UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL

**MARINA TIE SHIMADA**
**Médica Veterinária**

# PASTEURELOSE EM JUVENIS DE COBIAS (*Rachycentron canadum*) CRIADOS EM TANQUES-REDE NO LITORAL NORTE DO ESTADO DE SÃO PAULO-BRASIL

**Jaboticabal, São Paulo**
**2015**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL

# PASTEURELOSE EM JUVENIS DE COBIAS (*Rachycentron canadum*) CRIADOS EM TANQUES-REDE NO LITORAL NORTE DO ESTADO DE SÃO PAULO-BRASIL

**Marina Tie Shimada**
**Médica Veterinária**

**Orientadora: Profa. Dra. Julieta Rodini Engrácia de Moraes**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP), como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR em Aquicultura, área de concentração em Patologia de Organismos Aquáticos.

**Jaboticabal, São Paulo**

**2015**

Shimada, Marina Tie
S556p Pasteurelose em juvenis de cobias (*Rachycentron canadum*) criados em tanques-rede no litoral norte do Estado de São Paulo, Brasil. / Marina Tie Shimada. – – Jaboticabal, 2015
xiv, 61 p. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2015
Orientadora: Julieta Rodini Engrácia de Moraes
Banca examinadora: Fabiana Garcia Scaloppi, Sérgio Henrique Canello Schalch, Rogério Salvador, Laura Satiko Okada Nakaghi
Bibliografia

1. *Photobacterium damselae* subsp *piscicida*. 2. Pseudotuberculose. 3. Análise morfológica. 4. Patologia. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3.09

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
REITORIA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO: Pasteurelose em juvenis de cobias (Rachycentron canadum) criados em taques-rede no litoral norte do Estado de São Paulo - Brasil**

**AUTORA: MARINA TIE SHIMADA**
**ORIENTADORA: Profa. Dra. JULIETA RODINI ENGRACIA DE MORAES**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Aquicultura , pela Comissão Examinadora:

Julieta Rodini de Moraes

Profa. Dra. JULIETA RODINI ENGRACIA DE MORAES
Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Fabiana Garcia

Profa. Dra. FABIANA GARCIA SCALOPPI
Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, APTA, Votuporanga-SP

SSchalch

Prof. Dr. SÉRGIO HENRIQUE CANELLO SCHALCH
Agência Paulista Tecnológica dos Agronegócios, APTA, Pindamonhangaba-SP

Lsonchiyhi

Profa. Dra. LAURA SATIKO OKADA NAKAGHI
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. ROGÉRIO SALVADOR
/ Universidade Estadual do Norte do Paraná - Luiz Meneghel

Data da realização: 08 de junho de 2015.

# DADOS CURRICULARES

**Marina Tie Shimada –** Filha de Takako Shimada (*in memorian*) e Ituro Shimada, nasceu em 07 de setembro de 1974 em Londrina, Paraná. No ano de 1995 ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, onde se graduou em 1999. Durante a graduação desenvolveu projeto de Iniciação Científica sob a orientação da Profa. Dra. Ana Paula F.R.L. Bracarense. No ano de 2000 foi aprovada na seleção para o Programa de Residência em Patologia Animal, UEL. Em 2002 ingressou no curso de mestrado do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, UEL, na área de concentração Patologia Animal sob a orientação do Prof. Dr. Antônio Carlos Faria dos Reis. Nos anos de 2002 e 2003 trabalhou na Fundação Educacional de Guarapuava onde ministrou aulas de Patologia Geral e Animal para o curso de Medicina Veterinária. De 2004 a 2011 trabalhou na Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Câmpus Toledo onde ministrou aulas nos cursos de Medicina Veterinária, Ciências Biológicas e Enfermagem. Nesta instituição de ensino ainda atuou nos laboratórios de Análises Clínicas e Patologia Animal. Em 2011, ingressou no curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Estadual Paulista, na área de concentração Patologia de Peixes, sob a orientação da Profa. Dra. Julieta Rodini Engrácia de Moraes.

# SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS……i
APOIO FINANCEIRO……..iii
RESUMO……iv
ABSTRACT……...v
LISTA DE TABELAS……vi
LISTA DE FIGURAS.....vii
1. INTRODUÇÃO.....1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA……3
2.1 O cobia (*Rachycentron canadum*).....3
2.2 Pasteurelose……...4
2.3 Esteatose hepática em peixes marinhos.....8
2.4 Histofisiologia de peixes teleósteos.....10
2.4.1 Brânquias.....10
2.4.2 Coração.....11
2.4.3 Cecos pilóricos.....12
2.4.4 Fígado.....12
2.4.5 Baço.....14
2.4.6 Rim.....14
2.4.7 Centros de melanomacrófagos.....15
3. OBJETIVOS.....16
4. MATERIAL E MÉTODOS.....16
4.1 Local da coleta dos cobias e das amostras biológicas.....16
4.2 Anamnese, biometria e eutanásia de juvenis de cobias.....18
4.3 Identificação parasitológica.....19
4.4 Exame bacteriológico.....19
4.5 Análise histopatológica.....20
4.6 Extração de lipídio total e composição de ácidos graxos na ração.....21
5. RESULTADOS.....21
5.1 Anamnese e biometria.....21
5.2 Exame bacteriológico.....23
5.3 Alterações macroscópicas.....23
5.4 Alterações microscópicas.....24
5.4.1 Fígado.....24

5.4.3 Cecos pilóricos.....25
5.4.4 Coração e baço.....25
5.4.5 Brânquias.....26
5.5 Análise da composição de ácidos graxos na ração.....41
6. DISCUSSÃO.....41
7. ARTIGOS CIENTÍFICOS.....45
8. REFEREÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....45
ANEXOS.....55
Anexo 1 - Certificado do comitê de ética no uso de animais.....56
Anexo 2 – Diagnóstico molecular da *Photobacterium damselae* subsp *piscicida*.....57
Anexo 3 – Composição bromatológica da ração comercial oferecida aos juvenis de cobias criados em tanques-rede do litoral Norte do Estado de São Paulo.....58
Anexo 4 - Composição de ácidos graxos e lipídio total da ração para juvenis de cobias criados em tanques-rede do litoral Norte do Estado de São Paulo.....59
Anexo 5 – Artigo publicado no Journal of Applied Aquaculture - Photobacteriosis outbreak in cage-reared *Rachycentron canadum*: predisposing conditions……60
Anexo 6 – Artigo publicado no Journal Veterinary Science Medical Diagnosis – Hepatic steatosis in caged reared Young cobia, *Rachycentron canadum* (Linnaeus, 1766), in Brazil……62

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Julieta R. E. de Moraes pela orientação, paciência e compreensão, pelos ensinamentos acadêmicos e de vida e, companhia durante as viagens para as visitas técnicas e coletas de amostras ao longo do doutorado.

Ao Prof. Dr. Flávio Ruas de Moraes sempre disposto para contribuir na correção e sugestões da tese e artigos.

Ao Prof. Dr. José Luiz Pedreira Mouriño do laboratório de Camarões Marinho/ UFSC pelo isolamento e identificação bioquímica e fenotípica da *Photobacterium damselae* subsp *piscicida* que foi fundamental para a realização do presente trabalho.

Ao Prof. Dr. Clóvis Wesley Oliveira de Souza da Universidade Federal de São Carlos, pelo auxílio no isolamento e identificação de micobactérias das amostras biológicas de cobias.

À maricultura Itapema em São Sebastião, SP por ter permitido a coleta das amostras e execução da parte experimental do projeto.

Aos colegas da pós-graduação, Dayanne C. Fernandes, Fausto Marinho Neto, Gustavo S. Claudiano, Isabela M. Martins, Jefferson Yunis A., Paulo F. Marcusso, Silas Eto, Thalita R. Petrillo, Thiago A. Fernandes, pelo auxílio na execução da parte experimental e laboratorial assim como pela amizade e a união nos momentos difíceis e também na alegria.

À Dayanne C. Fernandes e Silas Eto, em especial, pela dedicação na análise laboratorial relacionada à microbiologia e imunologia.

Ao Gustavo S. Claudiano pela dedicação às análises estatística e contribuição na correção e sugestão da tese.

À pós-doutoranda Lygia Maria Malvestio pela contribuição na correção e sugestão da tese.

Ao Prof. Dr. Rogério Salvador, docente da Uenp/Bandeirantes/Paraná, pela concessão do laboratório para produção e manipulação da bacterina, bem como, por permitir o empréstimo dos equipamentos, os quais facilitaram o processamento das amostras.

À minha família que me ajudou durante várias situações difíceis ocorridas durante o doutorado, tanto em questões financeira quanto emocional. Ao meu namorado que há 10 anos traz-me muita felicidade e força para conseguir vencer as etapas da vida, apesar da minha limitação.

À ex-coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Unesp (CAUNESP), Profa. Dra. Laura Satiko Okada Nakaghi, pela concessão do veiculo e diárias para as coletas das amostras em Ilhabela/SP.

À Veralice e David, da secretaria da PG/CAUNESP sempre dispostos a nos atender nos momentos de desespero, para sanar as dúvidas.

Muito Obrigada.

