

Hematologia e sinais clínicos de *Piaractus mesopotamicus* infectados experimentalmente com *Aeromonas hydrophila*

Fabiana Garcia* e Flávio Ruas Moraes

Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Via Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, 14884-900, Jaboticabal, São Paulo, Brasil. *Autor para correspondência. E-mail: fgarcia@apta.sp.gov.br

RESUMO. Este ensaio teve como objetivo avaliar as respostas hematológicas e a ocorrência de sinais clínico-patológicos de *Piaractus mesopotamicus* infectados experimentalmente por *Aeromonas hydrophila*. Foram utilizados 324 pacus, *P. mesopotamicus*, com peso de $102,84 \pm 27,1$ g, distribuídos em 27 caixas de 300 L de capacidade, sendo 14 peixes por caixa. Os peixes foram mantidos nas caixas durante um mês, recebendo dieta balanceada, período em que se evitou qualquer tipo de manejo estressante. Passado esse período, foram infectados com 6×10^6 UFC de *A. hydrophila*, injetada via intraperitoneal. As coletas e análises de sangue foram realizadas 24h antes da infecção experimental e 24h após a infecção. Os resultados permitem concluir que a infecção por *A. hydrophila* em *P. mesopotamicus* é caracterizada por escurecimento da derme e sinais clínicos-patológicos relacionados à hemorragia, anemia normocítica-hipocrômica, redução nos níveis de proteínas, globulinas plasmáticas e eosinófilos, leucopenia, linfopenia, trombocitopenia, neutrofilia e monocitose.

Palavras-chave: bacteriose, pacu, infecção.

ABSTRACT. Hematology and clinical signs of *Piaractus mesopotamicus* experimentally infected with *Aeromonas hydrophila*. The purpose of this study was to evaluate the hematological response and clinical sign of *Piaractus mesopotamicus* infected by *Aeromonas hydrophila*. Were used 324 pacus, *P. mesopotamicus* weighing 102.84 ± 27.1 g distributed in 27 water tanks with 300 L of capacity, 14 fish per tank. The fish were kept in the water tanks during one month, receiving appropriate diet. In this period was avoided stressing management. After this period, the fish were infected with 6×10^6 cfu of *A. hydrophila* fish⁻¹, injected intraperitoneally. The blood collection was carried 24h before experimental infection and 24h after its. The *A. hydrophila* infection in *P. mesopotamicus* is characterized by dark skin and clinical signs related to hemorrhage, hypochromic normocytic anemia, decrease on plasmatic proteins and globulins levels, leucopenia, lymphopenia, thrombocytopenia, eosinophilia, neutrophilia and monocytosis.

Key words: bacteriosis, pacu, infection.

Introdução

A escassez de laboratórios especializados em bacteriologia de peixes no Brasil leva à falta de conhecimento dos agentes etiológicos causadores das doenças nas pisciculturas. Na maioria dos casos, os surtos ocorrem nas propriedades e não são notificados ou registrados. Estudos parasitológicos de peixes nativos apontam grande diversidade de classes de parasitos acometendo os animais (CAMPOS et al., 2008), entretanto, com relação às bactérias, pouco se conhece a respeito dessa relação patógeno-hospedeiro.

O Brasil é um país muito rico em espécies nativas de grande potencial econômico, como é o caso do pacu, *Piaractus mesopotamicus*, espécie expressiva na aquicultura por sua considerada aceitação pelos consumidores e elevada taxa de

crescimento (JOMORI et al., 2003). Entretanto, não se conhece a especificidade das bactérias em relação aos peixes nativos e a susceptibilidade e particularidades dos mecanismos de defesa destes animais frente às bactérias. Não há registros, ainda, da evolução de doenças nos peixes e dos danos e lesões característicos de cada bacteriose.

A *Aeromonas hydrophila* não tem recebido notória importância como patógeno de peixes, pois esta bactéria é parte integrante da microbiota intestinal de peixes saudáveis (TRUST et al., 1974). Desse modo, a presença desta bactéria, por si só, não é indicativo de doença; todavia, o estresse, presente nos sistemas de cultivo intensivos, é o principal fator contribuinte nos surtos de doenças causadas por esse agente etiológico (CIPRIANO, 2001).

