infra-específico, são detectadas diferenças importantes na composição das comunidades microbianas das superfícies dos peixes e do seu meio

ambiente. Deste modo, não surpreende o facto de os grupos bacterianos isolados dos peixes, neste estudo, não terem sido detectados em percentagens semelhantes nas amostras ambientais, apesar de os grupos, em si, serem, geralmente, os mesmos.

Uma situação semelhante à encontrada nos tanques da truticultura A foi observada nas amostragens efectuadas no rio, isto é, uma maior abundância de *Flavobacterium* nos peixes do que na água e no sedimento, ocorrendo o inverso relativamente às *Aeromonas* móveis. Excepções a esta regra foram observadas em Julho, amostragem na qual foram isoladas, maioritariamente, estirpes de *Aeromonas* móveis das bogas (1 estirpe) e, principalmente, das trutas comuns (8 estirpes), e em Agosto, amostragem em que *Flavobacterium* foi largamente predominante nas amostras ambientais e apenas foi isolada uma estirpe deste grupo bacteriano nas trutas comuns, enquanto que das bogas e dos escalos só foram isoladas estirpes de *Aeromonas* móveis (4 e 1 estirpes, respectivamente); curiosamente, nesta última amostragem (Agosto), o grupo das *Aeromonas* móveis não foi detectado na água do rio.

Estas diferenças observadas nos números de *Aeromonas* móveis detectadas nas amostras ambientais, relativamente ao pequeno número detectado nos peixes, podem estar relacionadas com uma maior selectividade das defesas dos peixes contra algumas das estirpes de *Aeromonas* móveis; é interessante, porém, notar o facto de Fouz *et al.* (1990) não terem encontrado, no muco de trutas arco-íris, qualquer actividade contra estirpes de *Vibrio* sp., *Aeromonas hydrophila*, *A. salmonicida* e *Yersinia ruckeri*. No entanto, esta explicação poderá não ser facilmente aplicável a *Flavobacterium*, pois este grupo tem também algumas estirpes potencialmente patogénicas para os peixes, tal como o grupo das *Aeromonas* móveis.

Poderá, todavia, ter ocorrido uma variação temporal nas estirpes destes (e de outros) grupos bacterianos, estirpes essas com diferentes graus de patogenicidade para os peixes. O facto de as identificações, neste trabalho, não terem podido ser efectuadas até à espécie, devido ao elevado número de estirpes isoladas, não permitiu verificar a veracidade, ou não, desta hipótese.

O grupo das *Pseudomonas-Xanthomonas* foi detectado com frequência, tanto nos peixes selvagens como nas amostras ambientais recolhidas nos dois locais do rio; no entanto, embora este grupo tenha sido encontrado regularmente nos peixes, durante os meses de Fevereiro, Março e Abril, nos meses de Verão (Julho, Agosto e Setembro) quase não o foi (apenas foi isolada uma estirpe, de uma boga, na amostragem de Setembro).

As *Enterobacteriaceae* foram isoladas, mais ou menos esporadicamente, quer dos peixes, quer das amostras ambientais, sem que se tenha detectado qualquer padrão de regularidade. Uma detecção também mais ou menos esporádica de bactérias desta família é referida por Nieto *et al.* (1984); segundo estes autores, "enquanto que *Pseudomonas* e *Aeromonas* constituiram as bactérias mais características da água doce, independentemente do local de amostragem, outros grupos, como o das *Enterobacteriaceae*, parecem ter sido significativamente influenciados pela qualidade da água". Estes autores detectaram, igualmente, algumas estirpes de *Aeromonas*, *Vibrio* e *Pseudomonas* com algum grau de virulência para trutas arco-íris.

Digna de registo é, também, a detecção de *Y. ruckeri* (serótipo O1) na água do rio, junto à saída da truticultura. No entanto, este facto não é inédito, uma vez que Romalde *et al.* (1994a) detectaram esta espécie 15 Km a jusante de uma truticultura galega. Segundo estes autores, este facto pode merecer interpretações diversas. Assim, por um lado, pode tratar-se de uma bactéria nativa, encontrada no rio em condições perfeitamente naturais, capaz de infectar os peixes cultivados através da água que entra na truticultura; por outro lado, esta espécie bacteriana pode ocorrer em peixes cultivados, inclusivé portadores assintomáticos, e ser libertada da piscicultura para o rio. Na opinião dos autores, as estirpes de *Y. ruckeri* que detectaram no rio tiveram origem, provavelmente, na truticultura.

Por outro lado, *Y. ruckeri* era considerada uma bactéria patogénica obrigatória (Poindexter, 1981, *in* Romalde *et al.*, 1994b). No entanto, Romalde *et al.* (1994b) demonstraram que esta bactéria sobrevive por um período superior a três meses, quer em água (doce ou salgada), quer em sedimento. Estes autores concluiram, ainda, que a persistência de *Y. ruckeri* foi mais longa no sedimento do que na água, sendo influenciada pela temperatura e pela salinidade, mas não pelo serótipo ou pela origem das estirpes utilizadas. A sobrevivência desta espécie é, pois, favorecida num ambiente dulciaquícola e a temperaturas baixas (6°C). Também Austin & Allen-Austin (1993) referem trabalhos que demonstraram a capacidade de *Y. ruckeri* sobreviver durante vários meses em águas com salinidades de 0-20‰.

Estas características favorecem a dispersão do microorganismo para o meio ambiente, o qual pode atingir locais consideravelmente distantes da truticultura de origem.

Embora não seja possível afirmar categoricamente que a origem da estirpe de *Y. ruckeri* detectada no rio tenha sido os peixes da truticultura A, as considerações anteriores levam a supor que foi isso, de facto, que ocorreu. Assim sendo, este facto

constitui um exemplo da libertação de agentes patogénicos de unidades de aquacultura para o meio ambiente, com o consequente risco de infecção de animais selvagens e difusão destes agentes patogénicos, inclusivé a outras pisciculturas.

Por outro lado, Romalde *et al.* (1994b) demonstraram, em *Y. ruckeri*, a existência de um estado viável e não cultivável (estado "dormente"), na água de estuário e de lago, após um ou dois meses em condições de escassez de nutrientes. Neste estado "dormente", as células tornaram-se menores, adquirindo a forma aproximada de cocos e reduziram a sua actividade metabólica; no entanto, estas estirpes mantiveram a sua patogenicidade para trutas. O retorno ao estado normal foi realizado adicionando TSB, a uma concentração final de 10%, aos microhabitats utilizados. A existência deste estado "dormente" no qual é mantida a patogenicidade e a longa sobrevivência de *Y. ruckeri* constituem factores muito importantes de risco de contaminação e de disseminação deste microrganismo.

Durante o período de estudo, apenas ocorreu uma epizootia, de furunculose, na truticultura A. Esta doença afectou muito mais intensamente as trutas comuns do que as trutas arco-íris, quase não se fazendo sentir nestas. Esta observação não é, de modo algum, surpreendente, pois vários autores referem que as trutas arco-íris são bastante resistentes à furunculose, ao contrário do que acontece com as trutas comuns (McCarthy & Roberts, 1980; Austin & Allen-Austin, 1993).

É importante reafirmar o facto de que as estirpes de *A. salmonicida* que foi possível isolar neste trabalho o foram de exemplares doentes, não tendo esta espécie bacteriana sido detectada em peixes aparentemente saudáveis, cultivados ou selvagens, nem em qualquer das amostras ambientais. Este facto torna oportuna a discussão sobre a possível origem desta bactéria na truticultura A. Tradicionalmente, *A. salmonicida* tem sido definida como uma bactéria patogénica obrigatória (Austin & Allen-Austin, 1993). No entanto, vários autores apresentam evidências de que esta bactéria é capaz de sobreviver, por períodos prolongados, no meio ambiente, quer em água (salgada ou, principalmente, doce), quer em sedimento (McCarthy & Roberts, 1980; Michel & Dubois-Darnaudpeys, 1980; Austin & Allen-Austin, 1993; Ford, 1994).

Por outro lado, a existência de peixes portadores assintomáticos desta bactéria é considerada uma das vias mais importantes de infecção, tal como, evidentemente, o contacto com peixes doentes (McCarthy & Roberts, 1980; Austin & Allen-Austin, 1993).

Um outro problema associado à detecção de *A. salmonicida* em peixes portadores assintomáticos e em amostras ambientais é a falta de métodos de detecção

suficientemente eficazes. Este problema deve-se, principalmente, à dificuldade de detectar este microorganismo em culturas mistas, devido à competição com outros microorganismos e à inibição que sofre por parte destes (Michel & Dubois-Darnaudpeys, 1980; Austin & Allen-Austin, 1993). No entanto, Ford (1994) desenvolveu um método, que envolve filtração da água e incubação em meio CBB ("Coomassie Brilliant Blue"), o qual permite a detecção de *A. salmonicida* em amostras de água, por vezes mesmo antes de se desenvolverem sintomas de furunculose. Assim, o isolamento de *A. salmonicida* unicamente de peixes doentes poderá ser interpretado como uma evidência de que, de facto, esta bactéria é patogénica obrigatória, mas, por outro lado, também pode ter sido devida à inadequação dos meios de detecção usados, os quais, eventualmente, não foram capazes de permitir o isolamento e identificação desta bactéria em culturas mistas.

Um dado importante na interpretação desta epizootia pode ser o facto de Saraiva *et al.* (1989) terem observado uma outra epizootia, também de furunculose, nesta mesma truticultura, o que constituiu a descoberta de *A. salmonicida*, pela primeira vez, em Portugal. É possível que o estabelecimento de exemplares portadores, aquando dessa primeira epizootia, seja responsável pela permanência da bactéria na truticultura, a qual é capaz de desencadear a doença quando eventuais condições de stress tornam as defesas dos peixes menos eficazes. Neste aspecto, os principais exemplares portadores são, provavelmente, trutas comuns. No entanto, não se pode pôr de parte a possível sobrevivência da bactéria no ambiente, na água ou no sedimento, a partir do qual passaria, de novo, aos peixes; porém, a ter acontecido esta sobrevivência, ela foi muito mais longa do que os períodos de vários meses referidos por vários autores (Michel & Dubois-Darnaudpeys, 1980; Austin & Allen-Austin, 1993).

Considerando os resultados globais obtidos na truticultura B (Tabelas 3.1.4 e 3.1.6, e Figuras 3.1.13 e 3.1.14), não é, de um modo geral, possível detectar padrões nítidos na distribuição dos diferentes grupos bacterianos pelos peixes saudáveis (cultivados e selvagens) e pelas amostras ambientais. No entanto, observa-se, tal como na truticultura A, uma menor abundância das *Aeromonas* móveis nos peixes (quinto grupo mais abundante nas trutas arco-íris cultivadas, e terceiro nos peixes selvagens, representando, respectivamente, 14% e 17% do total) do que nas amostras de água e de sedimento (onde este grupo predominou completamente, sendo sempre o mais abundante, excepto na água da jaula 2, na qual foi o segundo mais abundante).

Nesta truticultura, o grupo das *Enterobacteriaceae* foi isolado com grande regularidade, quer dos peixes, cultivados e selvagens, quer das amostras ambientais, estando quase sempre entre os três grupos bacterianos mais abundantes.

Foram detectadas estirpes de *Y. ruckeri* em peixes aparentemente saudáveis (serótipos O1 e O3) e, sobretudo, em amostras ambientais (principalmente serótipo O3). Especialmente notável foi o isolamento desta espécie bacteriana como a segunda ou terceira mais abundante no sedimento situado por baixo das três jaulas amostradas (constituindo, nos três casos, cerca de 16% do total de bactérias detectadas). Estas percentagens elevadas de *Y. ruckeri* no sedimento da truticultura B devem-se principalmente à abundância desta espécie na amostragem de Março, na qual constituiu o grupo mais abundante. O facto de *Y. ruckeri* ter sido detectada em maiores percentagens no sedimento do que na água sugere que o sedimento poderá funcionar como reservatório desta espécie bacteriana, a partir do qual esta reentra em suspensão na água. A descoberta de que a sobrevivência desta espécie é maior no sedimento de água doce a baixa temperatura (6°C) do que na água a temperatura mais elevada (Romalde *et al.*, 1994b) apoia esta interpretação. De facto, os números de CFU (Unidades Formadoras de Colónias; "Colony Forming Units") que os autores encontraram no sedimento foram sempre superiores aos encontrados na água, em 2 ou 3 ordens de magnitude (logaritmos decimais); por outro lado, uma das estirpes persistiu no sedimento do rio, e permaneceu viável, durante mais de 7 meses. De referir que os mesmos autores verificaram que a sobrevivência de *Y. ruckeri* no microhabitat lacustre foi bastante inferior à observada no microhabitat de rio, o que consideraram ser um efeito das elevadas concentrações de algumas substâncias, nomeadamente sulfatos, na água e no sedimento do lago.

No entanto, é bem conhecida a existência de exemplares de peixes que são portadores assintomáticos desta espécie bacteriana (Romalde, 1992; Furones *et al.*, 1993; Austin & Allen-Austin, 1993), os quais constituem reservatórios desta bactéria.

Tal como se verificou na truticultura A, também na truticultura B não foi possível detectar uma correlação nítida entre os grupos bacterianos isolados dos peixes e os isolados das amostras ambientais ao longo das amostragens mensais (Figuras 3.1.15 a 3.1.19 e 3.1.27 a 3.1.32). As duas únicas excepções a esta "regra" ocorreram nos meses de Abril e Julho. Assim, em Abril, o grupo das *Pseudomonas-Xanthomonas* foi o mais abundante na água das três jaulas amostradas, e, também, nos peixes selvagens, estando, ainda, presente nos peixes saudáveis da truticultura; em Julho, o grupo das *Enterobacteriaceae* e, em menor grau, também o das *Aeromonas* móveis, foram, geralmente, os dois grupos mais abundantes, quer nos peixes saudáveis

cultivados, quer nos peixes selvagens, e, ainda, nas amostras de água e de sedimento. Nos restantes meses, não se observou uma concordância nos grupos bacterianos predominantes nos peixes e nas amostras ambientais.

Os grupos bacterianos detectados nos peixes cultivados com aparência saudável foram os mesmos que foram detectados, também, nos peixes doentes, embora as quantidades relativas tenham sido diferentes (Tabela 3.1.5). As principais diferenças observaram-se nos grupos *Pseudomonas-Xanthomonas* (o mais abundante nos peixes saudáveis e, apenas, o quinto mais abundante nos peixes doentes), *Flavobacterium* (terceiro mais abundante nos peixes saudáveis e o mais adundante nos doentes) e *Aeromonas* móveis (quinto mais abundante nos peixes saudáveis e terceiro nos doentes); o grupo das *Enterobacteriaceae* foi isolado de peixes saudáveis e doentes na mesma percentagem (20%).

Nos peixes selvagens foi encontrada uma menor diversidade de grupos bacterianos (não foram detectados *Y. ruckeri* e *Staphylococcus-Micrococcus*). Este facto poderá dever-se a uma eventual infecção com *Y. ruckeri* através de peixes importados, enquanto que os cocos Gram + podem ter sido provenientes do alimento fornecido às trutas cultivadas. Inglis *et al.* (1993) referem a infecção de várias espécies de peixes selvagens por cocos Gram +, bem como a sobrevivência destas bactérias, durante 6 meses, em peixes (*Ammodytes personatus*) congelados, usados na alimentação de espécies piscícolas cultivadas. Estes factos, segundo os autores, indicam que os alimentos contaminados podem constituir a principal fonte de infecções por *Streptococcus* em peixes cultivados, podendo os sobreviventes, também, constituir reservatórios para futuras infecções.

Nos peixes selvagens, também as percentagens em que foram detectados os grupos bacterianos diferem das percentagens em que estes grupos foram encontrados nos peixes cultivados; estas diferenças observam-se, quer em relação aos peixes cultivados saudáveis, quer relativamente aos doentes. Assim, embora as *Enterobacteriaceae* constituam 21% do total de bactérias isoladas dos peixes selvagens (ocupando o segundo lugar em termos de abundância, tal como nos peixes cultivados), o grupo predominante foi *Acinetobacter-Moraxella*, sendo *Aeromonas* móveis, *Pseudomonas-Xanthomonas* e *Flavobacterium*, respectivamente, os terceiro, quarto e quinto mais abundantes.

De entre os compostos antimicrobianos utilizados no estudo da sensibilidade/resistência de estirpes bacterianas a estas substâncias, foi à nitrofurantoína que se observaram mais resistências. De facto, em ambas as truticulturas, foram encontradas elevadas percentagens de estirpes resistentes a esta

substância, em todos os grupos (71% a 100%), excepto nas *Aeromonas* móveis, que apresentaram percentagens de resistência bastante baixas (16% na truticultura A e 6% na B).

Relativamente à ampicilina, as percentagens de resistência encontradas foram máximas no grupo das *Aeromonas* móveis (100%, em ambas as truticulturas); todavia, este facto não é surpreendente, pois, das 6 espécies de *Aeromonas* móveis consideradas por Carnahan *et al.* (1991), apenas uma (*A. trota*) é referida pelos autores como sendo sensível à ampicilina. No conjunto dos grupos restantes, detectaram-se percentagens de estirpes resistentes mais elevadas na truticultura B (67% a 80%) do que na A (30% a 60%).

As percentagens de resistência ao cloranfenicol foram bastante baixas (0% a 20%) nos grupos de bactérias fermentativas, bem como em *Flavobacterium* na truticultura A (11%). Curiosamente, neste mesmo grupo, mas na truticultura B, a percentagem de estirpes resistentes foi bastante mais elevada (57%), o mesmo se verificando no grupo das *Pseudomonas-Xanthomonas*, nas duas truticulturas (60% e 80%).

As resistências à estreptomicina foram detectadas em percentagens bastante variáveis (20% a 78%), não se observando um padrão claro nessa variação. Uma variabilidade apreciável foi, também, observada em relação à oxitetraciclina. No entanto, as percentagens de resistência nunca ultrapassaram, neste caso, 40% (este valor máximo foi encontrado no grupo das *Pseudomonas-Xanthomonas*, nas duas truticulturas).

Quanto às quinolonas, detectaram-se percentagens de resistência de um modo geral mais elevadas ao ácido oxolínico do que à norfloxacina. Esta situação era, aliás, previsível, tendo em conta o facto de a norfloxacina estar disponível há menos tempo (de modo que menos resistências se terão desenvolvido contra este composto) e, também, ao facto de se tratar de uma quinolona fluorada; as quinolonas fluoradas, com efeito, têm uma actividade antimicrobiana mais intensa do que as quinolonas não fluoradas, como o ácido oxolínico (Wingard *et al.*, 1991). Contudo, no grupo *Flavobacterium* da truticultura A, a percentagem de resistência detectada em relação à norfloxacina (67%) foi superior à encontrada relativamente ao ácido oxolínico (56%), situação esta que é difícil de explicar. As percentagens de resistência encontradas foram relativamente elevadas nos grupos de bactérias oxidativas, quer no caso do ácido oxolínico (48% a 56% em *Flavobacterium* e 80 a 100% em *Pseudomonas-Xanthomonas*), quer da norfloxacina (38 a 67% em *Flavobacterium* e 30% a 60% em *Pseudomonas-Xanthomonas*). Nas bactérias fermentativas, as percentagens detectadas

foram consideravelmente mais baixas (0% a 33% para o ácido oxolínico e 0% a 7% para a norfloxacina).

Também foram detectadas percentagens de resistência ao trimetoprim-sulfametoxazol mais elevadas nos grupos de bactérias oxidativas (50% a 80% em *Pseudomonas-Xanthomonas* e 74% a 76% em *Flavobacterium*) do que nos fermentativos (0% a 11% de estirpes resistentes, apenas).

Verifica-se, portanto, que alguns antibióticos foram capazes de impedir o crescimento de quase todas as estirpes de bactérias fermentativas. A norfloxacina foi o antibiótico que se revelou como o mais eficaz contra as estirpes de *Aeromonas* móveis, sendo, igualmente, eficaz contra a totalidade das *Enterobacteriaceae*; nesta família, o crescimento bacteriano também foi inibido por completo por outros antibióticos, nomeadamente o trimetoprim-sulfametoxazol e, na truticultura A, ainda o ácido oxolínico e a oxitetraciclina. No grupo das *Aeromonas* móveis, para além da norfloxacina, também o trimetoprim-sulfametoxazol, o cloranfenicol e, curiosamente, a nitrofurantoína, se revelaram bastante eficazes.

Em relação às bactérias oxidativas, a eficácia dos diferentes compostos antimicrobianos foi consideravelmente menor. À excepção do cloranfenicol, na truticultura A (11% de estirpes resistentes), e da oxitetraciclina, na truticultura B (24% de estirpes resistentes), ambos relativamente a *Flavobacterium*, as percentagens de estirpes resistentes foram sempre iguais ou superiores a 30%. Recorde-se que outros autores referiram, já, ser difícil o tratamento de septicémias causadas por *Pseudomonas* com as drogas normalmente usadas em aquacultura (Toranzo *et al.*, 1992, 1993).

Deste modo, enquanto que eventuais epizootias provocadas por bactérias dos grupos *Enterobacteriaceae* e *Aeromonas* móveis poderiam ser controladas, com relativa facilidade, por antibióticos como trimetoprim-sulfametoxazol ou, principalmente, norfloxacina, no caso das bactérias oxidativas tal controle seria bastante mais problemático, tornando-se particularmente necessário realizar antibiogramas antes de qualquer antibiótico poder ser fornecido às trutas.

Durante o período de estudo, apenas na truticultura A foi usado um antibiótico (furazolidona), para controlar a epizootia de furunculose que ocorreu em Agosto. O uso deste nitrofurano influenciou, muito provavelmente, os grupos microbianos detectados, neste mês, nos peixes e, principalmente, na água e no sedimento. De facto, observou-se um predomínio de *Flavobacterium* na generalidade dos locais de amostragem, cortando, frequentemente, a tendência de predomínio do grupo das

Aeromonas móveis observada nos meses anteriores e logo retomada em Setembro; por outro lado, na truticultura B, não se observou uma correspondente interrupção, em Agosto, da tendência de predomínio de *Aeromonas* móveis, o que poderá estar relacionado com o facto de não ter sido usado qualquer antibiótico, nesta truticultura, durante o período de estudo. A propósito desta provável influência do uso de furazolidona sobre os grupos bacterianos detectados, é importante relembrar a elevada sensibilidade das *Aeromonas* móveis à nitrofurantoína (outro nitrofurano), em contraste com o que foi observado relativamente aos restantes grupos de bactérias (nomeadamente em relação a *Flavobacterium*). Esta elevada sensibilidade das *Aeromonas* móveis aos nitrofuranos poderá, assim, ter sido responsável pela diminuição selectiva nos números de *Aeromonas* móveis, permitindo um aumento nas proporções relativas dos restantes grupos bacterianos, mais resitentes a estes compostos antimicrobianos.

Para além da furazolidona, que tem sido usada com alguma frequência, quer na truticultura A, quer na B, também outros antibióticos, nomeadamente oxitetraciclina, o têm sido, embora esporadicamente.

O uso de antibióticos em aquacultura, inibindo as bactérias que lhes são sensíveis, selecciona as estirpes resistentes (Cahill, 1990). Por outro lado, a possibilidade de transmissão de resistências a variadíssimos compostos antimicrobianos codificados por plasmídeos (factores R) de umas estirpes bacterianas a outras (inclusivé de espécies diferentes), constitui um problema importante no controle de tais microorganismos. Dentro dos quatro grupos bacterianos cujos padrões de sensibilidade/resistência a antibióticos foram estudados, têm sido encontradas frequentemente estirpes possuidoras de factores de resistência à maior parte dos compostos antimicrobianos utilizados neste estudo (Krieg & Holt, 1984; Toranzo *et al.*, 1983a, 1984, 1985, 1993). A presença/ausência destes factores poderá ser responsável pela variabilidade encontrada nas percentagens de resistência determinadas para cada antibiótico, dos quatro grupos de bactérias estudados.

3.2. CARACTERIZAÇÃO DAS BACTÉRIAS CAUSADORAS DE DOENÇAS DE DECLARAÇÃO OBRIGATÓRIA: Aeromonas salmonicida e Yersinia ruckeri

3.2. CARACTERIZAÇÃO DAS BACTÉRIAS CAUSADORAS DE DOENÇAS DE DECLARAÇÃO OBRIGATÓRIA: *Aeromonas salmonicida* e *Yersinia ruckeri*

3.2.1. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1.1. Identificação e Sensibilidade a Substâncias Antimicrobianas

As estirpes de *A. salmonicida* e de *Y. ruckeri* incluídas neste estudo foram isoladas durante o estudo epidemiológico efectuado nas truticulturas A e B e descrito no capítulo 3.1 desta dissertação.

Foram consideradas presumíveis estirpes de *A. salmonicida* os bacilos curtos, Gram negativos, fermentativos, imóveis, catalase e oxidase positivos, possuidores de desidrolase da arginina, mas não possuidores de descarboxilase da ornitina, e capazes de produzir um pigmento castanho difusível em BHIA. De entre as bactérias que foram identificadas como *Enterobacteriaceae*, foram seleccionadas como presumíveis *Y. ruckeri* as estirpes que descarboxilavam a lisina e a ornitina, mas não hidrolisavam a arginina. Todas estas estirpes foram submetidas a caracterização bioquímica, incluindo API 20E e testes convencionais em tubo e em placa, e a testes serológicos de aglutinação em lâmina de vidro (ver capítulo 3.1). Adicionalmente, foi utilizado o meio SW para testar a capacidade das estirpes de *Y. ruckeri* de hidrolisarem o Tween 80.

Utilizando a técnica de difusão em placa, em Agar de Mueller-Hinton (MHA), foi testada a resistência/sensibilidade destas estirpes às seguintes substâncias antimicrobianas: ampicilina (10 µg), tetraciclina (30 µg), oxitetraciclina (30 µg), cloranfenicol (30 µg), estreptomicina (10 µg), furazolidona (300 µg), trimetoprim-sulfametoxazol (TMX-SMX; 25 µg), ácido oxolínico (2 µg), norfloxacina (10 µg) e enrofloxacina (5 µg). No caso de *A. salmonicida*, foi ainda incluido nesta análise o agente vibriostático O/129 (150 µg).

3.2.1.2. Análise de Lipopolissacarídeos e de Proteínas da Envoltura Celular

3.2.1.2.1. Em Geles de Poliacrilamida-SDS

3.2.1.2.1.1. Lipopolissacarídeos (LPS)

Os LPS foram obtidos segundo o método descrito por Hitchcok & Brown (1983). Após serem recuperadas por centrifugação de 1,5 ml de culturas em meio líquido, as células bacterianas ressuspenderam-se em "Final Sample Buffer" (FSB) 2X

e ferveram-se durante 5 minutos, antes de se proceder ao seu tratamento com proteinase K (1 hora a 60 °C) e a nova fervura rápida.

As amostras foram, então, submetidas a electroforese em geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) que foram preparados basicamente de acordo com a técnica descrita por Laemmli (1970). A concentração final de acrilamida foi de 12,5% na porção separadora do gel ("Running Gel") e de 3% na porção concentradora do mesmo ("Stacking Gel"), em Tris-HCl. Para facilitar a polimerização da acrilamida, foram usados TEMED (N,N,N',N'-Tetrametil-Etilenodiamina) e persulfato de amónio. As electroforeses foram levadas a cabo, em tampão Tris-glicina, numa cuveta vertical LKB 2001 ligada a uma fonte de alimentação SAVANT CVR-300, tendo-se processado a uma corrente constante de 15 mA durante 15 horas.

A revelação dos geles foi efectuada através da técnica de coloração com nitrato de prata descrita por Tsai & Frasch (1982). Terminada a electroforese, procedeu-se à fixação dos geles numa solução aquosa de etanol e ácido acético (durante 12 horas) e à sua oxidação na mesma solução suplementada com ácido periódico (a 0,7%). Após 3 lavagens em água destilada, foi realizada a coloração com uma solução aquosa de nitrato de prata contendo hidróxido de sódio e amoníaco, seguindo-se novas lavagens em água destilada. Finalmente, os geles foram revelados usando uma solução aquosa de ácido cítrico e formaldeído, parando-se a reacção por adição de metanol a 50% em água destilada.

Os protocolos detalhados para a obtenção dos LPS, electroforese e revelação dos geles são apresentados em anexo, no final desta dissertação.

3.2.1.2.1.2. Proteínas da Envoltura Celular (Totais e de Membrana Externa)

A obtenção das proteínas totais da envoltura celular foi conseguida seguindo, em linhas gerais, o método de Crosa & Hodges (1981). As células bacterianas recuperadas após centrifugação de culturas em meio líquido foram sujeitas a uma ressuspensão em 3 ml de Tris-HCl 10 mM (pH 8,0) com NaCl (0,3%) e à ruptura através de ultra-sons. Cada amostra era, então, dividida por 2 tubos Eppendorf. As células intactas eventualmente existentes, ainda, na suspensão eram eliminadas por centrifugação (12000 r.p.m. durante 3 minutos) e transferência do sobrenadante para para novos tubos Eppendorf. Após nova centrifugação (17000 r.p.m. durante 60 minutos), o sobrenadante era rejeitado, consistindo o sedimento nas envolturas celulares totais, que se ressuspenderam em água destilada. Um dos tubos de cada amostra foi armazenado a -20 °C até à sua utilização, enquanto que o segundo tubo foi submetido ao tratamento destinado à obtenção de proteínas de membrana externa.

Este tratamento consistiu na solubilização diferencial da membrana citoplasmática pelo detergente iónico lauril-sarcosinato-de-sódio ("sarkosyl") em tampão Tris-HCl (20 mM, pH 8,0), segundo o procedimento de Filip *et al.* (1973). Após incubação durante 20 minutos à temperatura ambiente e centrifugação (17000 r.p.m., 60 minutos), o precipitado (proteínas de membrana externa) ressuspendeu-se em água destilada e armazenou-se a -20 °C até ao seu uso.

As amostras de proteínas totais e de membrana externa foram submetidas a electroforese em geles de poliacrilamida-SDS, sob as mesmas condições já referidas para a análise de lipopolissacarídeos. No entanto, imediatamente antes da electroforese, foram fervidas (5 minutos) na presença de tampão FSB 2X.

A revelação dos geles foi realizada através da coloração com azul Coomassie (Sigma), numa solução aquosa contendo também isopropanol e ácido acético, à qual se seguiu uma descoloração numa solução de ácido acético a 5% em água destilada.

Os protocolos detalhados para a análise de proteínas totais e de membrana externa são apresentados, juntamente com os relativos aos LPS, em anexo, no final desta dissertação.

3.2.1.2.2. Transferência a Membranas de Nitrocelulose ("Western Blot") e Detecção Imunológica

Os ensaios de transferência electroforética de lipopolissacarídeos e de proteínas da envoltura celular a membrana de nitrocelulose ("Western Blot") foram realizados de acordo com os procedimentos de Towbin *et al.* (1979).

Após a separação electroforética dos LPS e das proteínas em geles de poliacrilamida-SDS (tal como na análise descrita no ponto anterior), estes componentes bacterianos foram transferidos a membranas de nitrocelulose (0,45 µm, BioRad) mediante electroforese em tampão Tris-Glicina-Metanol (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%; pH 8,3) (0,1 A durante toda a noite + 0,2 A durante 1-2 horas), utilizando uma cuveta TRANSPHOR 2005 (Pharmacia - LKB).

Após a transferência, as membranas de nitrocelulose bloquearam-se (1 hora) em tampão Tris-salino ("Tris-Buffered Saline"; TBS) (Tris-HCl 20 mM e NaCl 500 mM; pH 7,5) suplementado com gelatina (BioRad) a 3% (p/v) e lavaram-se 3 vezes com TTBS (TBS contendo Tween 20). Seguiu-se a incubação com o anti-soro correspondente diluído 1:500 numa solução de TBS suplementado com gelatina a 1% (p/v). Depois de outras 2 lavagens em TTBS, procedeu-se à incubação com soro

comercial anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina (BioRad), diluído (cerca de 1:6000) igualmente com TBS contendo gelatina a 1%. Retirado o excesso desta 2ª solução de anticorpo, por lavagens com TTBS e com TBS, as membranas foram reveladas usando uma solução de azul de tetrazolium ("Nitroblue tetrazolium", NBT; 0,3 mg/ml) e 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (0,15 mg/ml) em tampão carbonato $NaHCO_3$ 0,1 M, $MgCl_2$ 1,0 M; pH 9,8), detendo-se a reacção de revelação mediante lavagens com água destilada.

O protocolo utilizado para a transferência e detecção imunológica é apresentado em anexo.

3.2.1.3. Detecção de Plasmídeos

O conteúdo plasmídico das estirpes analisadas foi estudado usando duas técnicas diferentes para a extracção destes fragmentos de DNA extracromossómico, o método de Kado & Liu (1981) modificado por Toranzo *et al.* (1983a) e o método descrito por Birnboim & Doly (1979).

No primeiro destes métodos, as células resultantes da centrifugação de culturas em meio líquido ressuspendem-se em solução de lise, com SDS e pH alcalino (12,4). Para facilitar a lise das bactérias, a suspensão é incubada a 55-60 °C durante 45-90 minutos. Por outro lado, a acção do SDS a elevadas temperaturas provoca também a desnaturação do DNA cromossómico, mas não do plasmídico. Segue-se uma desproteinização com fenol-clorofórmio (1:1). Após centrifugação (12000 r.p.m., 10 minutos), transfere-se a fase aquosa (que contém o DNA plasmídico) a outro tubo Eppendorf e adiciona-se-lhe 5-7 µl de solução marcadora ("Stop-Mix") antes de se proceder à electroforese.

No método de Birnboim & Doly (1979), a lise celular é conseguida através da suspensão em solução de lise (que contém EDTA e lisozima) seguida de um tratamento com uma solução de NaOH 0,2 N contendo SDS a 1% (lise alcalina). O DNA cromossómico, juntamente com algumas proteínas, é eliminado com uma solução gelada de acetato de potássio (pH 4,8), centrifugação e transferência do sobrenadante a outro tubo Eppendorf. Este submete-se à desproteinização com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico. Após nova centrifugação e transferência da fase aquosa (superior) a novo tubo Eppendorf, o DNA existente nesta é precipitado por adição de 2 volumes de etanol absoluto frio e incubação em gelo (10 minutos) e posterior centrifugação (12000 r.p.m., 15 minutos). Rejeitado o sobrenadante, adiciona-se etanol a 70% frio e procede-se a nova centrifugação. O sedimento (DNA plasmídico) é,

então, bem seco antes de se ressuspender em tampão Tris-EDTA (pH 8,0). Finalmente, adiciona-se "stop-mix" e procede-se à electroforese.

A electroforese das amostras obtidas por ambos os métodos foi levada a cabo em geles de agarose a 0,7% (Tipo II, Sigma) e tampão Tris-Acetato-EDTA (tampão TAE) numa cuveta horizontal, permanecendo a uma voltagem constante de 40 V durante toda a noite.

As bandas de DNA foram reveladas submergindo os geles numa solução do corante fluorescente brometo de etídio (0,5 μg/ml), visualizadas com um transiluminador de luz ultravioleta LJS-8TI (LaJolla Scientific Co.) e fotografadas através de um filtro vermelho Wratten 23A em filme Kodak Plus-X-Pan.

Nas electroforeses foram incluidos, como marcadores de massa molecular, os plasmídeos da estirpe V517 de *Escherichia coli* (entre 1,4 e 35,8 Md). A massa molecular dos plasmídeos detectados foi estimada mediante a construção de uma recta de calibração definida pela mobilidade relativa dos plasmídeos de referência frente ao logaritmo da sua massa molecular.

Em anexo são apresentados os protocolos usados relativos à extracção (pelos dois métodos), electroforese e detecção de plasmídeos.

3.2.1.4. Estudo do Genoma

3.2.1.4.1. Extracção do DNA

A extracção do DNA bacteriano foi efectuada basicamente segundo a metodologia de Marmur (1961), descrita pormenorizadamente no protocolo que é apresentado em anexo. A lise das células é levada a cabo através do EDTA e da lisozima, e, posteriormente, da acção do Triton X-100 (detergente não iónico) e do SDS (detergente fortemente aniónico) a uma temperatura elevada (55-60 °C). A purificação do DNA é iniciada por 2 tratamentos sucessivos (desproteinizações) com clorofórmio-isopropanol (24:1), a que se segue a precipitação, com etanol absoluto frio, deste ácido nucleico presente no sobrenadante, sua recolha com vareta de vidro e dissolução em citrato salino sódico diluído (SSC 0,1 X). Procede-se, então, a um tratamento com uma solução de RNAse, prosseguindo-se com mais dois tratamentos de desproteinização sucessivos (clorofórmio-isopropanol, centrifugação, precipitação do DNA com etanol, sua recolha com vareta de vidro e dissolução em SSC 0,1X). A pureza e a concentração do DNA extraído determinam-se espectrofotometricamente por observação da absorvância a 260 (A_{260}) e a 280 nm (A_{280}). Uma A_{260} de 1,0 equivale aproximadamente a 50 μg de DNA/ml. Sempre que a pureza do DNA

extraído não era suficientemente elevada (quociente $A_{260}/A_{280} < 1,8$), procedia-se a um tratamento com pronase seguido de uma nova desproteinização com clorofórmio-isopropanol. No caso de a pureza não ter ainda atingido o nível desejado era efectuado um tratamento alternativo de purificação, pelo qual cada amostra de DNA-SSC 0,1 X era distribuida por tubos Eppendorf e o ácido nucleico precipitado por adição de acetato de amónio 7,5 M e etanol absoluto frio e manutenção a -80 °C durante 30-60 minutos, sendo recuperado por centrifugação (13000 r.p.m. durante 15-30 minutos). Depois de ressuspenso em SSC 0,1 X, realizava-se o tratamento do DNA com pronase e nova precipitação com acetato de amónio e etanol, incubação a -80 °C, centrifugação e ressuspensão em SSC 0,1 X, reavaliando-se, finalmente, a concentração e a pureza.

3.2.1.4.2. Ribotipagem

Uma vez extraído o DNA, este era sujeito a uma concentração por precipitação envolvendo a adição de acetato de amónio e etanol, manutenção a -80 °C e centrifugação (como no tratamento alternativo de purificação referido para a extracção), para além de uma lavagem em etanol a 70% e, depois de rejeitado o sobrenadante, uma secagem por centrifugação dos tubos com a tampa aberta. Finalmente, o DNA era ressuspenso em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE 1X) e a concentração era determinada através da medição da absorvância a 260 nm.

Tendo em conta a concentração de DNA presente em cada amostra, era retirado o volume correspondente a 2 µg, o qual era misturado com 5 µl de tampão enzima, 1 µ l de enzima de restrição e o volume de TAE 1X necessário para perfazer um volume total de 50 µl. A restrição era feita a 37 °C durante toda a noite, sendo parada por adição de solução estabilizadora.

Os fragmentos de DNA obtidos pela restrição eram, então, separados por electroforese em gel de agarose a 1% (Tipo II, Sigma), a 70 V durante 4,5-6 horas. O tampão usado, bem como os restantes procedimentos para a realização desta técnica são semelhantes aos já referidos para a separação electroforética do DNA plasmídico.

Foram, deste modo, testadas várias enzimas de restrição (utilizadas seguindo as recomendações do fabricante), nomeadamente *Xba*I, *Sma*I, *Pvu*I e *Pst*I, no sentido de determinar quais eram as mais adequadas. Os geles destinados a esta observação foram submersos numa solução aquosa de brometo de etídio (0,5 µg/ml) e as bandas de DNA visualizadas com luz ultravioleta, não sendo utilizados para a transferência a membrana de "nylon".

Uma vez determinadas as enzimas de restrição convenientes para utilização com as estirpes a analisar, elas foram usadas para realização integral da técnica. Os geles (não corados pelo brometo de etídio) foram lavados com HCl 0,25 M e o DNA desnaturalizado através de tratamentos com NaOH 0,5 M e com NaCl 1,5 M, seguindo-se uma neutralização com tampão Tris 0,5 M + NaCl 3,0 M, pH 7,0. A transferência dos fragmentos de DNA a membrana de "nylon" ("southern blot") foi efectuada utilizando um sistema de vácuo (Hybaid Vacu-Aid) e seguindo as instruções do fabricante. Depois da transferência, os geles eram corados com brometo de etídio, para confirmar que a transferência estava completa, e as membranas secas ao ar sobre papel de filtro e fixas com luz ultravioleta.

Para a preparação da sonda de DNA, ressuspendeu-se o RNA (16S + 23S) de *E. coli* em água bidestilada tratada com dietil pirocarbonato (DEPC) que, de seguida, se marcou mediante transcrição a cDNA utilizando a transcriptase reversa do vírus de mieloblastoma aviar (M-MLV; Boerhinger Mannheim), "random primers" e uma mistura de hexanucleótidos (Boerhinger Mannheim) marcada com digoxigenina. Esta mistura foi incubada a 37 °C durante toda a noite e a reacção deteve-se por adição de EDTA 0,2 M (pH 8,0). O cDNA marcado (sonda) assim obtido foi precipitado com acetato de amónio 5 M e etanol absoluto frio e incubado a -80 °C durante pelo menos 30 minutos. Após centrifugação e eliminação do sobrenadante, a sonda foi lavada por centrifugação com etanol a 70% frio, seca mediante centrifugação dos tubos com a tampa aberta e ressuspensa em tampão Tris-EDTA (TE; pH 7,4), mantendo-se congelada a -20 °C até ao momento da sua utilização.

As membranas de "nylon", devidamente secas e fixas com luz ultravioleta após a transferência, eram sujeitas a uma pré-hibridação em tampão de hibridação a 68 °C durante 1 hora, seguindo-se a hibridação com a sonda de DNA (diluída em tampão de hibridação) a 56 °C durante toda a noite. Finda a hibridação, os filtros eram lavados com SSC 2X + SDS a 0,1% (à temperatura ambiente) e com SSC 0,1X + SDS a 0,1% (a 68 °C).

Para a detecção imunológica dos locais de hibridação nas membranas de "nylon" estas eram lavadas rapidamente em tampão 1 (ácido maleico 0,1 M + NaCl 0,15 M; pH 7,5) e incubadas durante 30 minutos em tampão 2 (tampão 1 contendo agente bloqueante a 1%). Seguia-se a incubação (30 minutos) em solução de anti-soro conjugado com fosfatase alcalina (diluido em tampão 2) e duas lavagens em tampão de lavagem (Tween 20 a 0,3%, volume/volume, em tampão 1). As membranas eram, então, equilibradas em tampão 3 (Tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl2 50 mM; pH 9,5) antes de se proceder à revelação, em obscuridade, na mesma solução (tampão

3) suplementada com azul de tetrazolium e 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato. A reacção de revelação era parada através da imersão das membranas em tampão 4 (TE, pH 8,0).