# APOIO FINANCEIRO

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes – Edital Ciências do Mar – 09/2009 - auxílio pesquisa (projeto nº 23038.051648/2009-69) e concessão da bolsa de doutorado pelo mesmo projeto.

## RESUMO

O cobia (*Rachycentron canadum*) é forte candidato para piscicultura marinha no Brasil. Como em qualquer atividade de produção, a intensificação submete os peixes a elevada densidade de estocagem e alteração do hábito natural da espécie. Estes fatores acarretam estresse, reduz a eficiência do sistema imune e predispõe os peixes às doenças. O presente estudo teve como objetivo estabelecer o diagnóstico da elevada mortalidade em juvenis de cobias criados em tanques-rede no litoral norte do Estado de São Paulo. A maricultura iniciou em novembro de 2010, o primeiro ciclo de engorda de cobias com 24.000 alevinos e em setembro de 2011 restavam cerca de 500. O plano diagnóstico iniciou em março de 2011, com necropsia e coleta de tegumento, brânquias, coração, fígado, baço, rim e cecos pilóricos para análise histopatológica (n=8). Pela análise suspeitou-se tratar de pasteurelose, doença bacteriana septicêmica causada pela *Photobacterium damselae* subsp *piscicida*. Em maio, julho e setembro, foram coletadas fígado, baço, coração e rim para exame bacteriológico (n=15) e histologico (n=38). As bactérias isoladas foram submetidas a análise molecular confirmando a doença. Não houve isolamento de *Mycobacterium* sp. Na macroscopia, nódulos esbranquiçados com cerca de 0,5 milímetro foram observados no fígado e rim. Parasitas identificadas como *Neobenedenia melleni* e *Tuxophorus caligodes* estavam presentes principalmente, na cabeça. Na microscopia, 94% apresentavam granulomas no fígado contendo centro necrótico e aglomeração de bactérias delimitadas por células epitelióides e extensa fibroplasia. A coloração de *Ziehl Neelsen* foi negativa para bactérias álcool ácido resistente. O fígado de 92% dos peixes apresentava extensa e severa vacuolização no citoplasma dos hepatócitos. A coloração de *Sudan Black* identificou presença de lipídios confirmando o quadro de esteatose. A regressão da esteatose foi notada a partir de julho, quando foi incluído na dieta o rejeito da pesca. O diagnóstico da elevada mortalidade realizou-se pela caracterização das lesões microscópicas, isolamento e identificação da bactéria e confirmação pela análise molecular.

**Palavras-chave:** *Photobacterium damselae* subsp *piscicida*, pseudotuberculose, análise morfológica, patologia

## ABSTRACT

The cobia (*Rachycentron canadum*) shows great potential for marine fish farming in Brazil. As in any production activity, the intensification submit the fish to the high stocking density and alteration of the natural habit of the species. These factors cause stress, reduce the efficiency of the immune system and predispose fish to diseases. This study aimed to establish the diagnosis of high mortality in juvenile cobias raised in cages on the northern coast of São Paulo. The mariculture began in November 2010, the first cycle of fattening cobias with 24,000 fingerlings and in September 2011 remained about 500. The diagnostic plan began in March 2011, with necropsy and collection integument, gills, heart, liver, spleen, kidney and pyloric caeca for histopathological analysis (n = 8). After analysis, the fish mortality was related to pasteurellosis, a septicemic bacterial disease caused by *Photobacterium damselae* subsp *piscicida*. In May, July and September were collected liver, spleen, heart and kidney for bacteriological examination (n = 15) as well as same samples collected in March to histopathology (n = 38). Bacterial isolates were subjected to molecular analysis to confirm disease. No *Mycobacterium* sp. In macroscopic, whitish nodules with about 0.5 mm were observed in the liver and kidney. *Neobenedenia melleni* and *Tuxophorus caligodes* were the parasites identified mainly present in the head. In microscopy, we evaluated 46 fish of which 94% had liver granulomas containing necrotic center and agglomeration of bacteria delimited by epithelioid cells and extensive fibroplasia. The *Ziehl Neelsen* was negative for alcohol acid resistant bacteria. The liver of 92% of fish had severe and extensive vacuolization in the cytoplasm of hepatocytes. The *Sudan Black* stain identified the presence of lipids confirming steatosis. The regression of steatosis was noted from July, when the trash fish was included in the diet. The diagnosis of high mortality held by the characterization of microscopic lesions, isolation and identification of bacteria and confirmed by molecular analysis.

