



Departamento de Biologia

**Caracterização de isolados de
Photobacterium damsela subsp. *piscicida***

**Dissertação do Mestrado em Biologia e Gestão da
Qualidade da Água**

Andreia Filipa Oliveira da Silva

Porto 2012

AGRADECIMENTOS

O apoio e ajuda recebida ao longo da realização deste trabalho foram essenciais para a sua concretização.

Gostaria de agradecer em particular ao Professor Doutor José Américo Sousa pela disponibilidade, apoio e empenho na execução deste trabalho.

Ao Miguel, à Joana e a todos os funcionários do departamento de Biologia por toda a ajuda e paciência que demonstraram comigo.

Por fim, também quero agradecer à minha mãe e a todos os meus amigos por toda a força e carinho.

A todos, o meu sincero Obrigada.

Neste estudo procedeu-se à identificação por PCR de isolados de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* originários de uma piscicultura de Portugal continental. Onze isolados foram identificados através de uma PCR identificativa como *P. damsela* subsp. *piscicida*, originando, cada um deles, um produto de amplificação de 267bp. As onze estirpes estudadas, originárias de robalos (*Dicentrarchus labrax*), foram isoladas em Agosto de 2008.

As estirpes de *P. damsela* subsp. *piscicida* foram caracterizadas morfológica e bioquimicamente por métodos tradicionais, observando-se uma grande homogeneidade entre as estirpes testadas. Adicionalmente também foram caracterizadas pelo sistema miniaturizado API20E, para o qual se obteve o perfil numérico típico para *P. damsela* subsp. *piscicida* (2005004).

Através do método do disco-difusão foi estudada a suscetibilidade de *P. damsela* subsp. *piscicida* contra seis agentes quimioterapêuticos: ampicilina, penicilina G, oxitetraciclina, cloranfenicol, gentamicina e estreptomicina. Observou-se resistência aos agentes antimicrobianos ampicilina e estreptomicina.

ABSTRACT

In this study, the identity of isolates presumptively identified as *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* was confirmed by PCR. The eleven strains studied, originating from sea bass (*Dicentrarchus labrax*), were isolated in August 2008 from a fish farm in Portugal. All the sea bass isolates evaluated produced a unique and clear amplification product of 267bp.

Strains of *P. damsela* subsp. *piscicida* were characterized morphologically and biochemically by traditional methods. It was observed a great homogeneity among the strains tested. Strains were also characterized by miniaturized system API20E, which exhibited the typical index profile for *P. damsela* subsp. *piscicida* (2005004).

By the method of the disk diffusion, the susceptibility of *P. damsela* subsp. *piscicida* was studied against six chemotherapeutic agents (ampicillin, penicillin G, oxytetracycline, chloramphenicol, gentamycin and streptomycin). It was observed resistance to ampicillin and streptomycin.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	5
1.1 Características da fotobacteriose.....	7
1.2 Espécies hospedeiras e distribuição geográfica.....	8
1.3 Posição Taxonómica	9
1.4 Características morfológicas e bioquímicas do agente etiológico da fotobacteriose.....	10
1.5 PCR (<i>Polymerase chain reaction</i>)	12
1.6 Tratamento e prevenção da fotobacteriose	14
2. OBJETIVOS	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
2.1 PCR Identificativa	20
2.2 Caracterização morfológica e bioquímica	22
2.3 Sensibilidade de <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> a diversos agentes antimicrobianos.....	24
4. RESULTADOS	25
5. DISCUSSÃO	29
6. CONCLUSÃO	35
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

1. INTRODUÇÃO

A aquacultura assume uma importância cada vez maior como fonte de pescado para consumo humano devido, essencialmente, ao crescimento da população humana e à sobre-exploração dos recursos aquáticos. Em termos mundiais, a produção de organismos aquáticos a partir da aquacultura tem vindo a aumentar, contribuindo com cerca de metade dos produtos do mar (Soto, 2008). Portugal apresenta-se como um forte consumidor dos produtos do mar, sendo o maior consumidor de peixe na Europa (Afonso, 2008). Os principais peixes produzidos a nível Europeu incluem o salmão do Atlântico (*Salmo salar*), a truta (*Oncorhynchus* spp), o rodovalho (*Scophthalmus maximus*), o robalo (*Dicentrarchus labrax*), a dourada (*Sparus aurata*), a enguia europeia (*Anguilla anguilla*) e a carpa (*Cyprinus* spp.) (Afonso, 2008), sendo a produção na indústria da aquacultura limitada pelo aparecimento e desenvolvimento de doenças (Toranzo *et al.*, 2005).

Photobacterium damsela subsp. *piscicida* (anteriormente designada *Pasteurella piscicida*) é o agente causal da fotobacteriose. O estudo deste microrganismo é importante, uma vez que, a doença constitui uma das principais ameaças à aquacultura marinha devido à ampla distribuição geográfica do patogénico, ao largo espectro de espécies suscetíveis, à falta de vacinas eficazes, mortalidade elevada e alargada resistência a antibióticos (Do Vale *et al.*, 2005). A doença é também designada por pseudotuberculose devido ao aparecimento, nos casos crónicos, de pequenas protuberâncias esbranquiçadas nos órgãos internos, especialmente no baço e fígado (Austin & Austin, 2007; Magariños *et al.*, 1996; Romalde, 2002; Toranzo *et al.*, 2005).

O agente etiológico da fotobacteriose foi descrito pela primeira vez após um surto epizootico em 1963 nas populações selvagens de robalo-do-norte (*Morone americanus*) e robalo-muge (*Morone saxatilis*) em Chesapeake Bay (EUA) (Snieszko *et al.*, 1964). Desde 1969, é responsável por perdas económicas no Japão (Toranzo *et al.*, 2005). A doença é igualmente importante na Europa, onde a partir de 1990 registaram-se diversos surtos de fotobacteriose em diferentes países incluindo Espanha (Toranzo *et al.*, 1991), França (Baudin Laurencin *et al.*, 1991), Itália (Ceschia *et al.*, 1991), Grécia (Bakopoulos *et al.*, 1995) e Portugal (Baptista *et al.*, 1996).

1.1 Características da fotobacteriose

A fotobacteriose encontra-se associada a temperaturas de água elevadas (pelo menos 23°C) e baixas salinidades, sendo esta doença mais frequente durante os meses de verão (Romalde *et al.*, 1999).