Em anexo é apresentado o protocolo seguido para a realização de toda a técnica de ribotipagem.

3.2.1.5. Ensaios de Patogenicidade para Trutas

Estes ensaios foram realizados *in vivo*, em alevins de truta arco-íris (5-6 g) mantidos em tanques de água doce (20 litros) a 18 °C com arejamento, de acordo com a metodologia de Toranzo *et al.* (1983b).

Os inóculos bacterianos foram preparados a partir de culturas frescas em placa, suspendendo uma porção de cada uma dessas culturas em PBS (ph 7,4) estéril a uma concentração inicial aproximada de 10^9 bactérias/ml, estimada por comparação da sua turvação com a dos tubos da escala de McFarland. Desta suspensão inicial foram efectuadas diluições decimais seriadas no mesmo tampão.

O número de células bacterianas viáveis presentes no inóculo (dose real) foi determinado por sementeira directa, em placas de TSA, de 0,1 ml de cada uma das mais altas diluições decimais realizadas.

Os peixes foram inoculados intraperitonealmente com 0,1 ml das suspensões bacterianas (entre 10^2 e 10^8 células/ml), usando 5-7 peixes por dose. Como controle negativo foi usado o mesmo número de peixes inoculados com PBS estéril e como controles positivos a estirpe de referência de *Y. ruckeri* 11.4 e a estirpe de *Vibrio anguillarum* altamente virulenta para truta R82. As mortalidades observadas durante o período de experimentação (10 dias) apenas foram consideradas provocadas pelas bactérias inoculadas quando estas foram recuperadas em cultura pura a partir dos órgãos internos dos peixes moribundos.

O grau de patogenicidade para trutas, expresso como Dose Letal 50% (dose que causa a morte de 50% dos peixes inoculados; DL_{50}), foi determinado de acordo com o método de Reed & Müench (1938), considerando-se três categorias de virulência (Mittal *et al.*, 1980; Santos, 1991):

- estirpes altamente virulentas	$DL_{50}=10^2$-10^5 células
- estirpes debilmente virulentas	$DL_{50}=10^6$-10^7 células
- estirpes avirulentas	$DL_{50}>10^8$ células

3.2.2. RESULTADOS

3.2.2.1. *Aeromonas salmonicida*

3.2.2.1.1. Identificação e Sensibilidade a Substâncias Antimicrobianas

Como já foi referido no capítulo 3.1, as estirpes de *A. salmonicida* estudadas (4) foram isoladas durante uma epizootia de furunculose ocorrida na truticultura A em Julho-Agosto. Os peixes atingidos, todos trutas comuns à excepção de uma truta arco-íris, apresentavam sintomas característicos da doença, incluindo, em alguns exemplares, os furúnculos típicos (ver capítulo 3.1). Das quatro estirpes isoladas, 3 foram-no de trutas comuns e 1 da única truta arco-íris encontrada com furunculose.

Observou-se uma total homogeneidade nos resultados dos testes bioquímicos e fisiológicos, sendo Gram -, imóveis, produtoras de gás de glucose, possuidoras de desidrolase da arginina e de gelatinase, e positivas para as reacções de produção de indol e de redução de nitratos. Estes resultados são indicados na tabela 3.2.1 e são característicos das estirpes típicas de *A. salmonicida*, isto é, de *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*. No sistema API 20E foram obtidos resultados falsos positivos nos testes da β-galactosidase (ONPG) e da descarboxilação da lisina. Os perfis obtidos com este sistema miniaturizado foram 2006104, 3006104 e 6006104, todos codificados como pertencentes a *A. salmonicida* no índice API.

Todas as estirpes apresentaram o mesmo perfil de sensibilidade/resistência a substâncias antimicrobianas, sendo sensíveis a todas excepto ao agente vibriostático O/129 e à estreptomicina.

Esta homogeneidade verificou-se também a nível serológico, com todas as estirpes a proporcionarem uma reacção claramente positiva nos testes de aglutinação, quer com células intactas quer com o antigénio "O", utilizando soro anti-estirpe NF14-2 (*A. salmonicida* subsp. *salmonicida*).

3.2.2.1.2. Análise de Lipopolissacarídeos e de Proteínas da Envoltura Celular

3.2.2.1.2.1. Lipopolissacarídeos

A figura 3.2.1 ilustra os perfis de LPS em geles de poliacrilamida-SDS (a) e respectivo "western blot" usando soro anti-ATCC 33658 (*A. salmonicida* subsp. *salmonicida*) (b).

Tabela 3.2.1 - Perfil fenotípico das estirpes de *A. salmonicida* estudadas.

CARÁCTER	REACÇÃO
Nº de estirpes	4
Gram	-
Mobilidade	-
Oxidase	+
Catalase	+
O/F (Hugh-Leifson)	F
Produção de pigmento castanho	+
ONPG *	-
Hidrólise da arginina	+
Descarboxilação da lisina *	-
Descarboxilação da ornitina	-
Utilização de citrato	-
Redução de nitratos	+
Produção de H_2S	-
Urease	-
TDA	-
Produção de Indol	-
Voges-Proskauer	-
Hidrólise da Gelatina	+
Produção de ácido de:	
Glucose	+
Manitol	+
Inositol	-
Sorbitol	-
Ramnose	-
Sacarose	-
Melibiose	-
Amigdalina	-
Arabinose	-
RESISTÊNCIA/ /SENSIBILIDADE a:	
Agente vibriostático O/129 (150µg)	R (100)
Ampicilina (10µg)	S (100)
Tetraciclina (30µg)	S (100)
Oxitetraciclina (30µg)	S (100)
Cloranfenicol (30µg)	S (100)
Estreptomicina (10µg)	R (100)
Ácido oxolínico (2µg)	S (100)
Furazolidona (300µg)	S (100)
TMX-SMX (25µg)	S (100)
Norfloxacina (10µg)	S (100)
Enrofloxacina (5µg)	S (100)

* - Testes em que foram observadas reacções falsas, positivas ou negativas, com o sistema API 20E.
F - fermentativa; R - resistente; S - sensível.
TMX-SMX = Trimetoprim-sulfametoxazol (23,75µg-1,25µg).
Entre parêntesis são indicadas as percentagens de estirpes sensíveis/resistentes a cada substância antimicrobiana.

No gel pode observar-se, em todas as estirpes, o padrão de LPS típico desta bactéria, com 3-4 zonas principais bem evidentes na região de antigénios "O" de elevado peso molecular para além de se observarem nitidamente as bandas correspondentes aos antigénios "O" de baixo peso molecular. Nas fotografias apresentadas por outros autores, como, por exemplo, Griffiths & Lynch (1989), estes últimos são frequentemente pouco ou nada visíveis. Na figura 3.2.1.a é visível, ainda, o núcleo oligossacarídeo dos LPS ("core"), isto é, a banda de migração máxima.

No "western blot" (Figura 3.2.1.b) é notório, tal como no gel, um padrão de bandas imunorreactivas igual para todas as estirpes, sendo nitidamente mais imunogénicos os antigénios "O" de pesos moleculares mais elevados, apesar de também se observar alguma reacção com os de baixo peso molecular.

3.2.2.1.2.2. Proteínas da Envoltura Celular

Todas as estirpes apresentaram padrões de proteínas de membrana externa (figura 3.2.2.a) iguais, e iguais ao da estirpe NF 14-2, usada como estirpe de referência nesta análise.

No "western blot" (Figura 3.2.2.b) observa-se, de modo semelhante, o mesmo padrão de reactividade. Por outro lado, revelaram-se mais imunogénicas as proteínas de elevado peso molecular, embora também o sejam algumas de massa molecular baixa.

Quando se analisaram as proteínas totais da envoltura celular (gel e "western blot"), os resultados obtidos foram em tudo semelhantes aos referidos para as proteínas de membrana externa.

3.2.2.1.3. Conteúdo Plasmídico e Análise do DNA Cromossómico

3.2.2.1.3.1. Estudo do Conteúdo Plasmídico

Um único perfil plasmídico (ilustrado na figura 3.2.3) foi detectado nas estirpes de *A. salmonicida* estudadas neste capítulo, o qual foi observado também na estirpe (ATCC 14174; *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*) usada como referência. Este perfil consiste na presença de quatro plasmídeos, com pesos moleculares de 4,2 Md, 3,6 Md, 3,5 Md e 3,4 Md; este conjunto de 4 plasmídeos é, segundo vários autores, característico da grande maioria das estirpes desta subespécie bacteriana (Bast *et al.*, 1988; Toranzo *et al.*, 1991; Nielsen *et al.*, 1993). Para além destas, na figura 3.2.3 observam-se outras tantas bandas, as quais estão situadas um pouco mais acima e espelham o conjunto já referido, correspondendo às suas formas abertas ("OC forms").

3.2.2.1.3.2. Ribotipagem

Mediante a aplicação da técnica de ribotipagem ao DNA das quatro estirpes de *A. salmonicida* analisadas, apenas foram detectados padrões diferentes quando foi usada a enzima de restrição *Xba*I. De facto, com esta enzima, foram encontrados dois padrões, que, no entanto, são muito semelhantes entre si (Figura 3.2.4), enquanto que apenas um padrão foi detectado com cada uma das restantes enzimas de restrição usadas (*Sma*I, *Pvu*I e *Pst*I). A figura 3.2.5 ilustra o padrão obtido com a enzima *Sma*I.

3.2.2.1.4. Patogenicidade para Trutas

A estirpe de *A. salmonicida* que foi usada em ensaios de patogenicidade para trutas arco-íris revelou ser altamente virulenta para esta espécie de peixe, tendo sido estimada em 6,6 X 10^2 células a sua Dose Letal 50% (DL_{50}), enquanto que a DL_{50} das estirpes de referência usadas como controles positivos foi superior (8 X 10^2 células de *V. anguillarum* R82 e 3,3 X 10^4 células de *Y. ruckeri* 11.4).

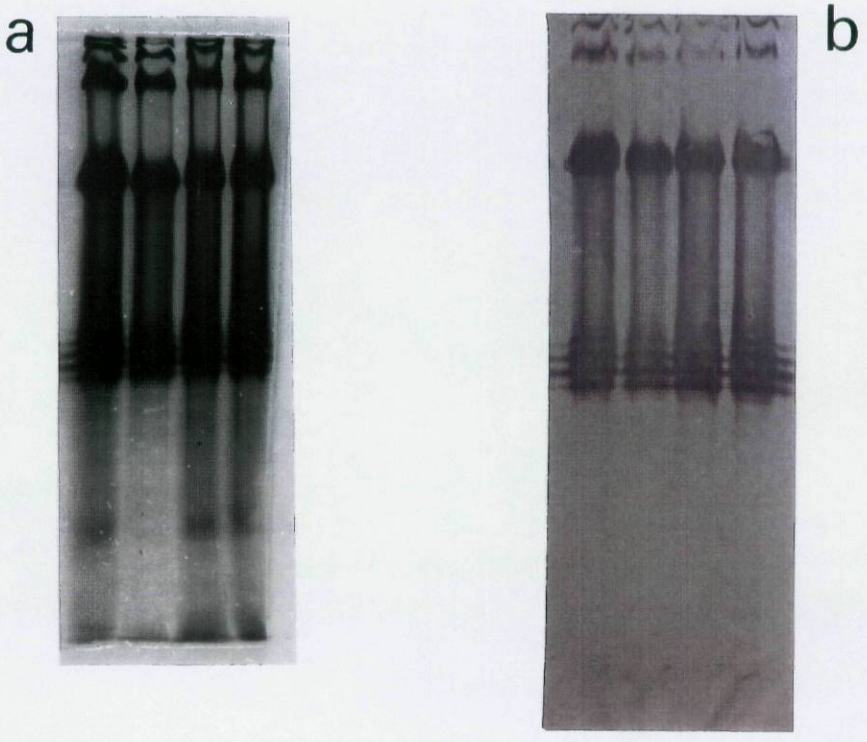


Figura 3.2.1 - Padrões electroforéticos em gel de poliacrilamida-SDS (a) e respectiva análise mediante "western blot" (b) dos lipopolissacarídeos das estirpes de *A. salmonicida* isoladas na truticultura A.

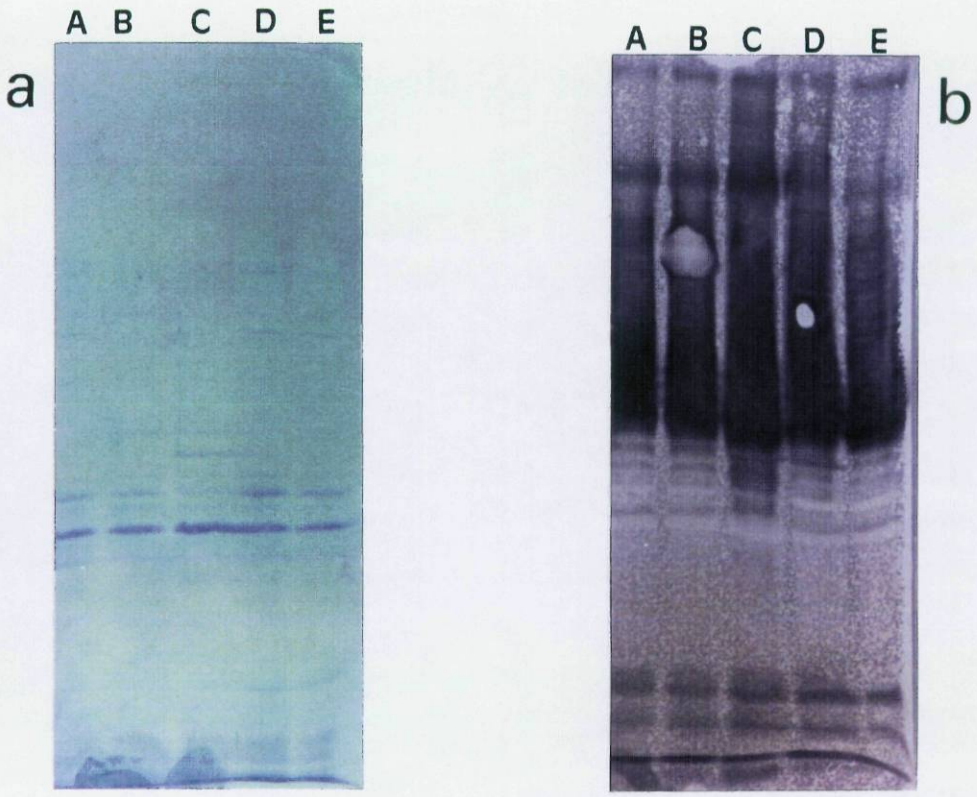


Figura 3.2.2 - Padrões electroforéticos em gel de poliacrilamida-SDS (a) e respectiva análise mediante "western blot" (b) das proteínas de membrana externa das estirpes de *A. salmonicida* isoladas na truticultura A (Colunas A, B, D e E). Coluna C - estirpe NF 14-2 (*A. salmonicida* subsp. *salmonicida*).

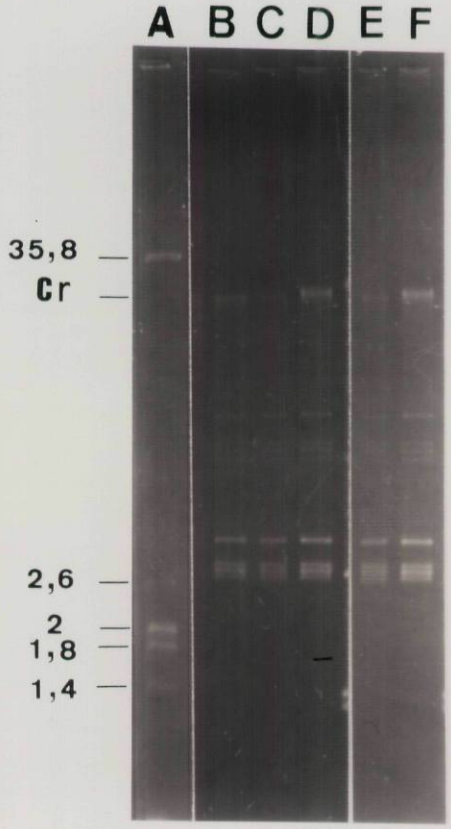


Figura 3.2.3 - Plasmídeos detectados nas estirpes de *A. salmonicida* isoladas na truticultura A (Colunas C-F). Coluna A - marcador de pesos moleculares (estirpe de *Escherichia coli* V517); Coluna B - estirpe NF 14-2 (*A. salmonicida* subsp. *salmonicida*). Os números indicam as massas moleculares dos plasmídeos em Megadaltons (Md). Cr - banda cromossómica.

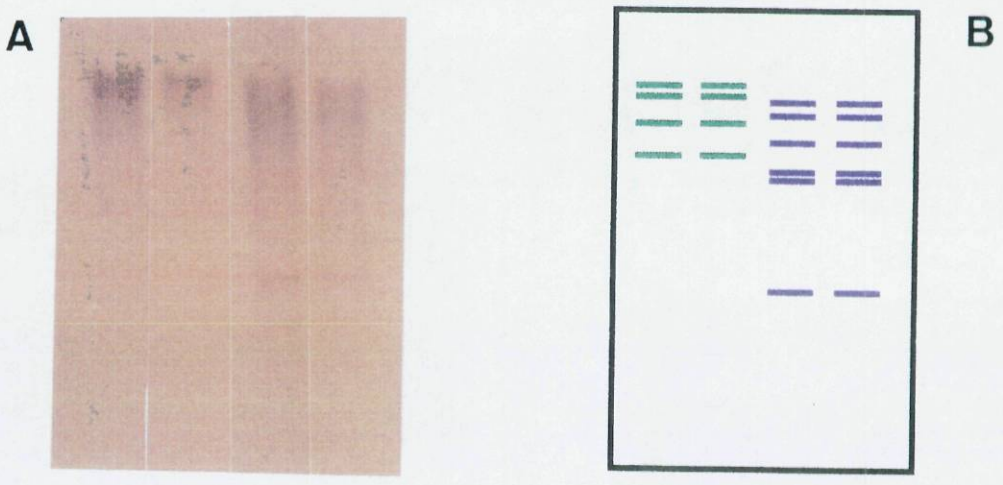


Figura 3.2.4 -Ribótipos das estirpes de *A. salmonicida* usando a enzima de restrição *Xba*I (A) e respectiva representação esquemática (B).

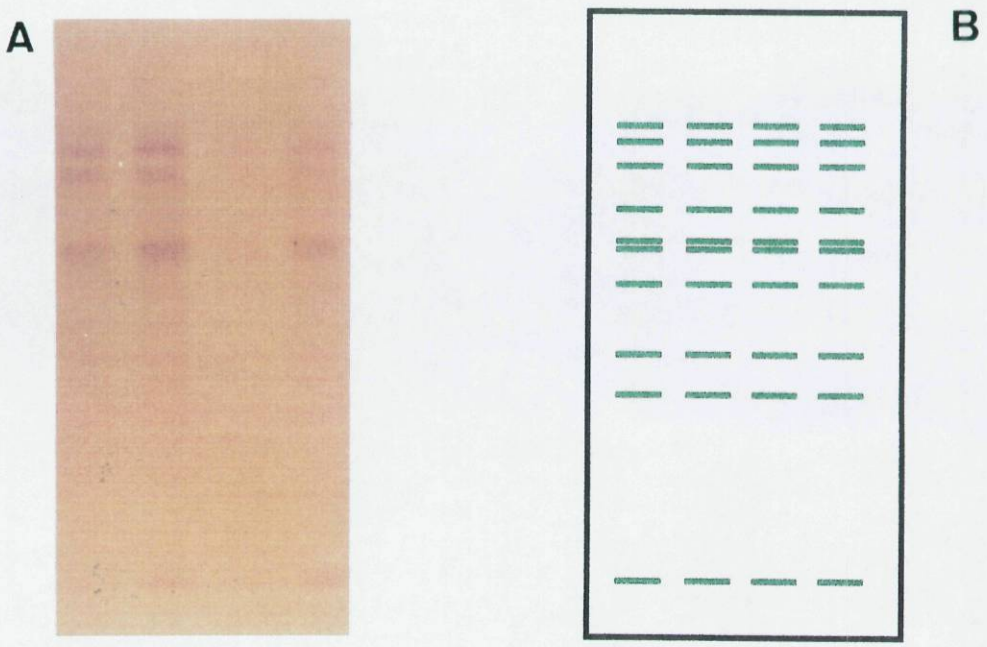


Figura 3.2.5 -Ribótipos das estirpes de *A. salmonicida* usando a enzima de restrição *Sma*I (A) e respectiva representação esquemática (B).

3.2.2.2. *Yersinia ruckeri*

3.2.2.2.1. Identificação e Sensibilidade a Substâncias Antimicrobianas

Na tabela 3.2.2 estão indicadas as amostragens e os locais em que foram isoladas as estirpes de *Y. ruckeri* ao longo do estudo epidemiológico efectuado em duas truticulturas do norte de Portugal (ver capítulo 3.1).

A análise desta tabela permite verificar que apenas em Fevereiro e em Dezembro não foi detectada esta espécie bacteriana em qualquer das duas instalações aquícolas.

Na truticultura A, a bactéria foi isolada da água (quer de um tanque da truticultura, quer do rio, junto da saída desta) na amostragem da Abril, do sedimento de um dos tanques em Setembro e de uma truta arco-íris doente em Novembro. Curiosamente, nesta última amostragem foram observados, entre os peixes reprodutores, sintomas de doença frequentemente relacionados com ERM (nomeadamente astenia e opacidade ocular), sendo a temperatura da água de 8-9 °C; no entanto, nesta amostragem não foi detectada *Y. ruckeri* em qualquer das amostras ambientais, como também não foi isolada de qualquer peixe em Abril ou em Setembro.

Na truticultura B, a presença da bactéria responsável pela ERM foi detectada com maior frequência, apenas não sendo isolada, para além de Fevereiro e Dezembro, nos meses em que o foi na truticultura A, isto é, Abril, Setembro e Novembro. Por outro lado, o seu isolamento nas amostragens de Março e de Julho ocorreu simultaneamente de peixes cultivados e de amostras ambientais; adicionalmente, em Março, a sua presença foi detectada em todos os tipos de amostras analisadas na truticultura B (peixes cultivados, água e sedimento), constituindo, inclusivé, o segundo ou terceiro grupo bacteriano mais abundante no sedimento subjacente às três jaulas amostradas (ver capítulo 3.1).

Embora *Y. ruckeri* tenha sido detectada, por uma vez (em Abril), na água do rio adjacente à truticultura A, a bactéria nunca foi isolada de qualquer peixe selvagem, quer neste rio, quer na albufeira onde está situada a truticultura B.

Embora, como já foi referido no capítulo 3.1, não tenha sido possível associar a presença de uma determinada espécie bacteriana com um determinado sintoma ou conjunto de sintomas, foram observados, particularmente na truticultura B, vários sintomas que estão frequentemente presentes em trutas com ERM, nomeadamente opacidade ocular, astenia, hemorragias nos maxilares, exoftalmia e, por vezes, a perda

Tabela 3.2.2 - Isolamentos de *Yersinia ruckeri* ao longo das amostragens mensais efectuadas nas truticulturas A e B.

	JAN	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV
TRUTICULTURA A										
T (ºC)	4-5	5	7-9	12-13	15-16	15-18,5	17-18,5	11,5-13,5	10,5-11,5	8-9
Peixes cultivados	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+5
Tanques: Água	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Sedimento	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Entrada:										
Água	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sedimento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rio: Saída:										
Água	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Sedimento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Peixes selvagens	NT	-	-	NT	NT	-	-	-	NT	NT
TRUTICULTURA B										
T (ºC)	10	12	14	13,5	19,5	22	22	17	16	13,5
Peixes cultivados	+1	+2	-	-	+3	+2	-	-	+4	-
Jaulas: Água	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Sedimento	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-
Peixes selvagens	NT	-	-	NT	NT	-	-	NT	NT	-

+, *Yersinia ruckeri* isolada e identificada; -, *Yersinia ruckeri* não detectada; NT, não testado.

1 - Cultura pura; 2 - Culturas puras, mas muito poucas colónias; 3 - Cultura mista com uma *Aeromonas* móvel; 4 - Culturas puras e mistas com uma *Enterobacteriaceae* e com uma *Aeromonas* móvel; 5 - Cultura mista com uma *Aeromonas* móvel e com um bacilo Gram positivo.

de um dos olhos. Na truticultura A, apenas na amostragem de Novembro se observaram a opacidade ocular e o aspecto asténico. No entanto, não se detectou *Y. ruckeri* em todos os exemplares com estes sintomas e, por outro lado, foi isolada esta espécie bacteriana de peixes sem qualquer sintoma de doença ou com sintomatologia diferente (por exemplo, na amostragem de Janeiro foi isolada *Y. ruckeri*, em cultura pura, de uma truta arco-íris cujo principal sintoma de doença era uma lesão no flanco, ulcerada e muito profunda).

A observação repetida destes sintomas (embora não simultaneamente), nomeadamente na truticultura B, e o isolamento de *Y. ruckeri* de exemplares sem sintomas de doença sugerem que esta bactéria teve uma presença mais ou menos constante, especialmente nesta truticultura, embora tenha estado "mascarada" por outros microrganismos. Na truticultura A, a menor detecção desta espécie bacteriana, e a observação de alguns destes sintomas de ERM apenas em Novembro poderá dever-se a uma manutenção dos peixes em condições que lhes provoquem menos stress do que na truticultura B, embora a ausência de qualquer epizootia de ERM nesta última truticultura sugira que, também aqui, as condições de stress não tenham sido demasiado acentuadas.

Quase todas as bactérias que foram identificadas presumivelmente como *Y. ruckeri* foram confirmadas como pertencentes a esta espécie, distribuindo-se entre os serótipos O1 e O3 de Romalde *et al.* (1993), de acordo com os testes de aglutinação efectuados (ver capítulo 3.1). A única estirpe não confirmada como tal foi detectada em peixes doentes dos quais foram isoladas estirpes imóveis da bactéria responsável pela ERM (ver capítulo 3.1).

Observou-se uma grande homogeneidade nos resultados dos testes bioquímicos e fisiológicos, embora tenham sido detectadas algumas variações significativas (Tabela 3.2.3). Assim, a fermentação do sorbitol foi observada em todas as estirpes do serótipo O3, mas em nenhuma do serótipo O1, enquanto que apenas uma estirpe do serótipo O3 não é capaz de hidrolisar a gelatina. As estirpes isoladas em Outubro (truticultura B) têm a particularidade de serem imóveis e incapazes de hidrolisar o Tween 80. A imobilidade destas estirpes foi confirmada após crescimento em meio líquido (BHI) e incubação durante toda a noite a 22 °C e a 37 °C.

No sistema API 20E foram obtidos resultados falsos, positivos ou negativos, nos testes de descarboxilação da lisina, utilização do citrato, hidrólise da gelatina e fermentação do sorbitol. Os perfis obtidos com este sistema miniaturizado foram: nas estirpes do serótipo O1, 5307100, 5107100, 5305100, 5307500, 5105100 e 1107100;

Tabela 3.2.3 - Perfis fenotípicos encontrados nas estirpes de *Y. ruckeri* estudadas.

	SERÓTIPO O1		SERÓTIPO O3	
N° de estirpes	9	4	9	1
Gram	-	-	-	-
Mobilidade	+	-	+	+
Oxidase	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	+
O/F (Hugh-Leifson)	F	F	F	F
Hidrólise do Tween 80	+	-	+	+
ONPG	+	+	+	+
Hidrólise da arginina	-	-	-	-
Descarboxilação da lisina *	(+)	(+)	(+)	(+)
Descarboxilação da ornitina	+	+	+	+
Utilização de citrato *	+	+	+	+
Redução de nitratos	+	+	+	+
Produção de H_2S	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-
TDA	-	-	-	-
Produção de Indol	-	-	-	-
Voges-Proskauer	+	+	+	+
Hidrólise da Gelatina *	+	+	+	-
Produção de ácido de:				
Glucose	+	+	+	+
Manitol	+	+	+	+
Inositol	-	-	-	-
Sorbitol *	-	-	+	+
Ramnose	-	-	-	-
Sacarose	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-
Amigdalina	-	-	-	-
Arabinose	-	-	-	-
RESISTÊNCIA/ /SENSIBILIDADE a:				
Ampicilina (10µg)	R (55)	R (100)	R (55)	S
Tetraciclina (30µg)	S (78)	S (100)	S (78)	S
Oxitetraciclina (30µg)	S (100)	S (100)	S (100)	S
Cloranfenicol (30µg)	S (100)	S (100)	S (100)	S
Estreptomicina (10µg)	R (100)	R (100)	R (100)	R
Ácido oxolínico (2µg)	S (100)	S (100)	S (100)	S
Furazolidona (300µg)	S (100)	S (100)	S (100)	S
TMX-SMX (25µg)	S (100)	S (100)	S (100)	S
Norfloxacina (10µg)	S (100)	S (100)	S (100)	S
Enrofloxacina (5µg)	S (100)	S (100)	S (100)	S

* - Testes em que foram observadas reacções falsas, positivas ou negativas, com o sistema API 20E.
(+) - reacções positivas fracas e retardadas. F - fermentativa; R - resistente; S - sensível.
TMX-SMX = Trimetoprim-sulfametoxazol (23,75µg-1,25µg).
Entre parêntesis são indicadas as percentagens de estirpes sensíveis/resistentes a cada substância antimicrobiana.

nas estirpes do serótipo O3, 5105500, 5107500, 5307500 e 5305500. Destes, só o perfil 5105100 dá como resultado, segundo o índice API, uma identificação duvidosa entre *Y. ruckeri* e *Hafnia alvei*; os restantes não estão codificados naquela base de dados da casa comercial.

Na tabela 3.2.4 são indicadas as condições mais significativas em que foram isoladas as diferentes estirpes de *Y. ruckeri* incluidas no presente estudo. Pela análise desta tabela é possível verificar que na truticultura A só foram isoladas estirpes pertencentes ao serótipo O1, e que apenas quando esta bactéria foi detectada em peixes se observou a sua associação a um problema sanitário. Apesar de, como já foi referido, alguns dos sintomas observados nesta amostragem (Novembro) estarem frequentemente associados à ERM, este isolamento foi feito em culturas mistas com uma *Aeromonas* móvel e um bacilo Gram +.

Na truticultura B, foram isoladas estirpes pertencentes ao mesmo serótipo nas amostragens de Janeiro, Março, Maio, Junho e Outubro. Destas, as que foram acompanhadas por problemas sanitários foram Janeiro, Junho (embora uma das estirpes isoladas nesta amostragem tenha sido obtida de uma truta sem qualquer sintoma de doença) e Outubro. Por outro lado, é conveniente realçar o facto de que as estirpes imóveis e Tween 80 negativas isoladas em Outubro estiveram associadas a problema de doença. As estirpes do serótipo O1 isoladas em Março e em Maio foram-no apenas da água.

Ainda na truticultura B, foram isoladas estirpes de *Y. ruckeri* pertencentes ao serótipo O3, quer de peixes (em Março e em Julho), quer de amostras ambientais (Março, Maio, Julho e Agosto). Destas, a estirpe que se revelou incapaz de hidrolisar a gelatina foi isolada do sedimento, na amostragem de Maio. É digno de nota, também, o facto de nenhuma das estirpes deste serótipo ter sido obtida em associação com qualquer problema de doença. Por outro lado, nas duas ocasiões em que *Y. ruckeri* serótipo O3 foi detectada em peixes, os números de colónias obtidos nas culturas foram muito baixos (entre 1 e 6 colónias/placa) apesar de não ter sido detectada qualquer outra bactéria.

Todas as estirpes de *Y. ruckeri* estudadas revelaram ser sensíveis a muitos dos agentes quimioterápicos testados. A resistência à estreptomicina é comum a todas as estirpes, enquanto que também foram observadas bastantes resistências à ampicilina. Assim, a resistência apenas à estreptomicina ou à estreptomicina e à ampicilina constituiram os dois perfis de resistência/sensibilidade mais comuns, independentemente do serótipo das estirpes. Um terceiro perfil, igualmente observado

Tabela 3.2.4 - Condições de isolamento das estirpes de *Yersinia ruckeri* incluidas no presente estudo.

Amostragem	Truticultura	Serótipo	Mobilidade/ /Tween 80	Gelatina	Origem	Associada a problema sanitário
Janeiro	B	O1	+	+	truta a.-i.	Sim
Março	B	O3	+	+	truta a.-i.	Não
	B	O1	+	+	água	Não
	B	O3	+	+	água/ /sedimento	Não
Abril	A	O1	+	+	água	Não
Maio	B	O1	+	+	água	Não
	B	O3	+	+	sedimento	Não
	B	O3	+	-	sedimento	Não
Junho	B	O1	+	+	truta a.-i.	Sim
	B	O1	+	+	truta a.-i.	Não
Julho	B	O3	+	+	truta a.-i.	Não
	B	O3	+	+	sedimento	Não
Agosto	B	O3	+	+	sedimento	Não
Setembro	A	O1	+	+	sedimento	Não
Outubro	B	O1	-	+	trutas a.-i.	Sim
Novembro	A	O1	+	+	truta a.-i.	Sim

Truta a.-i. = truta arco-íris.

em ambos os serótipos (mas apenas em duas estirpes de cada um), consistiu na resistência simultânea à estreptomicina, à ampicilina e à tetraciclina.

3.2.2.2.2. Análise de Lipopolissacarídeos e de Proteínas da Envoltura Celular

3.2.2.2.2.1. Lipopolissacarídeos

Na figura 3.2.6 estão ilustrados os resultados obtidos na análise dos LPS em geles de poliacrilamida-SDS (a) e respectivo "western blot" utilizando soro anti-serótipo O1 (b).

Os padrões de LPS obtidos com as estirpes do serótipo O1 (Figura 3.2.6.a, linhas B-E) são todos iguais entre si e ao da estirpe de referência deste mesmo serótipo (estirpe 11.4, linha A). De modo semelhante, os padrões obtidos com as estirpes do serótipo O3 (linhas F-I) são iguais entre si e indistinguíveis do da estirpe 11.47 (linha J), usada como estirpe de referência deste serótipo. As principais diferenças nos dois padrões encontrados, designados, respectivamente, como LPS I e LPS II (ver tabelas 3.2.5 e 3.2.6), consistem no número de bandas presentes e no espaçamento destas. Assim, no serótipo O3 observa-se um número de bandas claramente inferior, estando estas nitidamente mais espaçadas entre si do que no serótipo O1.

Deste modo, a análise dos padrões de LPS por SDS-PAGE confirma os resultados obtidos nos ensaios de aglutinação em lâmina de vidro, efectuados com soros anti-11.4 e anti-11.47, os quais permitiram identificar as estirpes de *Y. ruckeri* incluídas neste estudo como pertencentes aos serótipos O1 e O3, respectivamente.

Esta confirmação é proporcionada, também, pelos resultados dos "western blots", quer usando soro anti-11.4 (figura 3.2.6.b), onde se observa uma reactividade apenas das estirpes do serótipo O1, quer utilizando soro anti-11.47, onde a reactividade se detecta apenas nas estirpes do serótipo O3.

3.2.2.2.2.2. Proteínas da Envoltura Celular

Os padrões SDS-PAGE de proteínas de membrana externa encontrados nas estirpes de *Y. ruckeri* serótipo O1, bem como o respectivo "western blot" utilizando soro anti-11.4, estão ilustrados na figura 3.2.7 (a, b). A figura 3.2.8 (a, b) refere-se aos mesmos resultados obtidos com as estirpes do serótipo O3 (no "western blot" foi utilizado, também, soro anti-11.4). Embora não sejam apresentadas as fotografias correspondentes aos perfis de proteínas totais da envoltura celular, os resultados que foram obtidos com estas, incluindo com os "western blots" correspondentes,

Tabela 3.2.5 - Padrões das estirpes do serótipo O1 de *Y. ruckeri* (incluindo a estirpe de referência 11.4) obtidos por diferentes sistemas de tipagem.

Amostragem	Truticultura	Mobilidade/ /Tween 80	Origem	Padrão LPS	Padrão Proteínas	Padrão Plasmídeos	RIBÓTIPOS			
							*Xba*I	*Sma*I	*Pvu*I	*Pst*I
Janeiro	B	+	truta a.-i.	LPS I	OMP II	P I	I	A	i	a
Março	B	+	água	LPS I	OMP II	P I	I	A	i	a
Abril	A	+	água	LPS I	OMP III	P I	III	D	iii	c
Maio	B	+	água	LPS I	OMP I	P I	I	C	ii	b
Junho	B	+	truta a.-i.	LPS I	OMP I	P I	I	B	i	b
Setembro	A	+	sedimento	LPS I	OMP I	P I	II	B	iv	d
Outubro	B	-	truta a.-i.	LPS I	OMP II	P I	I	A	i	a
Novembro	A	+	truta a.-i.	LPS I	OMP I	P I	II	B	iv	c
Estirpe 11.4	Não aplicável	+	truta a.-i.	LPS I	OMP I	P I	IV	E	i	b

Truta a.-i. = truta arco-íris.

Tabela 3.2.6 - Padrões das estirpes do serótipo O3 de *Y. ruckeri* obtidos por diferentes sistemas de tipagem.

Amostragem	Truticultura	Gelatina	Origem	Padrão LPS	Padrão Proteínas	Padrão Plasmídeos	RIBÓTIPOS			
							*Xba*I	*Sma*I	*Pvu*I	*Pst*I
Março	B	+	truta a.-i.	LPS II	OMP IV	P III	V	F	v	f
	B	+	água e sedimento	LPS II	OMP IV	P IV	VI	G	v	f
Maio	B	-	sedimento	LPS II	OMP V	P II	NT	NT	NT	NT
	B	+	sedimento	LPS II	OMP IV	P III	NT	NT	NT	NT
Julho	B	+	truta a.-i.	LPS II	OMP IV	P II	V	F	v	f
	B	+	sedimento	LPS II	OMP IV	P II	V	F	v	f
Agosto	B	+	sedimento	LPS II	OMP IV	P III	V	F	vi	f

Truta a.-i. = truta arco-íris.
NT = Não Testado

corroboram totalmente o que de seguida irá ser descrito sobre as proteínas de membrana externa.

Entre as estirpes do serótipo O1 foram encontrados três padrões de proteínas de membrana externa (OMP I-III) (Figura 3.2.7.a; Tabela 3.2.5), embora com pequenas diferenças entre si. Os padrões OMP I e OMP II diferem unicamente na posição de uma das bandas (de peso molecular baixo) quantitativamente maioritárias. No terceiro padrão, representado por uma única estirpe (isolada da água da truticultura A, em Abril), encontra-se uma banda adicional (ausente dos outros dois) na mesma região onde se situa a diferença já referida entre os padrões OMP I e OMP II; esta estirpe que constitui o padrão OMP III parece possuir a banda que existe no padrão OMP II e não existe no OMP I, e, além disso, possui uma banda adicional que parece ter migrado um pouco mais.

As estirpes do serótipo O3 apresentam todas o mesmo padrão (OMP IV) de proteínas de membrana externa, à excepção da estirpe gelatinase negativa, que constitui um padrão ligeiramente diferente (padrão OMP V), caracterizado por apresentar uma banda adicional, de migração um pouco mais rápida do que as bandas correspondentes às proteínas quantitativamente maioritárias (ver tabela 3.2.6).

O "western blot" das proteínas de membrana externa das estirpes do serótipo O1 (figura 3.2.7.b), utilizando soro anti-11.4, constitui mais um dado confirmativo do serótipo destas estirpes, sendo evidente uma maior reactividade antigénica das proteínas de pesos moleculares mais elevados; curiosamente, as proteínas mais abundantes (bandas mais intensas no gel) apresentam uma reactividade muito pequena. Quando no "western blot" destas estirpes foi usado soro anti-11.47, não foi observada qualquer reactividade em qualquer das estirpes.

No "western blot" das proteínas de membrana externa das estirpes do serótipo O3, observou-se, também, uma forte reactividade (também muito mais evidente nas proteínas de elevado peso molecular) quando foi usado soro homólogo (soro anti-11.47), constituindo também um dado adicional para a confirmação do serótipo destas estirpes. Curiosamente, quando foi utilizado soro anti-11.4 (Figura 3.2.8.b), observou-se reacção cruzada da estirpe incapaz de hidrolisar a gelatina, na zona de proteínas de elevado peso molecular. No entanto, apesar de também se ter verificado esta reacção cruzada no "western blot" das proteínas totais da envoltura celular, não se observou o menor indício de tal reacção nos testes de aglutinação em lâmina de vidro. Ainda neste "western blot", pode observar-se uma reacção cruzada muito leve, em todas as estirpes,

em algumas bandas (nomeadamente nas que correspondem às proteínas mais abundantes).

3.2.2.2.3. Conteúdo Plasmídico e Análise do DNA Cromossómico

3.2.2.2.3.1. Estudo do Conteúdo Plasmídico

Em todas as estirpes do serótipo O1 foram detectadas duas bandas plasmídicas, com massas moleculares de cerca de 50 Md e 15 Md (Figura 3.2.9). Este perfil plasmídico (PI; tabela 3.2.5) é o mais frequentemente encontrado, por outros autores, neste serótipo (Romalde, 1992).

Entre as estirpes do serótipo O3 foram encontrados três perfis diferentes (PII-IV) relativamente ao conteúdo em DNA extracromossómico (Figura 3.2.10). O perfil PII é constituido por estirpes que possuem 3 bandas plasmídicas, com pesos moleculares próximos de 30 Md, 3,6 Md (embora a banda correspondente a este plasmídeo não seja bem visível na figura 3.2.10, ela foi claramente observada) e 2,2 Md; neste perfil está incluída a estirpe que não hidrolisa a gelatina. No perfil PIII estão incluidas 5 estirpes, tendo nestas sido encontrados dois plasmídeos, com cerca de 6 Md e 3 Md, para além dos três encontrados no perfil PII. Uma única estirpe constitui o perfil PIV, no qual foram detectados, em adição aos 5 plasmídeos já referidos, dois outros, cujas massas moleculares são de, aproximadamente, 25 Md e 20 Md (ver tabela 3.2.6).