Trata-se de um bastonete móvel com flagelos

polares. Não produz esporos, é Gram negativa, não-capsulada, aeróbia e anaeróbia facultativa (STOSKOPF, 1993). Tem ampla distribuição geográfica e causa a septicemia hemorrágica, caracterizada pela presença de pequenas lesões superficiais, hemorragias locais, particularmente nas brânquias e opérculos, úlceras, exoftalmia e distensão abdominal. Internamente, pode haver acúmulo de líquido ascítico, anemia e lesões no fígado e rins (AUSTIN; AUSTIN, 1987). Alguns desses bastonetes isolados podem ser considerados patógenos entéricos de humanos. Assim, a presença de elevados níveis de *Aeromonas* em piscicultura intensiva pode apresentar risco de infecção para o peixe e também para funcionários da piscicultura e consumidores (VIEIRA, 2004).

O estudo das variáveis hematológicas assume importância como meio auxiliar de diagnóstico e estado de saúde dos peixes (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004). Em mamíferos e peixes teleostes, as doenças infecciosas ativam o sistema imunológico celular, alterando o percentual de células sanguíneas de defesa orgânica circulantes (BOON et al., 1990). Portanto, há necessidade de identificação e quantificação de tais células, visando ao entendimento de sua participação nos processos morbidos.

Diante do exposto, com este ensaio, objetivou-se caracterizar a ocorrência de sinais clínico-patológicos em *Piaractus mesopotamicus* infectados experimentalmente por *Aeromonas hydrophila*, além de avaliar sua resposta hematológica.

Material e métodos

Foram utilizados 324 pacus (*Piaractus mesopotamicus*) juvenis, com peso de $102,84 \pm 27,1$ g, distribuídos em 27 caixas de 300 L de água com renovação e aeração constantes, sendo 14 peixes caixa⁻¹, localizadas no Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos do Centro de Aquicultura da 'Unesp – Universidade Estadual Paulista' de Jaboticabal, Estado de São Paulo.

Os peixes foram aclimatados nas caixas durante um mês, recebendo dieta balanceada, período em que se evitou qualquer tipo de manejo estressante. Passado esse período, foram submetidos à infecção experimental com a bactéria *Aeromonas hydrophila*.

Aeromonas hydrophila utilizada, neste experimento, foi isolada de dois exemplares de *Oreochromis niloticus*, com sinais clínicos característicos de septicemia hemorrágica, no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp de Jaboticabal. No procedimento realizado, pesaram-se

10 g de amostras aleatórias de músculo dos peixes. As amostras foram trituradas e incubadas em 100 mL de Caldo de Soja Triptona (TSB) acrescido de ampicilina na concentração de 10 mg L⁻¹, e incubadas por 24h a 30°C. Em seguida, procedeu-se ao plaqueamento deste material em ágar Vermelho de Fenol Amido Ampicilina, incubado por 24h a 30°C. As colônias Gram negativas suspeitas foram selecionadas e plaqueadas em ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI) pelo mesmo período e temperatura de incubação. As culturas que apresentavam reação ácida tanto na base quanto no bisel, com ou sem formação de gás, foram submetidas às provas da oxidase (+), fermentação do manitol (+), produção de indol (+), hidrólise da esculina (+) e arginina (+), descarboxilação da lisina (+) e ornitina (-) e produção de acetoina a partir da glicose (+) para caracterização da espécie.

De acordo com os resultados obtidos em testes preliminares de DL50, a infecção experimental foi realizada por injeção intraperitoneal da *A. hydrophila* na concentração de 6×10^6 UFC de *A. hydrophila* peixe⁻¹ diluída em 0,2 mL de solução salina estéril. Após o desafio, os peixes foram observados diariamente durante 10 dias, inspecionando-se o comportamento e sinais clínicos. Os peixes mortos foram submetidos ao exame bacteriológico para reisolamento da bactéria imediatamente após a morte.