Os sinais externos da fotobacteriose são geralmente impercetíveis não ocorrendo lesões óbvias à superfície do corpo (Magariños *et al.*, 1996; Nagano *et al.*, 2009; Romalde *et al.*, 1999). Contudo, alguns dos peixes infetados exibem cor escura, distensão abdominal, focos hemorrágicos nas brânquias, cabeça e barbatanas, e por vezes anemia (Liu *et al.*, 2003; Magariños *et al.*, 1996; Nagano *et al.*, 2009; Romalde *et al.*, 1999). A nível interno, a doença caracteriza-se por variações patológicas quer na forma aguda quer na forma crónica. Nos casos crónicos, a presença de estruturas esbranquiçadas, semelhantes a tubérculos, nos órgãos internos, com 0,5-3,5 mm de diâmetro, é

típica das infeções naturais, (Liu *et al.*, 2003; Magariños *et al.*, 1996; Nagano *et al.*, 2009), embora este tipo de lesão não seja universal (Magariños *et al.*, 1996). A ocorrência destas estruturas depende da dose bacteriana e da fase de crescimento (Nagano *et al.*, 2009). As lesões crónicas também caracterizam-se pela presença de macrófagos nos órgãos internos, muitos dos quais necróticos, com células bacterianas intactas o que poderá indicar que o patogénico não é degradado pelos mesmos. A função respiratória pode ser afetada devido ao aparecimento de macrófagos contendo *P. damsela* subsp. *piscicida* nas guelras (Magariños *et al.*, 1996; Romalde *et al.*, 1999). Na forma aguda, observa-se necrose multifocal no fígado, baço e rim, e aglomerados bacterianos, livres e no interior dos fagócitos, nos capilares e nos espaços intersticiais (Liu *et al.*, 2003; Magariños *et al.*, 1996; Romalde *et al.*, 1999).

1.2 Espécies hospedeiras e distribuição geográfica

A fotobacteriose encontra-se amplamente distribuída localizando-se na Ásia, América e Europa (Romalde *et al.*, 1999).

Nos Estados Unidos da América apenas as espécies de peixes do género *Morone* (*M. americanus*, *M. saxatilis* e *M. americanus* x *M. saxatilis*) têm revelado suscetibilidade à doença (Magariños *et al.*, 1996; Snieszko *et al.*, 1964). Embora *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* tenha sido inicialmente isolado a partir das populações naturais de *M. saxatilis* e *M. americanus*, este microrganismo tem sido encontrado em espécies economicamente importantes como *Seriola quinqueradiata*, *Plecoglossus altivelis*, *Spondylisoma cantharus*, *Epinephelus akaara*, *Pagrus major*,

Pseudocaranx dentex, *Sparus aurata* (dourada), *Dicentrarchus labrax* (robalo), *Solea solea* e *Solea senegalensis* (linguado) (Magariños *et al.*, 1996; Toranzo *et al.*, 2005).

1.3 Posição Taxonómica

Apesar de a fotobacteriose ser reconhecida como uma doença de peixes há bastante tempo a posição taxonómica do agente etiológico apenas foi esclarecida recentemente (Austin & Austin, 2007; Magariños *et al.*, 1996; Romalde, 2002). Devido à sua coloração bipolar marcada e fisiologia foi colocada por Snieszko e colaboradores (1964) no género *Pasteurella*. As espécies de *Pasteurella* descritas pela primeira vez por estes autores (Snieszko *et al.*, 1964) foram caracterizadas com maior profundidade revelando um organismo bastante homogéneo e distinto das outras espécies de *Pasteurella*. Assim, com base nos critérios morfológicos e fisiológicos Janssen & Surgalla (1968) concluíram que o género *Pasteurella* era o mais adequado, embora, algumas características não correspondessem à descrição do mesmo (Gauthier *et al.*, 1995). Os isolados estudados foram identificados como *P. piscicida* (Janssen & Surgalla, 1968).

Por outro lado, os estudos conduzidos por De Ley *et al.* (1990) sugeriram que *Pasteurella piscicida* deveria pertencer à família *Vibrionaceae*. Estes resultados foram confirmados por outros estudos incluindo o conduzido por Gauthier e colaboradores (1995). Baseados na análise filogenética de sequências da subunidade menor do rRNA, na hibridação DNA-DNA e

caracterização bioquímica os autores renomearam a bactéria *Pasteurella piscicida* como *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Posteriormente o nome foi corrigido para *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* (Truper & DeClari, 1997). Thyssen e colaboradores (1998) reportaram que não existiam evidências morfológicas e/ou bioquímicas para incluir *P. damselae* subsp. *piscicida* como subespécie de *P. damselae*, uma vez que as duas subespécies diferiam quanto à mobilidade, redução do nitrato, crescimento a 37° e 42°C, crescimento em meios TCBS e MacConkey, produção de urease e amilase, e capacidade de fermentar celobiose, maltose, trealose e amido. Posteriormente, Thyssen e colaboradores (2000) após um estudo de hibridização DNA-DNA observaram que o nível de similaridade entre *P. damselae* subsp. *piscicida* e *P. damselae* subsp. *damselae* era de 77%, pelo que a classificação dos dois organismos na mesma espécie era justificada. É importante referir que o nome *P. piscicida* nunca foi incluído nas Listas Aprovadas de Nomes Bacterianos (*Approved Lists of Bacterial Names*) (Skerman *et al.*, 1980) pelo que lhe falta validade taxonómica (Austin & Austin, 2007).

1.4 Características morfológicas e bioquímicas do agente etiológico da fotobacteriose

As estirpes de *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* caracterizam-se por uma grande homogeneidade fenotípica e bioquímica. O agente etiológico da fotobacteriose exibe reação negativa à coloração de Gram, imobilidade e frequentemente pleomorfismo variando entre a forma de coco e

de bastonete dependendo da idade da cultura (Romalde *et al.*, 1999). Comumente apresenta colónias com 0,5x1,5µm de tamanho e coloração bipolar marcada (Austin & Austin, 2007). As estirpes são oxidase e catalase positivas mas negativas para a produção de indol, sulfureto de hidrogénio, urease, caseinase, gelatinase, amilase, β-galactosidase e redução de nitratos (Austin & Austin, 2007; Magariños *et al.*, 1992; Romalde, 2002). Apresentam reações positivas para a arginina desidrolase, Tween 80, Voges-Proskauer e prova do vermelho de metilo. O citrato de sódio não é utilizado (Austin & Austin, 2007). Apresentam sensibilidade ao agente vibriostático O/129 (Magariños *et al.*, 1992; Magariños *et al.*, 1996; Romalde, 2002). Exibem atividade de lípase e fosfolípase (Austin & Austin, 2007; Magariños *et al.*, 1992; Romalde, 2002). Relativamente à utilização dos hidratos dos carbonos, este microrganismo apenas produz ácido a partir da glicose, galactose, manose e fructose, embora tenham sido referidos resultados variáveis para a sacarose e maltose (Magariños *et al.*, 1996; Romalde, 2002). A temperatura ótima de crescimento varia entre 22,5°C e 30°C, porém *P. damsela* subsp. *piscicida* consegue crescer entre os 15°C e os 32,5°C (Romalde, 2002). O crescimento ocorre com pH entre 5,5 e 8 (Austin & Austin, 2007). *P. damsela* subsp. *piscicida* é uma bactéria halofílica obrigatória que pode ser isolada utilizando meios como TSA (*Tryptic Soy Agar*), agar sangue ou BHIA (*Brain-Heart Infusion Agar*) suplementados com 1-2% de NaCl. O isolamento também pode ser em agar marinho 2216E (Magariños *et al.*, 1992; Romalde, 2002). O período de incubação a 22°C é 2 a 4 dias (Romalde, 1999; Romalde, 2002). Os isolados podem ser caracterizados bioquimicamente, serologicamente e molecularmente. Relativamente à identificação bioquímica existem testes

miniaturados como API 20E, que apesar de não incluírem na sua base de dados este microrganismo permitem a sua identificação presumível. O perfil obtido com este sistema é frequentemente o 2005004 (Magarinos *et al.*, 1992; Romalde *et al.*, 1999). A homogeneidade fenotípica de *P. damsela* subsp. *piscicida* permite distingui-la da outra subespécie – *P. damsela* subsp. *damsela* – através de características bioquímicas e fisiológicas importantes como a motilidade, a redução do nitrato, a formação de gás a partir da glicose e a produção de hemolisina, urease e amilase (Magariños *et al.*, 1996; Romalde, 2002).