3.2.2.2.3.2. Ribotipagem

A aplicação da técnica de ribotipagem ao DNA das estirpes do serótipo O1 permitiu a detecção de vários padrões diferentes (ribótipos). Estas diferenças foram observadas não apenas quando se usaram distintas enzimas de restrição, mas, também, com cada uma das enzimas foram observados quatro ou mais ribótipos (ver tabela 3.2.5).

Quando se usou a enzima de restrição *Xba*I, foram encontrados 4 ribótipos (Figura 3.2.11):

- Ribótipo I: compreende todas as estirpes do serótipo O1 isoladas na truticultura B;

- Ribótipo II: inclui as estirpes isoladas do sedimento e das trutas da truticultura A;

- Ribótipo III: constituido pela estirpe isolada da água na truticultura A;

- Ribótipo IV: estirpe 11.4 (estirpe de referência).

Estes ribótipos, e em especial os dois primeiros, apresentam algumas semelhanças entre si. Assim, observam-se bandas comuns aos quatro padrões detectados, embora o seu número seja variável (apenas é o mesmo nos ribótipos I e III) e algumas tenham localizações diferentes.

Com a enzima *Sma*I, as estirpes do serótipo O1 distribuiram-se por 5 ribótipos (Figura 3.2.12):

- Ribótipo A: inclui as estirpes isoladas em Janeiro, Março e Outubro na truticultura B;

- Ribótipo B: engloba as estirpes isoladas em Junho na truticultura B e em Setembro e Novembro na truticultura A;

- Ribótipo C: representado por uma única estirpe, isolada da água da truticultura B em Maio;

- Ribótipo D: definido pela estirpe isolada da água da truticultura A;

- Ribótipo E: inclui apenas a estirpe de referência (11.4).

Também neste caso os ribótipos apresentam semelhanças consideráveis, observando-se bandas comuns entre todos, e, especialmente, entre os dois primeiros (A e B).

Usando a enzima *Pvu*I, foram detectados 4 ribótipos, embora bastante similares:

- Ribótipo i: inclui as estirpes isoladas em Janeiro, Março, Junho e Outubro na truticultura B, e também a estirpe 11.4;

- Ribótipo ii: constituido apenas pela estirpe isolada da água da truticultura B em Maio;

- Ribótipo iii: definido, também, por uma só estirpe, isolada da água da truticultura A;

- Ribótipo iv: representado pelas estirpes isoladas do sedimento e das trutas da truticultura A.

Finalmente, utilizando a enzima de restrição *Pst*I, obtiveram-se os seguintes padrões:

- Ribótipo a: definido pelas estirpes isoladas em Janeiro, Março e Outubro na truticultura B;

- Ribótipo b: constituido pelas estirpes isoladas na truticultura B em Maio e em Junho e, ainda, pela estirpe 11.4;

- Ribótipo c: inclui apenas a estirpe isolada da água da truticultura A;

- Ribótipo d: representado somente pela estirpe isolada do sedimento na truticultura A

- Ribótipo e: inclui as estirpes isoladas das trutas na truticultura A.

Relativamente às estirpes de *Y. ruckeri* pertencentes ao serótipo O3, foram observados dois ribótipos com cada uma das enzimas *Xba*I, *Sma*I e *Pvu*I, enquanto que com a enzima *Pst*I todas as estirpes analisadas apresentaram o mesmo padrão (designado como ribótipo f) (ver tabela 3.2.6).

Os ribótipos obtidos com a enzima *Xba*I (Figura 3.2.13) foram:

- Ribótipo V: inclui as estirpes isoladas em Março (apenas de truta arco-íris), em Julho e em Agosto;

- Ribótipo VI: representado unicamente pela estirpe presente na água e no sedimento da truticultura B em Março.

O ribótipo VI possui um número de bandas consideravelmente inferior ao encontrado no ribótipo V.

Resultados similares a estes foram obtidos usando a enzima *Sma*I (Figura 3.2.14). Assim, também dois ribótipos foram detectados, incluindo as mesmas estirpes que com a enzima *Xba*I:

- Ribótipo F: estirpes isoladas em Março (de truta arco-íris), Julho e Agosto;

- Ribótipo G: constituido apenas pela estirpe presente na água e no sedimento da truticultura B em Março.

Curiosamente, quando foi usada a enzima *Pvu*I, o padrão diferente foi encontrado, não na estirpe da água e sedimento isolada em Março, mas na isolada em Agosto, sendo os ribótipos detectados os seguintes:

- Ribótipo v: estirpes isoladas em Março e em Julho;

- Ribótipo vi: estirpe isolada em Agosto.

A principal diferença entre os ribótipos v e vi consiste na presença, neste último, de um maior número de bandas.

3.2.2.2.4. Patogenicidade para Trutas

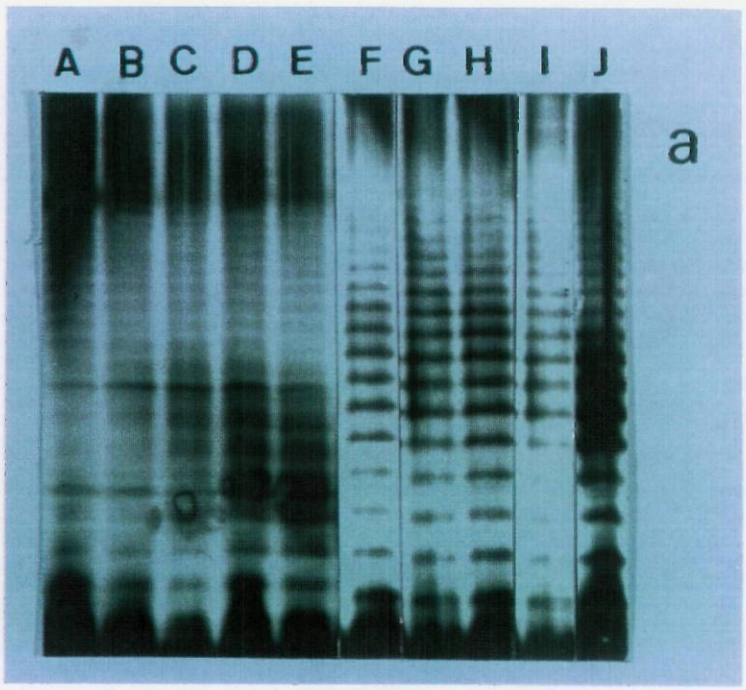
Todas as estirpes usadas nos ensaios de patogenicidade realizados se revelaram altamente virulentas para trutas arco-íris, com DL_{50} que variaram entre 1,1 X 10^3 e 3,6 X 10^4 células (ver tabela 3.2.7).

Não se observou uma maior virulência das estirpes do serótipo O1 relativamente às do serótipo O3, nem as estirpes isoladas em associação com problemas sanitários revelaram ser mais virulentas do que as isoladas em amostragens em que tais problemas não foram observados. No entanto, a maior virulência foi encontrada nas estirpes imóveis/tween 80 negativas, isoladas em associação com problemas sanitários, embora a diferença entre a sua LD_{50} e a LD_{50} da estirpe isolada em Abril na truticultura A (amostragem em que não foram observados quaisquer sintomas de doença) seja muito pequena.

Tabela 3.2.7 - Dose Letal 50% (DL_{50}) determinada para estirpes de *Y. ruckeri* isoladas durante o presente estudo.

Amostragem	Truticultura	Serótipo	Mobilidade/ /Tween 80	Associada a problema sanitário	Origem	DL_{50}
Outubro	B	O1	-	Sim	trutas a.-i.	$1,1 \times 10^3$
Abril	A	O1	+	Não	água	$1,7 \times 10^3$
Março	B	O3	+	Não	água/ /sedimento	$7,5 \times 10^3$
Julho	B	O3	+	Não	truta a.-i.	$7,9 \times 10^3$
Janeiro	B	O1	+	Sim	truta a.-i.	$9,8 \times 10^3$
Junho	B	O1	+	Sim	truta a.-i.	$3,6 \times 10^4$

Truta a.-i. = truta arco-íris.



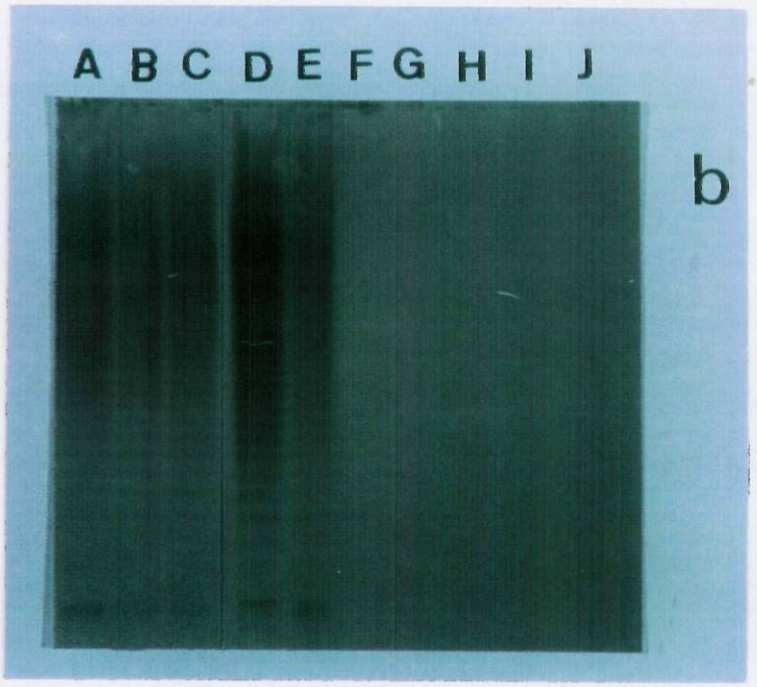


Figura 3.2.6 - Padrões electroforéticos em gel de poliacrilamida-SDS (a) e respectiva análise mediante "western blot" usando soro anti-11.4 (b) dos lipopolissacarídeos das estirpes de *Y. ruckeri* isoladas nas truticulturas A e B. Colunas B-E, estirpes do serótipo O1; Colunas F-I, estirpes do serótipo O3; Coluna A, estirpe (11.4) de referência do serótipo O1; Coluna J, estirpe (11.47) de referência do serótipo O3.

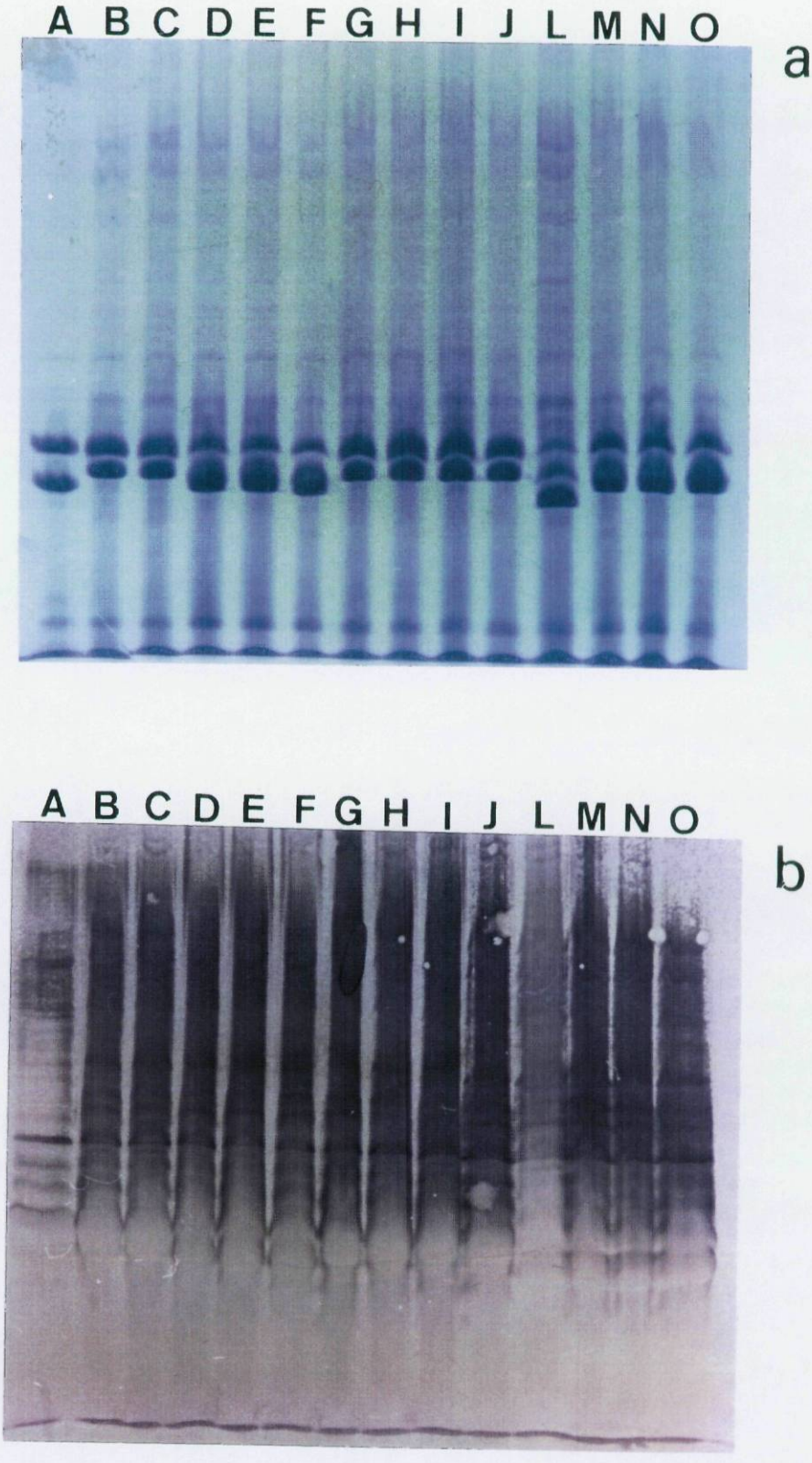


Figura 3.2.7 - Padrões electroforéticos em gel de poliacrilamida-SDS (a) e respectiva análise mediante "western blot" (b) das proteínas de membrana externa das estirpes do serótipo O1 de *Y. ruckeri* isoladas nas truticulturas A (Colunas L-O) e B (Colunas B-J). Coluna A, estirpe de referência 11.4 (*Y. ruckeri* serótipo O1); Coluna B, estirpe isolada em Janeiro; Coluna C, estirpe isolada em Março; Coluna D, estirpe isolada em Maio; Colunas E-F, estirpes isoladas em Junho; Colunas G-J, estirpes isoladas em Outubro (imóveis/Tween 80 negativas); Coluna L, estirpe isolada em Abril; Coluna M, estirpe isolada em Setembro; Colunas N-O, estirpes isoladas em Novembro.

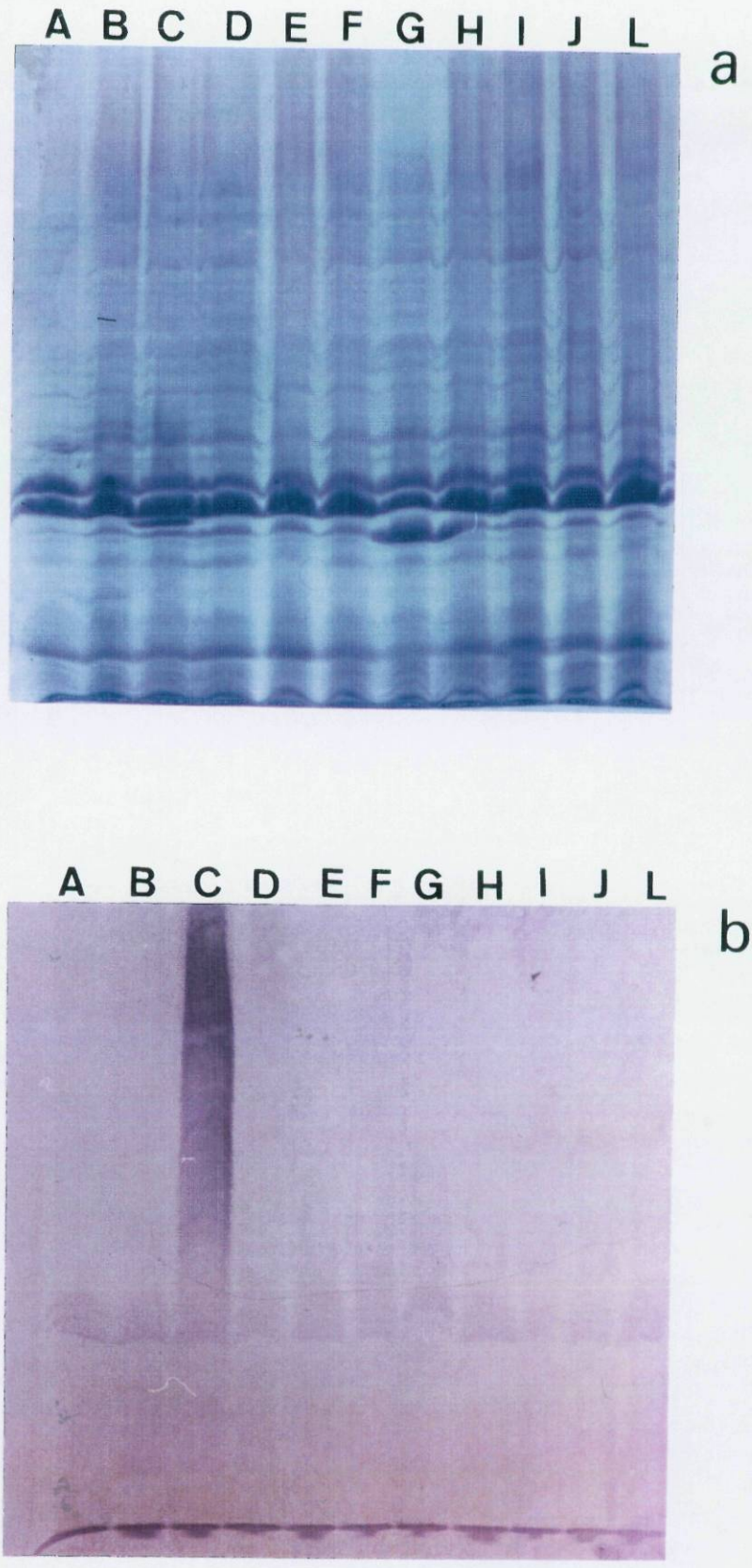


Figura 3.2.8 - Padrões electroforéticos em gel de poliacrilamida-SDS (a) e respectiva análise mediante "western blot" utilizando soro anti-11.4 (serótipo O1) (b) das proteínas de membrana externa das estirpes do serótipo O3 de *Y. ruckeri* isoladas na truticultura B (Colunas A-F e H-L; Coluna C, estirpe gelatinase negativa). Coluna G - estirpe de referência 11.47 (*Y. ruckeri* serótipo O3).

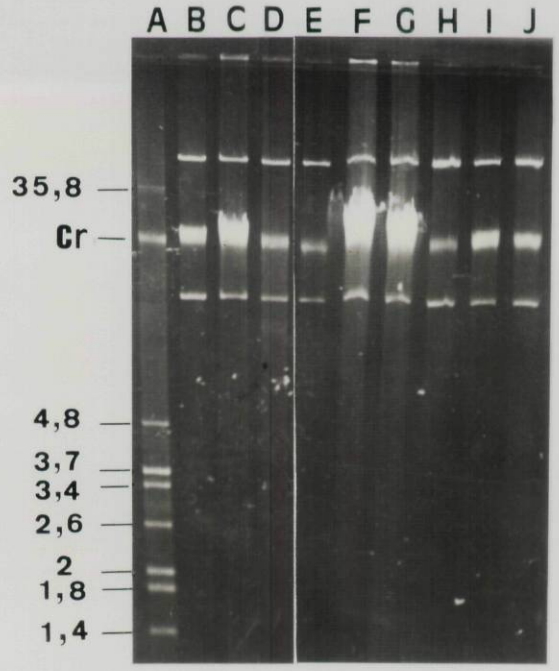


Figura 3.2.9 - Plasmídeos detectados nas estirpes do serótipo O1 de *Y. ruckeri* isoladas nas truticulturas A e B (Colunas C-J). Coluna A - marcador de pesos moleculares (estirpe de *Escherichia coli* V517); Coluna B - estirpe (11.4) de referência de *Y. ruckeri* (serótipo O1). Os números indicam as massas moleculares dos plasmídeos em Megadaltons (Md). Cr - banda cromossómica.

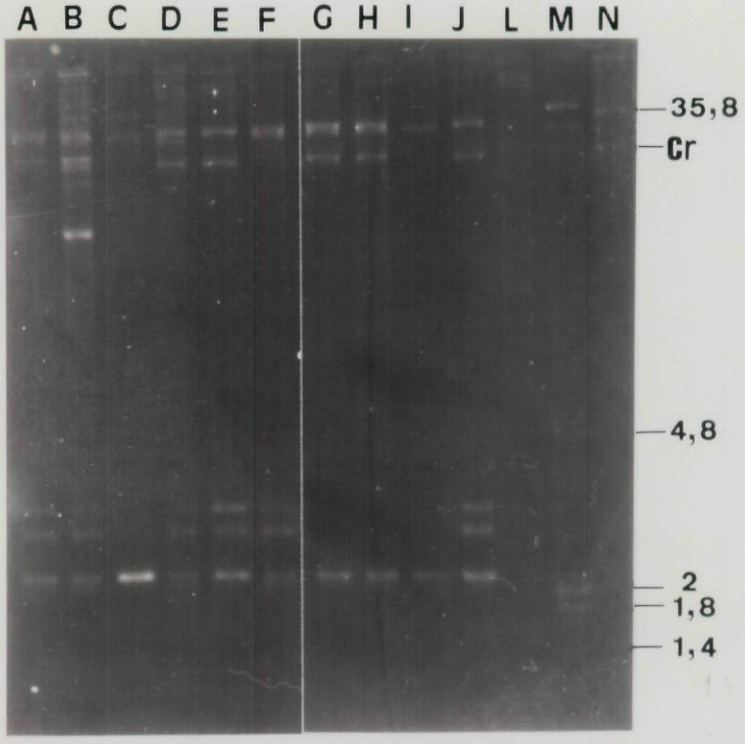


Figura 3.2.10 - Plasmídeos detectados nas estirpes do serótipo O3 de *Y. ruckeri* isoladas na truticultura B em Março (Colunas A-B), Maio (Colunas C-F; Coluna C-estirpe gelatinase negativa), Julho (Colunas G-I) e Agosto (Coluna J). Coluna L - estirpe (11.4) de referência de *Y. ruckeri* (serótipo O1); Coluna M - marcador de pesos moleculares (estirpe de *Escherichia coli* V517); Coluna N - estirpe de *Vibrio anguillarum* (R82). Os números indicam as massas moleculares dos plasmídeos em Megadaltons (Md). Cr - banda cromossómica.

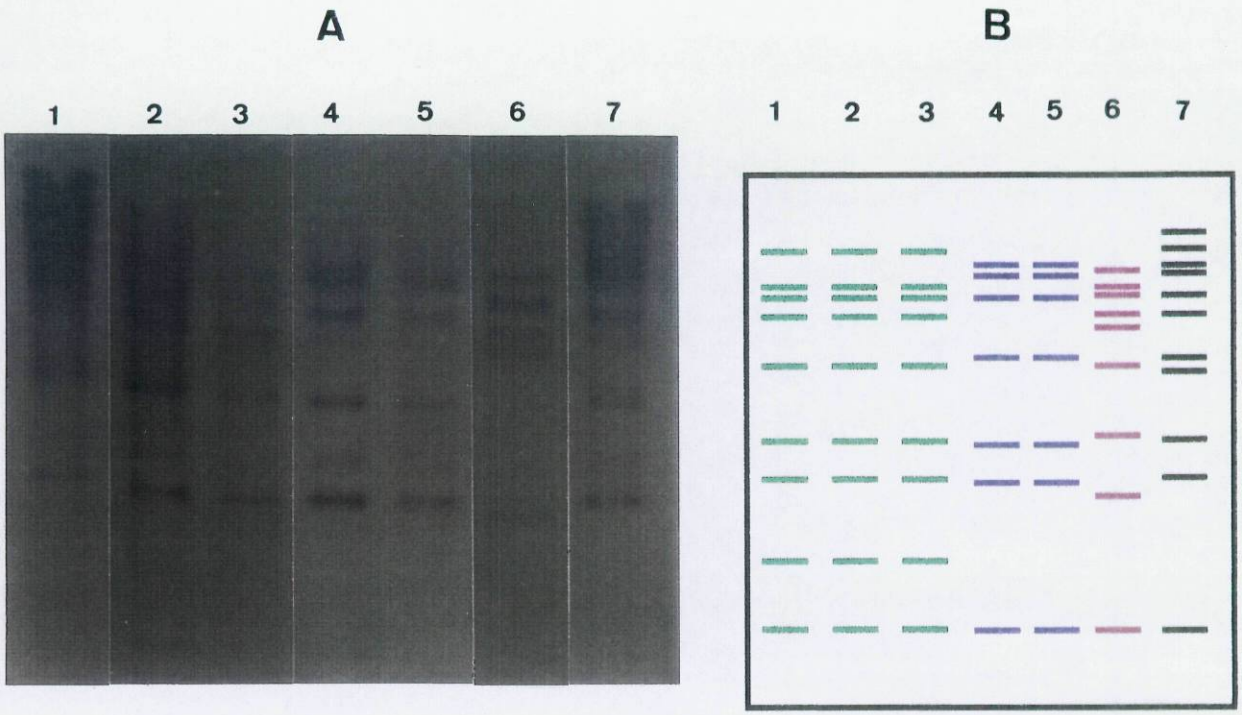


Figura 3.2.11 -Ribótipos das estirpes do serótipo O1 de *Y. ruckeri* isoladas em Janeiro (Coluna 1), Outubro (Colunas 2-3), Setembro (Coluna 4), Novembro (Coluna 5) e Abril (Coluna 6), usando a enzima de restrição *Xba*I (A) e respectiva representação esquemática (B). Coluna 7 - estirpe de referência (11.4).

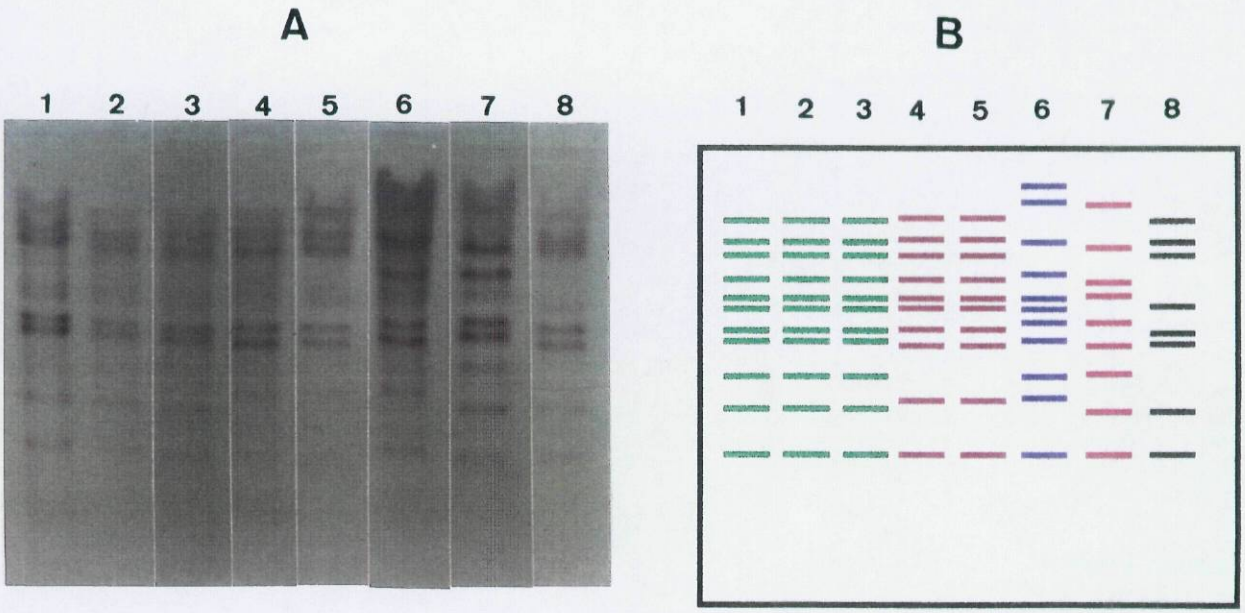


Figura 3.2.12 -Ribótipos das estirpes do serótipo O1 de *Y. ruckeri* isoladas em Janeiro (Coluna 1), Março (Coluna 2), Outubro (Coluna 3), Junho (Coluna 4), Setembro (Coluna 5), Maio (Coluna 6) e Abril (Coluna 7), usando a enzima de restrição *Sma*I (A) e respectiva representação esquemática (B). Coluna 8 - estirpe de referência (11.4).

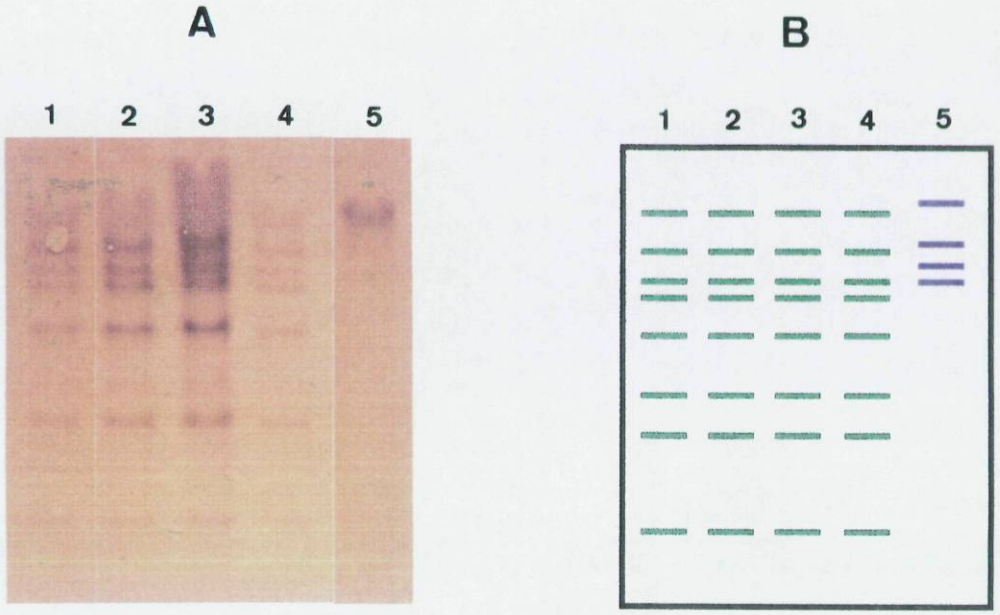


Figura 3.2.13 - Ribótipos das estirpes do serótipo O3 de *Y. ruckeri* isoladas em Março de truta arco-íris (Coluna 1), Julho (Colunas 2-3), Agosto (Coluna 4) e Março de água e sedimento (Coluna 5), usando a enzima de restrição *Xba*I (A) e respectiva representação esquemática (B).

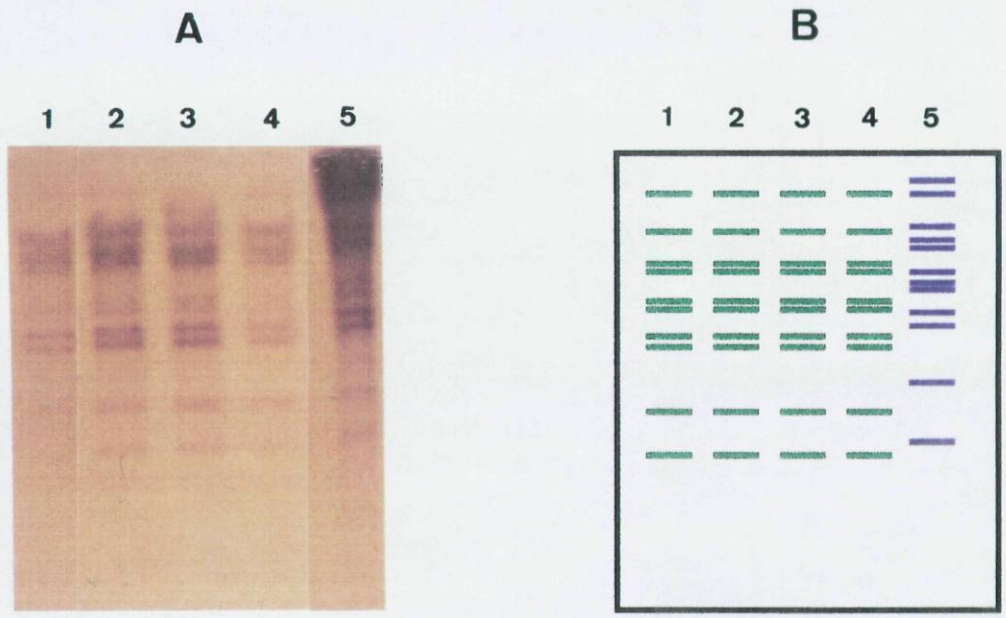


Figura 3.2.14 - Ribótipos das estirpes do serótipo O3 de *Y. ruckeri* usando a enzima de restrição *Sma*I (A) e respectiva representação esquemática (B). A distribuição das estirpes pelas diferentes colunas é semelhante à da figura 3.2.13.

3.2.3. DISCUSSÃO

3.2.3.1. *Aeromonas salmonicida*

Os aspectos epizootiológicos ligados à detecção de *A. salmonicida* quase exclusivamente de trutas comuns e sua aparente ausência das amostras ambientais analisadas foram discutidos no capítulo 3.1 (secção 3.1.3).

O facto de apenas terem sido isoladas 4 estirpes desta bactéria, e todas aquando de uma epizootia que afectou quase exclusivamente as trutas comuns cultivadas na truticultura A, faz supôr que se trate de estirpes em tudo semelhantes entre si. Esta suposição ganha, ainda, uma maior força se tivermos em conta que *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* constitui um grupo muito homogéneo, que dificulta ou impede totalmente a aplicação de sistemas tradicionais de tipagem como o estabelecimento de biótipos, serótipos ou tipos baseados em padrões electroforéticos de proteínas do envoltório celular, nomeadamente proteínas totais ou proteínas de membrana externa ("OMP-types"), embora alguns autores tenham encontrado algum potencial nos sistemas de tipagem que utilizam bacteriófagos ou padrões de resistência a substâncias antibacterianas (Toranzo *et al.*, 1991; Nielsen *et al.*, 1993; Dalsgaard *et al.*, 1994). Também a análise do conteúdo plasmídico e a ribotipagem têm sido utilizadas em estudos epizootiológicos de *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, tendo demonstrado possuir algum valor, embora limitado, como sistemas de tipagem (Nielsen *et al.*, 1994).

Deste modo, não pode considerar-se surpreendente o facto de as estirpes analisadas neste trabalho se terem revelado exactamente iguais entre si na quase totalidade dos testes efectuados, nomeadamente em todas as características fenotípicas testadas, incluindo os padrões de sensibilidade/resistência a substâncias antibacterianas e as reacções serológicas, nos padrões obtidos nas análises de lipopolissacarídeos, de proteínas do envoltório celular e de plasmídeos, e, também, em quase todas as análises do DNA cromossómico por ribotipagem. De facto, a única variação detectada foi a existência de dois ribótipos, que, no entanto, apresentam semelhanças entre si, quando foi usada a enzima de restrição *Xba*I.

Contudo, a existência de estirpes diferentes na epizootia de furunculose observada na truticultura A não constitui um facto inédito, uma vez que Sutherland & Inglis (1992) encontraram, na mesma piscicultura, diferentes padrões de sensibilidade de estirpes de *A. salmonicida* a substâncias antibacterianas (os autores observaram padrões diferentes de sensibilidade, também, em estirpes da bactéria isoladas de um mesmo peixe). Por outro lado, a diferença nos dois ribótipos observados pode

corresponder a uma pequena divergência genética, uma vez que um polimorfismo nos padrões de restrição do DNA por uma determinada enzima de restrição (e, assim, também o desenvolvimento de diferentes ribótipos) pode ocorrer devido a uma mutação que envolva apenas um par de nucleótidos (Owen, 1989). Esta variação observada não parece ter alterado qualquer das características da bactéria; de facto, segundo Owen (1989), estes polimorfismos representam geralmente mutações neutras, não causando, pois, qualquer modificação fenotípica.

Os resultados obtidos neste trabalho, para além de confirmarem a grande homogeneidade, quer fenotípica quer genética, de *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, estão de acordo com a conclusão de Hänninen *et al.* (1995) de que a ribotipagem é o método mais sensível para a tipagem desta bactéria.

3.2.3.2. *Yersinia ruckeri*

Alguns aspectos da epizootiologia de *Y. ruckeri* foram já discutidos no capítulo 3.1 (secção 3.1.3), tendo em conta, exclusivamente, a identificação das estirpes como pertencentes a esta espécie. O facto de apenas um dos perfis obtidos com o sistema API 20E estar codificado no índice como podendo pertencer a *Y. ruckeri* (sendo, mesmo assim, a identificação duvidosa, por poder tratar-se, também, de *H. alvei*) ilustra a necessidade de uma interpretação cuidadosa dos resultados obtidos com este sistema miniaturizado. Esta situação foi já referida por vários autores (Romalde, 1992; Furones *et al.*, 1993).

A aplicação de sistemas de tipagem, como a identificação de biótipos e serótipos, a análise de perfis de lipopolissacarídeos, de proteínas da envoltura celular e de plasmídeos, e a ribotipagem, embora não invalidando o que foi referido na secção 3.1.3, permite fazer outras considerações sobre este assunto.

As estirpes de *Y. ruckeri* isoladas nas duas truticulturas estudadas, e especialmente na truticultura B, permitem constatar uma situação ímpar em Portugal. Por um lado, foram isoladas estirpes pertencentes ao biótipo 2 de Davies & Frerichs (1989), isto é, estirpes (do serótipo O1) imóveis e Tween 80 negativas. A ocorrência deste biótipo na Europa foi observada por Davies & Frerichs (1989) apenas no Reino Unido e na Noruega, e, posteriormente, Klein *et al.* (1994) encontraram estirpes imóveis e Tween 80 negativas também na Alemanha. Curiosamente, estes autores afirmaram que o novo biótipo 2 descrito por Davies & Frerichs (1989), para além de ocorrer na Alemanha, também poderá, eventualmente, ser isolado noutros países europeus.

Por outro lado, foram isoladas várias estirpes do serótipo O3 (antigo serótipo V), contrariando o seu anterior isolamento apenas na América do Norte (Inglis *et al.*, 1993), enquanto que a maior parte das estirpes europeias pertence ao serótipo O1, tendo, no entanto, sido isoladas algumas do serótipo O2 no Reino Unido e nos países Bálticos (Daly *et al.*, 1986; Davies & Frerichs, 1989; Romalde *et al.*, 1993). Estas estirpes pertencentes ao serótipo O3 revelaram-se todas capazes de fermentar o sorbitol, ao contrário das do serótipo O1 (esta característica é, também, considerada como diferenciadora entre biótipos: biótipo 1, constituido pelas estirpes incapazes de fermentar esta substância; biótipo 2, cujas estirpes possuem essa capacidade).

Curiosamente, em Espanha, tal como na maioria dos países europeus, não foram detectadas estirpes imóveis/Tween 80 negativas, nem estirpes pertencentes a outro serótipo que não o O1 (e, dentro deste, ao subgrupo O1a) (Romalde, 1992; Romalde *et al.*, 1993).

Deste modo, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a introdução da espécie *Y. ruckeri* em Portugal, pelo menos na truticultura B, incluiu estirpes com diferentes origens (nomeadamente das Ilhas Britânicas ou da Noruega, ou, ainda, da Alemanha, no caso das estirpes imóveis/Tween 80 negativas, e da América do Norte, no caso das estirpes pertencentes ao serótipo O3). O facto de, em 1992, terem sido importados ovos da ilha britânica de Man para a truticultura B (ver secção 3.3.3) conduz à suspeita de que estes ovos, eventualmente não convenientemente desinfectados aquando da sua importação, possam ter servido de veículo de introdução na truticultura B, não apenas para o vírus referido, mas também para as estirpes de *Y. ruckeri* imóveis e Tween 80 negativas. A introdução das estirpes do serótipo O3 pode ter ocorrido concomitantemente ou em simultâneo com outros materiais importados, quer estas possíveis importações (de que não temos confirmação) tenham sido realizadas directamente da América do Norte, quer via qualquer país europeu. Evidentemente que não pode, todavia, descartar-se totalmente a possibilidade de que pelo menos algumas das estirpes detectadas existissem já em Portugal e apenas agora tenham sido identificadas, ou, alternativamente, tenham sido introduzidas na bacia hidrográfica do rio Cávado através de outras instalações de cultura de salmonídeos existentes nesta bacia.

Digno de registo é também o facto de, embora sem ter ocorrido qualquer epizootia de ERM, apenas estirpes pertencentes ao serótipo O1 terem sido isoladas em associação com problemas sanitários nas truticulturas A e B. Esta situação está de acordo com a observação de que a maior parte das epizootias desta doença tem sido causada por estirpes sorbitol negativas (Bullock *et al.*, 1978; Barja & Toranzo, 1988;

Valtonen *et al.*, 1992; Austin & Allen-Austin, 1993; Furones *et al.*, 1993; Inglis *et al.*, 1993). Porém, os ensaios de patogenicidade realizados permitiram-nos concluír que todas as estirpes de *Y. ruckeri* usadas, independentemente do serótipo a que pertencem e da sua origem, são altamente virulentas para truta arco-íris. Curiosamente, não se observou uma diferença na patogenicidade de estirpes pertencentes a diferentes serótipos, contrariamente ao que foi observado por outros autores (Hietala *et al.*, 1995). As mais patogénicas são as estirpes imóveis/Tween 80 negativas, que foram isoladas em associação com problemas sanitários, seguindo-se a estirpe isolada da água na truticultura A, a qual, apesar de não estar associada a tais problemas, apresenta uma DL_{50} muito próxima. É interessante, também, o facto de as estirpes do serótipo O3, todas isoladas sem qualquer associação a problemas sanitários, estarem igualmente na gama de estirpes altamente virulentas, apresentando mesmo uma DL_{50} menor do que a de algumas estirpes do serótipo O1.