**Keywords:** cobia, pseudotuberculosis, morphological analysis, pathology, granulomas

# LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Juvenis de cobias criados em tanques-rede no litoral norte do Estado de São Paulo, 2011 utilizados para coleta de amostras biológicas destinadas às análises bacteriológica e histopatológica..... 18

**Tabela 2.** Média e desvio padrão do comprimento total (cm) e do peso (g) de cobias coletadas no litoral norte do Estado de São Paulo em maio e setembro de 2011..... 22

**Tabela 3.** Valor de referência de ácido oleico e ácido docosahexaenoico quantificado em dieta natural de peixes marinhos (Spisni et al., 1998) comparado com o valor encontrado na ração comercial oferecida aos juvenis de cobias criados em tanques-rede no litoral norte do Estado de São Paulo, estudado no presente trabalho..... 41

# LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Cobia adulto (*Rachycentron canadum*). Fonte: http://graytaxidermy.com/gray-taxidermy-product-gallery.html..... 3

**Figura 2.** Fotomicrografia da brânquia normal de cobia (*Rachycentron canadum*). Corte longitudinal da lamela primária (1) e lamelas secundárias (2) contendo capilares (3). HE. Barra=50µm..... 11

**Figura 3.** Estrutura anatômica do coração e o fluxo de sangue nas câmaras de peixes teleósteos. Fonte: MUMFORD et al., 2007..... 12

**Figura 4.** Fotomicrografia do fígado normal de cobia (*Rachycentron canadum*). 1- hepatócitos, 2- sinusoide. HE. Barra=100µm..... 13

**Figura 5**. Mapa mostrando a praia do Perequê e a ilha do Saco do Poço onde se situava a maricultura em Ilhabela no litoral norte do Estado de São Paulo..... 17

**Figura 6.** Casa localizada na encosta da montanha onde foi montada o laboratório móvel para coleta das amostras de juvenis de cobias destinadas às análises bacteriológica e histopatológica, 2011. Cortesia: profa. Dra. Julieta Rodini Engrácia de Moraes..... 19

**Figura 7.** Tanque-rede circular com flutuadores de PEAD (seta) da maricultura comercial situada no litoral norte do Estado de São Paulo, 2011. Cortesia: profa. Dra. Julieta Rodini Engrácia de Moraes..... 23

**Figura 8.** Alterações macroscópicas em juvenis de cobias *Rachycentron canadum* criados em tanques-rede no litoral norte do Estado de São Paulo, 2011. (A) Ulceração da nadadeira dorsal com exposição óssea. (B) Despigmentação do tegumento (seta). Cortesia do Prof. Dr. Flávio Ruas de Moraes..... 27

**Figura 9.** Parasitas encontrados em juvenis de cobias *Rachycentron canadum* criados em tanques-rede no litoral norte do Estado de São Paulo, 2011. (A) *Neobenedenia melleni* (seta) (B) *Tuxophorus caligodes.* Cortesia do Prof. Dr. Flávio Ruas de Moraes..... 28

**Figura 10.** Alterações macroscópicas em juvenis de cobias *Rachycentron canadum* criados em tanques-rede no litoral norte do Estado de São Paulo, 2011. (A) Fígado aumentado de volume e amarelado (B) Nódulos esbranquiçados no fígado (setas). Cortesia do Prof. Dr. Flávio Ruas de Moraes..... 29

**Figura 11.** Alterações macroscópicas em juvenis de cobias *Rachycentron canadum* criados em tanques-rede no litoral norte do Estado de São Paulo, 2011. Rim aumentado e com nodulações esbranquiçadas (seta). Cortesia do Prof. Dr. Flávio Ruas de Moraes..... 30

**Figura 12.** Fotomicrografia do fígado de juvenis de cobias *Rachycentron canadum* criados em tanques-rede no litoral norte do Estado de São Paulo, 2011. (A) Hepatócitos com predomínio de macrovacúolos no citoplasma. Coloração: hematoxilina e eosina. Barra = 50µm. (B) Vacúolos de lipídios corados em negro. Coloração: *Sudan Black*. Barra = 20µm..... 31

**Figura 13.** Fotomicrografia do fígado de juvenis de cobias *Rachycentron canadum* da maricultura comercial situada no litoral Norte do Estado de São Paulo, 2011. (A) Área de hepatócitos com aspecto normal (*) e com microvacúolos no citoplasma (**). Barra = 100µm. (B) Congestão dos sinusóides. Coloração: hematoxilina e eosina. Barra = 50µm..... 32

**Figura 14.** Fotomicrografia do fígado de juvenis de cobias *Rachycentron canadum* criados em tanques-rede no litoral norte do Estado de São Paulo, 2011. (A) Granulomas de diferentes estágios e tamanhos localizados no parênquima. Barra = 200µm. (B) Lesão granulomatosa com centro necrótico contendo aglomeração de bactérias (seta). Coloração de hematoxilina e eosina. Barra = 20µm..... 33