1.5 PCR (*Polymerase chain reaction*)

A biologia molecular tornou-se uma ferramenta de rotina no diagnóstico, controlo e epidemiologia de doenças bacterianas (Altinok & Kurt, 2003). Além disso, permitiu grandes avanços na identificação, evolução e filogenia dos microrganismos. Tradicionalmente o diagnóstico da fotobacteriose faz-se por métodos microbiológicos padrão que se baseiam no cultivo e isolamento dos microrganismos (Amagliani *et al.*, 2009). O protocolo completo envolve confirmação bioquímica e serológica, tornando o diagnóstico um processo laborioso (Amagliani *et al.*, 2009). Os testes bioquímicos realizados conduzem, por vezes, a interpretações erradas dos resultados devido à variabilidade metabólica das estirpes (Amagliani *et al.*, 2009). O crescimento lento (Romalde, 1999) e o estado viável mas não cultivável de *P. damsela* subsp. *piscicida* (Magariños *et al.*, 1994) constituem desvantagens adicionais (Amagliani *et al.*, 2009). As técnicas moleculares caracterizam-se pela sua sensibilidade,

especificidade e rapidez, permitindo a detecção de patogénicos a partir de peixes assintomáticos que podem constituir um risco para as populações piscícolas (Altinok & Kurt, 2003). Assim, podem prevenir o desenvolvimento de epizootias e reduzir a utilização de agentes antimicrobianos nas pisciculturas (Altinok & Kurt, 2003).

A reacção em cadeia da polimerase (*PCR - Polymerase chain reaction*) permite a amplificação de uma região específica de DNA utilizando um conjunto de dois *primers* e uma enzima termoestável (Altinok & Kurt, 2003). Uma reacção de PCR necessita essencialmente do DNA que se quer amplificar, de nucleótidos, de uma enzima para a síntese do DNA e de um par de *primers*. O desenho dos *primers* é crucial uma vez que estes devem ser suficientemente longos para permitir uma temperatura de *annealing* elevada e evitar emparelhamentos não específicos (Altinok & Kurt, 2003). Contudo, *primers* demasiado longos podem facilitar emparelhamentos não específicos mesmo com regiões de DNA que não sejam perfeitamente complementares (Altinok & Kurt, 2003). Em cada ciclo de PCR ocorre a desnaturação do DNA, emparelhamento dos *primers* e síntese de DNA pela polimerase. O produto amplificado pode ser visualizado num gel de agarose.

Numa reacção de PCR multiplex mais do que uma região é amplificada através da inclusão de mais do que um par de *primers* na reacção (Altinok & Kurt, 2003). Esta alternativa à PCR convencional permite detetar vários patogénicos ao mesmo tempo o que se reflete numa poupança de tempo e esforço dentro do laboratório (Altinok & Kurt, 2003). Na área das doenças infecciosas, a técnica tem-se demonstrado bastante útil na identificação de vírus, bactérias, fungos e parasitas (Altinok & Kurt, 2003). A utilização de dois

pares de *primers* direcionados ao rRNA 16S e aos genes *ureC* permite diferenciar as estirpes de *P. damsela* subsp. *damsela* das de *P. damsela* subsp. *piscicida*. Independentemente da origem geográfica e da fonte de isolamento, as estirpes de *P. damsela* subsp. *damsela* apresentam duas bandas com um peso molecular de 267 e 448 bp correspondentes ao rRNA 16S e ao gene *ureC*, respectivamente. As estirpes de *P. damsela* subsp. *piscicida* apenas apresentam um fragmento de 267 bp (Osorio *et al.*, 2000).

1.6 Tratamento e prevenção da fotobacteriose

O estabelecimento e o desenvolvimento de bacterioses é um processo que resulta da interação entre o agente patogénico, o hospedeiro e o meio ambiente. Assim, o desenvolvimento de estudos multidisciplinares envolvendo as características do agente etiológico, aspectos biológicos dos hospedeiros e condições ambientais são importantes na prevenção e controlo das doenças piscícolas (Toranzo *et al.*, 2005; Toranzo *et al.*, 2009).

Os agentes antimicrobianos têm sido largamente utilizados no tratamento das doenças piscícolas, podendo conduzir ao aparecimento de estirpes resistentes a tais compostos (Altinok & Kurt, 2003). Bakopoulos e colaboradores (1995) observaram que os isolados Europeus (Gregos, Italianos e Franceses) apresentavam entre si um padrão de resistência antimicrobiana semelhante, sendo reportada a resistência à eritromicina, canamicina e estreptomicina. Os isolados Japoneses revelaram resistência a um maior número de agentes antimicrobianos incluindo a eritromicina, canamicina,

estreptomicina, ácido oxolínico, trimetoprim-sulfametoxazol, cefaloridina e cloranfenicol (Bakopoulos *et al.*, 1995). Um estudo conduzido por Thyssen & Ollevier (2001) revelou que das 145 estirpes testadas 99% eram sensíveis ao florfenicol e ao trimetoprim-sulfametoxazol. Noventa e três por cento das estirpes eram resistentes à eritromicina. Adicionalmente, com base na suscetibilidade aos antibióticos os autores conseguiram distinguir os isolados entre si. Os isolados Americanos e Europeus apresentaram sensibilidade à canamicina enquanto 49% dos isolados Japoneses eram resistentes (Thyssen & Ollevier, 2001). Além da aquisição de resistência aos antibióticos, a ineficácia da antibioterapia também pode ser devida a um período de parasitismo intracelular (López-Dóriga *et al.*, 2000; Magariños *et al.*, 1996; Romalde, 2002).