Estes resultados dos ensaios de patogenicidade permitem-nos afirmar que o isolamento de estirpes de *Y. ruckeri* não associadas a problemas sanitários não constitui qualquer indicação de que se trate de estirpes menos virulentas do que aquelas que são detectadas aquando da ocorrência de tais problemas. Este facto, associado à detecção de *Y. ruckeri* nas duas truticulturas em várias amostragens (o que sugere a presença constante desta bactéria nas duas unidades), torna claro o elevado risco de ocorrência de epizootias de ERM, se as condições ambientais forem suficientemente adversas para causarem stress aos peixes, bem como a premente necessidade de adoptar medidas preventivas para controlar esse risco. Entre estas medidas deveria considerar-se, especialmente, a vacinação contra a ERM.

Contrariamente ao que foi observado no caso de *A. salmonicida*, encontrou-se alguma variabilidade entre as estirpes de *Y. ruckeri* com todos os sistemas de tipagem usados. Para além dos biótipos e serótipos já referidos, observaram-se diferentes padrões de LPS, de proteínas e de plasmídeos, para além de terem sido encontradas diferenças na ribotipagem com cada uma das 4 enzimas de restrição utilizadas (Tabelas 3.2.5 e 3.2.6).

Tendo em conta todos estes resultados, verifica-se que, entre as estirpes do serótipo O1 (Tabela 3.2.5), as isoladas em Janeiro e Março na truticultura B não apresentam qualquer diferença entre si, apesar de terem sido isoladas, respectivamente, de uma truta arco-íris doente e da água. Curiosamente, as estirpes isoladas em Outubro na mesma truticultura são exactamente iguais àquelas, à excepção de serem imóveis e Tween 80 negativas. Estas estirpes (isoladas em Janeiro, Março e Outubro na truticultura B) constituem as únicas estirpes possuidoras do padrão de proteínas de

membrana externa OMP II. Uma estirpe, isolada da água da truticultura A em Abril, constitui um caso único em quase todas as características moleculares analisadas, apenas sendo igual às restantes estirpes do serótipo O1 nos padrões de LPS e de plasmídeos. De facto, obtiveram-se padrões únicos desta estirpe na análise de proteínas (padrão OMP III) e na ribotipagem com todas as enzimas de restrição usadas. As estirpes possuidoras do perfil de proteínas OMP I, distribuidas por ambas as truticulturas, puderam ser diferenciadas através da ribotipagem.

Tendo em conta o total das estirpes do serótipo O1 analisadas neste estudo, excepto aquela que constitui um caso único quanto à maioria das características moleculares testadas (a isolada em Abril da água da truticultura A), podemos afirmar que não se observa uma correlação entre a amostra da qual a estirpe foi isolada e qualquer das suas características moleculares, mas parece haver maiores semelhanças entre as estirpes isoladas na mesma truticultura, para além de a estirpe de referência (11.4) apresentar mais semelhanças com algumas das estirpes isoladas na truticultura B do que com as da truticultura A. Assim, como já foi referido, o padrão de proteínas OMP II foi encontrado apenas em estirpes isoladas na truticultura B (sendo as estirpes que o possuem exactamente iguais quanto aos padrões obtidos por ribotipagem com qualquer das enzimas de restrição usadas), embora o padrão OMP I tenha sido encontrado em estirpes isoladas em ambas as truticulturas e, também, na estirpe de referência. Os ribótipos obtidos usando a enzima *Xba*I permitiram diferenciar perfeitamente dois grupos principais de estirpes: por um lado, as isoladas na truticultura B (ribótipo I); por outro lado, as isoladas do sedimento e das trutas na truticultura A (ribótipo II); a estirpe 11.4 apresentou um ribótipo único. Na ribotipagem com as enzimas *Pvu*I e *Pst*I foram obtidos dois padrões entre as estirpes isoladas na truticultura B (um dos quais era comum ao da estirpe 11.4), enquanto que as estirpes da truticultura A apresentavam outros ribótipos (iguais entre si com a enzima *Pvu*I - ribótipo iv -, mas diferentes com a enzima *Pst*I). Os resultados da ribotipagem com a enzima *Sma*I não confirmam, todavia, esta aparente diferenciação entre estirpes isoladas nas duas truticulturas. De facto, com esta enzima, foi detectado um ribótipo (ribótipo B) comum às duas estirpes da truticultura A e às estirpes da truticultura B isoladas em Junho e dois ribótipos exclusivos de estirpes isoladas na truticultura B (ribótipos A e C), enquanto que, também neste caso, a estirpe 11.4 possui um ribótipo único (ribótipo E). Interessa referir, ainda, o facto de que as estirpes isoladas do sedimento e das trutas na truticultura A diferem entre si apenas pelo facto de apresentarem diferentes ribótipos com a enzima *Pst*I. A ribotipagem revelou-se, portanto, como o método mais sensível para a distinção entre as estirpes do serótipo O1 de *Y. ruckeri*.

Entre as estirpes do serótipo O3, para além de um padrão comum de lipopolissacarídeos (LPS II), todas apresentaram o mesmo padrão de proteínas (OMP IV) à excepção da estirpe incapaz de hidrolisar a gelatina (OMP V) (Tabela 3.2.6). Infelizmente, não foi possível isolar o DNA cromossómico desta nem das restantes estirpes do serótipo O3 isoladas em Maio, razão pela qual não foram determinados os seus ribótipos. Curiosamente, neste serótipo a ribotipagem não demonstrou ser mais sensível do que a análise do conteúdo plasmídico. Assim, as diferenças nos perfis plasmídicos permitiram constituir três grupos. Um destes grupos (P II) é constituido pela estirpe gelatinase negativa (isolada em Maio) e por todas as que foram isoladas em Julho; outro grupo inclui a estirpe isolada de truta arco-íris em Março, bem como as estirpes gelatinase positivas isoladas em Maio e a isolada em Agosto (P III); o terceiro grupo é constituido por uma única estirpe, detectada nas amostras ambientais da truticultura B em Março (P IV). Embora seja necessário ter em conta que não foi possível efectuar a ribotipagem das estirpes isoladas em Maio, esta técnica proporcionou padrões (ribótipos) bastante similares para as restantes; para além do facto de a estirpe que constitui o padrão de plasmídeos P IV apresentar, também, ribótipos únicos com as enzimas *Xba*I e *Sma*I (ribótipos VI e G, respectivamente), apenas na estirpe isolada em Agosto foi encontrado, com a enzima *Pvu*I, um padrão (ribótipo vi) diferente do das outras (ribótipo v) (ver tabela 3.2.6).

3.3. ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO VIRAL E CARACTERIZAÇÃO DO VÍRUS DA NECROSE PANCREÁTICA INFECCIOSA

3.3. ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO VIRAL E CARACTERIZAÇÃO DO VÍRUS DA NECROSE PANCREÁTICA INFECCIOSA

3.3.1. MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1.1. Linhas Celulares Utilizadas

Para o isolamento de vírus utilizaram-se as seguintes linhagens celulares contínuas de peixes:

- CHSE-214 ("Chinook Salmon Embryo") - linhagem celular epitelial obtida de salmões (*Oncorhynchus tschawytscha*) por Fryer *et al.* (1965, *in* Ledo, 1990).

  Esta linhagem celular contínua é específica para o isolamento dos seguintes vírus: vírus da necrose pancreática infecciosa ("Infectious Pancreatic Necrosis Virus"; IPNV); vírus da septicémia hemorrágica viral ("Viral Hemorrhagic Septicemia Virus"; VHSV); vírus da necrose hematopoiética infecciosa ("Infectious Hematopoietic Necrosis Virus"; IHNV); *Herpesvirus salmonis* (HS)

- RTG-2 (gónada de truta arco-íris; "Rainbow Trout Gonad") - linhagem celular fibroblástica, obtida por Wolf & Quimby (1962, *in* Ledo, 1990) a partir de gónada de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*).

  Esta linhagem celular contínua é susceptível aos seguintes vírus: IPNV; VHSV; vírus da virémia primaveril da carpa ("Spring Viraemia of Carp Virus"; SVCV).

- BF-2 ("Blue Gill Fry") - linhagem celular fibroblástica de pedúnculo de "bluegill" (*Lepomis macrochirus*).

  Esta linhagem celular contínua é susceptível aos vírus IPNV, VHSV e IHNV.

- EPC (Epitelioma papiloso de carpa; "Epitelioma Papillosum Cyprini") - linhagem celular epitelial obtida a partir de um epitelioma papiloso de carpa (*Cyprinus carpio*), estabelecida por Tomasec & Fijan (1971, *in* Ledo, 1990).

  Esta linhagem celular contínua é susceptível aos vírus IHNV, SVCV e rabdovírus dos alevins do lúcio ("Pike-Fry Rhabdovirus"; PFR).

3.3.1.2. Condições de Cultura

3.3.1.2.1. Meios de Cultura

Para o crescimento destas linhas celulares foi usado Meio Mínimo Essencial de Eagle (EMEM - "Eagle's Minimum Essencial Medium"; Flow), com solução salina tamponada (BSS) de Earle (Flow), suplementado com:

- bicarbonato de sódio (Flow) 0,18% (p/v)
- soro bovino fetal (FBS) (Flow) 10% (v/v)
- antibióticos:
  - Penicilina G (Flow) 100 UI/ml
  - Estreptomicina (Flow) 100 µg/ml
  - Gentamicina (Flow) 50 µg/ml

O meio EMEM é adquirido desidratado, sendo preparado por dissolução da quantidade adequada em água bidestilada e esterilizado por filtração através de cartuchos de nitrocelulose com poro de 0,22 µm de diâmetro (Sterivex, Millipore) usando uma bomba peristáltica (Millipore); o pH final é de 7,2-7,4.

Para a manutenção das culturas foi utilizado o meio EMEM suplementado com apenas 2% de soro bovino fetal (EMEM-2).

3.3.1.2.2. Temperaturas de Incubação e de Manutenção

As culturas de CHSE-214 e RTG-2 foram incubadas a 20°C, e as duas restantes, BF-2 e EPC, a 25°C. Todas as linhas celulares, porém, foram mantidas a 15°C após a formação das monocamadas de células confluentes.

3.3.1.2.3. Individualização Celular

A individualização celular para subcultivação foi efectuada com uma solução de Tripsina-EDTA (Tripsina-Verseno) contendo 0,1% de tripsina e 0,02% de EDTA, ajustada a pH 7,4, e seguindo os métodos padrão de tripsinização de Kuckler (1977).

A solução de tripsina foi preparada diluindo a solução padrão desta enzima (10X), comercial (Flow), numa solução salina tamponada sem cálcio nem magnésio, previamente esterilizada, cuja composição é a seguinte:

- NaCl 8,00g;
- KCl 0,20g;
- KH2PO4 0,20g;

- Na2HPO4 1,2g;
- água destilada 1000ml.

Posteriormente, adicionam-se 2ml de uma solução estéril de Vermelho de Fenol a 0,5% (Flow), distribui-se em frascos de 100ml, esteriliza-se em autoclave e mantém-se a 4°C.

3.3.1.2.4. Conservação Celular

Todas as linhagens celulares se conservaram congeladas (-80 °C), utilizando-se como agente crioprotector Dimetil-Sulfóxido (DMSO) (Merck) a 10%, adoptando-se a metodologia de congelação e descongelação recomendada pela Colecção Americana de Culturas Tipo ("American Type Culture Collection"; ATCC). De acordo com esta metodologia, as culturas da linha celular que se pretende congelar são submetidas ao processo de individualização celular com tripsina e a resultante suspensão de células dispersa-se num volume conhecido de meio EMEM contendo DMSO a 10%, estéril. Esta suspensão submete-se a uma centrifugação a baixa velocidade (2400 r.p.m.), a 4°C, durante 2-3 minutos. O sobrenadante é rejeitado, e as células ressuspendem-se no mesmo meio, de modo a obter uma concentração celular final de aproximadamente 5 X 10^6 células/ml. Os tubos congelam-se lentamente (2 a 3 horas a -30 °C), passando-se, de seguida, directamente para -80 °C.

3.3.1.3. Amostras para estudo virológico

As amostras para estudo virológico foram recolhidas, de cada peixe, imediatamente após o processamento para estudo bacteriológico (ver capítulo 3.1).

Foram analisadas 37 amostras (24 de truta arco-íris e 13 de truta comum) da truticultura A, e 43 da truticultura B (todas de truta arco-íris). Cada uma destas amostras consistiu no conjunto dos rins, baços e encéfalos de 6 peixes de cada tanque ou jaula flutuante. Foram, igualmente, analisadas, 17 amostras de peixes selvagens, tendo cada uma das quais consistido no conjunto dos rins, baços e encéfalos de, em média, 25 exemplares.

3.3.1.4. Processamento das amostras

O processamento das amostras foi realizado, basicamente, segundo as recomendações de Thoesen (1994). Assim, os tecidos de cada amostra foram homogenizados em EBSS ("Earle's Balanced Salt Solution"), seguindo-se a sua diluição (1:10) na mesma solução. Após a homogenização, o material celular foi removido por centrifugação a 2000 x g durante 15 minutos. O sobrenadante foi, então,

recolhido, e a sua contaminação microbiana foi eliminada através de um tratamento com antibióticos (800 UI de penicilina por ml e 800 μg de estreptomicina por ml) e antifúngicos (2 μg de fungizona por ml) durante toda a noite, a 4°C.

3.3.1.5. Inoculação das amostras e avaliação da presença de vírus

Após o tratamento com antibióticos, foram inoculadas 4 alíquotas de 0,1ml em 4 culturas de cada linha celular utilizada (inoculação em quadruplicado). Estas culturas celulares tinham sido realizadas em placas de 24 cavidades. De cada placa, foram utilizadas como controle 4 culturas celulares não inoculadas com amostra, mas sim com, apenas, meio de manutenção celular (EMEM-2)

Todas as culturas celulares foram incubadas a 15°C e examinadas diariamente, ao longo de 14 dias, para verificação do aparecimento de efeito citopático (ECP). Sempre que não se observou ECP durante este período de tempo, procedeu-se à inoculação de uma nova cultura de células, usando como inóculo 0,1 ml do "sobrenadante" da cultura inicial, após a realização de uma raspagem desta cultura celular ("blind pass"). Quando se detectou ECP durante os 14 dias de incubação das culturas iniciais, foi efectuada, de imediato, uma nova inoculação em culturas celulares frescas (segunda passagem), observando-se estas até ao aparecimento de novo ECP. As amostras nas quais foi observado ECP durante duas passagens consecutivas foram consideradas positivas para a presença de um agente viral.

3.3.1.6. Titulação Viral

A titulação dos vírus isolados foi efectuada mediante a técnica de microtitulação em placas de 96 cavidades com monocamadas celulares confluentes da linhagem celular RTG-2.

Foram preparadas diluições decimais seriadas do vírus, em meio de manutenção (EMEM-2). De cada uma das diluições seriadas do vírus foram inoculadas 8 alíquotas em outras tantas cavidades da placa. Em cada placa, foram deixadas cavidades sem inocular com qualquer diluição do vírus (cavidades controle).

As placas foram seladas com parafilm e foram incubadas a 15 °C durante 15 dias para observação do aparecimento de ECP.

Quando a progressão do ECP estava terminada, procedeu-se à determinação do título viral pelo método de Reed & Müench (1938), o qual se expressa como $TCID_{50}$/ml (dose infectiva que é capaz de provocar ECP em 50% das culturas).

3.3.1.7. Caracterização das estirpes virais isoladas

A caracterização das estirpes virais isoladas foi realizada de acordo com a metodologia indicada por Hetrick (1989) e Payment & Trudel (1993).

Foram utilizadas como controles as seguintes estirpes virais: IHNV (serótipo 1), IPNV, serótipos Sp, Ab e Vr-299, e *Herpesvirus Salmonis*.

Os testes de caracterização usados foram os seguintes:

3.3.1.7.1. Resistência ao Clorofórmio

O resultado deste teste é independente do uso de clorofórmio ou de éter; embora o uso de éter seja mais cómodo e eficaz, a periculosidade do manejo deste produto faz com que a maioria dos autores empreguem o clorofórmio (Dopazo, 1991).

Este teste permite a identificação de vírus possuidores de envoltura lipídica (vírus envoltos). Esta envoltura lipídica é derivada das membranas celulares, que contêm grandes quantidades de lípidos. A dissolução destes lípidos, mediante solventes como o clorofórmio, destrói a envoltura e leva à redução ou anulação da infectividade de vírus envoltos (Dopazo, 1991; Payment & Trudel, 1993).

Num tubo de vidro, juntou-se 1,5 ml de clorofórmio a 0,5 ml da suspensão viral a testar; agitou-se vigorosamente e incubou-se durante 1-2 horas a 20 °C com agitação periódica (alternativamente, pode incubar-se a 4 °C durante 18-24 horas). Após a incubação, colocou-se a mistura numa placa de Petri e deixou-se o solvente evaporar-se. Prepararam-se diluições decimais seriadas da suspensão viral tratada e, também, de uma suspensão do mesmo vírus não tratada. Titularam-se ambas as suspensões e compararam-se os títulos virais obtidos.

Como controles devem usar-se suspensões de um vírus envolto (foi usado o IHNV) e de um não-envolto (foi usado IPNV), as quais devem ser analisadas do mesmo modo que as suspensões do vírus que se pretende identificar.

Uma redução do título do vírus tratado com clorofórmio, em mais de um logaritmo decimal (90%), relativamente ao mesmo vírus não tratado com este solvente, indica que se trata de um vírus sensível a este tratamento (vírus envolto).

3.3.1.7.2. Microscopia Electrónica de Transmissão

A observações dos viriões por microscopia electrónica permite confirmar a presença ou ausência de envoltura lipídica, bem como determinar o número de cápsides presentes, a respectiva morfologia e o diâmetro.

Para a realização desta observação, foram enviadas amostras dos vírus isolados ao Serviço de Microscopia Electrónica da Universidade de Santiago de Compostela.

3.3.1.7.3. Sensibilidade à 5-Bromo-Deoxiuridina (5-BDU)

Este teste permite determinar a natureza do ácido nucleico viral (DNA ou RNA). Para o realizar, poderia ser usado 5-IUDR (5-iodo deoxiuridina) em vez de BDU.

A 5-BDU é uma substância inibidora da síntese de DNA, uma vez que é capaz de se incorporar na molécula deste ácido nucleico, onde substitui a timidina.

Foram preparadas diluições decimais seriadas do vírus que se pretendia identificar (cujo ácido nucleico era desconhecido) e de três vírus controle: um com DNA (*Herpesvirus Salmonis*) e dois com RNA (IPNV e IHNV). Cada uma das diluições decimais era inoculada em duas séries de culturas celulares em placa: uma com meio normal e outra com meio contendo BDU 0,1 mM. Após o período de incubação, calculava-se, para cada vírus, o título nas culturas com meio normal e nas culturas com meio contendo BDU. Se o vírus desconhecido apresentar uma redução de pelo menos um logaritmo decimal (90%) no seu título devido ao tratamento com BDU, então é considerado sensível a este tratamento e contém DNA como ácido nucleico. Entre os vírus controle, deve verificar-se que o vírus que se sabe possuir DNA sofre esta redução drástica no seu título devido ao tratamento com BDU, mas os vírus com RNA não são afectados por ele.

3.3.1.7.4. Coloração do Ácido Nucleico Viral

As técnicas de coloração do ácido nucleico, embora sejam consideradas de interpretação subjectiva por vários autores, permitem determinar se o material genético viral consiste em DNA ou RNA, se este é monocatenário ou bicatenário e se o vírus se replica no citoplasma ou no núcleo da célula infectada (Dopazo, 1991).

Para esta coloração foi usado o corante Laranja de Acridina e o protocolo descrito por Kuchler (1977). Cada estirpe viral foi inoculada, a uma MOI ("Multiplicity of Infection" = razão entre os números de viriões e de células que lhes

são susceptíveis; Singleton & Sainsbury, 1994) entre 0,01 e 0,1 em 2 monocamadas celulares da linhagem CHSE-214 formadas sobre lâminas de vidro, incubando-se até ao aparecimento de ECP. De seguida, as células foram fixadas com fixador de Carnoy (Metanol + ácido acético, 3:1) durante 20 minutos, reidratadas com soluções de etanol com concentrações decrescentes (absoluto, 95%, 75%) durante 5 minutos cada, e lavadas em água destilada. As monocamadas foram, então, tratadas com pepsina (a 0,02% em HCl 0,02 M) durante 10 minutos a 37 °C. Uma das lâminas de vidro foi tratada com uma solução de DNAse tipo I pancreática (a 0,01% numa solução de veronal 0,025 M e $MgSO_4$ 0,003 M) e a outra lâmina submetida a tratamento com RNAse A pancreática (a 0,05% em água destilada), durante 30 minutos a 37 °C. Após nova lavagem com água destilada, as monocamadas foram cobertas com uma solução de laranja de acridina a 0,01% em tampão McIlvane (combinar 32,3 ml de uma solução, preparada previamente, de ácido cítrico 0,1 M com 17,7 ml de uma solução, também preparada previamente, de $Na_2HPO_4.7H_2O$ 0,2 M) durante 5 minutos. Procedeu-se à lavagem com o mesmo tampão (mas já sem laranja de acridina) e à observação num microscópio de fluorescência, com a ampliação de 400X. Como controle usaram-se células da mesma linhagem, não infectadas mas tratadas do mesmo modo.

Os ácidos nucleicos monocatenários corados com laranja de acridina apresentam uma fluorescência vermelha intensa, enquanto que os bicatenários aparecem com uma coloração amarela-esverdeada. Assim, em células não infectadas o citoplasma cora-se de vermelho e o núcleo toma a coloração amarela-esverdeada. Por outro lado, o tratamento com pepsina facilita a penetração das enzimas DNAse e RNAse, das quais a primeira actua a nível de qualquer tipo de DNA, seja mono seja bicatenário, enquanto que a actividade da RNAse usada se restringe praticamente ao RNA monocatenário.

3.3.1.7.5. Seroneutralização

As estirpes virais isoladas foram sujeitas a testes de neutralização, de acordo com a técnica "vírus constante-soro variável" (Hetrick, 1989; Ledo, 1990; Dopazo, 1991; Payment & Trudel, 1993), e usando anti-soros de coelho contra os três serótipos tradicionais de IPNV (VR-299, Ab e Sp) e contra IHNV (serótipo 1).

Para a realização dos testes, as suspensões virais procedentes das segundas passagens em culturas celulares (que, de acordo com as características do ECP em CHSE-214 e RTG-2, com a morfologia observada em microscopia electrónica e com os resultados obtidos nos testes de resistência ao clorofórmio, de sensibilidade ao 5-BDU e de coloração com laranja de acridina, foram consideradas como presumíveis

IPNV) foram tituladas e diluídas em tampão Earle (EBSS) até uma concentração de 10^3 $TCID_{50}$/ml. Por outro lado, prepararam-se diluições seriadas dos anti-soros anti-IPNV (serótipos VR-299, Ab e Sp) aos correspondentes títulos de neutralização, incluindo em cada teste pelo menos duas diluições anteriores e duas posteriores à diluição óptima de reacção. De seguida, misturaram-se as diluições de todos os anti-soros com a diluição de cada um dos vírus, na proporção 1:1, deixando incubar durante 1 hora à temperatura ambiente. Após esta incubação, foram inoculadas 6 réplicas de 0,1 ml de cada uma das misturas em placas de microtitulação com monocamadas de células RTG-2.

Como controles positivos, foram usadas misturas das diferentes estirpes virais controle (IPNV, serótipos VR-299, Ab e Sp, e IHNV) com os respectivos anti-soros homólogos; como controles negativos, utilizaram-se estirpes dos mesmos vírus incubadas com anti-soros heterólogos. Com a finalidade de descartar possíveis resultados erróneos devidos a uma actividade anti-IPNV do soro do coelho não imunizado, incluíu-se em cada teste uma mistura da suspensão viral problema com soro normal (não imunizado) de coelho.

Todas as placas foram incubadas a 20 °C durante 15 dias. Após este tempo, procedeu-se à leitura dos resultados, tendo em conta que as estirpes virais problema que reagiram com o anti-soro homólogo na diluição óptima de neutralização não dão lugar à formação de ECP em cultura celular, o que é indicativo de uma especificidade por parte do anti-soro relativamente à estirpe problema.

3.3.1.7.6. Teste "Immunodot"

Este teste foi realizado segundo a metodologia descrita por Caswell-Reno *et al.* (1989), utilizando 5 anticorpos monoclonais (MAb), também usados por estes autores, e gentilmente cedidos pelo Dr. B. L. Nicholson (Departamento de Microbiologia, Universidade de Maine, Estados Unidos da América). Os anticorpos monoclonais usados, e respectivas especificidades, foram os seguintes:

* AS-1 - preparado contra uma estirpe do serótipo C1, pelo procedimento de Caswell-Reno *et al.* (1986, *in* Caswell-Reno *et al.*, 1989); este MAb reage com todas as estirpes do serogrupo A (reconhece um epítopo presente em todas estas estirpes);

* W2 - preparado contra uma estirpe do serótipo WB, pelo procedimento de Caswell-Reno *et al.* (1986, *in* Caswell-Reno *et al.*, 1989); reage com algumas estirpes do serótipo WB (VR-299) e com todas as dos serótipos Ab e Ja;

* W3 - preparado do mesmo modo que W2; reage com todas as estirpes de WB, Sp e Ja;

* W5 - preparado do mesmo modo que W2 e W3; reage com todas as estirpes dos serótipo WB e Ja;

* E2 - preparado contra o "eel virus european", um representante do serótipo Ab; este MAb reage com todas as estirpes dos serótipos Ab, Te e C1.

Para a realização dos testes, foram utilizados como inóculos os sobrenadantes das culturas celulares onde foram detectados os vírus. Estes sobrenadantes foram clareados por centrifugação a 1000 r.p.m. (100Xg) durante 10 minutos, e ajustados a uma concentração mínima de 10^7 $TCID_{50}$/ml; de seguida, foram depositadas alíquotas de 2 µl destas suspensões em tiras de nitrocelulose, deixando-se secar à temperatura ambiente. Após 4 lavagens em TBS ("Tris-Buffered Saline", pH 7,4), procedeu-se ao bloqueio dos restantes locais inespecíficos de ligação de proteínas com uma solução de albumina sérica bovina (3%; peso/volume) e de soro bovino (10%, volume/volume). Cada tira de nitrocelulose foi, então, incubada com o respectivo MAb durante 3 horas, à temperatura ambiente. Após novas lavagens e novo bloqueio dos locais de ligação inespecífica de proteínas (como anteriormente), as tiras de nitrocelulose foram incubadas com imunoglobulina anti-rato (produzida em cabra) conjugada com "horseradish peroxidase", durante 2 horas. As tiras foram lavadas de novo, e incubadas durante 15 minutos no substrato "revelador" (0,5 mg de 4-cloronaftol e 10 µl de H_2O_2 a 3% em 1 ml de TBS). O desenvolvimento de uma coloração púrpura bem visível dentro de 2 a 15 minutos era indicativo de uma reacção positiva (o contraste dos pontos coloridos com o resto da tira de nitrocelulose era, por vezes, mais nítido antes de esta secar, de modo que os resultados eram lidos de imediato, para que fossem correctamente lidas as reacções positivas fracas).

3.3.1.7.7. Caracterização do RNA Mediante Electroforese em Geles de Poliacrilamida

As estirpes isoladas foram inoculadas, em frascos de 75 cm^2, em culturas da linha RTG-2, e incubadas a 20 °C. As suspensões virais assim obtidas foram centrifugadas a 2000 r.p.m. durante 15 minutos, com a finalidade de eliminar possíveis restos celulares existentes na suspensão. Os sobrenadantes foram, de seguida, submetidos a uma ultracentrifugação, a 78000 X g durante 1 hora. O sobrenadante foi eliminado, e as "pellets" contendo as partículas virais foram ressuspensas em 50 µl de tampão citrato salino sódico (1X) ("Sodium Saline Citrate"; SSC) (NaCl 0, 15 M e citrato de sódio 0,015 M; pH 7). Estas novas suspensões virais foram tratadas com 1 µl

de uma solução de RNAse I à concentração de 1 mg/ml, incubando-se a 37 °C durante 30 minutos. Seguiu-se um tratamento com 5 µl de uma solução (20 mg/ml) de Proteinase K (Sigma) com incubação a 65 °C durante 1 hora.

A cada uma das amostras foram, então, adicionados 145 µl de água destilada e 20 µl de acetato de sódio 3 M. A extracção do RNA foi efectuada juntando a cada amostra 100 µl de fenol e 100 µl de uma mistura de clorofórmio e álcool isoamílico (1:1), agitando e centrifugando numa microcentrífuga Eppendorf durante 5 minutos (12000 r.p.m.); assim, as proteínas são separadas do ácido nucleico, que fica no sobrenadante. Este sobrenadante, com o RNA, é sumetido a um novo tratamento com 200 µl da mistura clorofórmio-álcool isoamílico, voltando-se a centrifugar. O sobrenadante é, então, recolhido e misturado com 600 µl de etanol absoluto frio, agitado e colocado a -70 °C durante 15 minutos. Passado este tempo, volta-se a centrifugar, para retirar o etanol. No passo seguinte, adicionam-se 500 µl de etanol a 70% frio, agita-se e centrifuga-se durante 15 minutos, eliminando-se o sobrenadante (etanol). A amostra resultante divide-se em duas subamostras, uma das quais se submete a um tratamento com 1 µl da solução de RNAse I (1 mg/ml em SSC), previamente aquecida a 37 °C, incubando-se a esta temperatura durante 30 minutos; a outra subamostra é tratada com 1 µl de uma solução aquosa de DNAse I (1 mg/ml em NaCl a 0,15 M e glicerol a 50%), procedendo-se a um aquecimento e uma incubação nas mesmas condições que a primeira subamostra. Antes de serem carregadas no gel, as amostras foram misturadas com volumes iguais de tampão de amostra (Tris-HCl a 0,065 M, pH 6,8; Dodecil-Sulfato-Sódico, SDS, a 2%; Glicerol a 10%; Azul de Bromofenol a 0,001%; 2-Mercaptoetanol a 5%), e foram aquecidas a 100 °C durante 5 minutos.

Neste teste foram usados geles de poliacrilamida a 10%, e as electroforeses foram realizadas, em cuvetas verticais, a 150 Volts durante 16 horas (Laemmli, 1970). Após a electroforese, as bandas de RNA presentes nos geles foram coradas com Brometo de Etídio (1 µg/ml em água destilada) e visualizadas com iluminação ultravioleta.

Como controles, foram utilizados vírus IPNV (cada um dos três serótipos principais - VR-299, Ab e Sp), os quais foram submetidos ao mesmo tratamento que os vírus-problema, e incluídos nos mesmos geles para comparação.

3.3.2. RESULTADOS

De entre as 80 amostras de peixes cultivados que foram analisadas, apenas duas provocaram ECP, nas culturas das linhagens celulares CHSE-214, RTG-2 e BF-2. Estas duas amostras positivas para a presença de vírus foram obtidas de trutas arco-íris retiradas de dois tanques da truticultura B, ambas na amostragem de Junho, quando a temperatura da água era de 20 °C (Figura 3.3.1). O peso médio das trutas era de 50 g num dos tanques e 150 g no outro. É interessante referir que, nas trutas do primeiro destes tanques (trutas de cerca de 50 g), também foi isolada *Yersinia ruckeri*. Interessante é, igualmente, o facto de não ter sido observada a existência de qualquer sintoma de doença em nenhuma das trutas analisadas, nem em qualquer das restantes dos mesmos tanques - portanto, este isolamento viral ocorreu em trutas portadoras assintomáticas. Não foi detectado qualquer vírus nos peixes cultivados na truticultura A, o mesmo se verificando relativamente aos peixes selvagens capturados nas proximidades de ambas as truticulturas.

Na tabela 3.3.1 estão indicadas as características observadas nas duas estirpes virais isoladas neste trabalho. Pela sua observação podemos verificar, por exemplo, que ambos os vírus produziram ECP nas culturas das linhagens CHSE-214, RTG-2 e BF-2, mas não na linhagem EPC. A figura 3.3.2 ilustra o aspecto de uma monocamada da linhagem celular CHSE-214 não inoculada (Figura 3.3.2.a) e o ECP produzido nesta mesma linhagem (Figura 3.3.2.b), onde é evidente o aspecto fusiforme das células mortas e as margens difusas das placas de lise, provocadas pela interdigitação destas células mortas com as células vivas circundantes, tal como é referido por Dopazo (1991) como característico de IPNV. Também nas linhagens celulares RTG-2 e BF-2, embora mais marcadamente na primeira, se observou um ECP similar, o que coincide com as características que Wolf (1988) refere como sendo típicas de IPNV, isto é, um retículo de células mortas alongadas e retraídas, e margens das placas de lise grosseiramente estreladas devido às células vivas, que radiam para o seu interior.

A observação dos viriões por microscopia electrónica permitiu verificar que estes possuem uma única cápside, não envolta, de simetria icosaédrica e com um diâmetro de cerca de 60 nm (Figura 3.3.3).

Por outro lado, os vírus isolados revelaram-se resistentes ao tratamento com clorofórmio, o que demonstra tratar-se de vírus sem envoltura lipídica, confirmando a observação efectuada por microscopia electrónica já referida.

Também foi observada resistência ao tratamento com 5-BDU, facto que é indicativo de que o genoma destes vírus consiste em RNA. Esta conclusão foi apoiada

Tabela 3.3.1 - Características das estirpes virais isoladas, na truticultura B, ao longo do presente estudo.

CARÁCTER	REACÇÃO
N° de vírus isolados	2
Formação de Efeito Citopático (ECP) em:	
CHSE-214	Sim
RTG-2	Sim
BF-2	Sim
EPC	Não
N° de Cápsides do Virião	1
Morfologia	icosaédrica
Diâmetro aproximado	60 nm
Teste de Sensibilidade ao Clorofórmio	R
Teste de Sensibilidade à 5-BDU	R
COLORAÇÃO COM LARANJA DE ACRIDINA:	
Células infectadas e não tratadas com DNAse ou RNAse:	
citoplasma	amarelo-esverdeado
núcleo	amarelo-esverdeado
Células infectadas e tratadas com DNAse:	
citoplasma	amarelo-esverdeado
núcleo	amarelo-esverdeado
Células infectadas e tratadas com RNAse:	
citoplasma	amarelo-esverdeado
núcleo	amarelo-esverdeado
N° de Bandas de RNA observadas por SDS-PAGE	2
Pesos moleculares aproximados das bandas	2,0 e 1,9 Md
Seroneutralização:	
com soros anti-IPNV (VR-299, Ab e Sp)	Sim
com soro anti-IHNV	Não
Reacções com Anticorpos Monoclonais:	
AS-1	+
W2	+
W3	-
W5	-
E2	+

R, resistente; +, reacção positiva; -, reacção negativa.

pelos resultados obtidos na coloração com laranja de acridina (Figura 3.3.4). Assim, as células não infectadas apresentavam, após coloração, o citoplasma vermelho e o núcleo amarelo-esverdeado (Figura 3.3.4.a), enquanto que as células infectadas com os vírus em análise exibiam uma fluorescência amarela-esverdeada quer no citoplasma, quer no núcleo, o que é característico de vírus com ácido nucleico de cadeia dupla que se replica no citoplasma. Além disso, nenhum dos tratamentos enzimáticos (DNAse ou RNAse) alterou este resultado (Figura 3.3.4.b e 3.3.4.c), o que indica que o ácido nucleico é RNA bicatenário.

Os testes de seroneutralização utilizando soros anti-IPNV (VR-299, Ab e Sp) proporcionaram a obtenção de resultados positivos, mas no teste com soro anti-IHNV não foi conseguida a neutralização viral. O conjunto destes resultados permite concluír que ambos os vírus isolados neste trabalho são estirpes do Vírus da Necrose Pancreática Infecciosa, IPNV.

No teste "Immunodot" obtiveram-se, com os dois vírus, reacções positivas com os anticorpos monoclonais (MAb) AS-1, W2 e E2, enquanto que as reacções com os MAb W3 e W5 foram negativas. Com base nestes resultados, podemos afirmar que os dois vírus isolados neste trabalho são estirpes do serótipo Ab de IPNV.

O padrão electroforético do RNA viral consistiu (em ambas as estirpes) em 2 bandas, de 1,9 e 2,0 megadalton (Md) (Figura 3.3.5). Estes resultados confirmam tratar-se de um vírus pertencente à família *Birnaviridae*; no entanto, diferem dos resultados obtidos por Dopazo (1991), que verificou que os pesos moleculares dos segmentos de RNA de estirpes do serótipo Ab eram de 1,72 Md (segmento menor ou segmento B) e 2,02 Md (segmento maior ou segmento A); note-se que, embora o peso molecular obtido por Dopazo (1991) para o segmento maior seja muito semelhante ao obtido por nós, há uma diferença de 180 Kd entre os valores obtidos para o segmento menor. Também outros autores chegaram a diferentes valores para os pesos moleculares dos segmentos de RNA; por exemplo, Hedrick *et al.* (1983, *in* Dopazo, 1991) obtiveram os valores de 1,9 Md para o segmento B e 2,3 Md para o segmento A. Curiosamente, estes autores obtiveram o mesmo valor que nós para o segmento menor, mas um valor consideravelmente mais elevado para o segmento maior. De qualquer modo, a diferença entre os pesos moleculares dos dois segmentos das duas estirpes portuguesas é bastante pequena, em comparação com o que obtiveram os dois autores que referimos, isto é, as estirpes portuguesas apresentam um perfil de RNA mais estreito do que as estudadas por aqueles autores; este perfil estreito foi referido por Dopazo (1991) como característico do serótipo Sp. Curiosamente, Novoa *et al.* (1993b) obtiveram um padrão electroforético do RNA, de um IPNV-"like" semelhante

a Ab que isolaram de rodovalhos doentes, exactamente igual ao obtido por nós (pesos moleculares de 1,9 e 2,0 Md para os segmentos B e A, respectivamente); no entanto, não se trata do mesmo vírus, pois a estirpe isolada por aqueles autores não era neutralizada por anti-soros contra os serótipos VR-299, Ab ou Sp.

Estas diferenças nos pesos moleculares dos segmentos de RNA do IPNV estimados por diferentes autores (que também se verificam dentro de outros serótipos do vírus, bem como, evidentemente, entre serótipos distintos) poderão corresponder a diferenças reais entre estirpes, ou poderão estar relacionadas com diferenças nas condições de realização da técnica.

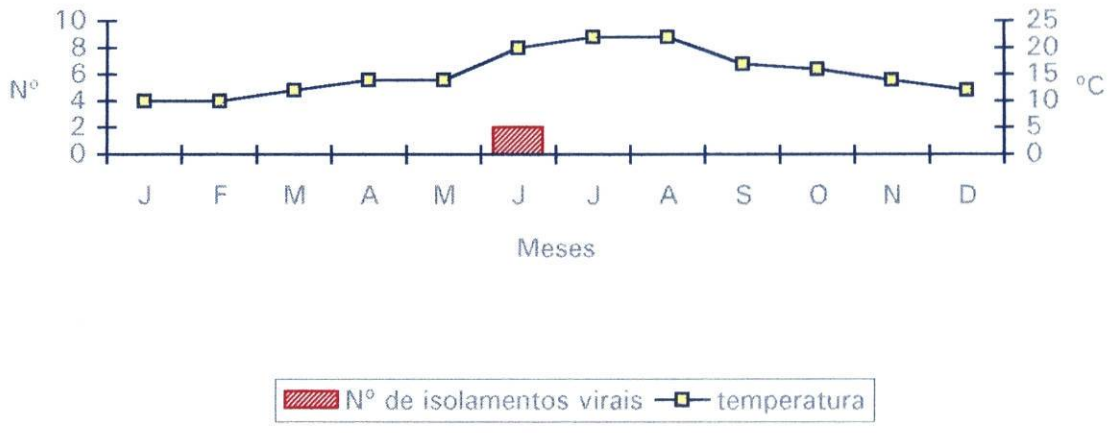


Figura 3.3.1 - Isolamentos virais efectuados ao longo das amostragens mensais na truticultura B.

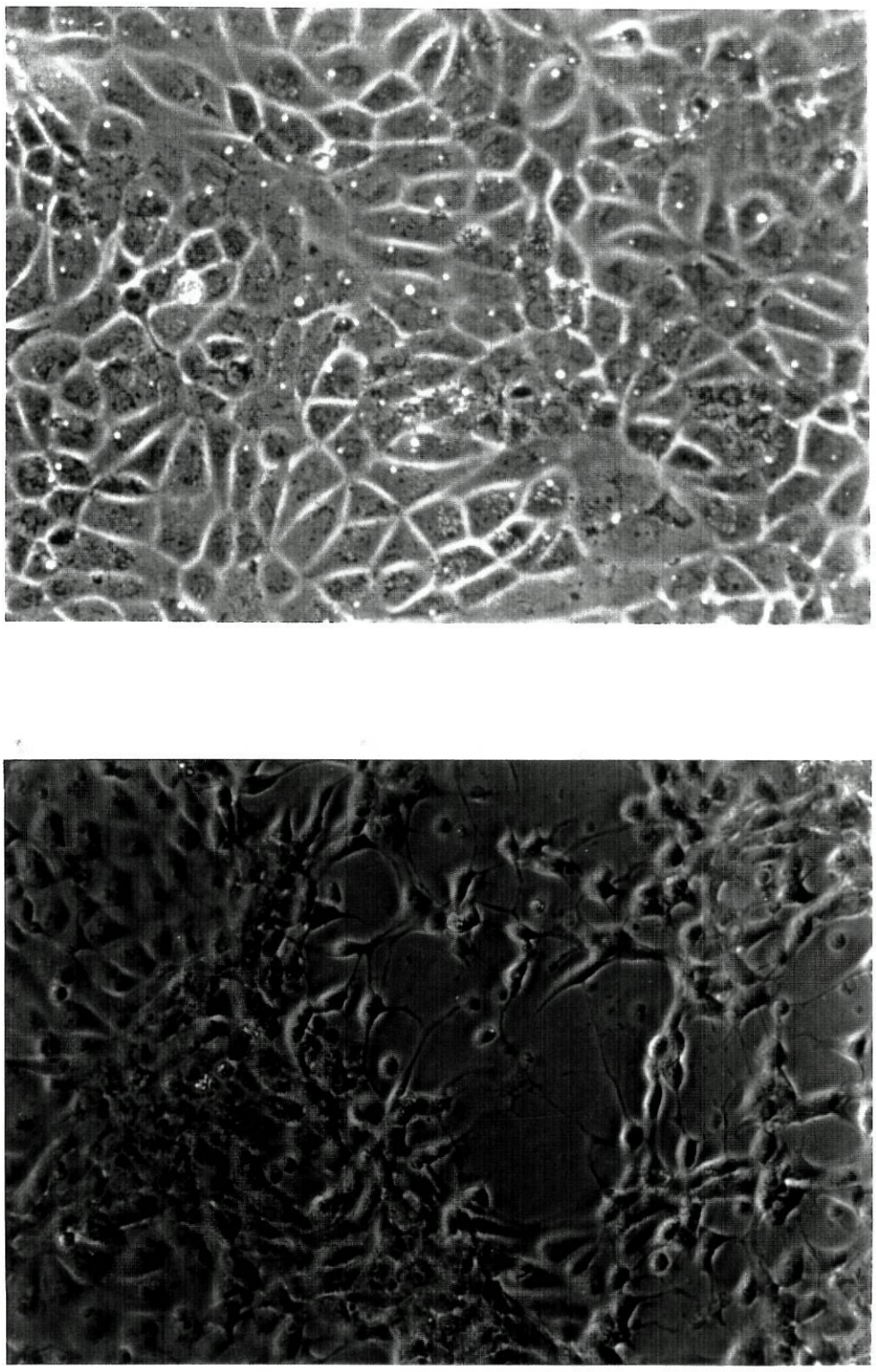


Figura 3.3.2 - Cultura celular da linhagem CHSE-214 não inoculada por vírus (a) e ECP provocado pelas estirpes virais nesta mesma linhagem (b). Ampliação 400X.