As coletas e análises de sangue foram realizadas 24h antes da infecção experimental e 24h após a infecção. Aliquotas de sangue foram coletadas por punção do vaso caudal de dois exemplares por caixa, a cada coleta, utilizando-se seringas contendo EDTA (10%) para avaliação das variáveis eritrocitárias e células sanguíneas de defesa orgânica (leucócitos e trombócitos), da concentração de proteínas plasmática total e globulinas. A contagem de eritrócitos foi realizada em contador automático de células sanguíneas (Modelo CC510, da Celm) e a dosagem de hemoglobina de acordo com o método de Collier (1944). O hematócrito foi determinado de acordo com as recomendações de Goldenfarb et al. (1971). As constantes corpusculares como o volume corpuscular médio (VCM), a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e a hemoglobina corpuscular média (HCM) foram calculadas, segundo Wintrobe (1934). Para a contagem diferencial de leucócitos, foram preparadas extensões sanguíneas coradas pancromaticamente com corante Rosenfeld e as células foram examinadas à microscopia de luz comum. Foram contadas até 200 células em cada extensão sanguínea, estabelecendo-se o percentual de cada componente celular de interesse. Os

leucócitos totais, trombócitos totais e eritroblastos foram quantificados indiretamente nas mesmas extensões contando-se o número de trombócito, leucócito e eritroblasto para cada 2.000 eritrócitos.

Durante o período experimental, foram monitoradas diariamente as variáveis limnológicas: temperatura, pH, oxigênio dissolvido e condutividade da água. Estas variáveis mantiveram-se dentro dos valores recomendados para o bem-estar dos peixes (SIPAÚBA-TAVARES, 1994), sendo: temperatura $30,5 \pm 1,8^{\circ}\text{C}$, oxigênio dissolvido $4,8 \pm 0,8 \text{ mg L}^{-1}$, condutividade elétrica $204,1 \pm 28,1 \mu\text{S cm}^{-1}$ e pH $8,6 \pm 1,1$. A taxa de renovação da água manteve-se em $45 \pm 15 \text{ mL s}^{-1}$.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (teste F) Anova.

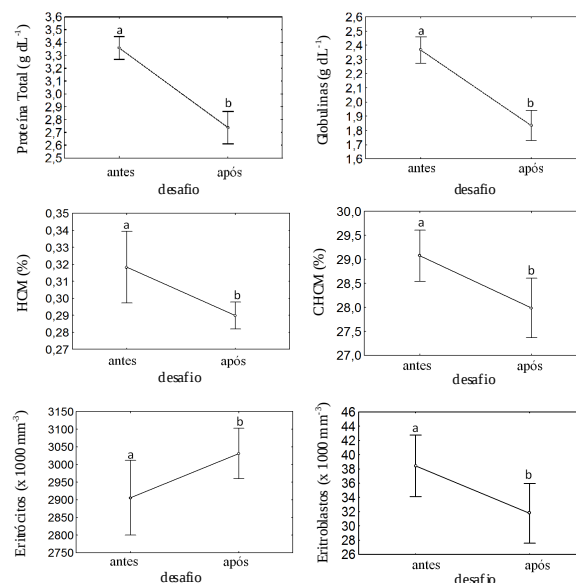
Resultados e discussão

Os peixes doentes apresentaram coloração enegrecida da derme. Secombes (1996) relaciona o escurecimento da derme de peixes doentes ao maior número de células no local, associado ao aumento de melanóforos, na tentativa de regeneração de tecidos danificados. Há, ainda, evidências de escurecimento da derme de peixes relacionadas à determinação da hierarquia social e condição de estresse, e os peixes subordinados, considerados em maior estímulo estressor, apresentam coloração mais escura que os dominantes (BEECHING, 1995) e a situação de enfermidade pode ser considerada como um estímulo de estresse.