Relativamente à prevenção das bacterioses, a vacinação assume uma importância cada vez maior na aquacultura uma vez que é considerada um método rentável no controlo de bacterioses (Toranzo *et al.*, 2009). Adicionalmente permite a redução do uso de antibióticos (Somerset *et al.*, 2005). Embora diversas vacinas tenham sido disponibilizadas contra *P. damselae* subsp. *piscicida* a sua eficácia depende da formulação, via, e estratégia de administração da vacina, da espécie, do tamanho dos indivíduos e da utilização de imunoestimulantes (Toranzo *et al.*, 2009). Diversas vacinas contra *P. damselae* subsp. *piscicida* têm sido disponibilizadas, embora, apenas uma bacterina enriquecida com produtos extracelulares patenteada pela Universidade de Santiago (Espanha) se tenha revelado eficaz contra a fotobacteriose em larvas de dourada com apenas 50 dias. Uma vez que a maioria dos surtos de fotobacteriose ocorrem entre os estados larvares e os juvenis com 10-30g, recomenda-se uma primeira imunização no estado larvar e

um reforço quando os indivíduos atingem aproximadamente 2g (Toranzo *et al.*, 2009; Magariños *et al.*, 1999).

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

1. Determinar se os 52 isolados presumivelmente identificados como *P. damsela* subsp. *piscicida* pertenciam à subespécie em estudo.
2. Caracterizar morfológica e bioquimicamente por métodos tradicionais os isolados de *P. damsela* subsp. *piscicida* confirmados por PCR.
3. Caracterizar as estirpes de *P. damsela* subsp. *piscicida* pelo sistema miniaturado API20E.
4. Estudar a sensibilidade/resistência a alguns agentes antimicrobianos utilizados no tratamento da fotobacteriose.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os 52 isolados usados neste estudo foram inoculados em TSA suplementado com 2% de NaCl (TSA-2) para crescer durante 48h a 24-26°C.

Inicialmente procederam-se aos testes de Gram, oxidase, catalase, mobilidade e determinação da forma dos microrganismos.

Dos 52 isolados utilizados neste trabalho, sete eram Gram-positivos pelo que não foram analisados. Cinco não cresceram em meio sólido, pelo que, após 48-96h em meio líquido foram pipetados 10µL de cultura bacteriana para meio sólido TSA-2. Determinou-se se ocorreu crescimento 48h após incubação a 24-26°C. Para estes últimos isolados não se observou crescimento nem em meio sólido nem em meio líquido. Vinte e três eram móveis e apresentavam um crescimento atípico para *P. damselae* subsp. *piscicida*. Os restantes dezassete isolados foram submetidos a uma PCR Identificativa. Destes, onze foram identificados como *P. damselae* subsp. *piscicida* e caracterizados.

2.1 PCR Identificativa

Os dezassete isolados presumivelmente identificados como *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* foram submetidos a uma PCR identificativa. Para a extração do DNA bacteriano suspendeu-se uma colónia do isolado a analisar em 200 µL de água ultrapura estéril. As suspensões bacterianas foram colocadas em água a ferver durante 5min, ao fim dos quais colocaram-se em gelo durante mais 5min. De seguida, foram centrifugadas a 13,200 g durante 1min, tendo-se utilizado 5 µL do sobrenadante como DNA molde para a PCR.

A mistura para a reação de PCR (25 µL) incluiu 5 µL de mastermix (5x FIREPol Master Mix), 0,5 µL de cada primer, 13 µL de água ultrapura estéril e 5µL de DNA molde. A amplificação foi efetuada num termociclador Px2 (ThermoHybaid).

O primer forward Car1 (5'-GCTTGAAGAGATTCGAGT-3') e o primer reverse Car2 (5'CACCTCGCGGTCTTGCTG-3) (Osorio *et al.*, 1999) foram utilizados em conjunto com os primers Ure-5' (5'-TCCGGAATAGGTAAAGC-GGG-3') e Ure-3' (5'CTTGAATATCCATCTCATCTGC3') numa reação de PCR multiplex (Osorio *et al.*, 2000). A reação de PCR iniciou-se com uma desnaturação de 4 minutos a 95°C, seguida de 30 ciclos de desnaturação de 1 minuto a 95°C, emparelhamento de 1 minuto a 60°C e extensão de 40 segundos a 72°C. A extensão final consistiu em 5 minutos a 72°C (Osorio *et al.*, 2000).

Após a adição do corante SYBR safe os produtos amplificados foram separados em gel de agarose a 1% (p/v) com tampão TAE 1x e visualizados no transiluminador UV. A eletroforese horizontal decorreu durante 60 minutos a uma voltagem de 90 V.

Utilizou-se uma escada de 100 bp (Promega) como marcador do peso molecular dos amplificados e um controle negativo (ausência de DNA na reação de PCR) para assegurar a ausência de contaminação na reação de PCR.

2.2 Caracterização morfológica e bioquímica

Os isolados confirmados através da PCR Identificativa como *P. damselae* subsp. *piscicida*, originários de robalos (*Dicentrarchus labrax*), foram isolados em Agosto de 2008 de uma piscicultura portuguesa. O stock bacteriano foi mantido a -80°C em *Tryptic Soy Broth* (TSA) complementado com 15% de glicerol.

As estirpes de *P. damselae* subsp. *piscicida* foram caracterizadas morfológica e bioquimicamente por métodos tradicionais (Cowan & Steel, 1993; Mac Faddin, 1993; Buller, 2004) após incubação a 24-26°C durante aproximadamente 48h. Os testes de Gram, oxidase, catalase e determinação da forma e mobilidade foram realizados após as 48h de incubação; o teste da redução dos nitratos foi registado depois de um período de incubação de 5 dias; a determinação da produção de β -galactosidase após 2 dias; os resultados dos restantes testes foram anotados a seguir a um período máximo de 8 dias.

Os testes realizados foram:

- Forma e mobilidade através de preparações extemporâneas observadas ao microscópio ótico com uma ampliação total de 400x;
- Reação de Gram com uma solução de hidróxido de potássio a 3%;
- Oxidade, com uma solução de tetrametil-p-fenilenediamina;
- Catalase, com uma solução de peróxido de hidrogénio a 3%;

- Oxidação/Fermentação (O/F), usando o meio ZOF (utilizou-se para um litro de meio 37,4g de Marine Broth (Pronadisa), 10mL de vermelho de fenol, 0,5g de trizma base e 3g de agar), suplementado com glicose a uma concentração final de 1%;
- Descarboxilação dos aminoácidos utilizando o meio Moeller (Difco) suplementado com L-arginina, L-lisina ou L-ornitina a uma concentração final de 1%;
- Produção de ácido a partir de açúcares utilizando o meio ZOF suplementado com os açúcares: arabinose, amigdalina, fructose, galactose, lactose, inositol, manose, manitol, melibiose, ramnose, sacarose e sorbitol a uma concentração final de 1%;
- Prova do Vermelho de Metilo (MR) e de Voges-Proskauer (VP) utilizando o meio MR-VP;
- Prova do citrato utilizando o meio Citrato de Simmons (BBL);
- Produção de sulfureto de hidrogénio (H₂S) e indol usando o meio SIM (MERCK);
- Redução do nitrato utilizando o meio Nitrate Broth (Difco);
- Hidrólise da gelatina usando um meio com peptona, extrato de levedura, gelatina, agar e NaCl;
- Teste da β-galactosidase (ONPG), utilizando o meio ONPG (solução ONPG em Na₂HPO₄ adicionada a água peptonada)
- Determinação do crescimento à temperatura de 4°C, 22°C, 30°C, e 37°C em meio TSA suplementado com 2% de NaCl;

- Determinação do crescimento em 0%, 1%, 2% e 3% de NaCl usando o meio de gelatina suplementado com as diferentes concentrações de sal; produção de gelatinase.