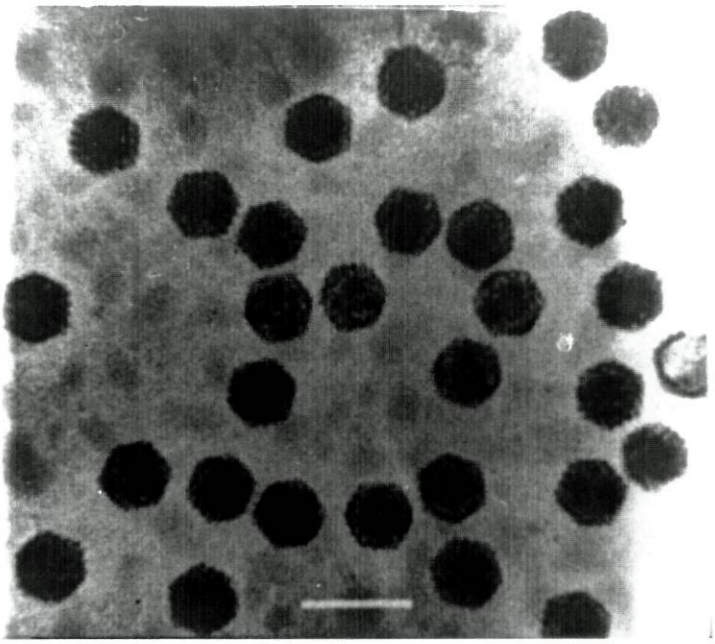


Figura 3.3.3 - Fotografia do vírus isolado, obtida em microscópio electrónico. (Barra - 100 nm).

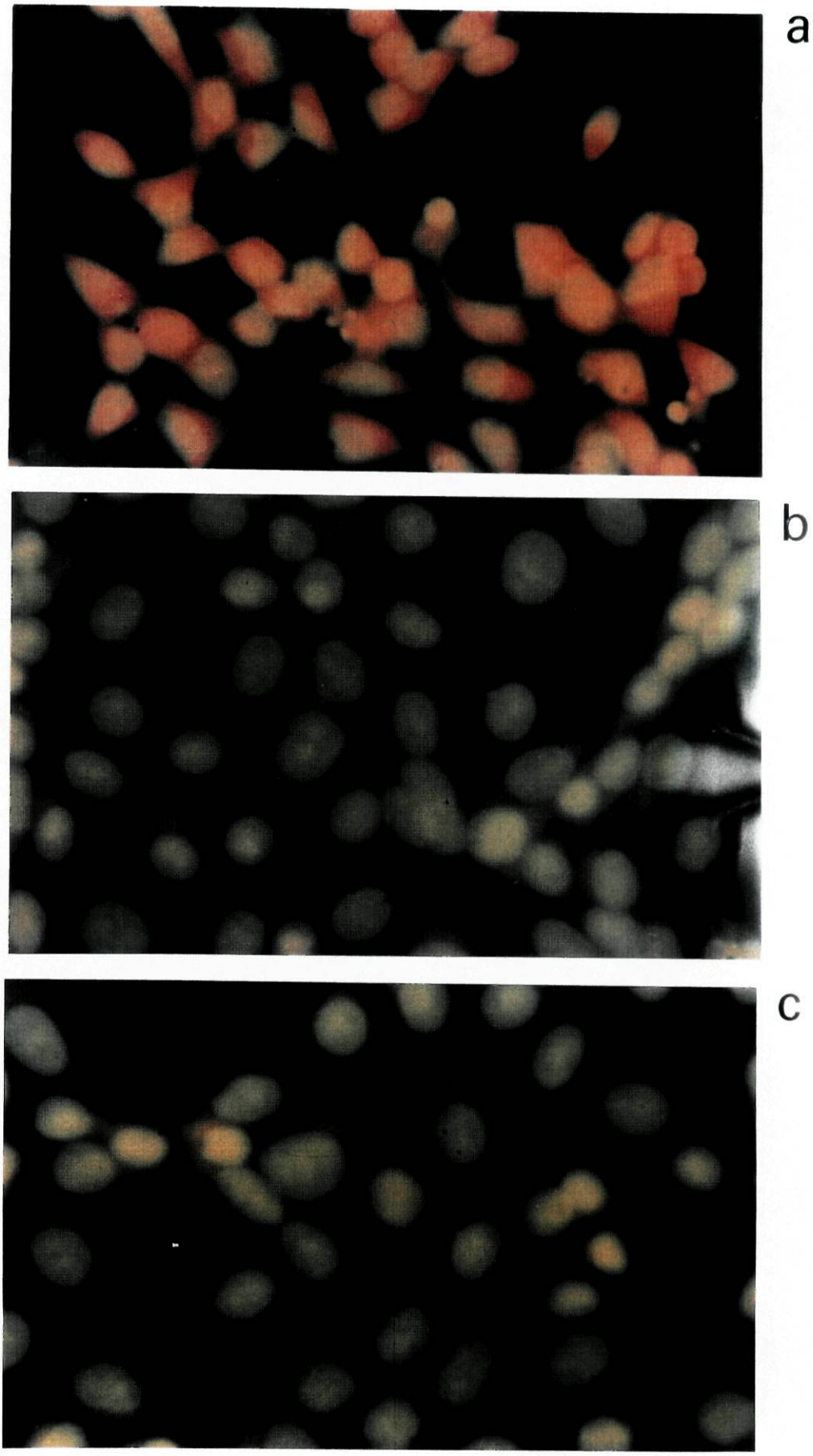


Figura 3.3.4 - Coloração com laranja de acridina de células da linhagem CHSE-214 não infectadas por qualquer vírus (a), e infectadas com o vírus isolado na truticultura B após tratamento com DNAse (b) ou com RNAse (c).

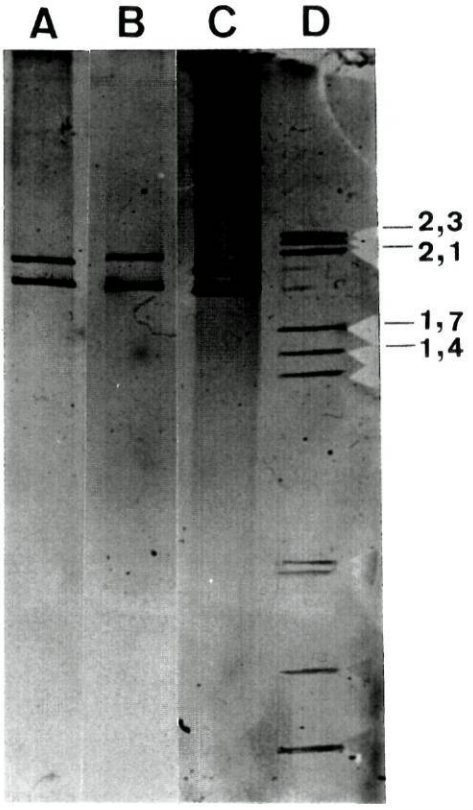


Figura 3.3.5 - Padrão electroforético em gel de poliacrilamida-SDS do ácido nucleico do vírus isolado na truticultura B (Coluna A) e de estirpes de referência dos serótipos Ab (Coluna B) e Sp (Coluna C). Coluna D - marcador de pesos moleculares. Os números indicam massas moleculares em Megadaltons (Md).

3.3.3. DISCUSSÃO

As duas estirpes virais isoladas durante o presente trabalho, cuja caracterização demonstrou pertencerem ao serótipo Ab do Vírus da Necrose Pancreática Infecciosa (IPNV) (família *Birnaviridae*), constituem o primeiro isolamento de um vírus na aquacultura portuguesa.

Este isolamento de IPNV em Portugal não constitui uma surpresa, tendo em conta, por um lado, o rápido desenvolvimento da truticultura portuguesa nas duas últimas décadas (Gouveia, 1994), e, por outro lado, a distribuição mundial deste vírus (McAllister, 1988; Wolf, 1988; Ledo, 1990; Thoesen, 1994).

Também o facto de as estirpes isoladas pertencerem ao serótipo Ab não é surpreendente, pois este é um dos dois serótipos principais do vírus IPN com origem europeia.

De facto, tradicionalmente, considera-se que, de entre os três serótipos principais deste vírus, um é originário dos Estados Unidos da América (serótipo VR-299 ou WB) e os outros dois da Europa (Ab e Sp) (Wolf, 1988; Dopazo, 1991), embora um número crescente de trabalhos indique que a serologia deste vírus é bem mais complicada do que esta divisão poderá fazer supôr. Assim, para além do isolamento de estirpes pertencentes ao serótipo americano na Europa (Novoa *et al.*, 1993a) e do serótipo europeu Ab na América do Norte (McAllister *et al.*, 1984), o isolamento de novas estirpes tem vindo a revelar, por um lado, a existência de novos serótipos (Lipipun *et al.*, 1989; Hill & Way, 1983, *in* Dopazo, 1991; Chi *et al.*, 1991), e, por outro lado, a existência de estirpes de cada um dos três serótipos tradicionais em novos locais, como o Chile, onde foi detectado o VR-299 (McAllister & Reyes, 1984; Espinosa *et al.*, 1985), ou em vários países da Ásia (Japão, China, Tailândia, Coreia). Nestes, têm sido isoladas estirpes, das quais poucas pertencem ao serótipo VR-299 (isoladas principalmente de salmonídeos, embora também de enguias e robalos) (Chi *et al.*, 1991) ou ao Sp (o número de estirpes deste serótipo tem, no entanto, aumentado significativamente, sendo quase todas de origem japonesa) (Chi *et al.*, 1991). A maioria das estirpes asiáticas de Birnavírus aquáticos são, portanto, do serótipo Ab ou muito semelhantes a este, tendo sido isoladas de uma grande variedade de espécies, incluindo peixes, salmonídeos e não salmonídeos, crustáceos e moluscos aquáticos (Lo *et al.*, 1988; Hsu *et al.*, 1989; Chi *et al.*, 1991; Chou *et al.*, 1993). Além disso, várias estirpes recentemente isoladas na Ásia não podem ser incluídas em VR-299, Ab ou Sp (Lipipun *et al.*, 1989; Chi *et al.*, 1991; Kusuda *et al.*, 1993). Chou *et al.* (1993) afirmam que as diferenças nas características de crescimento de vírus semelhantes a

Ab, relativamente às do serótipo Ab típico, sugerem que o IPNV tende a ser modificado pela espécie hospedeira e pelo ambiente. Também Novoa *et al.* (1993b) isolaram uma estirpe semelhante a Ab, responsável por mortalidades pouco elevadas, mas persistentes, em rodovalhos cultivados na Galiza. Esta estirpe, no entanto, diferia do típico serótipo Ab pelo facto de se replicar em células da linha FHM e, também, por não ser neutralizada por anti-soros contra os três serótipos tradicionais do IPNV.

Caswell-Reno *et al.* (1989) e Lipipun *et al.* (1989), utilizando o mesmo conjunto de 11 anticorpos monoclonais, verificaram que a única diferença entre as estirpes asiáticas muito próximas do serótipo Ab (incluindo o vírus conhecido como EVE) e este mesmo serótipo europeu consistia na presença, naquelas estirpes, de um só epítopo (contra o qual é dirigido o anticorpo monoclonal E3 utilizado pelos autores). Seria interessante verificar qual a reacção das estirpes portuguesas, que isolámos, com este MAb, para avaliar a possível semelhança destas com as estirpes asiáticas ou, o que nos parece mais provável, se esta reacção indicaria que se trata de estirpes em tudo semelhantes à estirpe-tipo do serótipo Ab; infelizmente, porém, não nos foi possível utilizar este anticorpo monoclonal no teste "immunodot" que realizámos.

É interessante, a propósito da distribuição geográfica dos diferentes serótipos, comparar os resultados obtidos por nós com a situação espanhola, incluindo a situação particular da Comunidade Autónoma da Galiza. Embora haja referências de isolamentos, em Espanha, de estirpes de IPNV pertencentes aos três serótipos tradicionais, a maior parte delas pertence ao serótipo Sp (Ledo, 1990; Dopazo, 1991; Novoa *et al.*, 1993a; Rivas *et al.*, 1993; Rodriguez *et al.*, 1993a, b, 1994; Sanjuan *et al.*, 1993, 1994). Também os IPNV-"like" isolados por Rivas *et al.* (1993) de moluscos (*Mytilus galloprovincialis*, *Ostrea edulis*, *Crassostrea gigas*, *Littorina* e *Monodonta*) e sedimentos marinhos foram neutralizados mais intensamente com anti-soro anti-Sp do que anti-Ab ou anti-VR299, embora houvesse reacções cruzadas com estes dois anti-soros. Esta diferença nos serótipos dos Birnavírus aquáticos detectados na Galiza e no Norte de Portugal está, provavelmente, relacionada com uma origem diferente. A origem das estirpes portuguesas terá sido, muito provavelmente, a ilha britânica de Man, local de onde foram importados ovos para a truticultura B, em 1992.

É importante, porém, ter bem presente o facto de que a classificação serológica dos vírus IPN e IPN-"like" é muito complexa, e que muitas das estirpes consideradas como pertencentes a um determinado serótipo podem não ter exactamente as mesmas características antigénicas que a estirpe-tipo desse serótipo (Dopazo, 1991). Portanto, este problema da classificação serológica do IPNV está longe de ser encerrado, com

todas as dificuldades que isso acarreta relativamente ao estudo da sua epidemiologia. Por esta razão, Dopazo (1991) afirma que é difícil ter a certeza de que as estirpes que isolou e que, como referimos, foram consideradas como do serótipo Sp, pertencem mesmo a este serótipo ou deverão considerar-se de serótipos distintos dos três tradicionais; deste modo, o autor afirma, ainda, que é difícil, se não impossível, determinar fidedignamente qual é a origem das estirpes que isolou (europeia ou americana).

O facto de não ter sido observada qualquer epizootia de IPN na truticultura B (não apenas na amostragem de Junho ou durante o ano de 1993, em que decorreram as amostragens, mas também antes ou depois deste período), apesar de terem sido isoladas as duas estirpes virais, deverá ficar a dever-se a uma combinação de vários factores, como: a) o facto de não se proceder à incubação dos ovos na truticultura (a qual é realizada numa outra truticultura, situada na bacia hidrográfica do rio Douro), de modo que as trutas mais jovens (os alevins), que são mais susceptíveis à doença, não estão em contacto com o vírus nesta truticultura (no entanto, se o IPNV tiver sido introduzido através dos ovos importados da ilha de Man, o vírus deverá estar presente, também, nesta truticultura em que se procede à incubação dos ovos); b) há uma grande concordância, na literatura sobre este assunto, que o serótipo Ab do IPNV é pouco ou nada virulento, ao contrário do que acontece com os outros dois serótipos principais do vírus (Krogsrud *et al.*, 1988; McAllister, 1988); embora este serótipo pareça ter sido associado a mortalidades ocorridas em várias espécies de peixes selvagens no estuário de um rio da Carolina do Norte (Estados Unidos da América) (McAllister *et al.*, 1984), os autores admitem que a causa das mortalidades terá sido outra, que não o vírus; c) a elevada temperatura observada em Junho (19,5 °C), à qual não são observadas epizootias ou mortalidades apreciáveis (Ledo, 1990).

O isolamento do IPNV coloca alguns problemas importantes: a) trata-se de um vírus que pode causar infecções persistentes (estado de portador assintomático), em exemplares aparentemente saudáveis, que libertam o vírus para o meio ambiente, nas fezes, urina e produtos sexuais (Wolf, 1988; Romalde & Toranzo, 1995); b) o vírus IPNV é o vírus de peixes que tem uma maior estabilidade, não só em condições laboratoriais, mas também no meio ambiente (água, sedimento, e espécies animais, incluindo barbos, escalos e bogas, que podem constituir vectores deste agente viral) (McAllister, 1988; Wolf, 1988; Ledo, 1990), permanecendo neste por longos períodos de tempo (Romalde & Toranzo, 1995); c) pode ser transmitido verticalmente (Fijan & Giorgetti, 1978; Ledo, 1990; Ledo *et al.*, 1990b; Bootland *et al.*, 1991), e não existem vacinas ou tratamentos suficientemente eficazes contra ele; d) as práticas causadoras de stress aos peixes devem ser evitadas com empenho acrescido, pois o stress é um

factor importante no desenvolvimento de epizootias em populações portadoras deste vírus (McAllister, 1988; Thoesen, 1994). No entanto, o facto de se tratar do serótipo Ab, pouco ou nada virulento, permite ter algum optimismo quanto às implicações económicas desta detecção vírica no nosso País.

De entre as 80 amostras de peixes cultivados e 17 de peixes selvagens que analisámos ao longo deste estudo, apenas duas se revelaram positivas para a presença do vírus; além disto, ambas pertenceram à truticultura B. Isto sugere que o IPNV se encontra em Portugal ainda com uma incidência muito baixa. Na Galiza, pelo contrário, a incidência do IPNV é elevada nas pisciculturas em água doce (embora, na aquacultura marinha seja, também, muito baixa) (Dopazo, 1991; Rodriguez *et al.*, 1994; Romalde & Toranzo, 1995).

Um outro facto importante que ressalta deste trabalho consiste em não ter sido isolado qualquer outro vírus em nenhuma das truticulturas estudadas, embora, evidentemente, este não isolamento de outros vírus não signifique necessariamente a sua ausência. Em particular, parece-nos significativo não terem sido detectados os Rabdovírus da Necrose Hematopoiética Infecciosa ("Infectious Hematopoietic Necrosis Virus"; IHNV) e da Septicémia Hemorrágica Viral ("Viral Hemorrhagic Septicemia Virus", VHSV; ou "Egtved Virus"), pois as linhas celulares que usámos permitem o isolamento destes vírus (o IHNV cresce em CHSE-214, BF-2 e EPC, e o VHSV cresce em CHSE-214, RTG-2 e BF-2). Recorde-se que estes dois Rabdovírus são considerados, juntamente com o IPNV, os mais importantes, do ponto de vista das perdas económicas que causam em aquacultura (Sanz & Coll, 1992); o seu não isolamento leva a supôr que o IPNV é, por enquanto, o único vírus que foi introduzido em Portugal. Assim sendo, é fundamental o estabelecimento de medidas de controlo adequadas e eficazes para evitar a entrada no País de outros agentes virais, nomeadamente serótipos mais virulentos do IPNV, IHNV ou VHSV. O VHSV é endémico na maior parte dos países da Europa continental, e também foi isolado na Suécia e na Finlândia, para além de algumas zonas dos Estados Unidos da América (Ahne & Jorgensen, 1993; Thoesen, 1994). Romalde & Toranzo (1995) referem a detecção deste vírus em Espanha (em 1988), embora Rodriguez *et al.* (1994) não o tenham isolado, especulando sobre a possibilidade de ele não ser capaz de sobreviver a algumas temperaturas elevadas (18-23 °C) e elevados níveis de radiação ultravioleta observados na região. Por outro lado, o IHNV, embora endémico de várias zonas dos Estados Unidos da América, Canadá e Japão, recentemente provocou epizootias em alguns países europeus, nomeadamente Itália, França, Alemanha e Suiça (Ahne & Jorgensen, 1993; Thoesen, 1994).

Entre as medidas de controlo destinadas a evitar a entrada de novos vírus em Portugal, deverá incluír-se sempre a análise de todos os stocks de ovos importados. De qualquer modo, as medidas de controlo devem estender-se aos movimentos de peixes e/ou ovos dentro do País, uma vez que, por esta via, pode ser disseminado o IPNV que detectámos na truticultura B, bem como qualquer outro agente patogénico (viral ou não) que, entretanto, venha a "conseguir" entrar em Portugal sem ser detectado.

IV. DISCUSSÃO GERAL

IV. DISCUSSÃO GERAL

Como já foi referido (capítulo 1.2), pouco tempo depois da definição em Portugal das doenças de peixes de declaração obrigatória, em 1985, foi realizado um estudo extensivo (Eiras *et al.*, 1987) destinado a "fazer o ponto da situação" das dezanove truticulturas existentes nessa altura no país no que diz respeito à presença ou ausência das doenças de declaração obrigatória de etiologias bacteriana e parasitária. Os resultados deste estudo, aliados à inexistência de qualquer referência à presença no país de doenças de etiologia viral, demonstraram que Portugal se encontrava, no domínio da patologia em aquacultura, numa situação única e extraordinariamente privilegiada em relação aos outros países europeus, pois, ao contrário destes, não tinha sido detectada nenhuma doença de declaração obrigatória.

Num trabalho posterior (Eiras *et al.*, 1988), os mesmos autores explicam esta situação privilegiada de Portugal no contexto europeu com base em factores geográficos e económicos. Assim, por um lado, a localização de Portugal no extremo ocidental da Europa, apenas possuindo fronteira com a Espanha (país onde, no entanto, já tinham sido detectadas algumas doenças de declaração obrigatória), faz com que os riscos de contaminação sejam menores do que os existentes noutros países. Por outro lado, a menor intensidade da aquacultura, juntamente com o facto de esta ser uma actividade mais recente em Portugal do que no resto da Europa, provocou importações de ovos menos abundantes e menos frequentes. Segundo os autores, estas importações menos abundantes e menos frequentes terão contribuido decisivamente para a inexistência das doenças que pesquisaram.

A situação privilegiada que encontraram levou ainda Eiras *et al.* (1988) a chamar a atenção para as suas grandes vantagens, dos pontos de vista biológico e económico, pois a manutenção desta situação poderia facilmente conduzir a um aumento de explorações tendentes a possibilitar a exportação de ovos com origem em stocks livres de tais doenças. Mais, os autores chamaram a atenção para a necessidade de tomar medidas no sentido de evitar a introdução em Portugal de qualquer das doenças de declaração obrigatória ou, no caso de qualquer delas ser introduzida, no sentido de evitar a sua disseminação. Para atingir estes fins, a medida mais eficaz seria a proibição de efectuar qualquer importação, embora os autores reconheçam a impossibilidade prática do seu estabelecimento; no entanto, essas importações, bem como a transferência de ovos ou peixes entre regiões dentro do país, deverão ser limitadas e sempre acompanhadas pelos respectivos certificados de sanidade.

Finalmente, os produtos importados ou transferidos deverão sempre ser sujeitos a quarentena, isto é, deverão ser isolados até ao momento em que se tenha a certeza de não virem a ser causa de introdução de doenças.

No entanto, nenhuma destas medidas pode permitir eliminar totalmente os riscos de introdução de doenças, e estes riscos tornam-se cada vez maiores à medida que a actividade de aquacultura se desenvolve. Assim, o facto de a aquacultura portuguesa ter sofrido um grande desenvolvimento nas últimas décadas, e especialmente desde a entrada na Comunidade Económica Europeia (Gouveia, 1990, 1994), acarreta consigo, necessariamente, maiores riscos de introdução de doenças devido a uma maior necessidade de importação de produtos, como ovos ou peixes. Tendo isto em conta, pode considerar-se "normal" a detecção de *Aeromonas salmonicida* (Saraiva *et al.*, 1989).

Porém, é importante que os estudos sobre a patologia acompanhem os desenvolvimentos da aquacultura, de modo que, por um lado, se mantenha "em dia" o conhecimento sobre as doenças presentes e, por outro lado, os grandes prejuizos provocados pelas doenças contagiosas nas populações em cultura intensiva possam ser minorados por medidas de controle tanto quanto possível eficazes.

Tendo em vista este objectivo, e tendo em conta a exiguidade dos trabalhos efectuados em Portugal neste domínio (particularmente na área da microbiologia), foi levado a cabo o presente estudo em duas truticulturas (com condições ecológicas diferentes) situadas, no norte de Portugal, em diferentes bacias hidrográficas e a uma grande distância entre si. Recorde-se que a truticultura constitui cerca de 80% da aquacultura em água doce em Portugal, situando-se as unidades que se dedicam a esta actividade no norte e no centro do país. Uma parte importantíssima deste estudo foi, evidentemente, a pesquisa de agentes etiológicos, bacterianos e virais, de doenças de declaração obrigatória, uma vez que *A. salmonicida*, detectada já em 1989, era o único desses agentes identificados em Portugal. Todavia, também foram estudados os principais grupos bacterianos existentes nas amostras ambientais, sua variação sazonal e sua comparação com os grupos isolados dos órgãos internos dos peixes, quer cultivados, quer selvagens.

De um modo geral, os grupos bacterianos que foram detectados nas amostras ambientais (água e sedimento) analisadas (ver capítulo 3.1) podem ser considerados como grupos habitualmente presentes no meio aquático. De facto, a detecção nestes ambientes de água doce de *Pseudomonas-Xanthomonas*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter-Moraxella*, *Aeromonas* móveis e *Enterobacteriaceae* é referida na generalidade dos trabalhos publicados sobre este assunto. Este conjunto de grupos

bacterianos foi detectado em ambas as truticulturas, bem como no rio adjacente à truticultura A, embora em diferentes proporções relativas. Por outro lado, também, em cada uma das truticulturas, se observou uma variação nessas proporções ao longo das 12 amostragens mensais efectuadas, o mesmo acontecendo em relação ao rio.

A pesquisa de agentes etiológicos de doenças de declaração obrigatória permitiu a obtenção de resultados muito significativos e muito importantes no contexto da patologia na aquacultura portuguesa.

Por um lado, foi confirmada a existência de *A. salmonicida* na truticultura A, local onde esta espécie bacteriana foi detectada por Saraiva *et al.* (1989) e onde é provável que tenha permanecido desde então em peixes portadores assintomáticos (assumindo particular importância, provavelmente, a população de trutas comuns cultivadas nesta truticultura, uma vez que estas são muito mais susceptíveis à bactéria do que as trutas arco-íris) e/ou no meio ambiente (em particular no sedimento, ao qual as células bacterianas podem adsorver-se e, além disso, no qual elas encontram uma maior concentração de nutrientes à sua disposição). É provável, inclusivé, que tenha ocorrido, e continue a ocorrer, uma "circulação" desta bactéria entre o meio ambiente e os peixes, só se tornando evidente quando os peixes estão sujeitos a níveis de stress suficientes para o desencadeamento de epizootias, como a que ocorreu em Julho-Agosto de 1993 e permitiu a detecção do agente etiológico (ver secção 3.1.3 desta dissertação). As dificuldades existentes na detecção de *A. salmonicida* a partir de amostras ambientais e de peixes portadores são, muito provavelmente, responsáveis pelo facto de esta espécie ter sido isolada apenas aquando da referida epizootia de furunculose e não ter sido detectada no rio (quer nas amostras de água e sedimento, quer nos peixes selvagens analisados).

Os resultados mais notórios do estudo que efectuámos são, no entanto, as detecções, pela primeira vez em Portugal, de dois outros agentes etiológicos de doenças de declaração obrigatória: a bactéria *Yersinia ruckeri* e o Vírus da Necrose Pancreática Infecciosa (IPNV). Este último constitui, ainda, o primeiro vírus detectado na aquacultura portuguesa. Estes isolamentos de novos agentes etiológicos de doenças de declaração obrigatória em Portugal foram já referidos em publicações originadas nos resultados obtidos no presente trabalho (Sousa *et al.*, 1994; Sousa *et al.*, 1996).

O isolamento do vírus da Necrose Pancreática Infecciosa não pode considerar-se surpreendente, em face da distribuição mundial do vírus e do facto de as estirpes isoladas pertencerem a um dos dois principais serótipos europeus, o serótipo Ab. Como já foi referido (secção 3.3.3), a origem provável deste vírus foi a ilha britânica de Man, da qual foram importados ovos para a truticultura B (onde ocorreram estes

isolamentos virais), embora não possa descartar-se totalmente a possibilidade de que o vírus tenha sido introduzido através de outra unidade de cultura de salmonídeos (*Salmo salar*) que esteve em funcionamento na mesma bacia hidrográfica que a truticultura B (Gouveia, 1994). Este isolamento de um vírus coloca alguns problemas adicionais de controle, relativamente ao isolamento de bactérias, os quais resultam em grande parte da inexistência de meios terapêuticos adequados ao controle viral. Na secção 3.3.3 foram já indicados alguns dos problemas principais que, no nosso entender, a "entrada" do IPNV em Portugal coloca, bem como são referidas algumas explicações possíveis para o facto de não terem sido observados problemas sanitários provocados por este vírus, nomeadamente a não observação de qualquer epizootia de IPN (a esta ausência de problemas não deverá ser estranho, entre outras causas, o facto de se tratar do serótipo Ab, pouco ou nada virulento).

Se, por um lado, também não constitui uma grande surpresa o isolamento de *Y. ruckeri* em Portugal, tendo em conta o já referido grande desenvolvimento da aquacultura no país, ou, até, o facto de esta bactéria ter sido detectada nas duas truticulturas estudadas, parece-nos surpreendente, e de grande significado epizootiológico, a considerável diversidade de estirpes desta bactéria isoladas, especialmente na truticultura B (ver capítulo 3.2): mesmo sem termos em conta as diferenças detectadas através dos estudos genéticos e moleculares (analisadas pormenorizadamente nas secções 3.2.2.2 e 3.2.3.2), foram detectadas estirpes pertencentes a diferentes serótipos e a diferentes biótipos. Assim, para além de estirpes do serótipo O1 de Romalde *et al.* (1993) (antigo serótipo I), foram encontradas estirpes que pertencem ao serótipo O3 dos mesmos autores (antigo serótipo V). Se, por um lado, não surpreende a detecção de estirpes do serótipo O1, largamente representado na generalidade dos países europeus (nos quais, para além deste, apenas foi detectado, em poucas ocosiões, o serótipo O2), o mesmo não poderá afirmar-se relativamente às estirpes do serótipo O3, até agora detectadas apenas na América do Norte. Por outro lado, todas as estirpes do serótipo O1 se revelaram incapazes de fermentar o sorbitol, contrariamente às do serótipo O3, que têm todas esta capacidade; deste modo a separação por serótipos coincide exactamente com uma separação por biótipos, definidos com base na fermentação do sorbitol. Um outro critério diferenciador de biótipos é a mobilidade ou imobilidade das estirpes, quase sempre associada à capacidade ou incapacidade de hidrolisar o Tween 80 (Davies & Frerichs, 1989). De facto, embora a maior parte das estirpes de *Y. ruckeri* que isolámos pertença ao biótipo 1 destes autores, isto é, seja móvel e Tween 80 positiva como a maior parte das estirpes isoladas no continente europeu, foram isoladas algumas estirpes imóveis e incapazes de hidrolisar o Tween 80, isto é, pertencentes ao biótipo 2 daqueles autores. O biótipo 2 de Davies & Frerichs (1989) apenas tinha sido detectado na Grã Bretanha

e na Noruega, e, posteriormente, na Alemanha (Klein *et al.*, 1994). Como já foi referido (secção 3.2.3.2), o isolamento de estirpes deste biótipo na truticultura B, aliado ao facto de ter sido detectado o vírus da Necrose Pancreática Infecciosa, leva a supôr que estas duas introduções de agentes etiológicos de doenças de declaração obrigatória tenham ocorrido simultaneamente, muito provavelmente através dos ovos importados da ilha de Man. A introdução das estirpes do serótipo O3 em Portugal, embora possa ter ocorrido concomitantemente, parece, no entanto, indicar uma contaminação de origem diferente, nomeadamente norte americana, quer através de importação de produtos (ovos ou peixes) directamente deste continente, quer através de um outro país europeu. De qualquer modo, a variabilidade detectada entre as estirpes de *Y. ruckeri* isoladas nas duas truticulturas permite também supôr que tenham ocorrido outras introduções, com diferentes origens, e, até, que alguma ou algumas das estirpes pudesse(m) estar já presente(s) no meio ambiente (no rio ou na albufeira), daqui passando para a(s) truticultura(s). Por exemplo, a introdução de estirpes do serótipo O1 poderá ter ocorrido a partir de Espanha, e, em particular, da Comunidade Autónoma da Galiza (o que parece não ser difícil dada a sua proximidade e o facto de as estirpes desta espécies aí detectadas pertencerem todas a este serótipo); por outro lado, o facto de ter sido detectada uma estirpe, na água da truticultura A, que se verificou ser diferentes de todas as outras (inclusivé das do mesmo serótipo, O1) em quase todas as características testadas poderá fazer-nos pensar que esta estirpe estará bem adaptada a uma vida livre no meio ambiente. Todavia, esta estirpe é, tal como todas as outras que foram usadas nos ensaios de patogenicidade, altamente virulenta para truta arco-íris.

Os resultados obtidos no presente trabalho confirmam, portanto, a necessidade de um rastreio sanitário frequente das instalações onde se procede à aquacultura, no sentido de se possuir um conhecimento actualizado sobre as doenças que poderão ocorrer e provocar importantes perdas económicas. Estes resultados permitiram, assim, verificar que a situação privilegiada encontrada por Eiras *et al.* (1987) está a degradar-se, sendo necessário tomar urgentemente medidas de controle que permitam reduzir ao mínimo possível os riscos de introdução de novos agentes de doenças de declaração obrigatória, quer bacterianos, quer virais.

De qualquer modo, a não detecção de *Renibacterium salmoninarum* (agente etiológico da Doença Bacteriana Renal), embora não significando necessariamente a sua inexistência nas truticulturas estudadas, devido às grandes dificuldades inerentes às tentativas de detecção e isolamento desta bactéria fastidiosa, constitui um motivo de optimismo, uma vez que esta é uma das doenças bacterianas mais difíceis de tratar (se não mesmo a mais difícil) (Eiras *et al.*, 1988). Também a situação resultante do

isolamento do serótipo Ab do IPNV, acompanhada do não isolamento de qualquer outro vírus, embora seja motivo de preocupação devida à existência de um agente viral na nossa aquacultura, não deixa de permitir um optimismo considerável; de facto, nenhuma estirpe viral virulenta foi detectada (nomeadamente pertencente aos serótipos Sp ou VR-299 do IPNV, ao IHNV ou ao VHSV). No entanto, este optimismo tem que ser moderado, pois é urgente o estabelecimento das medidas profiláticas necessárias para evitar a introdução no país destas estirpes virulentas, e, também, é importante evitar que as bactérias ou vírus que já existem em Portugal se espalhem para regiões que ainda estão livres destes microrganismos.

V. CONCLUSÕES

V. CONCLUSÕES

O estudo dos principais grupos bacterianos presentes nos peixes e nas amostras ambientais, da sua variação sazonal e da sua resistência/sensibilidade a substâncias antimicrobianas, permite retirar as seguintes conclusões:

1. Os grupos bacterianos detectados nos órgãos internos dos peixes analisados e nas amostras ambientais são, de um modo geral, similares aos referidos na generalidade dos trabalhos publicados sobre este assunto, podendo ser considerados como habitualmente presentes no meio aquático.

2. Os grupos bacterianos detectados predominantemente nos órgãos internos dos peixes aparentemente saudáveis da truticultura A, ao longo das amostragens efectuadas, não reflectiram os grupos mais abundantes nas amostras ambientais, sendo *Flavobacterium*, geralmente, muito mais frequente nos peixes do que nas amostras de água e sedimento, enquanto que o inverso se verificou relativamente aos grupos *Pseudomonas-Xanthomonas* e *Aeromonas* móveis. Uma situação muito semelhante a esta foi encontrada no rio adjacente a esta truticultura.

   Na truticultura B, embora o grupo das *Aeromonas* móveis tenha sido detectado com menor abundância nos peixes aparentemente saudáveis do que nas amostras ambientais, os padrões de distribuição dos outros grupos bacterianos por estes tipos de amostras não são tão claros como na truticultura A. Também não foi encontrada uma correlação entre os grupos bacterianos isolados dos peixes e os isolados das amostras ambientais ao longo das amostragens mensais.

3. Na truticultura B, os grupos bacterianos detectados nos peixes cultivados doentes são os mesmos que foram isolados de peixes com aparência saudável, embora as quantidades relativas tenham sido diferentes. As principais diferenças observaram-se nos grupos *Pseudomonas-Xanthomonas* (mais abundante nos aparentemente saudáveis), *Flavobacterium* e *Aeromonas* móveis (mais abundantes nos doentes).

   Na truticultura A, a situação encontrada foi diferente, pois dos peixes doentes foram isoladas *Aeromonas salmonicida* e *Yersinia ruckeri*, as quais não foram detectadas em peixes aparentemente saudáveis.

4. Nos peixes selvagens capturados na albufeira em que se situa a truticultura B foi encontrada uma menor diversidade de grupos bacterianos do que nos peixes cultivados nesta truticultura. Nomeadamente, não foi detectado o grupo

Staphylococcus-Micrococcus nem a espécie *Yersinia ruckeri* nos órgãos internos dos peixes selvagens.

5. As percentagens de estirpes resistentes a cada uma das substâncias antimicrobianas usadas foram quase sempre muito mais elevadas nos grupos de bactérias oxidativas, e especialmente em *Pseudomonas-Xanthomonas* (no qual estas percentagens foram sempre iguais ou superiores a 30%). Pelo contrário, verificou-se que alguns antibióticos impediram o crescimento de quase todas as estirpes de bactérias fermentativas. Deste modo, eventuais epizootias provocadas por bactérias dos grupos *Enterobacteriaceae* e *Aeromonas* móveis poderiam ser controladas com relativa facilidade com substâncias como trimetoprim-sulfametoxazol ou, especialmente, norfloxacina, ao contrário do que se passaria com bactérias oxidativas, cujo controle seria bastante mais problemático.

6. A nitrofurantoína foi a substância antimicrobiana à qual foram observadas mais resistências nas duas truticulturas, excepto no grupo das *Aeromonas* móveis. Entre as quinolonas, de um modo geral, observou-se existir menos resistência à norfloxacina do que ao ácido oxolínico, como seria de esperar tendo em conta o facto de a norfloxacina pertencer ao grupo das quinolonas fluoradas (ao contrário do ácido oxolínico).

7. O uso de furazolidona para controlar a epizootia de furunculose que ocorreu na truticultura A parece ter influenciado a composição qualitativa da comunidade bacteriana detectada em Agosto especialmente nas amostras ambientais, favorecendo o desenvolvimento de um predomínio de *Flavobacterium* e desfavorecendo o grupo das *Aeromonas* móveis.

A pesquisa de agentes etiológicos de doenças de declaração obrigatória permitiu a dedução das conclusões que se seguem:

8. Foi detectada a presença, na truticultura A, da bactéria *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, a qual foi responsável pela única epizootia observada ao longo deste trabalho.

   O facto de esta bactéria ter sido previamente isolada nesta mesma truticultura, aliado à existência de produção de ovos e alevins na própria truticultura permite concluir que a bactéria tem permanecido nesta unidade, quer em peixes portadores quer no meio ambiente (em particular no sedimento), apenas não sendo detectada nestes devido à inexistência de meios de detecção suficientemente adequados.

Entre as 4 estirpes de *A. salmonicida* isoladas foi observada uma homogeneidade total em quase todas as características analisadas, nomeadamente fenotípicas, genéticas e moleculares. A única excepção ocorreu na ribotipagem quando foi usada a enzima de restrição *Xba*I, com a qual se obtiveram dois ribótipos; estes, no entanto, apresentam algumas semelhanças entre si.

A ribotipagem foi, portanto, o único método capaz de revelar alguma variabilidade, pelo menos aparente, entre as 4 estirpes de *A. salmonicida* isoladas.

9. Foi detectada, em ambas as truticulturas, a espécie bacteriana *Yersinia ruckeri*, o que corresponde ao primeiro isolamento desta bactéria em Portugal.

   Na truticultura A apenas foram detectadas estirpes de *Y. ruckeri* pertencentes ao serótipo O1 de Romalde *et al.* (1993), enquanto que na truticultura B foram isoladas estirpes pertencentes a este serótipo (principalmente de peixes) e ao serótipo O3 (principalmente de sedimento). Apenas estirpes do serótipo O1 foram isoladas em associação com problemas sanitários, apesar de não ter sido observada qualquer epizootia de ERM, quer na truticultura A quer na B. No entanto, os ensaios de patogenicidade realizados revelaram que todas as estirpes, independentemente do serótipo a que pertencem e do tipo de amostra de que foram isoladas, são altamente patogénicas para truta arco-íris.

   Em Março, na truticultura B, esta espécie bacteriana foi, inclusivé, o grupo bacteriano mais abundante, tendo atingido, também, uma grande abundância na água.

   Todas as estirpes do serótipo O1 se revelaram incapazes de fermentar o sorbitol, ao contrário das pertencentes ao serótipo O3. No entanto, na truticultura B foram detectadas quatro estirpes do serótipo O1 imóveis e Tween 80 negativas, características que definem o biótipo 2 de Davies & Frerichs (1989) por oposição ao biótipo 1, muito mais frequente.

   Apesar de se ter observado, de um modo geral, uma grande homogeneidade nos resultados dos testes bioquímicos e fisiológicos, foram encontrados diferentes padrões de proteínas do envoltório celular, bem como diferentes ribótipos com todas as enzimas de restrição usadas, para além de diferentes padrões plasmídicos nas estirpes do serótipo O3. Isto sugere que as estirpes de *Y. ruckeri* detectadas apresentam alguma diversidade molecular e, sobretudo, genética, embora a natureza das análises realizadas (nomeadamente a ribotipagem) não permita uma avaliação exacta da extensão e do significado desta variabilidade. Por outro lado, é importante

ter em conta a considerável semelhança dos padrões encontrados nessas análises genéticas e moleculares, o que pode constituir um argumento a favor de uma certa homogeneidade desta espécie bacteriana, a qual é referida por alguns autores.