**Figura 15.** Fotomicrografia do fígado de juvenis de cobias *Rachycentron canadum* criados em tanques-rede no litoral norte do Estado de São Paulo, 2011. (A) Granuloma delimitado por camadas de células epitelioides e macrófagos (seta branca), raros linfócitos (seta preta). Coloração: hematoxilina e eosina. Barra = 20µm. (B) Granuloma com espessa camada de fibras colágenas (seta). Coloração: tricômio de Masson. Barra = 50µm..... 34

**Figura 16.** Fotomicrografia do granuloma em fígado de juvenis de cobias *Rachycentron canadum* criados em tanques-rede no litoral norte do Estado de São Paulo, 2011. Granuloma negativo para bacilos álcool ácido resistente. Coloração de Ziehl-Neelsen. Barra = 20µm..... 35

**Figura 17.** Fotomicrografia do fígado de juvenis de cobias *Rachycentron canadum* criados em tanques-rede no litoral norte do Estado de São Paulo, 2011. (A) Área de necrose dos hepatócitos (seta). Barra = 20µm. (B) Infiltrado de macrófagos na área de necrose dos hepatócitos (seta). Barra = 20µm. (C) Aglomerado denso de macrófagos (seta). Barra = 20µm. (D) Áreas de necrose no aglomerado de macrófagos (seta). Coloração: hematoxilina e eosina. Barra = 20µm..... 36

**Figura 18.** Fotomicrografia do rim caudal de juvenis de cobias *Rachycentron canadum* criados em tanques-rede no litoral norte do Estado de São Paulo, 2011. (A) Hiperplasia dos centros de melanomacrófagos (seta). Barra = 50µm. (B) Extensas áreas de necrose no parênquima (seta). Coloração: hematoxilina e eosina. Barra = 100µm..... 37

**Figura 19.** Fotomicrografia dos cecos pilóricos de juvenis de cobias *Rachycentron canadum* criados em tanques-rede no litoral norte do Estado de São Paulo, 2011. (A) Granulomas em diferentes estágios (setas). Barra = 100µm. (B) Necrose e descamação total do epitélio de revestimento (seta). Coloração: hematoxilina e eosina. Barra = 100µm..... 38

**Figura 20.** Fotomicrografia do coração de juvenis de cobias *Rachycentron canadum* criados em tanques-rede no litoral norte do Estado de São Paulo, 2011. Infiltrado inflamatório com predomínio de linfócitos e macrófagos localizado no epicárdio (seta). Coloração: hematoxilina e eosina. Barra = 20µm..... 39

**Figura 21.** Fotomicrografia do baço de juvenis de cobias *Rachycentron canadum* criados em tanques-rede no litoral norte do Estado de São Paulo, 2011. Depleção linfoide da polpa branca (seta). Coloração: hematoxilina e eosina. Barra = 20µm..... 39

**Figura 22.** Fotomicrografia da brânquia de juvenis de cobias *Rachycentron canadum* criados em tanques-rede no litoral Norte do Estado de São Paulo, 2011. (A) Hiperplasia e fusão do epitélio das lamelas secundárias. Barra = 20µm. (B) *Trichodina* sp livres entre as lamelas secundárias (setas). Coloração: hematoxilina e eosina. Barra = 20µm..... 40

# 1. INTRODUÇÃO

A aquicultura é o setor da produção de alimentos que teve maior desenvolvimento. A produção mundial apresentou crescimento anual médio de 10% entre 1980 e 2000. Mesmo que tenha ocorrido queda na média para 6,5% ao ano entre 2002 e 2010 (FAO, 2012), a produção foi constante em todos os continentes e atingiu 90 milhões de toneladas em 2012. Neste período, só a piscicultura atendeu a metade da demanda de carne para consumo humano no mundo (FAO, 2014).

O Brasil embora possua características favoráveis para a piscicultura marinha, como extensa costa litorânea, com cerca de 8.400 quilômetros, inteiramente diversificada e boas condições climáticas (COSTA FILHO; FABREGAT; ROSA, 2013), a atividade não consta na estatística nacional (CAVALLI et al., 2009). Isto se deve à restrição da produção aos pequenos produtores e às instituições de pesquisa que produzem alevinos (ROUBACH et al., 2003) bem como falta de políticas governamentais que estimulem os produtores. Soma-se a estes fatores, a escassez de mão-de-obra qualificada, principalmente nas áreas de nutrição e sanidade. Tais deficiências refletiram-se na quantidade e qualidade dos peixes produzidos assim como nos seus custos (ROMBENSO et al., 2009).