Alguns isolados também foram caracterizados utilizando o sistema miniaturado API20E (bioMérieux).

2.3 Sensibilidade de *P. damsela* subsp. *piscicida* a diversos agentes antimicrobianos

As estirpes de *P. damsela* subsp. *piscicida* foram suspensas em PBS (*Phosphate Buffered Saline*) após o crescimento em TSA-2 durante 48h. O estudo da sensibilidade/resistência a agentes antimicrobianos foi feito através do método do disco-difusão. O inóculo, ajustado para a escala nº 0,5 de McFarland, foi espalhado em meio Mueller-Hinton com o auxílio de uma zaragatoa.

Os discos antimicrobianos utilizados compreenderam a penicilina G (P;10µg), a oxitetraciclina (OT;30µg), ampicilina (AMP;10µg), cloranfenicol (C;30µg), estreptomicina (S;10µg), e gentamicina (GM;10µg). Após 48h de incubação a 26°C os halos de inibição bacteriana foram medidos e comparados com tabelas padrão.

4. RESULTADOS

Do total de 52 isolados usados neste estudo, 7 eram Gram-positivos pelo que não foram analisados; 5 não cresceram nem em meio líquido nem em meio sólido; 23 apresentaram mobilidade e um crescimento bastante rápido que cobria toda a placa de Petri ao fim de 24h de incubação. Portanto, dos 52 isolados presumivelmente identificados como *P. damselae* subsp. *piscicida* apenas 17 foram submetidos a uma reação de PCR multiplex.

Utilizando o procedimento anteriormente descrito por Osorio e colaboradores (2000) 17 isolados presumivelmente identificados como *P. damselae* subsp. *piscicida* foram submetidos a uma PCR identificativa e 11 foram identificados como *P. damselae* subsp. *piscicida*. Todos os 11 isolados originaram um produto de amplificação de 267 bp (Figura 1).

Os resultados morfológicos e bioquímicos observados nos 11 isolados de *P. damselae* subsp. *piscicida* encontram-se descritos na tabela 1.

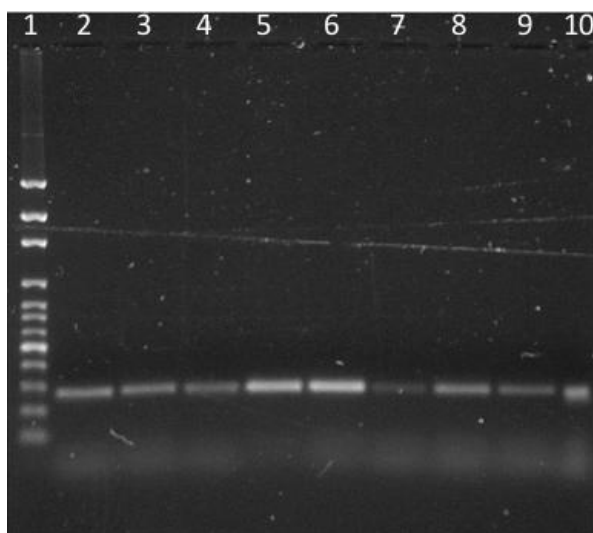


Figura 1 - PCR identificativa dos isolados de *P. damselae* subsp. *piscicida* utilizados neste estudo. 1, escada de peso molecular de 100 bp; 2 a 10, fragmentos amplificados de 267 bp.

Tabela 1 - Características morfológicas e bioquímicas dos isolados de *P. damsela* subsp. *piscicida* utilizados neste estudo.

Teste	Resultado ^a (n=11)
Gram	-
Mobilidade	-
Oxidase	+
Catalase	+
O/F	F
Hidrólise da arginina (ADH)	+
Descarboxilação da lisina (LDC)	-
Descarboxilação da ornitina (ODC)	-
Citrato	-
MR- Vermelho de metilo	+
VP - Vogues Proskauer	+
H ₂ S	-
Indol	-
Nitratos	-
Crescimento a:	
0% NaCl	-
1% NaCl	+
2% NaCl	+
3% NaCl	+(3)
Produção de ácido a partir de:	
Glicose	+
Galactose	+
Manose	+
Fructose	+
Melibiose	-
Arabinose	-
Inositol	-
Lactose	-
Manitol	-
Ramnose	-
Sacarose	-
Sorbitol	-
Amigdalina	-
Gelatinase	-
ONPG	-
Crescimento a	
4 °C	-
22 °C	+
30 °C	+
37 °C	-

^a +, reação positiva; - reação negativa; F, fermentativo; () nº de estirpes com um resultado diferente do assinalado.

Com o sistema miniaturado API20E, obteve-se o perfil numérico típico para *P. damsela* subsp. *piscicida* – 2005004 (tabela 2).

Quanto ao padrão de suscetibilidade/resistência a agentes antimicrobianos observou-se que os isolados utilizados neste estudo eram sensíveis à gentamicina, penicilina G, cloranfenicol e oxitetraciclina. Contudo, observou-se que eram resistentes à ampicilina e estreptomicina (tabela 3).

Tabela 2 – Características fenotípicas dos isolados de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* obtidas com o kit miniaturado API20E.

O	A	L	O	C	H	U	T	I	V	G	G	M	I	S	R	S	M	A	A	O
N	D	D	D	I	2	R	D	N	P	E	L	A	N	O	H	A	E	M	R	X
P	H	C	C	T	S	E	A	D		L	U	N	O	R	A	C	L	Y	A	
G																				
-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
2		0			0			5		0			0		4					

Tabela 3 – Sensibilidade/resistência de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* aos agentes antimicrobianos testados.

Agentes antimicrobianos	Interpretação ^a
Gentamicina (GM; 10µg)	S
Oxitetraciclina (OT; 30 µg)	S
Penicilina G (P; 10 µg)	S
Cloranfenicol (C; 30 µg)	S
Ampicilina (AMP; 10 µg)	R
Estreptomicina (S; 10 µg)	R

^a S indica sensibilidade aos agentes antimicrobianos e R resistência.

5. DISCUSSÃO

Os onze isolados de *P. damsela* subsp. *piscicida* utilizados neste trabalho apresentaram uma grande homogeneidade nos testes morfológicos e bioquímicos executados, o que vai de encontro ao anteriormente reportado por outros autores (Austin & Austin, 2007; Magariños *et al.*, 1996; Magariños *et al.*, 1992).