Como melhores sistemas de tipagem revelaram-se, pois, a análise de proteínas do envoltório celular (em particular no serótipo O3) e, especialmente, a ribotipagem (de um modo especial entre as estirpes do serótipo O1).

Embora alguma desta variabilidade encontrada possa ter sido originada por mutações ocorridas após a entrada de alguma(s) estirpe(s) nas truticulturas e, por outro lado, pelo menos alguma das estirpes detectadas possa ser ambiental, estes resultados sugerem diferentes e, provavelmente, repetidas introduções desta bactéria, possivelmente em ambas as truticulturas, mas principalmente na truticultura B.

10. Foram isoladas duas estirpes virais, ambas de trutas arco-íris aparentemente saudáveis cultivadas na truticultura B, cuja caracterização permitiu concluir tratar-se de estirpes pertencentes ao serótipo Ab do Vírus da Necrose Pancreática Infecciosa (IPNV).

    Este constitui o primeiro isolamento de um vírus em unidades de aquacultura em Portugal.

11. Não foi detectada a bactéria *Renibacterium salmoninarum* nem os vírus IHNV e VHSV, bem como os serótipos mais virulentos do IPNV (Sp e VR-299).

    Deste modo, embora a situação sanitária descrita por Eiras *et al.* (1987; 1988) se tenha modificado consideravelmente pela descoberta de *Y. ruckeri* e de IPNV serótipo Ab, os problemas económicos potenciais poderão ficar aquém do significado científico destas descobertas, especialmente no caso viral.

12. Independentemente dos eventualmente limitados problemas económicos resultantes da introdução dos microrganismos patogénicos referidos, os resultados obtidos neste trabalho tornam clara a necessidade premente de, por um lado, realizar rastreios sanitários periódicos em todas as unidades que se dedicam à actividade de aquacultura, e, por outro lado, tomar as medidas que permitam limitar ao mínimo os riscos quer de introdução em Portugal de novos microrganismos patogénicos, bacterianos ou virais, quer da disseminação daqueles que já foram introduzidos para outros locais do país.

VI. BIBLIOGRAFIA

VI. BIBLIOGRAFIA

Adams, A. & K. Thompson, 1990. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of *Aeromonas salmonicida* in fish tissue. *J. Aquat. An. Health*, 2: 281-288.

Ahne, W. & P.E.V. Jorgensen, 1993. Prevalence of neutralising antibodies to IHNV and VHSV in free-living and cultured rainbow trout in Germany. *Bull. Eur Ass. Fish Pathol.*, 13 (1): 7-9.

Albuquerque, M.T., M.S. Grazina-Freitas, M.P. C. Silva & M.T. Ventura, 1986. Vibriose por *Vibrio parahaemolyticus* em xarroco (*Batrachus didactylus* Schneider). *Rep. Trab.L. N. I. V.*, 18: 49-54.

Amend, D.F., K.A. Johnson, T.R. Croy & D.H. McCarthy, 1983. Some factors affecting the potency of *Yersinia ruckeri* bacterins. *J. Fish Dis.*, 6: 337-344.

Anderson, D.P. & A.J. Ross, 1972. Comparative study of Hagerman redmouth disease oral bacterins. *Prog. Fish-Cult.*, 34: 226-228.

Anderson, D.P. & J.R. Nelson, 1974. Comparison of protection in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) inoculated with and fed Hagerman redmouth bacterins. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 31: 214-216.

Anderson, D.P., B.S. Roberson & O.W. Dixon, 1979. Plaque-forming cells and humoral antibody in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) induced by immersion in a *Yersinia ruckeri* O-antigen preparation. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 36: 636-639.

Antipa, R., R. Gould & D.F. Amend, 1980. *Vibrio anguillarum* vaccination of sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka* (Walbaum), by direct and hyperosmotic immersion. *J. Fish Dis.*, 3: 161-165.

Austin, B., 1993. Recovery of "atypical" isolates of *Aeromonas salmonicida*, which grow at 37 °C, from ulcerated non-salmonids in England. *J. Fish Dis.*, 16: 165-168.

Austin, B. & C.J. Rodgers, 1981. Preliminary observations on *Aeromonas salmonicida* vaccines. *Develop. biol. Standard*, 49: 387-393.

Austin, B. & A.M.J. Al-Zaharani, 1988. The effect of antimicrobial compounds on the gastrointestinal microflora of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.*, 33: 1-14.

Austin, B. & D. McIntosh, 1988. Natural antibacterial compounds on the surface of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Dis.*, 11: 275-277.

Austin, B. & D. Allen-Austin (Editores), 1993. *Bacterial fish pathogens. Disease in farmed and wild fish* (2nd edition). Ellis Horwood, Ltd, Chichester.

Austin, B., M. Green & C.J. Rodgers, 1982. Morphological diversity among strains of *Yersinia ruckeri*. *Aquaculture*, 27: 73-78.

Austin, B., J. Rayment & D.J. Alderman, 1983. Control of furunculosis by oxolinic acid. *Aquaculture*, 31: 101-108.

Austin, B., I. Bishop, c. Gray, B. Watt & J. Dawes, 1986. Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assays for the rapid diagnosis of clinical cases of enteric redmouth and furunculosis in fish farms. *J. Fish Dis.*, 9: 469-474.

Austin, D.A., D. McIntosh & B. Austin, 1989. Taxonomy of fish associated *Aeromonas* spp., with the description of *Aeromonas salmonicida* subsp. *smithia* subsp. nov.. *System. Appl. Microbiol.*, 11: 277-290.

Aznar, R., R.J. Owen & J. Hernandez, 1992. DNA-DNA hybridization and ribotyping of *Acidovorax delafieldii* isolates from eels and aquatic environments. *Letters in Applied Microbiology*, 14: 185-188.

Bandín, I., 1992. Caracterización del patogeno de peces *Renibacterium salmoninarum*. Tese de Doutoramento, Santiago de Compostela.

Bandín, I., Y. Santos, J.L. Barja & A.E. Toranzo, 1989. Influence of the growth conditions on the hydrophobicity of *Renibacterium salmoninarum* evaluated by different methods. *FEMS Microbiol. Lett.*, 60: 71-78.

Barja, J.L. & A.E. Toranzo, 1988. Enfermedades bacterianas de peces. *In* Espinosa de los Monteros, J. & U. Labarta (Editores): *Patología en acuicultura*. Mundi-Prensa Libros, Madrid.

Barja, J.L. & A.E. Toranzo, 1989. Enfermedades infecciosas en peces planos. *Cuadernos da Área de Ciencias Marinas, Seminario de Estudos Galegos*, 3: 99-113.

Barja, J.L., A.E. Toranzo, M. Lemos & F. Hetrick, 1983. Influence of water temperature and salinity on the survival of IPN and IHN viruses. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 3: 47-50.

Barnes, A.C., S.G.B. Amyes, T.S. Hastings & C.S. Lewin, 1991. Fluoroquinolones display rapid bactericidal activity and low mutation frequencies against *Aeromonas salmonicida*. *J. Fish Dis.*, 14: 661-667.

Barnes, A.C., T.S. Hastings & S.G.B. Amyes, 1994. Amoxycillin resistance in Scottish isolates of *Aeromonas salmonicida*. *J. Fish Dis.*, 17: 357-363.

Bast, L., J.G. Daly, S.A. DeGrandis & R.M.W. Stevenson, 1988. Evaluation of profiles of *Aeromonas salmonicida* as epidemiological markers of furunculosis infections in fish. *J. Fish Dis.*, 11: 133-145.

Belland, R.J. & T.J. Trust, 1988. DNA:DNA reassociation analysis of *Aeromonas salmonicida*. *J. Gen. Microbiol.*, 134: 307-315.

Benediktsdõttir, E. & S. Helgason, 1990. The isolation of *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes* from the gills of salmonid fish. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 10(4): 104-105.

Birnboim, H. & J. Doly, 1979. A rapid extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.*, 7: 1513-1525.

Board, R.G., D. Jones & F.A. Skinner (Editores). 1992. *Identification methods in applied and environmental microbiology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

Bohm, K.H., H. Fuhrmann, H.-J. Schlotfeldt & W. Korting, 1986. *Aeromonas salmonicida* from salmonids and cyprinids - serological and cultural identification. *J. Vet. Med. B*, 33: 777-783.

Boomker, J., M.M. Henton, T.W. Naudé & F.W. Hunchzermeyer, 1984. Furunculosis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) raised in sea water. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 51: 91-94.

Bootland, L.M., P. Dobos & R.M.W. Stevenson, 1991. The IPNV carrier state and demonstration of vertical transmission in experimentally infected brook trout. *Dis. Aquat. Org.*, 10: 13-21.

Bosse, M.P. & G. Post, 1983. Tribrissen and tiamulin for control of enteric redmouth disease. *J. Fish Dis.*, 6: 27-32.

Bowser, P.R. & M. House, 1990. *In vitro* sensitivity of some fish pathogens to the quinolones nalidixic acid and oxolinic acid and the fluoroquinolone enrofloxacin. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 10: 48-49.

Bragg, R.R. & M.M. Henton, 1986. Isolation of *Yersinia ruckeri* from rainbow trout in South Africa. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 6 (1): 5-6.

Bricknell, I.R., 1995. A reliable method for the induction of experimental furunculosis. *J. Fish Dis.*, 18: 127-133.

Bruno, D.W., 1986. Furunculosis in sea-reared atlantic salmon, *Salmo salar* L.. Colonization of the gill epithelium. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 6 (3): 76-79.

Bruno, D.W. & A.L.S. Munro, 1989. Immunity in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., fry following vaccination against *Yersinia ruckeri*, and the influence of body weight and infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) on the detection of carriers. *Aquaculture*, 81:205-211.

Buck, J.D., 1982. Nonstaining (KOH) method for determination of Gram reactions of marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44(4): 992-993.

Bullock, G.L., 1987. Tests indicate inability of *Aeromonas salmonicida* to be transmitted vertically. *Fish Health Newsletter*, 15: 3.

Bullock, G.L. & H.M. Stuckey, 1975. *Aeromonas salmonicida*: detection of asymptomatically infected trout. *The Progressive Fish Culturist*, 37(4): 237-239.

Bullock, G.L. & S.F. Snieszko, 1979. Enteric redmouth disease of salmonids. *Fish Disease Leaflet* 57, U.S. Department of the Interior. Washington, D.C..

Bullock, G.L., H.M. Stuckey & E.B. Shotts, 1978. Enteric redmouth bacterium: comparison of isolates from different geographic areas. *J. Fish Dis.*, 1: 351-356.

Bullock, G.L., G. Maestrone, C. Starliper & B. Schill, 1983. Potentiated sulfonamide therapy of enteric redmouth disease. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 40: 101-102.

Busch, R.A., 1978. Enteric redmouth disease (Hagerman strain). *Marine Fisheries Review*, 40: 42-51.

Busch, R.A., 1983. Enteric redmouth disease (*Yersinia ruckeri*). *In*: *Antigens of Fish Pathogens.* Anderson, D.P., M. Dorson & P. Dubourget (Eds.). Collection Marcel Merieux, Lyon, pp. 201-223.

Busch, R.A. & A.J. Lingg, 1975. Establishment of an asymptomatic carrier state infection of enteric redmouth disease in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 32: 2429-2432.

Cahill, M.M., 1990. Bacterial flora of fishes: a review. *Microb. Ecol.*, 19: 21-41.

Carnahan, A.M., S. Behram & S.W. Joseph, 1991. Aerokey II: a flexible key for identifying clinical *Aeromonas* species. *J. Clin. Microbiol.*, 29 (12): 2843-2849.

Caswell-Reno, P., V. Lipipun, P.W. Reno & B.L. Nicholson, 1989. Use of a group-reactive and other monoclonal antibodies in an enzyme immunodot assay for identification and presumptive serotyping of aquatic birnaviruses. *J. Clin. Microbiol.*, 27 (9): 1924-1929.

Ceschia, G., G. Giorgetti, G. Bertoldini & S. Fontebasso, 1987. The *in vitro* sensitivity of *Yersinia ruckeri* to specific antibiotics. *J. Fish Dis.*, 10: 65-67.

Chapman, P.F., 1990. Isolation of an oxidase-negative *Aeromonas salmonicida* from coho salmon. *FHS/AFS Newsletter*, 18 (1): 6.

Chevalier, R., J.P. Gerard & C. Michel, 1981. Distribution et cinétique tissulaire de la fluméquine chez la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*, Richardson). *Révue Méd. vét.*, 132: 831-837.

Chi, S.-C., S.-N. Chen & G.-H. Kou, 1991. Establishment, characterization and application of monoclonal antibodies against eel virus european (EVE). *Gyobyo Kenkyu*, 26 (1): 1-7.

Chou, H.-Y., C.-F. Lo, M.-C. Tung, C.-W. Wang, H. Fukuda & T. Sano, 1993. The general characteristics of a birnavirus isolated from cultured loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) in Taiwan. *Gyobyo Kenkyu*, 28 (1): 1-7.

Christie, K.E. & L.S. Havarstein, 1988. A new serotype of infectious pancreatic necrosis virus (IPN N1). *In* Ahne, W. & E. Kurstak (Ed.): *Viruses of lower vertebrates*. Springer-Verlag.

Cipriano, R.C., 1982a. Immunization of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) against *Aeromonas salmonicida*: immunogenicity of virulent and avirulent isolates and protective ability of different antigens. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 39: 218-221.

Cipriano, R.C., 1982b: Furunculosis in brook trout: infection by contact exposure. *Prog. Fish-Cult.*, 44 (1): 12-14.

Cipriano, R.C., 1983. Resistance of salmonids to *Aeromonas salmonicida*: relation between agglutinins and neutralizing activities. *Transactions of the American Fisheries Society*, 112: 95-99.

Cipriano, R.C. & C.E. Starliper, 1982. Immersion and injection vaccination of salmonids against furunculosis with an avirulent strain of *Aeromonas salmonicida*. *Prog. Fish-Cult.*, 44 (4): 167-169.

Cipriano, R.C., W.B. Schill, S.W. Pyle & R. Horner, 1986. An epizootic in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) caused by a sorbitol-positive serovar 2 strain of *Yersinia ruckeri*. *J. Wildlife Dis.*, 22 (4): 488-492.

Cipriano, R.C., T. Ruppenthal, W.B. Schill, S.W. Pyle & E.B. Shotts, 1987. Susceptibility of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) to experimental infections with different serotypes of *Yersinia ruckeri*. *Microbios Letters*, 35: 27-31.

Cipriano, R.C., L.A. Ford, J.D. Teska & L.E. Hale, 1992. Detection of *Aeromonas salmonicida* in the mucus of salmonid fishes. *J. Aquat. An. Health.*, 4: 114-118.

Clapés, B.O., 1969. Indices microbiologicos de la polucion. Simposium sobre polucion da las aguas, Documentos de investigacion hidrologica, Suplemento Cientifico de la Revista *Água* n° 7.

Colwell, R.R., M.T. MacDonell & J. De Ley, 1986. Proposal to recognize the family *Aeromonadaceae fam. nov.*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 36: 473-477.

Cornick, J.W., C.M. Morrison, B. Zwicker & G. Shum, 1984. Atypical *Aeromonas salmonicida* infection in atlantic cod, *Gadus morhua* L.. *J. Fish Dis.*, 7: 495-499.

Cossarini-Dunier, M., 1986. Protection against enteric redmouth disease in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, after vaccination with *Yersinia ruckeri* bacterin. *J. Fish Dis.*, 9: 27-33.

Crosa, J.H. & L.L. Hodges, 1981. Outer membrane proteins induced under conditions of iron limitation in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* 775. *Infect. Immun.*, 31: 223-227.

Dalsgaard, I. & H. Paulsen, 1986. Atypical *Aeromonas salmonicida* isolated from diseased sand-eels, *Ammodytes lancea* (Cuvier) and *Hyperoplus lanceolatus* (Lesauvege). *J. Fish Dis.*, 9: 361-364.

Dalsgaard, I., J. From & V. Hørlyck, 1984. First observation of *Yersinia ruckeri* in Denmark. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 4 (1): 10.

Dalsgaard, I., B. Nielsen & J.L. Larsen, 1994. Characterization of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*: a comparative study of strains of different geographic origin. *J. Appl. Bacteriol.*, 77: 21-30.

Daly, J.G., B. Lindvik & R.M.W. Stevenson, 1986. Serological heterogeneity of recent isolates of *Yersinia ruckeri* from Ontario and British Columbia. *Dis. Aquat. Org.*, 1: 151-153.

Daly, J.G., G.F. Wiegertjes & W.B. Van Muiswinkel, 1994. Protection against carp erythrodermatitisfollowing bath or subcutaneous exposure to sublethal numbers of virulent *Aeromonas salmonicida* subsp. *nova. J. Fish Dis.*, 17: 67-75.

Davies, R.L., 1991. Clonal analysis of *Yersinia ruckeri* based on biotypes, serotypes and outer membrane protein-types. *J. Fish Dis.*, 14: 221-228.

Davies, R.L. & G.N. Frerichs, 1989. Morphological and biochemical differences among isolates of *Yersinia ruckeri* obtained from wide geographical areas. *J. Fish Dis.*, 12: 357-365.

De Grandis, S.A. & R.M.W. Stevenson, 1982. Variations in plasmid profiles and growth characteristics of *Yersinia ruckeri* strains. *FEMS Microbiology Letters*, 15: 199-202.

De Grandis, S.A. & R.M.W. Stevenson, 1985. Antimicrobial susceptibility patterns and R plasmid-mediated resistance of the fish pathogen *Yersinia ruckeri*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 27 (6): 938-942.

De Grandis, S.A., P.J. Krell, D.E. Flett & R.M.W. Stevenson, 1988. Deoxyribonucleic acid relatedness of serovars of *Yersinia ruckeri*, the enteric redmouth bacterium. *Int. J. System. Bacteriol.*, 38 (1): 49-55.

De La Cruz, J., E. De Lucas, J. Orozco, A. Rodriguez & C. Tejedor, 1987. Aislamiento e identificación de la *Yersinia ruckeri*; agente causal de la enfermedad de la boca roja (ERM). *Cuad. Marisq. Publ. Téc.*, 8: 143-148.

Dear, G., 1988. *Yersinia ruckeri* isolated from Atlantic salmon in Scotland. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 8: 18-20.

DePaola, A., J.T. Peeler & G.E. Rodrick, 1995. Effect of oxytetracycline-medicated feed on antibiotic resistance of gram-negative bacteria in catfish ponds. *Appl. Env. Microbiol.*, 61 (6): 2335-2340.

Dopazo, C.P., 1991. *Caracterización de* Birnavirus *y* Rotavirus *de peces: propiedades biológicas, serológicas y moleculares.* Tese de Doutoramento. Santiago de Compostela, Espanha.

Dopazo, C.P., C. Rivas, B. Lupiani & A.E. Toranzo, 1990. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de cinco rotavirus de peces. *Actas III Congreso Nac. Acuicult.* (Santiago de Compostela, Espanha): 827-832.

Dwilow, A.G., B.W. Souter & K. Knight, 1987. Isolation of *Yersinia ruckeri* from burbot, *Lota lota* (L.), from the Mackenzie river, Canada. *J. Fish. Dis.*, 10: 315-317.

Effendi, I. & B. Austin, 1993. A rapid method for the determination of viability of *Aeromonas salmonicida* in seawater. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 13 (5): 171-173.

Effendi, I. & B. Austin, 1994. Survival of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* in the marine environment. *J. Fish Dis.*, 17: 375-385.

Effendi, I. & B. Austin, 1995a. Uptake of *Aeromonas salmonicida* by Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 15 (4): 115-118.

Effendi, I. & B. Austin, 1995b. Dormant/unculturable cells of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida*. *Microb. Ecol.*, 30: 183-192.

Eiras, J.C., 1990. Índice bibliográfico de trabalhos de autores portugueses no domínio da ictiopatologia. *Revista da Universidade de Coimbra*, 35: 163-175.

Eiras, J.C. & A. Saraiva, 1986. Nutritional factors as the cause of an outbreak of *Pseudomonas fluorescens* in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Publicação do Instituto de Zoologia "Dr. Augusto Nobre"* (Faculdade de Ciências do Porto), N° 192.

Eiras, J.C., A. Saraiva & C. Cruz, 1987. A note on the Portuguese situation concerning some notifiable fish diseases. *Aquaculture*, 67: 279-281.

Eiras, J.C., A. Saraiva & C. Cruz, 1988. Sobre a ausência de algumas doenças de peixes de declaração obrigatória em Portugal. *Publicação do Instituto de Zoologia "Dr. Augusto Nobre"* (Faculdade de Ciências do Porto), Nº 200.

Ellis, A.E., A.S. Burrows, T.S. Hastings & K.J. Stapleton, 1988. Identification of *Aeromonas salmonicida* extracellular protease as a protective antigen against furunculosis by passive immunization. *Aquaculture*, 70: 207-218.

Espinoza, E., G. Farías, M. Soler & J. Kuznar, 1985. Identity between infectious pancreatic necrosis virus VR-299 and a chilean isolate. *Intervirology*, 24: 58-60.

Evelyn, T.P.T., 1971. An aberrant strain of the bacterial fish pathogen *Aeromonas salmonicida* isolated from a marine host, the sablefish (*Anoplopoma fimbria*), and from two species of cultured pacific salmon. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 28: 1629-1634.

Evenberg, D., P. De Graaff, B. Lugtenberg & W.B. Van Muiswinkel, 1988. Vaccine-induced protective immunity against *Aeromonas salmonicida* tested in experimental carp erythrodermatitis. *J. Fish Dis.*, 11: 337-350.

Ewing, W.H., A.J. Ross, D.J. Brenner & G.R. Fanning, 1978. *Yersinia ruckeri* sp. nov., the redmouth (RM) bacterium. *Int. J. System. Bacteriol.*, 28 (1): 37-44.

Ezura, Y., H. Yamamoto, M. Yoshimizu, K. Tajima, H. Sannohe, K. Ikeda, H. Sako, T. Hara & T. Kimura, 1984. An outbreak of furunculosis in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) at the beginning of marine pen culture. *Fish Pathology*, 19 (2): 75-80.

Ferguson, H. & D.H. McCarthy, 1978. Histopathology of furunculosis in brown trout *Salmo trutta* L. *J. Fish Dis.*, 1: 165-174.

Fevolden, S.E., T. Refstie & K.H. Roed, 1992. Disease resistance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selected for stress response. *Aquaculture*, 104: 19-29.

Fijan, N.N. & G. Giorgetti, 1978. Infectious pancreatic necrosis: isolation of virus from eyed eggs of rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Dis.*, 1: 269-270.

Filip, C., G. Fletcher, J.L. Wulff & C.F. Earhart, 1973. Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by the ionic detergent sodium lauryl sarcosinate. *J. Bacteriol.*, 115: 717-722.

Ford, L.A., 1994. Detection of *Aeromonas salmonicida* from water using a filtration method. *Aquaculture*, 122: 1-7.

Fouz, B., R.F. Conchas, M.L. Lemos & A.E. Toranzo, 1990. Espectro antibacteriano del mucus de rodaballo, salmon y trucha. *Actas III Congreso Nac. Acuicult.* (Ed. Landín & Cerviño), Santiago de Compostela, pp. 855-860.

Fréchette, J.L., M.A. Elazhary & R. Lallier, 1983. Treatment of fish furunculosis with a potentiated sulfonamide compound. *Can. Vet. J.*, 24.

Frerichs, G.N. & A. Holliman, 1991. Isolation of a brown pigment-producing strain of *Pseudomonas fluorescens* cross-reacting with *Aeromonas salmonicida* diagnostic antisera. *J. Fish Dis.*, 14: 599-601.

Frerichs, G.N., J.A. Stewart & R.O. Collins, 1985. Atypical infection of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, with *Yersinia ruckeri*. *J. Fish. Dis.*, 8: 383-387.

Frerichs, G.N., S.D. Millar & C. McManus, 1992. Atypical *Aeromonas salmonicida* isolated from healthy wrasse (*Ctenolabrus rupestris*). *Bull. Eur Ass. Fish Pathol.*, 12 (2): 48-49.

Fuhrmann, H., K.H. Böehm & H.J. Schlotfeldt, 1983. An outbreak of enteric redmouth disease in West Germany. *J. Fish Dis.*, 6: 309-311.

Furones, M.D., C.J. Rodgers & C.B. Munn, 1993. *Yersinia ruckeri*, the causal agent of enteric redmouth disease (ERM) in fish. *In: Annual Review of Fish Diseases* (Faisal, M. & F.M. Hetrick. Eds.), Pergamon Press, NY, vol. 3, pp. 105-129.

Garduño, R.A., J.C. Thornton & W.W. Kay, 1993a. *Aeromonas salmonicida* grown *in vivo*. *Infect. Immun.*, 61 (9): 3854-3862.

Garduño, R.A., J.C. Thornton & W.W. Kay, 1993b. Fate of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* in the peritoneal cavity of rainbow trout. *Can. J. Microbiol.*, 39: 1051-1058.

Giorgetti, G., G. Ceschia & G. Bovo, 1985. First isolation of *Yersinia ruckeri* in farmed rainbow trout in Italy. *In*: *Fish and Shellfish Pathology*, Ellis, A.E. (Ed.). Academic Press, London.

Gjedrem, T., R. Salte & H.M. Gjoen, 1991. Genetic variation in susceptibility of Atlantic salmon to furunculosis. *Aquaculture*, 97: 1-6.

Gouveia, A.J.R., 1990. A situação da aquacultura em Portugal. *Actas III Congreso Nac. Acuicult.* (Santiago de Compostela, Espanha): 923-926.

Gouveia, A.J.R., 1994. Aquaculture in Portugal: state of art, constraints and perspectives. *Aquaculture Europe*, 19: 23-28.

Grazina-Freitas, M.S., 1985. Lesões provocadas por bacilos álcool ácido resistentes em *Apagon imberbis* (L.). *Rep. Trab. L.N.I.V.*, 17: 65-68.

Green, M. & B. Austin, 1983. The identification of *Yersinia ruckeri* and its relationship to other representatives of the *Enterobacteriaceae*. *Aquaculture*, 34: 185-192.

Griffiths, S.G. & W.H. Lynch, 1989. Characterization of *Aeromonas salmonicida* mutants with low-level resistance to multiple antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33 (1): 19-26.

Groberg, W.J., R.H. McCoy, K.S. Pilcher & J.L. Fryer, 1978. Relation of water temperature to infections of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*), chinook salmon (*O. tshawytscha*), and steelhead trout (*Salmo gairdneri*) with *Aeromonas salmonicida* and *A. hydrophila*. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 35: 1-7.

Guilvout, I., M.L. Quilici, S. Rabot, R. Lesel & D. Mazigh, 1988. *Bam*HI restriction endonuclease analysis of *Yersinia ruckeri* and their relatedness to the genus *Yersinia* 42- to 47-megadalton plasmid. *Appl. Env. Microbiol.*, 54 (10): 2594-2597.

Guinea, J., J. Sancho & R. Pares, 1979. Flora microbiana del agua. *Analisis Microbiologico de Aguas. Aspectos Aplicados*. Ediciones Omega, Barcelona.

Hänninen, M.-L., J. Ridell & V. Hirvelä-Koski, 1995. Phenotypic and molecular characteristics of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* isolated in southern and northern Finland. *J. Appl. Bacteriol.*, 79: 12-21.

Hansen, C.B. & A.J. Lingg, 1976. Inert particle agglutination tests for detection of antibody to enteric redmouth bacterium. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 33: 2857-2869.

Hastein, T., S.J. Saltveit & R.J. Roberts, 1978. Mass mortality among minnows *Phoxinus phoxinus* (L.) in lake Tveitevatn, Norway, due to an aberrant strain of *Aeromonas salmonicida*. *J. Fish Dis.*, 1: 241-249.

Hastings, T.S. & D.W. Bruno, 1985. Enteric redmouth disease: survey in Scotland and evaluation of a new medium, Shotts-Waltman, for differentiating *Yersinia ruckeri*. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 5(2): 32-35.

Hattori, M., H. Kodama, S. Ishiguro, A. Honda, T. Mikami & H. Izawa, 1984. *In vitro* and *in vivo* detection of infectious pancreatic necrosis virus in fish by enzyme-linked immunosorbent assay. *American Journal of Veterinary Research*, 45 (9), 1876-1879.

Hayasaka, S.S. & J. Sullivan, 1981. Furunculosis in cultured american eel *Anguilla rostrata* (Le Sueur). *J. Fish Biol.*, 18: 655-659.

Hayashi, F., Y. Araki, K. Harada, M. Inoue & S. Mitsuhashi, 1982. Epidemiological studies of drug resistant strains in cultured fish and water. *Bull. Japanese Society Scientific Fisheries*, 48 (8): 1121-1127.

Hennigan, M., L.M. Vaughan, T.J. Foster, P. Smith & F. Gannon, 1989. Characterization of *Aeromonas salmonicida* strains using DNA probe technology. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 46: 877-879.

Hetrick, F.M., 1989. Fish viruses. *In*: B. Austin & D.A. Austin (Editores). *Methods for the microbiological examination of fish and shellfish*, Ellis Horwood, Ltd., Chichester, pp. 217-239.

Hietala, J., E.T. Valtonen & T. Aaltonen, 1995. Experimental infection of brown trout, *Salmo trutta* L., using a Finnish *Yersinia ruckeri* isolate. *Aquaculture*, 136: 11-20.

Hill, B.J., 1982. Infectious pancreatic necrosis virus and its virulence. *In*: R.J. Roberts (Editor) *Microbial diseases of fish*, Academic Press, London, pp. 91-114.

Hiney, M., 1995. Detection of stress inducible furunculosis in salmonids vaccinated with water and oil-based furunculosis vaccines. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 15 (3): 98-99.

Hiney, M., M.T. Dawson, D.M. Heery, P.R. Smith, F. Gannon & R. Powell, 1992. DNA probe for *Aeromonas salmonicida*. *Appl. Env. Microbiol.*, 58 (3): 1039-1042.

Hirvela-Koski, V., P. Koski & H. Niiranen, 1994. Biochemical properties and drug resistance of *Aeromonas salmonicida* in Finland. *Dis. Aquat. Org.*, 20: 191-196.

Hitchcok, P.J. & T.M. Brown, 1983. Morphological heterogenicity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. *J. Bacteriol.*, 154: 269-272.

Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley & S.T. Williams (Editores), 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th Edition. Williams & Wilkins, Baltimore.

Horsley, R.W., 1973. The bacterial flora of the atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in relation to its environment. *J. Appl. Bacteriol.*, 36: 377-386.

Houghton, G., G.F. Wiergertjes, A. Groeneveld & W.B. Van Muiswinkel, 1991. Differences in resistance of carp, *Cyprinus carpio* L., to atypical *Aeromonas salmonicida*. *J. Fish Dis.*, 14: 33-341.

Hsu, Y.-L., B.-S. Chen & J.-L. Wu. 1989. Comparison of RNAs and polypeptides of infectious pancreatic necrosis virus isolates from eel and rainbow trout. *J. Gen. Virol.*, 70: 2233-2239.

Hunter, V.A., M.D. Knittel & J.L. Fryer, 1980. Stress-induced transmission of *Yersinia ruckeri* infection from carriers to recipient steelhead trout *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Dis.*, 3: 467-472.

Inglis, V. & R.H. Richards, 1991. The *in vitro* susceptibility of *Aeromonas salmonicida* and other fish-pathogenic bacteria to 29 antimicrobial agents. *J. Fish Dis.*, 14: 641-650.

Inglis, V., G.N. Frerichs, S.D. Millar & R.H. Richards, 1991a. Antibiotic resistance of *Aeromonas salmonicida* isolated from Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Scotland. *J. Fish Dis.*, 14: 353-358.

Inglis, V., R.H. Richards, K.J. Varma, I.H. Sutherland & E.S. Brokken, 1991b. Florfenicol in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., parr: tolerance and assessment of efficacy against furunculosis. *J. Fish Dis.*, 14: 343-351.

Inglis, V., R.J. Roberts & N.R. Bromage (Editores), 1993. *Bacterial diseases of fish*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

Jacobsen, M.D., 1989. Withdrawal times of freshwater rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, after treatment with oxolinic acid, oxytetracycline and trimetoprim. *J. Fish Dis.*, 12: 29-36.

Johnson, G.R., G. Wobeser & B.T. Rouse, 1974. Indirect fluorescent antibody technique for detection of RM bacterium of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 31: 1957-1959.

Johnson, K.A. & D.F. Amend, 1983a. Comparison of efficacy of several delivery methods using *Yersinia ruckeri* bacterin on rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Dis.*, 6: 331-336.

Johnson, K.A. & D.F. Amend, 1983b. Efficacy of *Vibrio anguillarum* and *Yersinia ruckeri* bacterins applied by oral and anal intubation of salmonids. *J. Fish Dis.*, 6: 473-476.

Johnson, K.A., J.K. Flynn & D.F. Amend, 1982. Onset of immunity in salmonid fry vaccinated by direct immersion in *Vibrio anguillarum* and *Yersinia ruckeri* bacterins. *J. Fish Dis.*, 5: 197-205.

Kado, C.I. & S.-T. Liu, 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.*, 145 (3): 1365-1373.

Kawahara, E., S. Oshima & S. Nomura, 1990. Toxicity and immunogenicity of *Aeromonas salmonicida* extracellular products to salmonids. *J. Fish Dis.*, 13: 495-503.

Kelly, R.K. & O. Nielsen, 1993. Comparative serology of three recent canadian isolates of aquatic birnavirus. *Gyobyo Kenkyu*, 28 (4): 161-164.

Klein, B.U., D.W. Kleingeld & K.H. Böhm, 1994. First isolation of a non motile/tween 80 negative *Yersinia ruckeri* strain in Germany. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 14 (5): 165-166.

Krieg, N.R. & J.G. Holt (Editores), 1984. *Bergey's manual of systematic bacteriology.* 9th Edition. Vol. 1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.

Krogsrud, J., T. Hastein & K. Ronningen, 1988. Infectious pancreatic necrosis virus in norwegian fish farms. *In* Ahne, W. & E. Kurstak (Ed.): *Viruses of lower vertebrates*. Springer-Verlag.

Kuckler, R.J. (Editor), 1977. *Biochemical methods in cell culture and virology.* Dowden, Hutchinson & Ross, Inc., Stroudsburg (Pennsylvania).

Kusuda, R., Y. Nishi, N. Hosono & S. Suzuki, 1993. Serological comparison of birnaviruses isolated from several species of marine fish in south west Japan. *Gyobyo Kenkyu*, 28 (2): 91-92.

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.

Ledo, A., 1990. *Incidencia de infecciones de origen viral en la piscicultura de Galicia.* Tese de Doutoramento. Santiago de Compostela, Espanha.

Ledo, A., C.P. Dopazo, J.L. Romalde, A.E. Toranzo & J.L. Barja, 1987. Effectiveness of different chemotherapeutic agents for controling bacterial fish diseases. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 7 (1): 20-22.

Ledo, A., M. Babin, J.L. Barja & J. Dominguez, 1990a. Comparación entre la tácnica Elisa y el método de inoculación en cultivos celulares en el diagnóstico del vírus de la necrosis pancreática infecciosa. *Actas III Congreso Nac. Acuicult.* (Santiago de Compostela, Espanha): 821-826.

Ledo, A., B. Lupiani, C.P. Dopazo, A.E. Toranzo & J.L. barja, 1990b. Fish viral infections in northwest of Spain. *Microbiología SEM*, 6: 21-29.

Lesel, R., M. Lesel, F. Gavini & A Vuillaume, 1983. Outbreak of enteric redmouth disease in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, in France. *J. Fish. Dis.*, 6: 385-387.

Lewin, C.S. & T.S. Hastings, 1990. *In vitro* activities of oxolinic acid, ciprofloxacin and norfloxacin against *Aeromonas salmonicida. J. Fish Dis.*, 13: 377-384.

Lillehaug, A., T. Lunder & T.T. Poppe, 1992. Field testing of adjuvanted furunculosis vaccines in Atlantic salmon, *Salmo salar* L.. *J. Fish Dis.*, 15: 485-496.

Lindsay, G.J.H., 1986. The significance of chitinolytic enzymes and lysozyme in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) defence. *Aquaculture*, 51: 169-173.

Lipipun, V., P. Caswell-Reno, Y.-L. Hsu, J.-L. Wu, M.-C. Tung, P.W. Reno, W. Wattanavijarn & B.L. Nicholson, 1989. Antigenic analysis of asian aquatic birnavirus isolates using monoclonal antibodies. *Fish Patology*, 24 (3): 155-160.

Llewellyn, L.C., 1980. A bacterium with similarities to the redmouth bacterium and *Serratia liquefaciens* (Grimes and Hennerty) causing mortalities in hatchery reared salmonids in Australia. *J. Fish. Dis.*, 3: 29-39.

Lo, C.-F., Y.-W. Hong, S.-Y. Huang & C.H. Wang, 1988. The characteristics of the virus isolated from the gill of clam, *Meretrix lusoria. Fish Patology*, 23 (3): 147-154.

Lund, V., T. Jorgensen, K.O. Holm & G. Eggset, 1991. Humoral immune response in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., to cellular and extracellular antigens of *Aeromonas salmonicida. J. Fish Dis.*, 14: 443-452.

MacDonald, R.D. & T. Yamamoto, 1977. The structure of infectious pancreatic necrosis virus RNA. *J. Gen. Virol.*, 34: 235-247.

Machado-Cruz, J., A. Saraiva, J.C. Eiras, R. Branco & J.C. Sousa, 1986. An outbreak of *Plesiomonas shigelloides* in farmed rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, in Portugal. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 6 (1): 20-22.

Maheshkumar, S., S.M. Goyal & P.P. Economon, 1990. Concentration and detection of *Aeromonas salmonicida* from hatchery water. *J. Fish Dis.*, 13: 513-518.

Markwardt, N.M. & G.W. Klontz, 1989a. Evaluation of four methods to establish asymptomatic carriers of *Aeromonas salmonicida* in juvenile spring chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). *J. Fish Dis.*, 12: 311-315.

Markwardt, N.M. & G.W. Klontz, 1989b. A method to eliminate the asymptomatic carrier state of *Aeromonas salmonicida* in salmonids. *J. Fish Dis.*, 12: 317-322.

Marmur, J., 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.*, 3: 208-218.

Marquis, H. & R. Lallier, 1989. Efficacy studies of passive immunization against *Aeromonas salmonicida* infection in brook trout, *Salvelinus fontinalis* (Mitchill). *J. Fish Dis.*, 12: 233-240.

McAllister, E., 1988. Infecciones víricas de peces cultivados. *In* Espinosa de los Monteros, J. & U. Labarta (Editores): *Patología en acuicultura.* Mundi-Prensa Libros, Madrid.

McAllister, P.E. & X. Reyes, 1984. Infectious pancreatic necrosis virus: isolation from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, imported into Chile. *J. Fish Dis.*, 7: 319-322.

McAllister, P.E., M.W. Newman, J.H. Sauber & W.J. Owens, 1984. Isolation of infectious pancreatic necrosis virus (serotype Ab) from diverse species of estuarine fish. *Helgolander Meeresunters*, 37: 317-328.

McArdle, J.F. & C. Dooley-Martyn, 1985. Isolation of *Yersinia ruckeri* type I (Hagerman strain) from goldfish *Carassius auratus* (L.). *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 5 (1): 10-11.

McCarthy, D.H., 1975. Detection of *Aeromonas salmonicida* antigen in diseased fish tissue. *J. Gen. Microbiol.*, 88: 384-386.

McCarthy, D.H., 1977. The identification and significance of atypical strains of *Aeromonas salmonicida*. *Bull. Off. int. Epiz.*, 87 (5-6): 459-463.

McCarthy, D.H. & R.J. Roberts, 1980. Furunculosis of fish - the present state of our knowledge. *In*: M.R. Droop & H.W. Jannasch (Editores). *Advances in Aquatic Microbiology*. Academic Press, London, pp. 293-341.

McCarthy, D.H., J.P. Stevenson & A.W. Salsbury, 1974. Therapeutic efficacy of a potentiated sulphonamide in experimental furunculosis. *Aquaculture*, 4: 407-410.

McCashion, R.N. & W.H. Lynch, 1987. Effects of polymyxin B nonapeptide on *Aeromonas salmonicida*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 31 (9): 1414-1419.

McIntosh, D. & B. Austin, 1990. Recovery of cell wall deficient forms (L-forms) of the fish pathogens *Aeromonas salmonicida* and *Yersinia ruckeri*. *System. Appl. Microbiol.*, 13: 378-381.

McIntosh, D. & B. Austin, 1991. Atypical characteristics of the salmonid pathogen *Aeromonas salmonicida*. *J. Gen. Microbiol.*, 137: 1341-1343.

McKnight, I.J. & R.J. Roberts, 1976. The pathology of infectious pancreatic necrosis. I. The sequential histopathology of the naturally occurring condition. *Br. Vet. J.*, 132: 76-85.

Meier, W., 1986. Enteric redmouth disease: outbreak in rainbow trout in Switzerland. *Dis. Aquat. Org.*, 2: 81-82.

Melby, H.P., P. Caswell-Reno & K. Falk, 1994. Antigenic analysis of Norwegian aquatic birnaviruses isolates using monoclonal antibodies - with special reference to fish species, age and health status. *J. Fish Dis.*, 17: 85-91.

Menezes, J., 1991. Pasteurellosis in wild mullet, *Liza ramada* Risso, from a coastal lagoon, Lagoa d'Óbidos, Portugal. Seminário sobre Aquacultura Mediterrânica. Instituto Nacional de Investigação das Pescas, Lisboa.

Menezes, J., M.T. Dinis, M.C. Nunes, M.A. Moledo & P. Conceição, 1989. Aspectos sanitários da policultura marinha e medidas de profilaxia. *Relatórios Técnicos e Científicos* (Instituto Nacional de Investigação das Pescas), N° 15.

Menezes, J., M.C. Nunes, F. Ruano & J. Bela, 1991. Pathology of gilthead seabream in Portugal: bacteriosis outbreak in fry. Seminário sobre Aquacultura Mediterrânica. Instituto Nacional de Investigação das Pescas, Lisboa.

Michel, C., 1979. Furunculosis of salmonids: vaccination attempts in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) by formalin-killed germs. *Ann. Rech. Vét.*, 10 (1): 33-40.