Várias espécies de peixes marinhos possuem potencial para a piscicultura no Brasil, como a tainha (*Mugil* sp.), robalo (*Centropomus* sp.) a garoupa (*Epinephelus marginatus*), o pargo-rosa (*Pagrus pagrus*), o peixe-rei (*Odonthestes argentinensis*), a carapeba (*Eugerres brasilianus*), o mero (*Epinephelus itajara*), o badejo (*Mycteroperca bonaci*) e o cobia (*Rachycentron canadum*) que são encontrados naturalmente na costa brasileira, principalmente em águas de clima tropical (BALDISSEROTO; GOMES, 2010).

Dentre estas, o cobia foi considerado o peixe que reúne condições e características adequadas para a criação em cativeiro (CAVALLI; HAMILTON, 2009; SAMPAIO; TESSER; JÚNIOR, 2010) e por isso despertou o interesse dos empresários para a produção (CAVALLI; HAMILTON, 2007).

A espécie é dócil, adapta-se bem às características de cultivo e a reprodução em cativeiro é fácil (CAYLOR; BIESIOT; FRANKS, 1994; FAULK; HOLT, 2006). Além disso, o desempenho produtivo é caracterizado pelo rápido crescimento, de cerca de 4 a 8 quilos em um ano, e a razão de conversão alimentar relativamente baixa (1,5 :1) (BENETTI et al., 2008). No ambiente natural há registro de cobias capturados medindo de 110 a 200 centímetros de comprimento e peso máximo de 68 quilos (FRANKS; WARREN; BUCHANAN, 1999).

A produção de cobias em escala comercial iniciou-se em Taiwan na década de 90 e logo se difundiu para Ásia, Europa, América Central, EUA e América do Sul (LIAO et al., 2004). Desde que a criação de cobias tornou-se emergente em vários países, as doenças de etiologias distintas começaram a surgir em todas as idades decorrentes da intensificação da produção, alimentação artificial e da geração de estresse e depressão do sistema imune (BARTON; IWAMA, 1991; KU; LU, 2000; SPISNI et al., 1998).

As doenças de etiologia bacteriana são as mais comuns e incluem pasteurelose (LIU; LIN; LEE, 2003; LOPEZ et al., 2002), vibriose (LIU et al., 2004; LOPEZ et al., 2002; RAJAN et al., 2001) e estreptococose (CHANG; YANG; CHANG, 2006). Destas, a pasteurelose é a doença que ameaça a piscicultura marinha pelo fato do agente etiológico não possuir hospedeiro específico (MAGARIÑOS; TORANZO; ROMALDE, 1996; NOYA et al., 1995). Há relatos de elevada mortalidade em juvenil de cobias, *seabas*s, *seabream*, *yellowtail* ocasionados pela bactéria (LIU; LIN; LEE, 2003; LOPEZ et al., 2002).

A idéia do presente estudo iniciou-se em 2011, quando os alevinos de cobias do primeiro ciclo de engorda da maricultura situada no litoral norte do Estado de São Paulo apresentou mortalidade elevada atingindo taxa de mortalidade de 97% em dez meses. O plano para estabelecer o diagnóstico incluiu visitas técnicas a cada dois meses e coleta de dados da piscicultura e amostras biológicas para as análises, bacteriológica, histopatológica e parasitológica e análise da composição da ração.

# 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 2.1 O cobia (*Rachycentron canadum*)

O *Rachycentron canadum* (Linnaeus, 1766) é a única espécie representante da família Rachycentridae pertencente à ordem dos Perciformes (SHAFFER; NAKAMURA, 1989). Mundialmente é conhecido como cobia, mas dependendo do país recebeu outras denominações como, bonito negro na Argentina (MENNI; RINGUELET; ARANBURU, 1984), *black kingfish* na Austrália (LA MONTE, 1952) e India (PILLAI, 1982), *bacalao* na Colombia (MENNI; RINGUELET; ARANBURU, 1984), *mafou* na França, *sugi* no Japão (UENO, 1965). No Brasil, receberam os nomes de cobia, beijupirá, pirambijú e cação de escama (CARVALHO FILHO, 1999; FIGUEIREDO; MENEZES, 1980) (Figura 1).