Verificou-se que os peixes infectados pela *A. hydrophila* apresentaram petéquias e sufusões hemorrágicas na superfície do corpo, a cavidade abdominal apresentou-se distendida, com conteúdo ascítico (2,0 a 3,0 mL) transparente e límpido, hematoma no local da injeção, hemorragia anal, nadadeiras pélvicas corroídas e hemorrágicas. O exame macroscópico interno revelou marcado quadro congestivo-hemorrágico no fígado, rim cefálico e baço. Estes eventos podem estar relacionados à secreção de enzimas extracelulares dos neutrófilos que, em geral, causam danos aos tecidos do hospedeiro, contribuindo para a liquefação hemorrágica dos tecidos, comumente vista em infecções bacterianas (SECOMBES, 1996).

Os níveis de proteína total e globulinas do sangue, após o desafio, foram reduzidos (Figura 1). Resultados da literatura revelam que peixes acometidos tanto por bactérias como por parasitos apresentaram redução nos níveis de proteínas do sangue (BOON et al., 1990). Dentre os fatores que levam à redução nos níveis de proteína plasmática, cita-se a maior demanda deste nutriente para

reposição de tecidos danificados e lesados em processos inflamatórios, em que a permeabilidade vascular é aumentada e há o extravasamento de proteína para os espaços extra-vasculares, com consequente perda dessa proteína nesses locais (KANEKO, 1989). Hemorragias externas também desencadeiam perdas de células sanguíneas e de proteína plasmática. Tanto a albumina quanto as globulinas tendem a diminuir com a perda de sangue (JAIN, 1993).



Figuras 1. Médias das variáveis hematológicas de *Piaractus mesopotamicus* antes e após o desafio com a bactéria *Aeromonas hydrophila*. Figuras corrigidas.

Apesar do aumento no número de eritrócitos após a infecção (Figura 1), verificou-se um processo de anemia normocítica-hipocrômica (Figura 1). Os processos anemiantes são atribuídos a distúrbios na produção de eritrócitos ou perda dessas células por hemólise (JAIN, 1986). Diversos autores (YOSHINAGA et al., 1996; RANZANI-PAIVA et al., 2000; TAVARES-DIAS et al., 2002) relacionam a anemia normocítica-hipocrômica às infecções por patógenos e parasitos dos mais variados grupos taxonômicos.

Em peixes, os mecanismos imunológicos não-específicos são semelhantes aos de outras classes de vertebrados. Similarmente, a imunidade mediada por células específicas está demonstrada para todos os níveis de evolução, dos Cyclostomata aos Teleostei (CORBEL, 1975).

No presente estudo, observou-se que, 24h após o desafio com a *A. hydrophila*, houve aumento no número de neutrófilos e monócitos no sangue (Figura 2), corroborando estudos com trutas arco-

íris infectadas com *Vibrio anguillarum* (LAMAS et al., 1994) e salmão do Atlântico infectado com *Renibacterium salmoninarum* (BRUNO; MUNRO, 1986). Os casos de resposta inflamatória aguda são caracterizados por neutrofilia e monocitose no sangue e acúmulo de neutrófilos e macrófagos no local da injúria ou infecção (SECOMBES, 1996; ROBERTS, 1989). Em peixes, a neutrofilia inicia-se uma hora após os estímulos inflamatórios e, comumente, atinge um pico com 48h (SECOMBES, 1996). Segundo Sopinska (1984), o aumento no número de monócitos, importante célula fagocítica, pode ser decorrente da intensificação da atividade dos mecanismos de defesa celular.