Michel, C., 1982. Progress towards furunculosis vaccination. *In* Roberts, R.J. (Ed.) *Microbial Diseases of Fish*. Academic Press, London.

Michel, C. & A. Dubois-Darnaudpeys, 1980. Persistence of the virulence of *Aeromonas salmonicida* strains kept in river sediments. *Ann. Rech. Vét.*, 11(4): 375-380.

Michel, C., J.-P. Gerard, B. Fourbet, R. Collas & R. Chevalier, 1980. Emploi de la fluméquine contre la furonculose des salmonidés: essais thérapeutiques et perspectives pratiques. *Bulletin Français de Pisciculture*, 52: 7-10.

Michel, C., B. Faivre & P. De Kinkelin, 1986. A clinical case of enteric redmouth in minnows (*Pimephales promelas*) imported in Europe as bait-fish. *Bull. Eur Ass. Fish Pathol.*, 6 (4): 97-99.

Mittal, R.K., G. Lalonde, D. Leblanc, G. Olivier & R. Lallier, 1980. *Aeromonas hydrophila* in rainbow trout: relation between virulence and surface characteristics. *Can. J. Microbiol.*, 26: 1501-1503.

Mortensen, S.H., B. Hjeltness, O. Rodseth, J. Krosgrud & K.E. Christie, 1990. Infectious pancreatic necrosis virus, serotype N1, isolated from norwegian halibut

(*Hipoglossus hipoglossus*), turbot (*Scophthalmus maximus*) and scallops (*Pecten maximus*). *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 3: 37-38.

Moyer, N.P., G.M. Luccini, L.A. Holcomb, N.H. Hall & M. Altwegg, 1992. Application of ribotyping for differentiating aeromonads isolated from clinical and environmental sources. *Appl. Env. Microbiol.*, 58 (6): 1940-1944.

Munro, A.L.S., 1982. Furunculosis - an old problem facing a new industry. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh*, 81B: 177-184.

Murphy, F.A. & D.W. Kingsbury, 1990. Virus taxonomy. *In* Fields, B.N, D.M. Knipe, R.M. Chanock, M.S. Hirsch, J.L. Melnick, T.P. Monath & B. Roizman (Editors): *Virology*. Raven Press, New York.

Newman, J.T., B.J. Cosenza & J.D. Buck, 1972. Aerobic microflora of the bluefish (*Pomatomus saltatrix*) intestine. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 29: 333-336.

Newman, S.G., 1993. Bacterial vaccines for fish. *In: Annual Review of Fish Diseases* (Faisal, M. & F.M. Hetrick, Eds.), Pergamon Press, NY, vol. 3, pp. 145-185.

Newman, S.G. & J.J. Majnarich, 1982. Direct immersion vaccination of juvenile rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and juvenile coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum), with a *Yersinia ruckeri* bacterin. *J. Fish Dis.*, 5: 339-341.

Nicholson, B.L. & R. Dexter, 1975. Possible interference in the isolation of IPN virus from carrier fish. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 32: 1437-1439.

Nielsen, B., J.E. Olsen & J.L. Larsen, 1993. Plasmid profiling as an epidemiological marker within *Aeromonas salmonicida*. *Dis. Aquat. Org.*, 15: 129-135.

Nielsen, B., J.E. Olsen & J.L. Larsen, 1994. Ribotyping of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. *Dis. Aquat. Org.*, 18: 155-158.

Nieto, T.P., A.E. Toranzo, & J.L. Barja, 1984. Comparison between the bacterial flora associated with fingerling rainbow trout cultured in two different hatcheries in the North-West of Spain. *Aquaculture*, 42: 193-206.

Nisbet, M. & J. Verneaux, 1970. Composantes chimiques des eaux courantes. Discussion et proposition de classes en tant que bases d'interprétation des analyses chimiques. *Annales de Limnologie*, 6(2): 161-190.

Noga, E.J. & H.A. Berkhoff, 1990. Pathological and microbiological features of *Aeromonas salmonicida* infection in the american eel (*Anguilla rostrata*). *Fish Pathology*, 25 (3): 127-132.

Nougayrede, P., E. Sochon & A. Vuillaume, 1990. Isolation of *Aeromonas* subspecies *salmonicida* in farmed turbot (*Psetta maxima*) in France. *Bull. Eur Ass. Fish Pathol.*, 10 (5): 139-140.

Novoa, B., A.E. Toranzo, C.P. Dopazo, J.L. Barja & A. Figueras, 1993a. Isolation of IPN virus serotype VR-299 from turbot in Europe. *Dis. Aquat. Org.*, 17: 61-65.

Novoa, B., A. Figueras, C.F. Puentes, A. Ledo & A.E. Toranzo, 1993b. Characterization of a birnavirus isolated from diseased turbot cultured in Spain. *Dis. Aquat. Org.*, 15: 163-169.

O'Brien, D., J. Mooney, D. Ryan, E. Powell, M. Hiney, P.R. Smith & R. Powell, 1994. Detection of *Aeromonas salmonicida*, causal agent of furunculosis in salmonid fish, from the tank effluent of hatchery-reared Atlantic salmon smolts. *Appl. Env. Microbiol.*, 60 (10).

O'Leary, P.J., J.S. Rohovec & J.L. Fryer, 1979. A further characterization of *Yersinia ruckeri* (enteric redmouth bacterium). *Fish Pathol.*, 14 (2): 71-78.

O'Leary, P.J. J.S. Rohovec, J.E. Sanders & J.L. Fryer, 1982. Serotypes of *Yersinia ruckeri* and their immunogenic properties. U. S. Department of the Interior. Technical Paper n° 6235.

Olsen, J.E. & J.L. Larsen, 1993. Ribotypes and plasmid contents of *Vibrio anguillarum* strains in relation to serovar. *Appl. Env. Microbiol.*, 59 (11): 3863-3870.

Oppegaard, H., H. Sorum & K. Gravningen, 1995. *In vitro* antimicrobial activity of sulphachlorpyridazine and sulphadiazine in combination with trimethoprim against bacterial fish pathogens. *J. Fish Dis.*, 18: 371-376.

Ostland, V.E., B.D. Hicks & J.G. Daly, 1987. Furunculosis in baitfish and its transmission to salmonids. *Dis. Aquat. Org.*, 2: 163-166.

Owen, R.J., 1989. Chromosomal DNA fingerprinting - a new method of species and strain identification applicable to microbial pathogens. *J. Med. Microbiol.*, 30: 89-99.

Paterson, W.D. & J.L. Fryer, 1974. Effect of temperature and antigen dose on the antibody response of juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) to *Aeromonas salmonicida* endotoxin. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 31: 1743-1749.

Paterson, W.D., D. Douey & D. Desautels, 1980a. Isolation and identification of an atypical *Aeromonas salmonicida* strain causing epizootic losses among atlantic salmon (*Salmo salar*) reared in a Nova Scotian hatchery. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 37: 2236-2241.

Paterson, W.D., D. Douey & D. Desautels, 1980b. Relationships between selected strains of typical and atypical *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophila*, and *Haemophilus piscium*. *Can. J. Microbiol.*, 26: 588-598.

Payment, P. & M. Trudel (Editores), 1993. *Methods and techniques in virology.* Marcel Dekker, Inc., NY.

Pedersen, K., G. Ceschia & J.L. Larsen, 1994a. Ribotypes of *Vibrio anguillarum* O1 from Italy and Greece. *Current Microbiology*, 28: 97-99.

Pedersen, K., H. Kofod, I. Dalsgaard & J.L. Larsen, 1994b. Isolation of oxidase-negative *Aeromonas salmonicida* from diseased turbot *Scophthalmus maximus*. *Dis. Aquat. Org.*, 18: 149-154.

Peleteiro, M.C. & R.H. Richards, 1985. Identification of lymphocytes in the epidermis of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*, Richardson. *J. Fish Dis.*, 8: 161-172.

Pérez, M.J., A.I.G. Fernández, L.A. Rodriguez & T.P. Nieto, 1995. Importance of the sample size to determine the survival time of *Aeromonas salmonicida*. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 15 (2): 45-48.

Post, G., 1981. Two potentially useful drugs for control of ERM. *Salmonid*, 4 (5): 4-7.

Pyle, S.W., T. Ruppenthal, R.C. Cipriano & E.B. Shotts, 1987. Further characterization of biochemical and serological characteristics of *Yersinia ruckeri* from different geographic areas. *Microbios Letters*, 35: 87-93.

Real, F., B. Acosta, S. Déniz, J. Oros & E. Rodriguez, 1994. *Aeromonas salmonicida* infection in *Sparus aurata* in the Canaries. *Bull. Eur Ass. Fish Pathol.*, 14 (5): 153-155.

Reed, L.J. & H. Müench, 1938. A simple method of estimating fifty percent end points. *Amer. J. Hyg.*, 27: 493-497.

Rintamaki, P. & E.T. Valtonen, 1991. Aeromonas salmonicida in Finland: pathological problems associated with atypical and typical strains. *J. Fish Dis.*, 14: 323-331.

Rintamäki, P., E.T. Valtonen & G.N. Frerichs, 1986. Occurrence of *Yersinia ruckeri* infection in farmed white fish, *Coregonus peled* Gmelin and *Coregonus muksun* Pallas, and Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in northern Finland. *J. Fish. Dis.*, 9: 137-140.

Rivas, C., 1994. *Ciclo vital del* Aquareovirus *del rodaballo TRV* in vivo *e* in vitro. Tese de doutoramento. Santiago de Compostela, Espanha.

Rivas, C., C. Cepeda, C.P. Dopazo, B. Novoa, M. Noya & J.L. Barja, 1993. Marine environment as reservoir of birnaviruses from poikilothermic animals. *Aquaculture*, 115: 183-194.

Roberts, M.S., 1983. A report of an epizootic in hatchery reared rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, at an english trout farm, caused by *Yersinia ruckeri. J. Fish Dis.*, 6: 551-552.

Robertsen, B., G. Røstad, R. Engstad & J. Raa, 1990. Enhancement of non-specific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar.* L., by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. *J. Fish Dis.*, 13: 391-400.

Rodgers, C.J., 1991. The usage of vaccination and antimicrobial agents for control of *Yersinia ruckeri. J. Fish Dis.*, 14: 291-301.

Rodgers, C.J., 1992. Development of a selective-differential medium for the isolation of *Yersinia ruckeri* and its application in epidemiological studies. *J. Fish Dis.*, 15: 243-254.

Rodgers, C.J. & B. Austin, 1983. Oxolinic acid for control of enteric redmouth disease in rainbow trout. *The Veterinary Record*, 112: 83.

Rodgers, C.J. & E.B. Hudson, 1985. A comparison of two methods for isolation of *Yersinia ruckeri* from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 5 (4): 92-93.

Rodriguez, S., P. Vilas & S. Pérez, 1993a. A viral diagnostic survey on Spanish rainbow trout farms: I. Sensitivity of four cell lines to wild IPNV isolates. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 13: 119-122.

Rodriguez, S., S. Pérez & P. Vilas, 1993b. A viral diagnostic survey on Spanish rainbow trout farms: II. IPNV serotypes. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 13 (5): 146-149.

Rodriguez, S., M.P. Vilas & S.I. Pérez, 1994. Prevalence of infectious pancreatic necrosis virus on salmonid fish farms in Spain. *J. Aquat. An. Health*, 6: 138-143.

Romalde, J.L., 1992. *Yersinia ruckeri*: estudio epidemiologico y del mecanismo de virulencia. Tese de Doutoramento. Santiago de Compostela.

Romalde, J.L. & A.E. Toranzo, 1991. Evaluation of the API-20E system for the routine diagnosis of the enteric redmouth disease. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 11 (4): 147-149.

Romalde, J.L. & A.E. Toranzo, 1995. Patología de peces. Relación entre calidad del água y efectos en los cultivos. *In*: *Acuicultura Marina en Galicia*. Edicios do Castro. Sada, La Coruña (Espanha), pp. 167-190.

Romalde, J.L., B. Magariños, J.L. Barja & A.E. Toranzo, 1993. Antigenic and molecular characterization of *Yersinia ruckeri*. Proposal for a new intraspecies classification. *System. Appl. Microbiol.*, 16: 411-419.

Romalde, J.L., B. Magariños, F. Pazos, A. Silva & A.E. Toranzo, 1994a. Incidence of *Yersinia ruckeri* in two farms in Galicia (NW Spain) during a one-year period. *J. Fish Dis.*, 17: 533-539.

Romalde, J.L., J.L. Barja, B. Magariños & A.E. Toranzo, 1994b. Starvation-survival process of the bacterial fish pathogen *Yersinia ruckeri*. Syst. Appl. Microbiol, 17: 161-168.

Rose, A.S., A.E. Ellis & A.L.S. Munro, 1989. The infectivity by different routes of exposure and shedding rates of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., held in sea water. *J. Fish Dis.*, 12: 573-578.

Rose, A.S., A.E. Ellis & A.L.S. Munro, 1990. The survival of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* in sea water. *J. Fish Dis.*, 13: 205-214.

Ross, A.J. & G.W. Klontz, 1965. Oral immunization of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) against an etiologic agent of "redmouth disease". *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 22: 713-719.

Ross, A.J., R.R. Rucker & W.H. Ewing, 1966. Description of a bacterium associated with redmouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Can. J. Microbiol.*, 12: 763-770.

Ross, K. & A.L.S. Munro, 1995. Serological analysis of virulent infectious pancreatic necrosis virus strains. *J. Fish Dis.*, 18: 377-380.

Rydlo, M. & T. Weismann, 1977. Comparative experiments to infect rainbow trout with *Aeromonas salmonicida*. *Bull. Off. int. Epiz.*, 87 (5-6): 479-481.

Sakai, D.K., 1986. Electrostatic mechanism of survival of virulent *Aeromonas salmonicida* strains in river water. *Appl. Env. Microbiol.*, 51 (6): 1343-1349.

Sakata, T., 1989. Microflora of healthy animals. *In*: B. Austin & D.A. Austin (Editores). *Methods for the microbiological examination of fish and shellfish*. Ellis Horwood, Ltd., Chichester, pp. 141-163.

Sandvik, O. & A.-B. Hvaal, 1992. Bacterial inhibitors affecting proteases produced by *Aeromonas salmonicida*, and the occurrence of such inhibitors in furunculosis vaccines. *J. Fish Dis.*, 15: 131-141.

Sanjuan, M.L., E. Yus, I. Simarro, J.M. Castro, G. Fernández & A. Solana, 1993. The polypeptides of infectious pancreatic necrosis virus isolated from salmonid fish in Spain. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 13 (5): 150-153.

Sanjuan, M.L., E. Yus, I. Simarro, J.M. Castro, F. Perez & A. Solana, 1994. Infectious pancreatic necrosis virus from brown trout (*Salmo trutta*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*) with high mortality in Spain. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 14 (1): 5-7.

Sano, M., N. Okamoto, H. Fukuda, M. Saneyoshi & T. Sano, 1992. Virulence of infectious pancreatic necrosis virus is associated with the larger RNA segment (RNA segment A). *J. Fish Dis.*, 15: 283-293.

Santos, Y., 1991. Factores de virulencia y características antigénicas de *Vibrio anguillarum* e *Aeromonas* móveis. Tese de Doutoramento. Santiago de Compostela.

Santos, Y., J.L. Romalde, I. Bandín, B. Magariños, S. Núñez, J.L. Barja & A.E. Toranzo, 1993. Usefulness of the API-20E system for the identification of bacterial fish pathogens. *Aquaculture*, 116: 111-120.

Sanz, F. & J. Coll, 1992. Techniques for diagnosing viral diseases of salmonid fish. *Dis. Aquat. Org.*, 13: 211-223.

Saraiva, A., J.C. Eiras & C. Cruz, 1989. Nota sobre a ocorrência de *Aeromonas salmonicida* em Portugal. *Publicação do Instituto de Zoologia "Dr. Augusto Nobre"* (Faculdade de Ciências do Porto), N° 209.

Scallan, A. & P. Smith, 1993. Importance of sampling time in detecting stress inducible furunculosis in Atlantic salmon smolts. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 13 (3): 77-78.

Schill, W.B., 1987. Large plasmid of *Yersinia ruckeri* has no homology to the virulence plasmid of *Yersinia enterocolitica*. *Fish Health Newsletter*, 15 (3): 7.

Schill, W.B., S.R. Phelps & S.W. Pyle, 1984. Multilocus electrophoretic assessment of the genetic structure and diversity of *Yersinia ruckeri*. *Appl. Env. Microbiol.*, 48 (5): 975-979.

Shieh, H.S., 1979. Sensitivity of *Aeromonas salmonicida* to trimethoprim *in vitro*. *Microbios Letters*, 12: 103-108.

Shotts, E.B. & J.D. Teska, 1989. Bacterial pathogens of aquatic vertebrates. *In*: B. Austin & D.A. Austin (Editores). *Methods for the microbiological examination of fish and shellfish*. Ellis Horwood, Ltd., Chichester, pp. 141-163.

Singleton, P. & D. Sainsbury, 1994. *Dictionary of microbiology and molecular biology*. 2nd. edition. John Wiley & Sons Ltd., Chichester.

Smibert, R.M. & N.R. Krieg, 1994. Phenotypic characterization. *In*: Gerhardt, P., R.G. Murray, W.A. Wood & N.R. Krieg (Editores). *Methods for general and molecular bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp. 607-654.

Sousa, J.A., S. Núñez, J.C. Eiras & A.E. Toranzo, 1994. *Yersinia ruckeri* in Portugal: characterization of the first isolates from fish and environment. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 14: 113-116.

Sousa, J.A., J.L. Romalde, A. Ledo, J.C. Eiras, J.L. Barja & A.E. Toranzo, 1996. Health Status of Two Salmonid Aquaculture Facilities in North Portugal. Characterization of the Bacterial and Viral Pathogens Causing Notifiable Diseases. *J. Fish Dis*, 19.

Sparboe, O., C. Loren, T. Håstein, T. Poppe & H. Stenwing, 1986. The first isolation of *Yersinia ruckeri* from farmed norwegian salmon. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 6: 41-42.

Spence, K.D., J.L. Fryer & K.S. Pilcher, 1965. Active and passive immunization of certain salmonid fishes against *Aeromonas salmonicida*. *Can. J. Microbiol.*, 11: 397-405.

Stevenson, R.M.W. & J.G. Daly, 1982. Biochemical and serological characteristics of Ontario isolates of *Yersinia ruckeri*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 39: 870-876.

Stevenson, R.M.W. & D.W. Airdrie, 1984a. Serological variation among *Yersinia ruckeri* strains. *J. Fish Dis.*, 7: 247-254.

Stevenson, R.M.W. & D.W. Airdrie, 1984b. Isolation of *Yersinia ruckeri* bacteriophages. *Appl. Env. Microbiol.*, 47 (6): 1201-1205.

Sugita, H., S. Ushioka, D. Kihara & Y. Deguchi, 1985. Changes in the bacterial composition of water in a carp rearing tank. *Aquaculture*, 44: 243-247.

Sutherland, D.W. & V. Inglis, 1992. Multiple antibiotic sensitivity patterns of *Aeromonas salmonicida* within diagnostic specimens from outbreaks of furunculosis. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 12 (5): 163-165.

Teska, J.D., R.C. Cipriano & W.B. Schill, 1992. Molecular and genetic characterization of cytochrome oxidase-negative *Aeromonas salmonicida* isolated from coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Journal of Wildlife Diseases*, 28 (4): 515-520.

Thoesen, J.C. (Editor), 1994. *Suggested procedures for the detection and identification of certain finfish and shellfish pathogens.* 4th edition, Fish Health Section, American Fisheries Society, Bethesda.

Thornton, J.C., R.A. Garduño, S.G. Newman & W.W. Kay, 1991. Surface-disorganized, attenuated mutants of *Aeromonas salmonicida* as furunculosis vaccines. *Microbial Pathogenesis*, 11: 85-99.

Thornton, J.C., R.A. Garduño, S.J. Carlos & W.W. Kay, 1993. Novel antigens expressed by *Aeromonas salmonicida* grown *in vivo*. *Infect. Immun.*, 61 (11): 4582-4589.

Thornton, J.C., R.A. Garduño & W.W. Kay, 1994. The development of live vaccines for furunculosis lacking the A-layer and O-antigen of *Aeromonas salmonicida. J. Fish Dis.*, 17: 195-204.

Thuvander, A., U.P. Wichardt & L.J. Reitan, 1993. Humoral antibody response of brown trout *Salmo trutta* vaccinated against furunculosis. *Dis. Aquat. Org.*, 17: 17-23.

Toranzo, A.E., 1990. Problemas actuales de la patología bacteriana y viral en acuicultura. Diagnóstico, prevención y control. *Actas III Congreso Nac. Acuicult.* (Santiago de Compostela, Espanha): 969-995.

Toranzo, A.E. & J.L. Barja, 1993a. Fry mortality syndrome (FMS) in Spain. Isolation of the causative bacterium *Flexibacter psychrophilus. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 13(1): 1-3.

Toranzo, A.E., J.L. Barja, R.R. Colwell & F.M. Hetrick, 1983a. Characterization of plasmids in bacterial fish pathogens. *Infect. Immun.*, 39 (1): 184-192.

Toranzo, A.E., J.L. Barja, S.A. Potter, R.R. Colwell, F.M. Hetrick & J.H. Crosa, 1983b. Molecular factors associated with virulence of marine vibrios isolated from striped bass in Chesapeake Bay. *Infect. Immun.*, 39: 1220-1227.

Toranzo, A.E., P. Combarro, M.L. Lemos & J.L. Barja, 1984. Plasmid coding for transferable drug resistance in bacteria isolated from cultured rainbow trout. *Appl. Env. Microbiol.*, 48 (4): 872-877.

Toranzo, A.E., P. Combarro, Y. Conde & J.L. Barja, 1985. Bacteria isolated from rainbow trout reared in fresh water in Galicia (Northwestern Spain): taxonomic analysis and drug resistance patterns. *In: Fish and Shellfish Pathology* (N.W. Ellis, Ed), Academic Press, Londres, pp. 141-152.

Toranzo, A.E., A.M. Baya, B.S. Roberson, J.L. Barja, D.J. Grimes & F.M. Hetrick, 1987. Specificity of slide agglutination test for detecting bacterial fish pathogens. *Aquaculture*, 61: 81-97.

Toranzo, A.E., A.M. Baya, J.L. Romalde & F.M. Hetrick, 1989. Association of *Aeromonas sobria* with mortalities of adul gizzard shad, *Dorosoma cepedianum* Lesueur. *J. Fish Dis.*, 12: 439-448.

Toranzo, A.E., Y. Santos, S. Núñez & J.L. Barja, 1991. Biochemical and serological characteristics, drug resistance and plasmid profiles of Spanish isolates of *Aeromonas salmonicida*. *Fish Pathol.*, 26 (2): 55-60.

Toranzo, A.E., J.L. Romalde, I. Bandín, Y. Santos & J.L. Barja, 1992. Evaluation of the sensitivity of bacterial fish pathogens to different antimicrobial compounds. *In:* Michel, C. & D.J. Alderman (Editores), *Chemotherapy in aquaculture: from theory to reality*. Office International des Epizooties (OIE), Paris, França, pp.: 315-325.

Toranzo, A.E., B Novoa, J.L. Romalde, S. Núñez, S Devesa, E. Mariño, R. Silva, E. Martinez, A. Figueras & J.L.Barja, 1993. Microflora associated with healthy and diseased turbot (*Scophthalmus maximus*) from three farms in northwest Spain. *Aquaculture*, 114: 189-202.

Towbin, H., T. Staehelin & J. Gordon, 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 76: 4350-4354.

Treasurer, J.W. & L.A. Laidler, 1994. *Aeromonas salmonicida* infection in wrasse (*Labridae*), used as cleaner fish, on an Atlantic salmon, *Salmo salar* L., farm. *J. Fish Dis.*, 17: 155-161.

Trust, T.J., L.M. Bull, B.R. Currie & J.T. Buckley, 1979. Obligate anaerobic bacteria in the gastrointestinal microflora of the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*), goldfish (*Carassius auratus*), and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 36: 1174-1179.

Trust, T.J., A.G. Khouri, R.A. Austen & L.D. Ashburner, 1980. First isolation in Australia of atypical *Aeromonas salmonicida*. *FEMS Microbiology Letters*, 9: 39-42.

Tsai, C.M. & C.E. Frasch, 1982. Staining of lipopolysaccharide in SDS-polyacrylamide gels using silver staining method. *Annal. Biochem.*, 119: 115-119.

Tsoumas, A., D.J. Alderman & C.J. Rodgers, 1989. *Aeromonas salmonicida*: development of resistance to 4-quinolone antimicrobials. *J. Fish Dis.*, 12: 493-507.

Turnbull, J.F., R.H. Richards & M.F. Tatner, 1989. Evidence that superficial branchial colonies on the gills of *Salmo salar* L. are not *Aeromonas salmonicida*. *J. Fish Dis.*, 12: 449-458.

Underwood, B.O., C.J. Smale, F. Brown & B.J. Hill, 1977. Relationship of a virus from *Tellina tenuis* to infectious pancreatic necrosis virus. *J. Gen. Virol.*, 36: 93-109.

Valtonen, E.T., P. Rintamäki & M. Koskivaara, 1992. Occurrence and pathogenicity of *Yersinia ruckeri* at fish farms in northern and central Finland. *J. Fish. Dis.*, 15: 163-171.

Vuillaume, A., R. Brun, P. Chene, E. Sochon & R. Lesel, 1987. First isolation of *Yersinia ruckeri* from strurgeon, *Acipenser baeri* Brandt, in south west of France. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 7 (1): 18-19.

Waltman, W.D. & E.B. Shotts, 1984. A medium for the isolation and differentiation of *Yersinia ruckeri*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 41: 804-806.

Wedemeyer, G.A. & N.C. Nelson, 1977. Survival of two bacterial fish pathogens (*Aeromonas salmonicida* and the enteric redmouth bacterium) in ozonated, chlorinated, and untreated waters. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 34 (3): 429-432.

Whittington, R.J. & B. Cullis, 1988. The susceptibility of salmonid fish to an atypical strain of *Aeromonas salmonicida* that infects goldfish, *Carassius auratus* (L.), in Australia. *J. Fish Dis.*, 11: 461-470.

Wiegertjes, G.F., J.G. Daly & W.B. Van Muiswinkel, 1993. Disease resistance of carp, *Cyprinus carpio* L.: identification of individual genetic differences by bath challenge with atypical *Aeromonas salmonicida*. *J. Fish Dis.*, 16: 569-576.

Wiklund, T., 1990. Atypical *Aeromonas salmonicida* isolated from ulcers of pike, *Esox lucius* L.. *J. Fish Dis.*, 13: 541-544.

Wiklund, T. & G. Bylund, 1991. A cytochrome oxidase negative bacterium (presumptively an atypical *Aeromonas salmonicida*) isolated from ulcerated flounders (*Platichthys flesus*(L.)) in the northern Baltic sea. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 11 (2): 74-76.

Wiklund, T. & G. Bylund, 1993. Skin ulcer disease of flounder *Platichthys flesus* in the northern Baltic sea. *Dis. Aquat. Org.*, 17: 165-174.

Wiklund, T., L. Lonnstrom & H. Niiranen, 1993. *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida* lacking pigment production, isolated from farmed salmonids in Finland. *Dis. Aquat. Org.*, 15: 219-223.

Wiklund, T., I. Dalsgaard, E. Eerola & G. Olivier, 1994. Characteristics of 'atypical', cytochrome oxidase-negative *Aeromonas salmonicida* isolated from ulcerated flounders (*Platichthys flesus* (L.)). *J. Appl. Bacteriol.*, 76: 511-520.

Willumsen, B., 1989. Birds and wild fish as potential vectors of *Yersinia ruckeri*. *J. Fish. Dis.*, 12: 275-277.

Wingard, L.B., T.M. Brody, J.Larner & A. Schwartz, 1991. *Human pharmacology. Molecular to clinical.* Kist, K. (Ed.). Mosby-Year Book, Inc..

Wolf, K., 1982. Newly discovered viruses and viral diseases of fishes, 1977-1981. *In*: R.J. Roberts (Editor) *Microbial diseases of fish*, Academic Press, London, pp. 59-90.

Wolf, K., 1988. *Fish viruses and fish viral diseases.* Cornell University Pr+ess, Ithaca (USA).

Zhao, G., C. Pijoan, M.P. Murtaugh & T.W. Molitor, 1992. Use of restriction endonuclease analysis and ribotyping to study epidemiology of *Pasteurella multocida* in closed swine herds. *Infect. Immun.*, 60 (4): 1401-1405.

VII. ANEXOS

ANEXO 1. IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRECTA

ANEXO 1

IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRECTA

(pesquisa de *Renibacterium salmoninarum*)

PRODUTOS NECESSÁRIOS:

A - SORO ANTI-*R. salmoninarum* MARCADO COM ISOTIOCIANATO DE FLUORESCEÍNA (FITC).

Conservar a 4°C.

B - SOLUÇÃO DE MONTAGEM:

- bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$)
- glicerol

Fazer uma solução 1:1, e conservar a 4°C.

PROCEDIMENTO:

1. Cobrir o esfregaço, previamente fixado ao calor, com 15 µl do soro anti-*R. salmoninarum* marcado com FITC.
2. Deixar em obscuridade durante 5 minutos.
3. Lavar com PBS corrente, durante cerca de 15-20 segundos.
4. Secar ao ar.
5. Cobrir com 10 µl de solução de montagem (bicarbonato de sódio - glicerol, 1:1) e colocar uma lamela (não é necessário deixar secar).
6. Observar no microscópio de fluorescência, usando a objectiva de imersão (1000X), procurando diplobacilos fluorescentes.

ANEXO 2. PADRÕES ELECTROFORÉTICOS E "WESTERN BLOT" DE LIPOPOLISSACARÍDEOS E DE PROTEÍNAS DA ENVOLTURA CELULAR

ANEXO 2

PADRÕES ELECTROFORÉTICOS E "WESTERN BLOT" DE LIPOPOLISSACARÍDEOS E DE PROTEÍNAS DA ENVOLTURA CELULAR

OBTENÇÃO DE LIPOPOLISSACARÍDEOS (LPS) PARA ANÁLISE POR ELECTROFORESE (Hitchcok & Brown, 1983)

1. Suspender, em PBS estéril, uma porção de uma cultura pura da estirpe desejada (tubo 4 da escala de McFarland);
   - alternativamente, utilizar uma cultura crescida em meio líquido (TSB ou BHI).
2. Passar cerca de 1,5 ml desta suspensão bacteriana a um tubo de Eppendorf, e centrifugar a 12000 r.p.m. durante 5 minutos.
3. Rejeitar o sobrenadante, e bater o tubo sobre papel de filtro, de modo a retirar o máximo de líquido possível.
4. Ressuspender a "pellet" (cerca de 1 mg de células) em 60 μl de Final Sample Buffer (FSB) 2X [Tris-HCl 0,065 M, pH 6,8; Dodecil-Sulfato-Sódico (SDS) a 2%; Glicerol a 10%; Azul de Bromofenol a 0,001%; 2-Mercaptoetanol a 5%].
5. Ferver durante 5 minutos.
6. Adicionar um volume igual de uma solução de Proteinase K (2 mg/ml em FSB 2X).
7. Incubar a 60 °C durante 1 hora.
8. Aumentar novamente a temperatura, e ferver durante mais 2 a 3 minutos.
9. Submeter 10 μl de cada amostra a electroforese em gel de poliacrilamida-SDS a 12,5%

OBTENÇÃO DE PROTEÍNAS DA ENVOLTURA CELULAR PARA ANÁLISE POR ELECTROFORESE (Crosa & Hodges, 1981)

A - OBTENÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

1. Cultivar a(s) estirpe(s) bacteriana(s) desejada(s) em 50 ml de meio TSB, incubando a 22°C em agitação, até alcançar a fase exponencial (por exemplo, incubar durante a noite).
2. Centrifugar a 10000 r.p.m. durante 10 minutos, a 4°C.
3. Rejeitar o sobrenadante e ressuspender os precipitados celulares ("pellets") em 3 ml de Tris-HCl 10 mM, pH 8 com 0,3% de NaCl.
4. Submeter as suspensões bacterianas a ultra-sons (3 a 4 pulsos com a duração de 30 segundos, a 50 W, alternando com períodos de descanso em gelo picado, igualmente de 30 segundos), de modo a provocar a ruptura das células. Deve obter-se uma solução clara.
5. Transferir cada amostra a 2 tubos de Eppendorf (cerca de 1,5 ml para cada). Destes tubos, um será destinado à obtenção de Proteínas Totais e o outro será submetido a um tratamento adicional, para obtenção de Proteínas de Membrana Externa.
6. Centrifugar durante 3 minutos a 12000 r.p.m, com a finalidade de eliminar as possíveis células intactas ainda presentes na suspensão.
7. Transferir os sobrenadantes a novos tubos Eppendorf, e centrifugar a 17000 r.p.m. durante 60 minutos (a 4°C).
8. Rejeitar o sobrenadante. Ressuspender o precipitado (que consiste nas envolturas celulares totais) em 100 μl de água destilada.
9. Armazenar um dos tubos (amostra destinada à análise de proteínas totais) à temperatura de -20°C até à sua utilização. Submeter o outro tubo ao tratamento destinado à obtenção de Proteínas de Membrana Externa.

B - OBTENÇÃO DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA (Filip *et al.*,1973)

10. Adicionar aos 100 ml de solução aquosa de Membranas Totais um volume igual de uma solução a 3% de Sarkosyl em tampão Tris-HCl 20 mM (pH 8,0).
11. Incubar durante 20 minutos, à temperatura ambiente.
12. Centrifugar a 17000 r.p.m., durante 60 minutos (a 4°C).
13. Rejeitar o sobrenadante. Ressuspender o precipitado (que consiste nas Proteínas de Membrana Externa) em 100 μl de água destilada.
14. Armazenar à temperatura de -20°C até à utilização das amostras.

C - PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PROTEÍNAS TOTAIS E DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA PARA A ELECTROFORESE:

1. Adicionar a cada amostra de Proteínas Totais e de Proteínas de Membrana Externa 20 μl de FSB 2X.
2. Ferver durante 5 minutos.
3. Submeter 20-30 μl de cada amostra a electroforese em gel de poliacrilamida a 12,5%.

CONDIÇÕES DE ELECTROFORESE DE LPS E DE PROTEÍNAS DA ENVOLTURA CELULAR (Laemmli, 1970)

(Levada a cabo numa cuveta vertical LKB 2001)

A - SOLUÇÕES "STOCK" DE ACRILAMIDA:

1. "STOCK" I: - Acrilamida a 44%
   - Bis-acrilamida a 0,8%
   - Água destilada
2. "STOCK" II: - Acrilamida a 30%
   - Bis-acrilamida a 0,8%
   - Água destilada

B - PROCEDIMENTO

1. Limpar cuidadosamente os vidros com papel absorvente embebido em acetona e, depois, em etanol.
2. Colocar os separadores dos vidros, um de cada lado.
3. Fixar o conjunto (vidros e separadores) com os dispositivos apropriados, verificando que os vidros e separadores .estejam bem alinhados na extremidade inferior.
4. Espalhar uma pequena quantidade de vaselina nesta extremidade inferior, e fixá-la sobre uma tira de borracha (na qual foi, também, espalhada previamente uma pequena quantidade de vaselina) colocada no suporte apropriado.
5. Encher o intervalo entre os vidros com água destilada (para verificar que esta não se perde).
6. Preparar a Porção Separadora do Gel ("Running Gel") (Poliacrilamida-SDS a 12,5%) (utilizar um recipiente apropriado para a posterior desgasificação):
   - Solução "Stock I" 9,94 ml
   - SDS a 10% (em água destilada) 0,699 ml

- Tris-HCl 1,5 M, pH 8,0 (em água destilada) 8,74 ml
- Água destilada 15,49 ml
- Persulfato de Amónio a 10% (em água destilada)* 69,9 **µl**
- TEMED (N,N,N',N'-Tetrametil-Etilenodiamina)* 10,4 **µl**

* Observações:

a) A solução de persulfato de amónio deve ser preparada imediatamente antes da sua utilização (a 4°C, poderá, no entanto, armazenar-se durante um ou dois dias);

b) Antes de se adicionar o TEMED, deve submeter-se a mistura dos outros componentes a uma desgasificação mediante bomba de vácuo.

7. Agitar levemente a solução (para que ocorra uma conveniente mistura de todos os seus componentes) e colocá-la entre os vidros, após rejeitar a água usada para verificar que estes não perdem líquido (o persulfato de amónio e o TEMED são agentes que vão iniciar a polimerização da acrilamida, de modo que este passo deve ser realizado tão rapidamente quanto possível).
8. Colocar, à superfície, uma camada (cerca de 1-2 cm de altura) de uma solução aquosa de SDS a 0,1% (que vai favorecer uma polimerização rectilínea da acrilamida) (esta camada será posteriormente retirada).
9. Esperar, pelo menos, 60 minutos, antes de preparar a Porção Concentradora do Gel ("Stacking Gel") (se possível, esperar ainda mais tempo).
10. Preparar a Porção Concentradora do Gel ("Stacking Gel") (Poliacrilamida-SDS a 3%), procedendo do mesmo modo que na preparação da porção separadora:

- Solução "Stock II" 1,0 ml
- SDS a 10% (em água destilada) 0,1 ml
- Tris-HCl 0,25 M, pH 6,8 (em água destilada) 5,0 ml
- Água destilada 3,66 ml
- Persulfato de Amónio a 10% (em água destilada) 24 **µl**

- TEMED 40 μl

11. Colocar um "pente" apropriado (que promova a formação do número de cavidades necessário para colocar todas as amostras a separar).
12. Esperar, pelo menos, 60 minutos, antes de colocar as amostras na Porção Concentradora do Gel ("Stacking Gel") (se possível, esperar ainda mais tempo).
13. Retirar cuidadosamente o "pente" e encher as cavidades por ele formadas no "Stacking Gel" com tampão de electroforese [Tampão Tris-Glicina (Tris-(hidroximetil)-aminometano 25 mM, Glicina 192 mM; SDS a 0,1%; Água destilada)].
14. Colocar as amostras a analisar nas cavidades do "Stacking Gel".
15. Preparar o gel para a sua colocação no interior da cuveta, fixando aos vidros o recipiente (que contém um dos eléctrodos), tendo o cuidado de colocar entre ambos a respectiva borracha impermeabilizante, sobre a qual se colocou, previamente, uma pequena quantidade de vaselina.
16. Colocar o conjunto na cuveta (a qual deve conter uma quantidade adequada de tampão de electroforese). e encher com tampão o recipiente referido no passo anterior, até que o filamento situado na sua zona central esteja totalmente coberto.
17. Colocar a tampa da cuveta e ligar a fonte de alimentação (SAVANT CVR-300), deixando a uma corrente constante de 15 mA, durante 15 horas.

REVELAÇÃO DOS GELES PARA ANÁLISE DE LIPOPOLISSACARÍDEOS (LPS) (Tsai & Frasch, 1982)

(Usar luvas durante esta revelação)

1. Depois da elecroforese, fixar o gel numa solução de etanol a 40% e ácido acético a 5% em água destilada, mantendo em agitação durante toda a noite.
2. Oxidar numa solução de etanol a 40% , ácido acético a 5% e ácido periódico a 0,7%, mantendo em agitação durante 5 minutos.
3. Lavar 3 vezes com água destilada, mantendo em agitação durante 15 minutos de cada vez.
4. Corar durante 10 minutos, mantendo em agitação, com a solução:

- Nitrato de Prata [$(NO_3)_2$ Ag]	1 g
- Água destilada	120 ml
- NaOH 0,1N	28 ml
- NH_4OH (amoníaco)	2 ml

Notas: - A adição do hidróxido de sódio faz a solução tomar uma coloração castanha escura;

- o amoníaco deve ser a última substância a juntar à solução; esta torna-se, de novo, incolor.

5. Lavar 3 vezes com água destilada, mantendo em agitação durante 15 minutos de cada vez.
6. Revelar, em agitação, com a seguinte solução:

- Ácido cítrico	50 mg
- Formaldeído	0,5 ml
- Água destilada	200 ml

Nota: manter em agitação, até ao aparecimento das bandas (desenvolvimento de uma cor castanha escura), o que ocorre, normalmente, após 5-10 minutos.

7. A reacção de revelação pode ser parada juntando uma solução aquosa de metanol a 50% (agitar).

   Nota: esta solução pode ser usada, também, para conservar o gel (embora este sofra desidratação, quando mantido nela durante algumas horas).

COLORAÇÃO DOS GELES PARA ANÁLISE DE PROTEÍNAS DA ENVOLTURA CELULAR

(Usar luvas durante esta coloração)

1. Após a electroforese, corar, durante 60 minutos, com uma solução de Azul Comassie a 0,05%, Isopropanol a 25% e Ácido Acético a 10%, em água destilada.
2. Colocar o gel numa solução de Ácido Acético a 5% em água destilada, e deixar a descorar. Colocar de cada lado do gel uma tira de papel de filtro (que vai absorver o corante da solução); substituir o papel de filtro quando este se encontre saturado com corante; se necessário, substituir também a solução (se a descoloração se prolongar por mais de 24 horas).

TRANSFERÊNCIA ELECROFORÉTICA DE LIPOPOLISSACARÍDEOS E DE PROTEÍNAS DA ENVOLTURA CELULAR A MEMBRANAS DE NITROCELULOSE (Towbin *et al.*, 1979)

SOLUÇÕES NECESSÁRIAS:

A - TAMPÃO DE TRANSFERÊNCIA 10X (SOLUÇÃO "STOCK"):

- Trisma Base	48,44 g
- Glicina ou Glicocola	225,2 g
- Água destilada	2000 ml

B - TAMPÃO DE TRANSFERÊNCIA 1X (tampão TRIS-GLICINA-METANOL):

- Solução "stock"	500 ml
- Metanol	1000 ml
- Água destilada	3500 ml

PROCEDIMENTO (Usar luvas):

1. Depois da electroforese, equilibrar o gel em tampão de transferência (1X), 2 vezes, durante 15 minutos de cada vez.
2. Cortar 2 pedaços de papel de filtro do tamanho das esponjas.
3. Cortar uma porção de membrana de nitrocelulose (um pouco maior do que o gel), tendo o cuidado de não lhe tocar directamente (manuseá-lo, tanto quanto possível, com os papeis de protecção).
4. Saturar as esponjas, o papel de filtro e a membrana de nitrocelulose em tampão de transferência (1X).
5. Colocar uma das grelhas, sobre ela uma esponja e, sobre esta, um pedaço de papel de filtro; de seguida, colocar o gel e, sobre este, a membrana de nitrocelulose (tendo sempre o cuidado de lhe pegar pelos bordos, tocando-lhe o mínimo possível); finalmente, cobrir com o outro pedaço de papel de filtro, a outra esponja e a outra grelha.