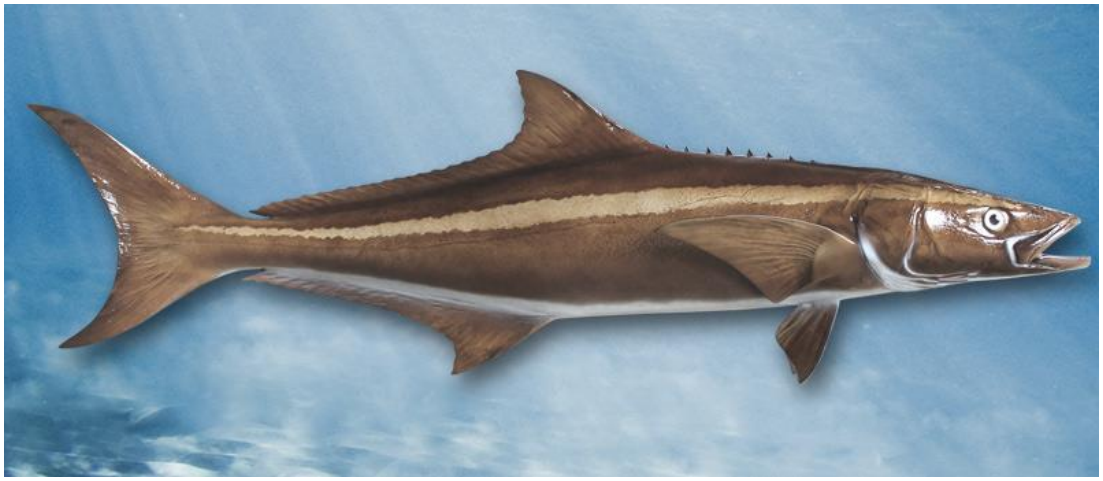


Figura 1. Cobia adulto (*Rachycentron canadum*). Fonte: http://graytaxidermy.com/gray-taxidermy-product-gallery.html

O cobia é um peixe teleósteo carnívoro (SHAFFER; NAKAMURA, 1989), pelágico costeiro que migra sozinho ou raramente em pequenos cardumes de quatro a seis. No Brasil, o hábito de não formar cardumes faz com que poucos cobias sejam capturados pelos pescadores sendo comercializados apenas para restaurantes litorâneos. Por isso, os cobias são desconhecidos pela população das cidades do interior, e mesmo, em algumas localidades do litoral, o que limita a demanda pelo peixe (CAVALLI; HAMILTON, 2009).

A distribuição do cobia é ampla, nos mares de água temperada, subtropical e tropical, com exceção do leste do oceano Pacífico e costa européia (SHAFFER; NAKAMURA, 1989). No Brasil, a espécie é encontrada em toda zona litorânea, porém, mais frequente na região Nordeste onde a temperatura da água fica em torno de 28º C (FIGUEIREDO; MENEZES, 1980).

## 2.2 Pasteurelose

A pasteurelose ou pseudotuberculose é doença bacteriana septicêmica, altamente contagiosa causada pelo *Photobacterium damselae* subsp *piscicida* que pertence à família Vibrionaceae (LIU et al., 2011).

A bactéria é bacilo gram negativo (0,8-1,3 x 1,4-4,0 µm), imóvel, oxidase e catalase positivos, fermentativo e anaeróbico facultativo. As bactérias coradas pelo método de Gram verifica-se pleomorfismo dependendo das condições de cultivo e da fase de crescimento e coloração bipolar na qual as extremidades da bactéria são mais coradas (TORANZO; MAGARIÑOS; ROMALDE, 2002).

A denominação pasteurelose associou-se à nomenclatura antiga *Pasteurella piscicida* (JANSEN; SURGALLA, 1968) e a pseudotuberculose, à característica macroscópica da lesão que lembra a micobacteriose em peixes (KIMURA; KITAO, 1971). O termo fotobacteriose é evitado por alguns autores para não confundir com as doenças ocasionadas pelas bactérias de outros gêneros de *Photobacterium* (ROMALDE, 2002).

O primeiro caso da doença foi descrito em percas brancas (*Morone americanus*) e *striped bass* (*Morone saxatilis*) selvagens, em 1963, nos EUA (SNIEZSKO et al., 1964). A partir deste relato, a doença foi identificada em *yellowtail* (*Seriolae quinqueradiata*), *black seabream* (*Mylio macrocephalus*), *red spotted grouper* (*Epinephelus akaara*) e *striped jack* no Japão (MAGARIÑOS et al., 1996), em *gilthead sea bream* (*Sparus aurata*) e *seabass* (*Dicentrarchus lablax*), solea (*Solea senegalensis* e *Solea solea*) na Europa e cobias em Taiwan (LIU; LIN; LEE, 2003; TORANZO et al., 1991).