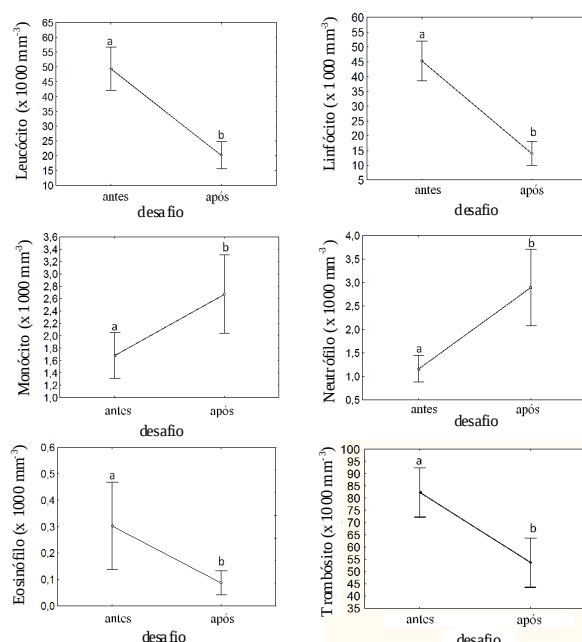


Figura 2. Médias das variáveis hematológicas de *Piaractus mesopotamicus* antes e após o desafio com *Aeromonas hydrophila*. Figuras corrigidas

O número de leucócitos, trombócitos e linfócitos sanguíneos, após 24h do desafio, foi reduzido (Figura 2). Esta redução pode estar relacionada à migração dessas células para o foco de inflamação, assim como verificado por Lamas et al. (1994) no sangue de trutas arco-íris infectadas por *V. anguillarum*. Segundo Secombes (1996), durante as respostas inflamatórias, primeiro ocorre o aumento no suprimento de sangue da área infectada, acompanhado por aumento na permeabilidade capilar e depois migração dos leucócitos para fora dos capilares circundando o tecido infectado. O patógeno, então, é rapidamente rodeado por uma rede de células fagocíticas com potente atividade

microbicida, que impede sua expansão ou o remove completamente. Em *P. mesopotamicus*, a hipótese de migração das células para o foco de inflamação pode ser confirmada pelos estudos da composição celular do exsudado inflamatório induzido na bexiga natatória por tioglicolato, *A. hydrophila* e endotoxina (LPS) de *Escherichia coli*, em que Bozzo et al. (2007) demonstraram que as células predominantes no foco inflamado são os trombócitos, acompanhados de menor quantidade de linfócitos, enquanto que macrófagos e granulócitos encontram-se presentes em quantidades baixas desde as avaliações iniciais, independentemente do estímulo inflamatório considerado.

Conclusão

A infecção por *A. hydrophila* em *P. mesopotamicus* é caracterizada por escurecimento da derme e sinais clínico-patológicos relacionados à hemorragia, seguidos de anemia normocítica-hipocrômica, redução nos níveis de proteínas, globulinas plasmáticas e eosinófilos, leucopenia, linfopenia, trombocitopenia, eosinofilia, neutrofilia e monocitose.

Referências

- AUSTIN, B.; AUSTIN, D. A. **Bacterial fish pathogens**: disease in farmed and wild fish. Chichester: Ellis Horwood, 1987.
- BEECHING, S. C. Colour pattern and inhibition aggression in the cichlid fish *Astronotus ocellatus*. **Journal of Fish Biology**, v. 47, n. 1, p. 50-58, 1995.
- BOON, J. H.; CANNAETS, V. M. H.; AUGUSTIJN, H.; MACHIELS, M. A. M.; CHARLEROY, D.; OLLEVER, F. The effect of different infection levels with infective Larvae of *Anguillicola crassus* on haematological parameters of European Eel (*Anguilla anguilla*). **Aquaculture**, v. 87, n. 3, p. 243-253, 1990.
- BOZZO, F. R.; MORAES, J. E.; MORAES, F. R.; PEREIRA, G. T.; TAVARES-DIAS, M.; ONAKA, E. M. Kinetics of Cellular Component in Inflammatory Response Induced by Different Stimuli in the Swim Bladder of Pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887 (Characidae). **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 38, n. 2, p. 302-308, 2007.
- BRUNO, D. W.; MUNRO, L. S. Haematological assessment of rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson, and Atlantic salmon, *Salmo salar* L., infected with *Renibacterium salmoninarum*. **Journal of Fish Diseases**, v. 9, n. 1, p. 195-204, 1986.
- CAMPOS, C. M.; FONSCECA, V. E.; TAKEMOTO, R. M.; MORAES, F. R. Fauna parasitária de cachara *Pseudoplatystoma fasciatum* (Siluriforme: Pimelodidae) no rio Aquidauana, Pantanal Sul-matogrossense, Brasil. **Acta Scientiarum. Biological Science**, v. 30, n. 1, p. 91-96, 2008.