6. Encher a cuveta (Transphor 2005 - Pharmacia LKB) com tampão de transferência (1X) e colocar no seu interior as grelhas, de modo que o gel fique do lado do cátodo (polo negativo).
7. Aplicar 0,1 Amperes, e deixar durante toda a noite; no dia seguinte, antes de retirar, aplicar 0,2 Amperes durante 1 a 2 horas (alternativamente, pode aplicar-se 0,2 Amperes, e deixar durante 5 horas).

REVELAÇÃO DAS BANDAS NAS MEMBRANAS DE NITROCELULOSE

SOLUÇÕES NECESSÁRIAS:

A - TBS 5X (Solução "stock"):

- Trisma base 4,84 g
- NaCl 58,48 g
- Água destilada 1900 ml

Nota: Ajustar o pH a 7,5 com HCl e completar 2 litros, com água destilada.

B - TBS 1X

C - TTBS:

- Tween 20 0,5 ml
- TBS 1X 1000 ml

D - SOLUÇÃO BLOQUEANTE:

- Gelatina 3 g
- TBS 1X 100 ml

Nota: Aquecer a 37°C para dissolver.

E - SOLUÇÃO DE ANTICORPOS:

- Gelatina 2 g
- TBS 1X 200 ml

Nota: Aquecer a 37°C para dissolver.

F - TAMPÃO CARBONATO:

- Bicarbonato de Sódio 8,4 g
- Cloreto de Magnésio 0,203 g
- Água destilada 900 ml

Nota: Ajustar o pH a 9,8 com NaOH 1M e completar 1 litro, com água destilada.

G - SOLUÇÃO DE REVELAÇÃO:

Solução 1:

- N,N dimetilformamida	0,7 ml
- Água destilada	0,3 ml
- NBT (Nitroblue Tetrazolium)	30 mg

Solução 2:

- N,N dimetilformamida	1 ml
- BCIP (5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil fosfato)	15 mg

NOTA: Juntar as soluções 1 e 2 a 100 ml de Tampão Carbonato. e usar imediatamente

PROCEDIMENTO (Usar luvas):

1. Após a transferência, colocar a membrana de nitrocelulose em solução bloqueante durante 30-60 minutos (pode manter-se mais tempo nesta solução, a 4°C).
2. Rejeitar a solução bloqueante e lavar 2 vezes com TTBS, durante 5 minutos de cada vez (manter em agitação).
3. Incubar, durante 1 hora, em agitação, com uma solução do anti-soro correspondente, diluído 1:500 em solução de anticorpos (100 μl de anti-soro em 50 ml de solução de anticorpos).
4. Lavar 2 vezes com TTBS, durante 5 minutos de cada vez (manter em agitação).
5. Incubar, durante 1 hora, em agitação, com uma solução de soro comercial anti-imunoglobulina G (IgG) de coelho conjugado com fosfatase alcalina (BioRad) diluído aproximadamente 1:6000 em solução de anticorpos (17 μl de soro em 100 ml de solução de anticorpos).
6. Lavar 2 vezes com TTBS, durante 5 minutos de cada vez (manter em agitação).
7. Lavar com TBS (1X), durante 5 minutos (manter em agitação).

8. Revelar (em solução G) durante 30 minutos a 4 horas (vigiar, para que a coloração desenvolvida não se torne excessivamente intensa).
9. Concluída a revelação, lavar com água destilada durante 10 minutos (mudando a água pelo menos uma vez).
10. Secar a membrana de nitrocelulose sobre papel de filtro, e conservá-la em papel de filtro bem seco.

ANEXO 3. DETECÇÃO DE PLASMÍDEOS

ANEXO 3

DETECÇÃO DE PLASMÍDEOS

EXTRACÇÃO DE PLASMÍDEOS PELO MÉTODO DE KADO & LIU (1981) MODIFICADO POR TORANZO *et al.* (1983)

SOLUÇÕES NECESSÁRIAS:

A - SOLUÇÃO DE LISE pH 12,4:

- Tris 50 mM (0,60 g/100 ml; dissolver bem)
- SDS a 3%
- NaOH 2N (para ajustar o pH a 12,4)
- Água destilada

B - SOLUÇÃO DE FENOL-CLOROFÓRMIO 1:1

C - SOLUÇÃO ESTABILIZADORA (MARCADORA) pH 7,9 (STOP-MIX):

- Tris 50 mM (0,60 g/100 ml; dissolver bem)
- Glicerol a 50%
- Púrpura de bromocresol a 0,25%

PROCEDIMENTO:

1. De uma placa, retirar uma colónia da estirpe bacteriana desejada, e semeá-la em meio líquido (TSB ou BHI); deixar em agitação, à temperatura a que cresça a bactéria, até ao final da fase logarítmica.
2. Passar cerca de 1,5 ml desta cultura para um tubo Eppendorf, e centrifugar a 12000 r.p.m., durante 5 minutos (se necessário, eliminar o sobrenadante da primeira centrifugação e centrifugar mais 1,5 ml da suspensão, no sentido de aumentar a quantidade de células bacterianas presentes na "pellet").

3. Eliminar o sobrenadante, e ressuspender as células em 50-70 μl de solução de lise, pH 12,4 (é importante verificar que o pH tenha este valor elevado).
4. Incubar a 55-60°C durante 45-90 minutos.
5. Adicionar 50-70 μl de fenol-clorofórmio (1:1), e agitar até formar uma emulsão.
6. Centrifugar a 12000 r.p.m., durante 10 minutos.

   Nota: Após a centrifugação, manter os tubos a 4°C enquanto não se retirar a fase aquosa para outro tubo Eppendorf.
7. Passar a fase aquosa, superior, que contém o DNA plasmídico, para outro tubo Eppendorf.
8. Adicionar 5-7 μl de solução estabilizadora (STOP MIX), e proceder à electroforese.

EXTRACÇÃO DE PLASMÍDEOS PELO MÉTODO DE BIRNBOIM & DOLY (1979)

SOLUÇÕES NECESSÁRIAS:

A - SOLUÇÃO DE LISE pH 12,4:

- Glicose 50 mM
- Tris 25 mM pH 8,0
- EDTA 10 mM
- Água destilada
- Lisozima 4 mg/ml

Nota: Juntar a lisozima (0,004 g para cada ml de solução de lise) imediatamente antes de usar, e fazer a sua dissolução em gelo, para dissolver bem.

B - SOLUÇÃO DE NaOH 0,2 N com SDS a 1%:

- Água destilada estéril 900 μl
- NaOH 2N 100 μl
- SDS (Dodecil-sulfato-sódico) 10 mg

Nota: Fazer a solução imediatamente antes de usar, e não em gelo.

C - SOLUÇÃO GELADA DE ACETATO DE POTÁSSIO pH 4,8:

- Solução aquosa de acetato de potássio 5M (490,7 g/l) 40 ml
- Ácido acético glacial
- Água destilada

Nota: ajustar o pH da solução de acetato de potássio 5M a 4,8 com ácido acético glacial, e completar 100 ml com água destilada.

Autoclavar e armazenar a 4°C.

D - SOLUÇÃO DE FENOL-CLOROFÓRMIO-ÁLCOOL ISOAMÍLICO:

- Fenol 25 ml

- Clorofórmio 24 ml
- Álcool isoamílico 1 ml

Nota: Usar luvas durante o manuseamento do fenol (produto altamente corrosivo).

E - ETANOL ABSOLUTO (a 4°C)

F - ETANOL A 70% (a 4°C)

G - TRIS-EDTA 1X pH 8,0 (TE 1X)

H - SOLUÇÃO ESTABILIZADORA (MARCADORA) pH 7,9 (STOP-MIX):

- Tris 50 mM (0,60 g/100 ml; dissolver bem)
- Glicerol a 50%
- Púrpura de bromocresol a 0,25%

PROCEDIMENTO:

1. Transferir uma colónia de uma cultura pura, em placa, da estirpe bacteriana desejada a um tubo com meio líquido (TSB ou BHI).
2. Manter em agitação, a uma temperatura conveniente ao crescimento da bactéria, durante toda a noite.
3. Passar 1,5 ml desta cultura em meio líquido a um tubo de Eppendorf, e centrifugar a 12000 r.p.m. durante 5 minutos. Se necessário, eliminar o sobrenadante e centrifugar mais 1,5 ml, para aumentar a quantidade de células bacterianas a usar.
4. Retirar todo o sobrenadante possível, por aspiração com uma micropipeta.
5. Ressuspender o precipitado ("pellet") em 100 μl de solução de lise.
6. Deixar os tubos abertos durante 5 minutos, à temperatura ambiente. (a lisozima ataca a bactéria).
7. Adicionar 200 μl da solução de NaOH 0,2 N com SDS a 1%.
8. Agitar o tubo por inversão (3-5 vezes), e deixar em gelo durante 5 minutos (lise alcalina).
9. Juntar 150 μl de solução gelada de acetato de potássio pH 4,8.

10. Agitar por inversão, e deixar em gelo durante 5 minutos. (precipitam proteínas e DNA cromossómico).
11. Centrifugar a 12000 r.p.m. durante 5 minutos.
12. Transferir o sobrenadante (algumas proteínas e o DNA plasmídico) a outro tubo de Eppendorf em gelo
13. Juntar um volume igual (cerca de 400 μl) da solução de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico, e agitar, por inversão, muitas vezes.
14. Centrifugar a 12000 r.p.m. durante 7 minutos (separam-se as proteínas do DNA plasmídico: a fase aquosa superior, contém o DNA plasmídico; a fase fenólica, inferior, contém proteínas).
15. Transferir a fase aquosa (superior) a outro tubo de Eppendorf, e adicionar dois volumes (cerca de 800 μl) de etanol absoluto frio (4°C).
16. Misturar, por inversão, e deixar em gelo durante 10 minutos (precipita o DNA plasmídico).
17. Centrifugar a 12000 r.p.m. durante 15 minutos (a 4°C).
18. Rejeitar o sobrenadante, e juntar 1 ml de etanol a 70% frio (4°C) (lava e elimina sais).
19. Centrifugar a 12000 r.p.m. durante 15 minutos (a 4°C).
20. Retirar o sobrenadante e secar, primeiro, por inversão sobre papel de filtro, e, depois, num secador (aqui, deve estar o menos tempo possível).
21. Ressuspender o precipitado ("pellet"), depois de bem seco, em 10-20μl de TE 1X.
22. Adicionar 2,5 μl de solução estabilizadora (corante STOP-MIX), e proceder à electroforese.

CONDIÇÕES DE ELECTROFORESE DE DNA PLASMÍDICO

(Levada a cabo numa cuveta horizontal)

PROCEDIMENTO

1. Preparar uma solução de agarose a 0,7%:

   - Agarose 1,4 g
   - Tampão Tris-Acetato 10X 20 ml
   - Água destilada 180 ml

   Nota: Aquecer (por exemplo, em microondas) para dissolver bem.

2. Preparar a placa de acrílico para a colocação da solução de agarose a 0,7% (que irá constituir o gel):

   - colocar uma fita impermeabilizante numa das extremidades;
   - colocar a vareta de acrílico no local pretendido (definindo, assim, o tamanho do gel), e impermeabilizá-la com um pouco da solução de agarose (deixar esta solidificar).

3. Colocar o "pente" no local adequado (junto da extremidade impermeabilizada com a fita).

4. Deitar a solução de agarose na placa de acrílico (entre a extremidade que foi impermeabilizada com fita e a vareta), tendo o cuidado de não deixar bolhas de ar. Deixar solidificar.

5. Encher a cuveta com tampão Tris-Acetato-EDTA 1X (cerca de 2,5 litros):

   - Tris 40 mM
   - EDTA (ácido etileno-diamino-tetra-acético) 2 mM
   - Ácido acético glacial

   Nota: Ajustar o pH a 7,9 com o ácido acético glacial.

6. Depois de solidificada a agarose, retirar cuidadosamente a vareta de acrílico, a fita impermeabilizante e o "pente".

7. Colocar a placa de acrílico na cuveta, de modo que o gel fique completamente imerso no tampão.

8. Colocar as amostras a analisar nas cavidades do gel.
9. Ligar a fonte de alimentação, deixando a uma voltagem constante de 40 V, durante toda a noite (alternativamente, pode deixar-se a 110 V durante 4-5 horas).

REVELAÇÃO DAS BANDAS PLASMÍDICAS POR COLORAÇÃO COM BROMETO DE ETÍDIO

1. Após a electroforese, retirar o gel da placa de acrílico e submergi-lo numa solução aquosa de brometo de etídio (0,5 μg/ml).
2. Deixar durante 30 minutos, em agitação (o brometo de etídio intercala-se dentro do DNA, e torna-se visível pelo facto de absorver luz ultravioleta, corando as bandas deste ácido nucleico).
3. Se necessário, descorar em água destilada, antes de fotografar (o gel também pode ser conservado em água destilada).
4. Visualizar as bandas, e fotografá-las, usando um emissor de radiação ultravioleta.

ANEXO 4. EXTRACÇÃO DE DNA

ANEXO 4

EXTRACÇÃO DE DNA

(Método de MARMUR, 1961, modificado)

REAGENTES NECESSÁRIOS:

1. EDTA - SALINO (tampão)

- NaCl 0,15 M ; Na-EDTA 0,01 M
  (8,77g de NaCl; 3,72g de Na-EDTA; ÁGUA até 1000ml)
- ajustar o pH a 8,0 (com NaOH)

Autoclavar

O EDTA e/ou o pH elevado inibe(m) a actividade DNAse.

2. EDTA - SALINO 1:5

- 0,1754g de NaCl
- 0,0744g de Na-EDTA
- 100ml de água destilada

Autoclavar

3. EDTA - SALINO CONCENTRADO

- 1,14g de NaCl
- 0,4836g de Na-EDTA
- 50ml de água destilada

Autoclavar

4. SDS ("Sodium Lauryl Sulfate") a 20%:

Este detergente aniónico (NaC12H26SO4) provoca a lise da maior parte das células não activas metabolicamente, inibe a acção enzimática e desnatura algumas proteínas.

5. PERCLORATO DE SÓDIO 5 M:

- 70,25g de perclorato de sódio

- 100 ml de água destilada

A elevada concentração de sal, proporcionada pelo perclorato, ajuda a dissociar proteínas do ácido nucleico.

6. CLOROFÓRMIO - ISOPROPANOL, 24:1 (v/v):

- para 1 litro: 960 ml de clorofórmio + 40 ml de isopropanol (preparar imediatamente antes de usar)

Usado para desproteinizar: o clorofórmio causa a desnaturação superficial das proteínas.

7. TRITON X-100 a 2%

- 1,5ml de Triton X-100 por cada 75ml de suspensão

8. CITRATO - SALINO - SÓDICO ("Sodium Saline Citrate" - SSC 20X):

- NaCl 0,15 M + Citrato trissódico 0,015 M, pH 7,0 + 0,2
(175,4g de NaCl + 88,23g de Na_3-citrato + 1000 ml de água; pH 7,0)
Autoclavar

Mantém a força iónica do DNA dissolvido e constitui um agente quelante de iões divalentes.

9. CITRATO - SALINO - SÓDICO DILUÍDO (SSC 0,1X):

- diluir 0,1ml de SSC 20X juntando 19,9ml de água destilada

O DNA dissolve-se mais prontamente em soluções salinas diluidas, mas nunca usar água pura para o dissolver.

10. RIBONUCLEASE (RNAse):

- 1mg/ml em NaCl 0,15 M, pH 5,0
(dissolver 8,77g de NaCl em 1000ml de água, e ajustar o pH a 5,0 com HCl; autoclavar. Dissolver 1mg de RNAse por mililitro desta solução, e usar imediatamente).

A RNAse digere o RNA e facilita a sua separação do DNA.

11. LISOZIMA:

- 25 mg por cada 50 ml de suspensão da bactéria

Usada para lisar as células resistentes à acção do detergente, as quais são, então, também, sujeitas à acção do SDS.

12. ÁLCOOL ETÍLICO ABSOLUTO:

Usado para precipitar ácidos nucleicos a seguir à desproteinização (também pode usar-se álcool etílico desnaturado)
(usar frio).

13. PRONASE (protease):

- 10mg/ml em água destilada estéril (dissolver a enzima em água destilada previamente esterilizada, e usar imediatamente).

PROCEDIMENTO:

A - CULTURA DAS BACTÉRIAS:

1. Inocular a estirpe bacteriana num tubo com TSB ou BHI, e incubar, em agitação, durante toda a noite.
2. Inocular, com esta cultura, dois frascos com cerca de 120 ml de TSA ou BHIA cada um (este meio de cultura deve ter sido deixado solidificar com os frascos deitados, de modo a que a sua superfície seja máxima; aquando da inoculação com a cultura em meio líquido, esta deve ser espalhada por toda a superfície do TSA ou BHIA).
3. Incubar, a 22-25°C, durante 24-48 horas.

B - LISE DAS CÉLULAS BACTERIANAS:

1. Pesar os frascos de centrífuga.

2. Recolher as células que cresceram nos frascos com TSA ou BHIA, fazendo uma "lavagem" da superfície deste meio com tampão EDTA-salino pH 8,0 (usar cerca de 10ml por frasco).
3. Centrifugar a 8000 r.p.m., durante 15 minutos.

   Nota: equilibrar os frascos de centrífuga, usando tampão EDTA-salino pH 8,0.
4. Remover o sobrenadante, e lavar as células, 2 vezes, com tampão EDTA-salino pH 8,0.
5. Voltar a pesar os frascos de centrífuga, e determinar o peso das células.
6. Ressuspender as células em EDTA-Salino 1:5 (50ml por cada 2g de células).
7. Adicionar 25mg de lisozima por cada 50ml de suspensão.
8. Incubar, a 37°C, durante 2 horas.
9. Adicionar 25ml de EDTA-Salino Concentrado por cada 50ml de suspensão.
10. Juntar Triton X-100, para uma concentração final de 2% (1,5ml por cada 75ml de suspensão).
11. Deixar à temperatura ambiente, durante 5 minutos.
12. Adicionar SDS a 20%, para uma concentração final de 2% (10,4ml por cada 100ml de suspensão).
13. Incubar a 50-60°C, até que a suspensão se torne viscosa e sofra um clareamento (estas características indicam que a lise das células está completa, e observam-se, geralmente, ao fim de cerca de 30 minutos).

C - PURIFICAÇÃO DO DNA:

1. Juntar perclorato de sódio 5 M, para uma concentração final de 1 M (20ml/100ml de suspensão).
2. Adicionar clorofórmio-isopropanol 24:1, na quantidade de metade do volume da suspensão.
3. Agitar fortemente, durante 30 minutos.
4. Centrifugar a 8500 r.p.m., durante 15 minutos, a 4°C.

Nota: se necessário, equilibrar os frascos de centrífuga, usando clorofórmio-isopropanol 24:1.

5. Separar o sobrenadante para um matraz, esterilizado, de 250ml (ou para um novo frasco de centrífuga, igualmente esterilizado); anotar o volume de sobrenadante retirado.
6. Adicionar clorofórmio-isopropanol 24:1, na quantidade de metade do volume de sobrenadante recolhido no passo anterior.
7. Agitar fortemente, durante 30 minutos.
8. Centrifugar a 8500 r.p.m., durante 15 minutos, a 4°C.
9. Separar o sobrenadante para um matraz, esterilizado, de 250ml, anotando o volume de sobrenadante retirado.
10. Proceder à precipitação do DNA, à sua recolha e dissolução em SSC 0,1X:
    a) Precipitação: com uma proveta, previamente esterilizada, adicionar ao sobrenadante, recolhido no passo anterior, etanol absoluto frio (4°C), na quantidade de, aproximadamente, o dobro do volume deste.
    b) Recolha: lavar uma vareta de vidro com papel absorvente embebido em etanol absoluto frio; colocar a vareta verticalmente, e rodá-la, de modo a que o DNA adira à sua superfície.
    c) Dissolução: retirar a vareta com o DNA, exercer uma leve pressão sobre o bordo do matraz (de modo a retirar o etanol), e introduzi-la num frasco contendo 10ml de SSC 0,1X; dissolver bem o DNA.
11. Adicionar 0,5ml da solução de RNAse por cada 10ml de solução de DNA em SSC 0,1X.
12. Incubar a 37°C durante 30 minutos.
13. Transferir esta solução para um frasco de centrífuga esterilizado, e juntar 5ml de clorofórmio-isopropanol 24:1 (metade do volume da solução).
14. Agitar fortemente, durante 15 minutos.
15. Centrifugar a 8500 r.p.m., durante 10 minutos.

Nota: se necessário, equilibrar os frascos de centrífuga, usando clorofórmio-isopropanol 24:1.

16. Separar o sobrenadante para um matraz de 50ml esterilizado.
17. Adicionar 0,45ml de SSC 20X por cada 10ml de sobrenadante retirado (para uma concentração final de 1X).
18. Proceder à precipitação do DNA, à sua recolha e dissolução em SSC 0,1X (como é indicado no passo 10).
19. Transferir esta solução para um frasco de centrífuga esterilizado, e juntar 5ml de clorofórmio-isopropanol 24:1.
20. Agitar fortemente, durante 15 minutos.
21. Centrifugar a 8500 r.p.m., durante 10 minutos.

    Nota: se necessário, equilibrar os frascos de centrífuga, usando clorofórmio-isopropanol 24:1.
22. Separar o sobrenadante para um novo matraz de 50ml esterilizado.
23. Proceder à precipitação do DNA e à sua recolha (como é indicado no passo 10) e dissolvê-lo em 3ml de SSC 0,1X.
24. Avaliar a pureza do DNA isolado:

    - usando cuvetas de quartzo, determinar a absorvância da solução de DNA em SSC 0,1X, a 260nm (indica a concentração do DNA obtido) e a 280nm (indica a quantidade de proteínas existentes na solução).
    - determinar o quociente entre a absorvância a 260nm e a absorvância a 280nm.
25. Se o quociente determinado no passo anterior for igual ou superior a 1,8, adicionar à solução de DNA 3-4 gotas de clorofórmio, envolver a porção superior do frasco em "parafilm" e guardar a 4°C até à sua utilização posterior.

    Se o referido quociente for inferior ao valor indicado, é necessário proceder a uma purificação adicional (passos 26 a 32).

26. Adicionar à solução de DNA uma solução de Pronase (100µl de solução de pronase por cada mililitro de solução de DNA).
27. Incubar a 37°C, durante 1 hora.
28. Transferir esta solução para um frasco de centrífuga esterilizado, e juntar 1,5ml de clorofórmio-isopropanol 24:1 (metade do volume de solução de DNA).
29. Agitar fortemente, durante 15 minutos.
30. Centrifugar a 8500 r.p.m., durante 10 minutos.

    Nota: se necessário, equilibrar os frascos de centrífuga, usando clorofórmio-isopropanol 24:1.
31. Separar o sobrenadante para um novo matraz de 50ml esterilizado.
32. Proceder à precipitação do DNA, à sua recolha e dissolução (como é indicado no passo 23).
33. Reavaliar a pureza do DNA (procedendo como é indicado no passo 24).
34. Se o quociente determinado no passo anterior for igual ou superior a 1,8, adicionar à solução de DNA 3-4 gotas de clorofórmio, envolver a porção superior do frasco em "parafilm" e guardar a 4°C até à sua utilização posterior.

    Se o referido quociente permanecer inferior ao valor indicado, é necessário proceder a uma purificação adicional, usando o procedimento alternativo descrito a seguir.

PROCEDIMENTO ALTERNATIVO PARA A PURIFICAÇÃO DO DNA

1. Distribuir a solução de DNA em SSC 0,1X por tubos Eppendorf estéreis (0,5ml em cada um destes tubos).
2. Juntar 50 µl de uma solução aquosa de acetato de amónio 7,5 M.
3. Adicionar 1ml de etanol absoluto frio (4°C).
4. Deixar a -80°C, durante 30 minutos a 1 hora (se possível, 1 hora).

5. Centrifugar a 13000 r.p.m., durante 15 a 30 minutos (se possível, 30 minutos).
6. Eliminar o sobrenadante, e ressuspender o DNA em 100 µl de SSC 0,1X (se a quantidade de DNA for grande, dissolvê-lo em 200µl de SSC 0,1X).
7. Adicionar 10µl de solução de pronase (a 10 mg por mililitro de água destilada estéril).
8. Incubar a 37°C, durante 1 hora.
9. Juntar 10µl de acetato de amónio 7,5 M.
10. Adicionar 1ml de etanol absoluto frio.
11. Deixar a -80°C, durante 30 minutos a 1 hora (se possível, 1 hora).
12. Centrifugar a 13000 r.p.m., durante 15 a 30 minutos (se possível, 30 minutos).
13. Eliminar o sobrenadante, e ressuspender o DNA em 100 µl de SSC 0,1X (se a quantidade de DNA for grande, dissolvê-lo em 200µl de SSC 0,1X).
14. Recolher 10µl da solução obtida no passo anterior, e diluir com 2ml de SSC 0,1X. De seguida, avaliar a concentração e a pureza do DNA, como é indicado no passo 24 do procedimento normal de extracção deste ácido nucleico.

ANEXO 5. RIBOTIPAGEM

ANEXO 5

RIBOTIPAGEM

(Usar sempre luvas)

REAGENTES NECESSÁRIOS:

A. CONCENTRAÇÃO DO DNA

1. Acetato de amónio 7,5 M estéril.
2. Etanol absoluto (96% ou 99%).
3. Etanol a 70%.
4. Tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE 1X):
   - Tris-acetato 0,04 M
   - EDTA 0,001 M
   Autoclavar.

B. RESTRIÇÃO E ELECTROFORESE

1. Solução Estabilizadora:
   - Púrpura de bromocresol a 0,25%
   - Glicerol a 50%
   - em Tris-Acetato 50 mM
   Ajustar o pH a 7,9 e autoclavar.
2. Solução aquosa de brometo de etídio (0,5 μg/ml).

C. DESNATURALIZAÇÃO DO DNA E NEUTRALIZAÇÃO DOS GELES

1. Ácido clorídrico 0,25 M (HCl)
   - preparar uma solução "stock" 2,5 M, e diluí-la 1/10.
2. Hidróxido de sódio 0,5 M (NaOH)
   - preparar uma solução "stock" 2 M, e diluí-la 1/4.

3. Cloreto de sódio 1,5 M (NaCl)
   - dissolver 87,66 g de NaCl em 1000 ml de água destilada
   Autoclavar

4. Cloreto de sódio 3,0 M - Tris 0,5 M, pH 7,0:
   - dissolver 175,32 g de NaCl e 60,55 g de Tris em 1000 ml de água destilada.
   Ajustar o pH a 7,0 e autoclavar.

D. TRANSFERÊNCIA A FILTRO DE NYLON ("SOUTHERN BLOT")

1. Citrato salino sódico (SSC) a 2X.
2. Solução aquosa de brometo de etídio (0,5 μg/ml).

E. PREPARAÇÃO DA SONDA DE DNA

1. RNA ribossómico (16S + 23S) de *Escherichia coli* (4 mg/ml, Sigma R-8510).
2. Transcriptase reversa de virus de mieloblastoma aviar (M-MLV) (Boerhinger Manhein Cat. N° 109118, Sigma R-9376 ou Gibco Cat. N° 510-8025SA).
3. Tampão de reacção 5X (Gibco Cat. N° 510-8025SA) (acompanha a transcriptase reversa).
4. dNTP 10X (mistura de hexanucleótidos marcados com digoxigenina) (Boerhinger Manhein DIG DNA Labeling and Detection Kit Nonradiactive. Cat. N° 1093 657).
5. "Random Primers" [p(dN)6] (Boerhinger Manhein Cat. N° 103 4 731)
6. Inibidor de RNAse (Boerhinger Manhein Cat. N° 799 017).
7. "Dithiothreitol" (DTT) (Sigma D 9779).
8. Dietil pirocarbonato (DEPC) (Sigma D 5758).
9. EDTA 0,2 M, pH 8,0.
10. Acetato de amónio 5 M.
11. Etanol absoluto.

12. Etanol a 70%.

13. Tampão Tris-EDTA (TE), pH 7,4:
    - Tris-HCl 10 mM
    - EDTA 1 mM

    Ajustar o pH a 7,4 e autoclavar.

F. HIBRIDAÇÃO E DETECÇÃO IMUNOLÓGICA

1. Solução de SSC 2X + SDS a 0,1% (p/v).

2. Solução de SSC 0,1X + SDS a 0,1% (p/v).

3. Tampão 1:
    - Ácido maleico 0,1 M (11,6 g/l)
    - Cloreto de sódio 0,15 M (8,76 g/l)

    Ajustar o pH a 7,5 com NaOH concentrado e autoclavar.

4. Solução Bloqueante a 10%:
    - dissolver o conteúdo do tubo nº 11 do "kit" Boerhinger em tampão 1 a uma concentração final de 10% (peso/volume), com agitação e aquecimento. Autoclavar e guardar a 4 °C ou a -20 °C.

5. Tampão 2 (solução bloqueante a 1%):
    - diluir a solução bloqueante 1:10 em tampão 1. Autoclavar.

6. Solução de anticorpo:
    - diluir o anti-soro contendo o anticorpo conjugado com fosfatase alcalina em tampão 2 (25µl em 125µl).

    Nota: esta solução diluida é estável apenas durante 12 horas a 4 °C.

7. Tampão de Lavagem:
    - Tween 20 a 0,3% (volume/volume) em tampão 1. Autoclavar.

8. Tampão 3 (Solução Equilibradora):
    - Tris-HCl 100 mM (12,1 g/l)
    - NaCl 100 mM (5,8 g/l)
    - $MgCl_2$ 50 mM (10,15 g/l)

    Ajustar o pH a 9,5 e autoclavar.

9. Tampão 4:
   - Tris-HCl 10 mM (1,21 g/l)
   - EDTA 1 mM (0,372 g/l)

   Ajustar o pH a 8,0 e autoclavar.

10. Solução Reveladora:
   - 45 µl de "NBT-solution" (tubo 9 do "kit") (75 mg de azul de tetrazolium por ml de dimetilformamida a 70%)
   - 35 µl de solução "X-phosphate" (tubo 10 do "kit") (50 mg de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato por ml de dimetilformamida)
   - 10 ml de tampão 3.

11. Tampão de Hibridação (TH):
   - diluir a solução bloqueante até 1% em SSC 5X (diluição 1/10)
   - adicionar "sarkosyl" (Lauril sarcosinato de sódio) a 0,1% (p/v)
   - adicionar SDS a 0,02%.

   Autoclavar.

   Conservar a 4 °C ou a -20 °C.

PROCEDIMENTO (Usar sempre luvas):

A. CONCENTRAÇÃO DO DNA POR PRECIPITAÇÃO

1. Colocar 200 µl da amostra de DNA num tubo Eppendorf estéril.
2. Juntar 200 µl de acetato de amónio 7,5 M estéril e 800 µl de etanol absoluto frio.
3. Incubar durante 30-60 minutos (se possível, 60 minutos) a -80 °C.
4. Centrifugar a 13000 r.p.m. durante 15-30 minutos (se possível, 30 minutos) e eliminar o sobrenadante utilizando uma micropipeta tendo o cuidado de não arrastar o precipitado (DNA).
5. Adicionar 1 ml de etanol a 70% frio.
6. Centrifugar a 13000 r.p.m. durante 5 minutos e eliminar o sobrenadante.
7. Secar, centrifugando os tubos, com a tampa aberta, a 7000 r.p.m. durante 7 minutos.

8. Ressuspender o DNA em 20 µl de tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE 1X).

9. Medir a concentração do DNA por leitura espectrofotométrica a 260 nm:
   - diluir em TAE 1X uma porção da amostra obtida no passo anterior (1/250-1/300).
   (A260 0,40-0,44 = 20-22 µg DNA/ml, ou 1 unidade de Absorvância a 260 nm = 50 µg de DNA/ml).

B. RESTRIÇÃO DO DNA

1. Ajustar as amostras de DNA a uma concentração de 2 µg num volume final de 50 µl [DNA+TAE+Tampão enzima+ Enzima (pelo menos 3 unidades/µg de DNA)]

   Exemplo:
   - 10 µl de amostra de DNA (250 µg/ml)
   - 34 µl de TAE 1X
   - 5 µl de Tampão enzima
   - 1 µl de Enzima (10 unidades de enzima)

2. Incubar a 37 °C durante 10 horas ou, se possível, toda a noite.

3. Parar a reacção adicionando 10 µl da solução estabilizadora (púrpura de bromocresol+glicerol, em tris-acetato; pH 7,9).

C. CONDIÇÕES DE ELECTROFORESE

1. O DNA digerido submete-se a electroforese em gel de agarose (Tipo II, Sigma) [0,8-1% (peso/volume)] a 70 V durante 4,5-6 horas. Os restantes procedimentos para a realização da electroforese são semelhantes aos já descritos para a electroforese de DNA plasmídico. Se o gel se destina a realizar a transferência do DNA para a membrana de "nylon", não deve proceder-se ao passo seguinte (coloração com brometo de etídio).

2. Se o gel se destina a determinar a(s) enzima(s) mais adequada(s), deverá proceder-se à coloração do DNA numa solução aquosa de brometo de etídio (0,5 µg/ml) e à sua visualização com luz ultravioleta. Neste caso, o gel não se usa para efectuar a transferência para membrana de "nylon".

D. "SOUTHERN BLOT" (Transferência para Membrana de "Nylon")

a) Tratamento das amostras antes da transferência:

1. Lavar o gel 2 vezes (15 minutos de cada vez) com HCl 0,25 M.
2. Desnaturalização do DNA:

   - Tratar o gel 2 vezes (20 minutos de cada vez) com NaOH 0,5 M;

   - Tratar o gel 2 vezes (20 minutos de cada vez) com NaCl 1,5 M.

3. Neutralização:

   - Lavar 2 vezes (20 minutos de cada vez) com tampão Tris 0,5 M + NaCl 3,0 M (pH 7,0).

b) Transferência, utilizando um sistema de vácuo (Hybaid Vacu-Aid):

1. Colocar sobre a placa porosa do sistema de vácuo uma porção de papel de filtro (Whatman 1), de tamanho maior do que o gel, embebido em SSC 2X.
2. Sobre o papel de filtro, colocar a membrana de "nylon" ("Nylon membranes positively charged" 1209 299, 10cm X 15cm, Boerhinger Mannhein).
3. Colocar a borracha de modo que a abertura nela existente fique exactamente sobre a membrana.
4. Colocar o gel de maneira a que este tape completamente a abertura da borracha para que o vácuo possa ser bem conseguido.
5. Cobrir o gel com SSC 2X (pode deitar-se apenas a quantidade suficiente para cobrir apenas o gel ou pode inundar-se completamente a câmara de transferência), colocar a tampa e ligar o sistema de vácuo.
6. Efectuar a transferência durante 1,5-2 horas, tendo o cuidado de não deixar secar a parte superior do gel (se necessário, ir deitando mais SSC 2X).
7. Após este tempo, corar o gel com solução de brometo de etídio, para comprovar que a transferência foi bem feita.

8. Secar a membrana ao ar (sobre papel de filtro) durante 10-15 minutos.

9. Fixar com luz ultravioleta ("ultraviolet crosslinker") durante 2 minutos.
   - a membrana pode, se necessário, ser guardada para uso posterior (dentro de uma bolsa de plástico selada e envolvida em folha de alumínio, a 4 °C e em condições de dessecação).

E. PREPARAÇÃO DA SONDA DE DNA

a) Tratamento da Água

1. Fazer uma solução a 0,1% (1 g/l) de Dietilpirocarbonato (DEPC) em água bidestilada (Milli Q).
2. Agitar vigorosamente durante 10 minutos.
3. Autoclavar a solução ou aquecê-la a 70 °C durante 1 hora, para eliminar o DEPC.
4. Guardar a solução à temperatura ambiente ou fazer alíquotas congelando-as a -20 °C.

b) Ressuspender o rRNA (16S+23S) de *E. coli* em água tratada com DEPC, a uma concentração de 4 µg/µl.

c) Dissolver "random primer" (50 A_{260} unidades = 2 mg = 1 µmol) em 200 µl de água tratada com DEPC. Conservar a -20 °C até usar.

d) Síntese da Sonda

1. Num tubo Eppendorf, misturar 2,5 µl de solução de rRNA de *E. coli* (4µg / µl) com 30 µl de água tratada com DEPC.
2. Juntar os seguintes reagentes, nas quantidades indicadas:
   - 6 µl de "random primer" p(dN)6
   - 12,5 µl de dNTP 10X
   - 1,5 µl de inibidor de RNAse
   - 21,2 µl de água tratada com DEPC
   - 25 µl de tampão de síntese cDNA 5X

-12,5 µl de DTT (0,1M em água tratada com DEPC)
- 10 µl (200 U/µl) de transcriptase reversa (Gibco).

3. Misturar a solução e transferir 20 µl para tubos Eppendorf.
4. Incubar a 37 °C durante toda a noite (em banho-maria).
5. Parar a reacção adicionando 2 µl de EDTA 0,2 M (pH 8,0).
6. Precipitar o cDNA marcado, com 0,6 volumes de acetato de amónio 5 M e 3 volumes de etanol absoluto (96% ou 99%) frio (-20 °C). Misturar.
7. Deixar a -80 °C durante pelo menos 30 minutos (ou a -20 °C durante 90 minutos).
8. Centrifugar a 13000 r.p.m. durante 15 minutos.
9. Retirar o sobrenadante com micropipeta, sem tocar na "pellet".
10. Lavar a "pellet" adicionando 0,5-1 ml de etanol a 70% frio (ter o cuidado de adicionar esta solução pelo lado contrário àquele em que se encontra o cDNA..
11. Centrifugar a 13000 r.p.m. durante 5 minutos e eliminar o sobrenadante.
12. Secar os tubos centrifugando-os com a tampa aberta a 7000 r.p.m. durante 7 minutos.
13. Dissolver a "pellet" em 50 µl de tampão Tris-EDTA pH 7,4.
14. Usar a sonda directamente ou congelá-la (não ferver).

F. HIBRIDAÇÃO

1. Pré-hibridar a membrana (filtro) de nylon numa bolsa de plástico com 20 ml de tampão de hibridação/100 cm^2 de filtro (não deixar bolhas de ar dentro da bolsa), a 68 °C durante pelo menos 1 hora.
2. Substituir a solução por tampão de hibridação (2,5 ml/cm^2 de filtro) contendo a sonda de DNA (12,5 µl). (Ter o cuidado de não deixar secar o filtro entre a pré-hibridação e a hibridação, e, tal como no passo anterior, não deixar bolhas de ar dentro da bolsa).
3. Deixar a 56 °C durante toda a noite (hibridação).
4. Lavar o filtro 2 vezes (5 minutos de cada vez), à temperatura ambiente, com pelo menos 50 ml da solução de SSC 2X + SDS a 0,1%.

5. Lavar o filtro 2 vezes (15 minutos de cada vez), a 68 °C, com SSC 0,1X + SDS a 0,1%.

   O filtro pode ser usado de imediato para a detecção do DNA hibridado, ou pode secar-se ao ar e guardar-se para posterior detecção.

G. DETECÇÃO IMUNOLÓGICA. **Todas as incubações devem ser realizadas à temperatura ambiente e, excepto no caso da revelação, em agitação.** Os volumes indicados estão calculados para membranas (filtros) de 150 cm^2.

1. Lavar o filtro rapidamente (1 minuto) em tampão 1.
2. Incubar durante 30 minutos em 150 ml de tampão 2.
3. Incubar durante 30 minutos em 30 ml da solução de anticorpo.
4. Lavar 2 vezes (15 minutos de cada vez) com 150 ml de tampão de lavagem.
5. Equilibrar a membrana durante 2 minutos com 30 ml de tampão 3.
6. Incubar a membrana, **em obscuridade**, com 15 ml da solução reveladora, até a revelação estar completa. **Não agitar**.
7. Parar a reacção lavando a membrana durante 5 minutos com 75 ml de tampão 4.

UNIVERSIDADE DO PORTO
FACULDADE DE CIÊNCIAS
BIBLIOTECA

SUMMARY

An epidemiological survey was carried out on two Portuguese trout farms leading to the conclusion that, in general, the same bacterial groups were detected both in fish's internal organs and environmental samples of water and sediment, although in different relative quantities.

An important part of this study was the search for bacteria and virus which are aetiological agents of notifiable fish diseases; as a result, the bacteria *Aeromonas salmonicida* and *Yersinia ruckeri* (serotypes O1 and O3) and the Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) were detected.

Y. ruckeri and IPNV are reported in Portugal for the first time, the two IPNV strains being, additionally, the first viral isolation in Portuguese aquaculture facilities.

The detection of *Y. ruckeri* strains belonging to the serotype O3 (former serotype V) is particularly interesting, since it was found for the first time outside North America. Also of great significance was the isolation of four strains, belonging to serotype O1, non motile and tween 80 negative, formerly detected only in the United Kingdom, Norway and Germany.

RÉSUMÉ

Une étude épidemiologique a été realisée chez deux élevages de truite du nord du Portugal. En général, les mêmes groupes bactériens étaient présents dans les organes internes des poissons et dans les prélèvements environmentaux d'eau et de sédiment, bien qu'en différentes quantités rélatives.

Une partie importante de ce travail a été la recherche de bactéries et de virus responsables par maladies des poissons de notification obligatoire, ce qui nous a permi de détecter les bactéries *Aeromonas salmonicida* et *Yersinia ruckeri* (sérotypes O1 et O3) et le virus de la Nécrose Pancréatique Infeccieuse (IPNV).

La bactérie *Y. ruckeri* et le IPNV ont été isolés par la première fois au Portugal. Les deux souches d'IPNV sont, d'ailleurs, les premiers isolats d'un virus chez des établissements d'aquaculture portugais.

La détection de souches d'*Y. ruckeri* appartenant au sérotype O3 a une signification particulière, parce que c'est la première fois que ce sérotype est isolé hors de l'Amérique du Nord. D'une aussi grande signification est la détection de quatre souches du sérotype O1 immobiles et tween 80 négatives, auparavant isolées uniquement en Grande Bretagne, Norvège et Allemagne.

Gravura da capa:
Estação Experimental de Aquacultura flutuante na Albufeira da Caniçada, pertencente ao Instituto de Zoologia "Dr. Augusto Nobre" da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.