Não foi observado qualquer crescimento na ausência de NaCl, o que vai de encontro à descrição do microrganismo como halofílico obrigatório (Austin & Austin, 2007; Magariños *et al.*, 1996; Magariños *et al.*, 1992; Gauthier *et al.*, 1995). Por outro lado, não se observou o crescimento a 3% de NaCl para alguns isolados, contrariando as características descritas para *P. damsela* subsp. *piscicida* (0,5 a 3% NaCl) (Austin & Austin, 2007; Magariños *et al.*, 1996; Magariños *et al.*, 1992; Snieszko *et al.*, 1964).

As estirpes analisadas neste trabalho não cresceram a 4 e 37°C. Esta observação enquadra-se nas características descritas na bibliografia que reportam que *P. damsela* subsp. *piscicida* consegue crescer a temperaturas entre os 15 e os 32,5°C (Romalde, 2002). Contudo, alguns autores já reportaram crescimento a 35°C (Gauthier *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2011).

Todos os isolados estudados eram anaeróbios facultativos. Adicionalmente os isolados deste estudo apresentaram as características previamente descritas para esta subespécie: reação de Gram, mobilidade, descarboxilação da lisina e ornitina negativas; ausência de produção de H₂S, gelatinase e indol; resposta negativa para a utilização do citrato, ONPG e redução do nitrato. As estirpes exibiram testes vermelho de metilo e Vogues-Proskauer positivos. Todas as estirpes produziram ácido a partir da glicose,

galactose, fructose e manose. Resultados variáveis já foram reportados por outros autores relativamente aos testes vermelho de metilo, Vogues-Poskauer, e produção de ácido a partir da sacarose e maltose (Robohm, 1983). A aplicação de diferentes meios basais pode contribuir para essa variabilidade (Koike *et al.*, 1975), bem como a manutenção das estirpes em laboratório, o que pode resultar na perda ou alteração de algumas características (Bryant *et al.*, 1986).

Apesar de *P. damsela* subsp. *piscicida* ser descrito como um microrganismo bastante homogêneo em termos fenotípicos, neste estudo, além do número de isolados não ser elevado, provêm todos da mesma piscicultura, da mesma espécie de hospedeiro (robalo) e foram isolados na mesma altura do ano, o que pode explicar, em certa medida, a ausência de variabilidade observada.

Inicialmente desenvolvido para a identificação de patógenos entéricos Gram-negativos em laboratórios clínicos, o sistema API20E tem sido frequentemente utilizado para a identificação de microrganismos patogênicos de peixes (Austin & Austin, 2007; Grisez *et al.*, 1991). Deste modo, estes testes miniaturados devem ser acompanhados por testes bioquímicos tradicionais devido ao aparecimento de falsos positivos/negativos e adaptados para bactérias marinhas (Austin & Austin, 2007). Grisez e colaboradores (1991) sugerem para a identificação de isolados marinhos um aumento do tempo de incubação para 48-72h e um decréscimo da temperatura para 26°C. Thyssen e colaboradores (1998) também utilizaram 26°C e 72h como temperatura e tempo de incubação, respetivamente. Neste estudo, a temperatura e o tempo

de incubação utilizados foram os sugeridos por Thyssen e colaboradores (1998). Contudo, neste trabalho, após observações diárias (às 24, 48 e 72h), não se observaram diferenças nos resultados dos sistemas miniaturados, não se justificando as 72h propostas pelos autores. Os isolados de *P. damsela* subsp. *piscicida*, usados neste trabalho, e submetidos ao sistema miniaturado API20E originaram o perfil numérico 2005004. Embora *P. damsela* subsp. *piscicida* geralmente exiba o código 2005004, algumas estirpes podem apresentar reações atípicas como a utilização do citrato e testes negativos para a arginina e Vogues-Proskauer (Thyssen *et al.*, 1998). A produção de ácido a partir dos hidratos de carbono pode apresentar alguma inconsistência como reportado por Bakopoulos e colaboradores (1995). Adicionalmente, os autores também reportaram um resultado negativo no teste Vogues-Proskauer para todos os isolados testados. Os autores recomendam que o sistema API20E seja acompanhado pelos testes bioquímicos clássicos uma vez que as reações observadas podem ser anómalas para *P. damsela* subsp. *piscicida* (Bakopoulos *et al.*, 1995; Thyssen *et al.*, 1998). Thyssen e colaboradores (1998) recomendam, por exemplo, a realização de testes de tolerância ao sal e temperatura, bem como, a execução por métodos clássicos, dos testes vermelho de metilo, Vogues-Proskauer, arginina desidrolase, redução do nitrato e produção de gás a partir da glicose.

O estudo de sensibilidade/resistência a diferentes agentes antimicrobianos, revelou que os isolados testados eram sensíveis à gentamicina, penicilina G, cloranfenicol, oxitetraciclina, e resistentes à ampicilina e estreptomicina. Vários estudos testaram estas substâncias em

estirpes de *P. damselae* subsp. *piscicida* (Liu *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2003; Magariños *et al.*, 1992; Thyssen *et al.*, 1998; Thyssen & Ollevier, 2001). Como anteriormente revisto por Magariños e colaboradores (1996) as estirpes de *P. damselae* subsp. *piscicida* são sensíveis a uma grande variedade de compostos incluindo a ampicilina, cloranfenicol, penicilina, ácido oxolínico, tetraciclina, novobiocina, e resistentes à estreptomicina, eritromicina e canamicina. Liu e colaboradores (2003) observaram que a estirpe estudada era resistente à ampicilina, cloranfenicol, oxitetraciclina, penicilina G, tetraciclina, entre outros, mas sensível à estreptomicina. Num outro estudo, Liu e colaboradores (2011) reportaram que *P. damselae* subsp. *piscicida* era resistente à ampicilina mas sensível à gentamicina e oxitetraciclina. Ambos os estudos foram realizados com estirpes isoladas em Taiwan. Um estudo conduzido por Thyssen & Ollevier (2001) conseguiu relacionar a suscetibilidade aos agentes antimicrobianos com a origem geográfica dos isolados; os isolados Europeus e Americanos eram todos sensíveis à canamicina enquanto 49% dos isolados Japoneses eram resistentes. De uma forma geral, os isolados Japoneses são resistentes a uma maior variedade de antibióticos (Thyssen & Ollevier, 2001; Magariños *et al.*, 1996; Magariños *et al.*, 1992). Segundo estes autores este fenómeno deve-se à ampla utilização destes compostos no tratamento da fotobacteriose.

Relativamente ao Mediterrâneo, os compostos antimicrobianos administrados variam conforme a autorização legal de cada país, o que pode refletir-se em diferenças no padrão de sensibilidade/resistência a agentes quimioterapêuticos (Thyssen & Ollevier, 2001). Quando comparados os resultados deste estudo com os de Magariños e colaboradores (1992)

observou-se que os isolados destes autores eram também resistentes à estreptomicina e sensíveis ao cloranfenicol, oxitetraciclina e gentamicina. Contudo, ao contrário deste estudo, eram sensíveis à ampicilina. Em oposição a este trabalho, Thyssen & Ollevier (2001) observaram que o único isolado português testado mostrava resistência à gentamicina e sensibilidade à estreptomicina.