- CIPRIANO, R. C. **Aeromonas hydrophila and motile aeromonad septicemias of fish**. Washington, D.C.: Fish and Wildlife Service Division of Fishery Research, 2001.
- COLLIER, H. B. The standardization of blood haemoglobin determinations. **Canadian Medical Association Journal**, v. 50, n. 6, p. 550-552, 1944.
- CORBEL, M. J. The immune response in fish: a review. **Journal of Fish Biology**, v. 7, n. 4, p. 539-563, 1975.
- GOLDENFARB, P. B.; BOWYER, F. P.; HALL, E.; BROSIUS, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 56, n. 1, p. 35-39, 1971.
- JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. 4th ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 1986.
- JAIN, N. C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea and Febiger, 1993.
- JOMORI, R.; CARNEIRO, D. J.; PORTELLA, M. C. Growth and survival of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) juveniles reared in ponds or at different initial larviculture periods indoors. **Aquaculture**, v. 221, n. 1-4, p. 277-287, 2003.
- KANEKO, J. J. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 4th ed. San Diego: Academic Press, 1989.
- LAMAS, J.; SANTOS, Y.; BRUNO, D. W.; TORANZO, A. E.; ANADON, R. Non-specific cellular responses of rainbow trout to *Vibrio anguillarum* and its extracellular products (ECPs). **Journal of Fish Biology**, v. 45, n. 5, p. 839-854, 1994.
- RANZANI-PAIVA, M. J. T.; SILVA-SOUZA, A. T.; PAVANELLI, G. C.; TAKEMOTO, R. M. Hematological characteristics and relative condition factor (Kn) associated with parasitism in *Schizodon borellii* (Osteichthyes, Anostomidae) and *Prochilodus lineatus* (Osteichthyes, Prochilodontidae) from Paraná river, Paraná, Brazil. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 22, n. 2, p. 515-521, 2000.
- ROBERTS, R. J. **Patologia de los peces**. Madrid: Ed. Mundi-Prensa, 1989.
- SECOMBES, C. J. **The fish immune system: the nonspecific immune system – cellular defenses**. London: Academic Press, 1996.
- SIPAÚBA-TAVARES, L. H. **Limnologia aplicada à aquicultura**. Jaboticabal: Funep, 1994. (Boletim Técnico, 1).
- SOPINSKA, A. Effects physiological factors, stress, and disease on hematological parameters of carp, with a particular reference to the leukocyte patterns. II. Hematological results of stress in carp. **Acta Ichthyologica Pisca**, v. 14, n. 1/2, p. 125-139, 1984.
- STOSKOPF, M. K. **Fish medicine**. Philadelphia: Saunders, 1993.
- TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M. L.; MORAES, F. R. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. V. Variáveis do piaçu *Leporinus macrocephalus* Garavello and Britski, 1988 (Anostomidae). **Naturalia**, v. 25, n. 1, p. 39-52, 2002.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. **Hematologia de peixes teleósteos**. Ribeirão Preto: Villimpress Complexo Gráfico, 2004.
- TRUST, T. J.; BULL, L. M.; CURRIE, B. R.; BUCKLEY, J. T. Obligate anaerobic bacteria in the gastrointestinal microflora of the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*), goldfish (*Carassius auratus*), and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, v. 36, n. 10, p. 1174-1179, 1974.
- VIEIRA, R. H. S. **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática**. São Paulo: Varela, 2004.
- WINTROBE, M. M. Variations on the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood various vertebrates. **Folia Haematologica**, v. 51, n. 32, p. 32-49, 1934.
- YOSHINAGA T.; SEGAWA, I.; YAMANO, K.; IKEDA, H.; SORIMACHI, M. Anemia caused by challenges with the monogenean *Neoheterobothrium hirane* in the Japanese flounder. **Fish Pathology**, v. 31, n. 1, p. 19-23, 1996.

Received on October 25, 2007.

Accepted on June 25, 2008.

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.