Diversos estudos sugerem que *P. damsela* subsp. *pisicida* consegue sobreviver aos mecanismos de defesa dos hospedeiros e aos agentes antimicrobianos através da internalização das bactérias (Romalde, 2002; López-Dóriga *et al.*, 2000; Magariños *et al.*, 1996). Neste estudo, a maioria dos agentes antimicrobianos usados (oxitetraciclina, estreptomicina, gentamicina e cloranfenicol) interferem com a síntese proteica bacteriana. Os restantes (ampicilina e penicilina G) interferem com a síntese da parede celular (Rigos & Troisi, 2005). O facto de este microrganismo ser descrito como um parasita intracelular facultativo pode explicar, em certa parte, a ineficácia *in vivo* da antibioterapia no tratamento da fotobacteriose (Romalde, 2002).

Os agentes antimicrobianos utilizados no tratamento das bacterioses são geralmente administrados oralmente através do alimento. Este ponto pode tornar difícil a avaliação do efeito destes compostos nos animais, nomeadamente quando alguns indivíduos não ingerem alimento ou consomem uma quantidade insuficiente do mesmo. Outros critérios como a biodisponibilidade dos agentes antimicrobianos, o local de infecção, o estado de saúde do animal e o mecanismo de ação dos compostos (bactericida/bacteriostático) tornam difícil relacionar a sensibilidade bacteriana

aos agentes quimioterapêuticos *in vitro* com a sua eficácia *in vivo* (Rigos & Troisi, 2005).

6. CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos neste trabalho podemos concluir que:

1. Dos 52 isolados presumivelmente identificados como *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, 17 foram submetidos a uma PCR identificativa e 11 confirmados como pertencentes à subespécie em estudo.
2. O conjunto dos 11 isolados identificados como *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* revelou ser um grupo bastante homogêneo em termos fenotípicos e bioquímicos.
3. A aplicação do sistema miniaturado API20E permitiu obter o perfil numérico tipicamente descrito para *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (2005004).
4. Relativamente ao estudo da sensibilidade/resistência a agentes quimioterapêuticos observou-se sensibilidade à gentamicina, penicilina G, cloranfenicol e oxitetraciclina, mas resistência à ampicilina e estreptomicina.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afonso, A. 2008. Review of aquaculture development in Portugal and Europe 2008. Pp. 6-7 in: Pham, C.K., R.M. Higgins, M. De Girolamo & E. Isidro (Eds). Proceedings of the International Workshop: Developing a Sustainable Aquaculture Industry in the Azores. Arquipélago. Life and Marine Sciences. Supplement 7: xiii + 81 pp.
- Altinok, I., & I. Kurt, 2003, Molecular diagnosis of fish diseases: a review. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, v. 3, p. 131-138.
- Amagliani, G., E. Omiccioli, F. Andreoni, R. Boiani, I. Bianconi, R. Zaccone, M. Mancuso, & M. Magnani, 2009, Development of a multiplex PCR assay for *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* identification in fish samples. Journal of Fish Diseases, v. 32, p. 645-653.
- Austin, B., & D. A. Austin, 2007, Bacterial Fish Pathogens: Diseases of Farmed and Wild Fish. Fourth Edition. London, Springer-Praxis:457 pp.
- Bakopoulos, V., A. Adams, & R. Richards, 1995, Some biochemical properties and antibiotic sensitivities of *Pasteurella piscicida* isolated in Greece and comparison with strains from Japan, France and Italy. Journal of Fish Diseases, v. 18, p. 1-7.
- Baptista, T., J. Romalde, & A. E. Toranzo, 1996, First occurrence of pasteurellosis in Portugal affecting cultured gilthead seabream (*Sparus aurata*). Bulletin-European Association of Fish Pathologists, v. 16, p. 92-95.
- Baudin Laurencin, F., J. Pepin, & J. Raymond, 1991, First observation of an epizootic of pasteurellosis in farmed and wild fish of the French Mediterranean coasts. In Abstracts of the 5th International Conference of the European Association of Fish Pathology, p. 17. Budapest: European Association of Fish Pathologists.
- Buller, N. B., 2004, Bacteria from fish and other aquatic animals: a practical identification manual. Wallingford, UK, CABI Publishing: 361 pp.

- Bryant, T. N., Lee, J. V., West, P. A. & Colwell, R. R. ,1986, Numerical classification of species of *Vibrio* and related genera. *Journal of Applied Microbiology*, v. 61, 437-467.
- Candan, A., Kucuker, M. A. & Karatas, S., 1996, Pasteurellosis in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in Turkey. *Bulletin-European Association of Fish Pathologists*, v. 16, 150-153.
- Cowan, S. T. & Steel, K. J., 2003, *Cowan & Steel's manual for identification of medical bacteria*. Cambridge, UK, Cambridge University Press: 333pp.
- Ceschia, G., F. Quaglio, G. Giorgetti, G. Bertoja, & G. Bovo, 1991, Serious outbreak of pasteurellosis (*Pasteurella piscicida*) in euryhaline species along the Italian coasts. In *Abstracts of the 5th International Conference of the European Association of Fish Pathology*, p. 26. Budapest: European Association of Fish Pathologists.
- De Ley, J., W. Mannheim, R. Mutters, K. Piechulla, R. Tytgat, P. Segers, M. Bisgaard, W. Frederiksen, K. H. Hinz, & M. Vanhoucke, 1990, Inter-and intrafamilial similarities of rRNA cistrons of the *Pasteurellaceae*. *International journal of systematic bacteriology*, v. 40, p. 126-137.
- Do Vale, A., M. T. Silva, N. Dos Santos, D. S. Nascimento, P. Reis-Rodrigues, C. Costa-Ramos, A. E. Ellis, & J. E. Azevedo, 2005, AIP56, a novel plasmid-encoded virulence factor of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* with apoptogenic activity against sea bass macrophages and neutrophils. *Molecular microbiology*, v. 58, p. 1025-1038.
- Gauthier, G., B. Lafay, R. Ruimy, V. Breittmayer, J. L. Nicolas, M. Gauthier, & R. Christen, 1995, Small-subunit ribosomal RNA sequences and whole DNA relatedness concur for the reassignment of *Pasteurella piscicida* (Snieszko et al.) Janssen and Surgalla to the genus *Photobacterium* as *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* comb-nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 45, p. 139-144.

- Grisez, L., R. Ceusters, & F. Ollevier, 1991, The use of API-20E for the identification of *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *Journal of Fish Diseases*, v. 14, p. 359-365.
- Hanif, A., V. Bakopoulos, & G. J. Dimitriadis, 2004, Maternal transfer of humoral specific and non-specific immune parameters to sea bream (*Sparus aurata*) larvae. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 17, p. 411-435.
- Hawke, J. P., Plakas, S. M., Minton, R. V., McPhearson, R. M., Snider, T. G. & Guarino, A. M., 1987, Fish pasteurellosis of cultured striped bass (*Morone saxatilis*) in coastal Alabama. *Aquaculture*, v. 65, 193-204.
- Janssen, W., & M. Surgalla, 1968, Morphology, physiology, and serology of a *Pasteurella* species pathogenic for white perch (*Roccus americanus*). *Journal of Bacteriology*, v. 96, p. 1606-1610.
- Kimura, T. & Kitao, T., 1971, On the causative agent of tuberculosis of yellowtail. *Fish Pathology*, v. 6, 8-14.
- Kent, M. L., 1982, Characteristics and identification of *Pasteurella* and *Vibrio* species pathogenic to fishes using API-20E (Analytab Products) multitube test strips. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, v. 39, 1725-1729.
- Koike, Y., Kuwahara, A. & Fujiwara, H., 1975, Characterization of *Pasteurella piscicida* isolated from white perch and cultivated yellowtail. *Japanese Journal of Microbiology*, v. 19, 241-247.
- Liu, P.-C., C.-F. Cheng, C.-H. Chang, S.-L. Lin, W.-S. Wang, S.-W. Hung, M.-H. Chen, C.-C. Lin, C.-Y. Tu, & Y.-H. Lin, 2011, Highly virulent *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* isolated from Taiwan paradise fish, *Macropodus opercularis* (L.), in Taiwan. *African Journal of Microbiology Research*, v. 5, p. 2107-2113.
- Liu, P. C., J. Y. Liu, & K. K. Lee, 2003, Virulence of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in cultured cobia *Rachycentron canadum*. *Journal of Basic Microbiology*, v. 43, p. 499-507.

- López-Dóriga, M., A. C. Barnes, N. dos Santos, & A. E. Ellis, 2000, Invasion of fish epithelial cells by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: evidence for receptor specificity, and effect of capsule and serum. *Microbiology*, v. 146, p. 21-30.
- MacFaddin, J. F., 1993, Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. México, Editorial Medica Panamericana.
- Magariños, B., J. Romalde, I. Bandin, B. Fouz, & A. Toranzo, 1992, Phenotypic, antigenic, and molecular characterization of *Pasteurella piscicida* strains isolated from fish. *Applied and environmental microbiology*, v. 58, p. 3316-3322.
- Magariños, B., J. Romalde, J. Barja, & A. Toranzo, 1994, Evidence of a dormant but infective state of the fish pathogen *Pasteurella piscicida* in seawater and sediment. *Applied and environmental microbiology*, v. 60, p. 180-186.
- Magariños, B., J. L. Romalde, J. L. Barja, S. Nunez, & A. E. Toranzo, 1999, Protection of gilthead seabream against pasteurellosis at the larval stages. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, v. 19, p. 159-161.
- Magariños, B., A. E. Toranzo, & J. L. Romalde, 1996, Phenotypic and pathobiological characteristics of *Pasteurella piscicida*. *Annual review of fish diseases*, v. 6, p. 41-64.
- Nagano, I., S. Inoue, K. Kawai, & S. Oshima, 2009, Repeatable immersion infection with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* reproducing clinical signs and moderate mortality. *Fisheries Science*, v. 75, p. 707-714.
- Osorio, C. R., M. D. Collins, A. E. Toranzo, J. L. Barja, & J. L. Romalde, 1999, 16S rRNA gene sequence analysis of *Photobacterium damsela* and nested PCR method for rapid detection of the causative agent of fish pasteurellosis. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, p. 2942-2946.
- Osorio, C. R., A. E. Toranzo, J. L. Romalde, & J. L. Barja, 2000, Multiplex PCR assay for ureC and 16S rRNA genes clearly discriminates between both subspecies of *Photobacterium damsela*. *Diseases of Aquatic Organisms*, v. 40, p. 177-183.

- Rigos G. & G. M. Troisi, 2005, Antibacterial agents in Mediterranean finfish farming: A synopsis of drug pharmacokinetics in important euryhaline fish species and possible environmental implications. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, v. 15, p. 53–73.
- Robohm, R.A., 1983, *Pasteurella piscicida*. In: Anderson, DP, Dorsonand, M., Dubourget, P. (eds) *Antigens of fish pathogens*. Collection Foundation Marcel Merieux, Lyon, France, pp. 161-175.
- Romalde, J., B. Magariños, & A. Toranzo, 1999, Pasteurellosis= Pasteurellose: Fiches d'identification des maladies et parasites des poissons, crustacés et mollusques= ICES Identification Leaflets for diseases and parasites of fish and shellfish, v. 54, 6pp.
- Romalde, J. L., 2002, *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida*: an integrated view of a bacterial fish pathogen. *International Microbiology*, v. 5, p. 3-9.
- Simidu, U. & Egusa, S., 1972, A re-examination of the fish-pathogenic bacterium that had been reported as a *Pasteurella* species. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*., v. 38, 803-812.
- Skerman, V. B. D., V. McGowan, and P. H. A. Sneath, 1980, Approved lists of bacterial names. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 30, p. 225-420.
- Snieszko, S., G. Bullock, E. Hollis, & J. Boone, 1964, *Pasteurella* sp. from an epizootic of white perch (*Roccus americanus*) in Chesapeake Bay tidewater areas. *Journal of Bacteriology*, v. 88, p. 1814.
- Sommerset, I., B. Krossoy, E. Biering, & P. Frost, 2005, Vaccines for fish in aquaculture. *Expert Review of Vaccines*, v. 4, p. 89-101.
- Soto, D., 2008, Status of world aquaculture and its future development within an ecosystem's perspective. Pp. 3-5 in: Pham, C.K., R.M. Higgins, M. De Girolamo & E. Isidro (Eds). *Proceedings of the International Workshop: Developing a Sustainable Aquaculture Industry in the Azores*. Arquipélago. Life and Marine Sciences. Supplement 7: xiii + 81 pp.

- Thyssen, A., L. Grisez, R. van Houdt, & F. Ollevier, 1998, Phenotypic characterization of the marine pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. International Journal of Systematic Bacteriology, v. 48, p. 1145-1151.
- Thyssen, A., & F. Ollevier, 2001, In vitro antimicrobial susceptibility of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* to 15 different antimicrobial agents. Aquaculture, v. 200, p. 259-269.
- Toranzo, A., J. Romalde, B. Magariños, & J. Barja, 2009, Present and future of aquaculture vaccines against fish bacterial diseases: The use of veterinary drugs and vaccines in Mediterranean aquaculture. Options Mediterraneennes Serie A, v. 86, 155-176.
- Toranzo, A. E., S. Barreiro, J. F. Casal, A. Figueras, B. Magarinos, & J. L. Barja, 1991, Pasteurellosis in cultured gilthead seabream (*Sparus aurata*) - First report in Spain. Aquaculture, v. 99, p. 1-15.
- Toranzo, A. E., B. Magarinos, & J. L. Romalde, 2005, A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. Aquaculture, v. 246, p. 37-61.
- Truper, H. G., & L. DeClari, 1997, Taxonomic note: Necessary correction of specific epithets formed as substantives (nouns) "in apposition". International Journal of Systematic Bacteriology, v. 47, p. 908-909.