A taxa de mortalidade na infecção natural pelo *P. damselae subsp. piscicida*, geralmente é elevada, superior a 90%, como verificada em juvenis de *atlantic bluefin tuna* (*Thunnus thynnus*) (MLADINEO; MILETIC; BOCINA, 2006), cobias (SHIMADA et al., 2011), *seabass* e *seabream* (AVCI et al., 2013) e em *golden pompano* (*Trachinotus ovatus*) (WANG et al., 2013).

A idade dos peixes parece influenciar na resistência à infecção devido à diferença na eficiência da fagocitose e degradação das bactérias pelos neutrófilos e macrófagos. *Gilthead seabream* com pesos de 0,5g e 20-30g foram injetados via intracelomática com solução contendo *P. damselae* subsp *piscicida.* O exsudato do celoma, e os fragmentos do rim e do baço foram coletados 30 minutos, 1, 5, 10, 24 e 48 horas após inoculação e a mortalidade verificada durante um mês. O rim e o baço foram analisados pela microscopia eletrônica de transmissão. Todos os peixes de 0,5g morreram em 4-5 dias. Ainda, à análise do exsudato, rim e baço mostrou a maioria das bactérias, livre no meio extracelular. As poucas bactérias fagocitadas estavam viáveis e multiplicando-se no fagolisossomo observados aos 48h. Por outro lado, nos peixes de 20-30g, a mortalidade foi nula. A maioria das bactérias foram fagocitadas e destruídas no fagolisossoma dos neutrófilos e macrófagos presentes no exsudato, no rim e no baço. (NOYA; MAGARIÑOS; LAMAS, 1995).

O efeito da idade também foi observado em cobias quando *P. damselae* subsp *piscicida* isolado de peixes com cerca de 3k foi inoculado no celoma de juvenis de 10g, os quais desenvolveram a forma aguda da doença e causou elevada mortalidade (LIU; LIN; LEE, 2003).

A indução da pasteurelose ocorreu experimentalmente, pela injeção intramuscular ou intraperitoneal, administração gástrica, por imersão em água contendo a bactéria e por coabitação, na qual um peixe doente é introduzido em tanques contendo peixes sadios (NAGANO et al., 2009).

A patogênese da doença é um processo multifatorial que depende do estado imunológico do hospedeiro, da quantidade inicial de microrganismo inoculado e dos fatores de virulência do agente patogênico (LEVIN; EDEN, 1990). Os principais fatores que influenciam de maneira negativa o estado imunológico

são: a qualidade de água ruim, densidade de estocagem elevada, desnutrição e doenças concomitantes (OBA et al., 2009).

Os fatores de virulência são produtos da expressão de genes das bactérias e incluem secreção de proteínas como toxinas e enzimas, estruturas da superfície celular como polissacarídios capsulares e lipopolissacarídios e proteínas da membrana externa (BROGDEN et al., 2000; CHEN et al., 2005). Estes elementos participam da adesão, colonização e invasão das células do hospedeiro que são essenciais no início da infecção (KLEMEN et al., 2010). Em *gilthead seabream, seabass* e *turbot*, *P damselae* subsp *piscicida* mostrou alta afinidade para adesão à mucosa intestinal com valores variando de $10^4$ a $10^5$ bactérias/g (MAGARIÑOS et al., 1996). Após invasão do tecido, a bactéria apresentou capacidade de permanecer viável por sete dias em linhagens de células não fagocíticas derivadas de *gilthead seabream.* Este fato permitiu às bactérias evadirem dos mecanismos de defesa do hospedeiro e da ação dos antimicrobianos e tornou a infecção persistente além de servir como carreador da bactéria (ACOSTA et al., 2009; LÓPEZ-DORIGA et al., 2000; SALYERS; WHITT, 1994).

Outros mecanismos que possibilitaram a *P. damselae* subsp *piscicida* evadir do sistema de defesa do hospedeiro incluem capacidade de induzir apoptose de neutrófilos e macrófagos (VALE; MARQUES; SILVA, 2003) e de resistir à fagocitose (VALE; ELLIS; SILVA, 2001).

A atividade apoptogênica foi verificada em neutrófilos e macrófagos do exsudato da cavidade celomática de todos os *seabass* inoculados com a cepa virulenta de *P. damselae* subsp *piscicida* e com o sobrenadante da cultura. O sobrenadante foi utilizado para averiguar a possibilidade da atividade estar relacionada com as proteínas secretadas pela bactéria (VALE; MARQUES; SILVA, 2003).

A resistência da *P. damselae* subsp *piscicida* à fagocitose foi associada à presença de cápsula de natureza polissacarídica (VALE; ELLIS; SILVA, 2001).

A capacidade em captar o ferro do hospedeiro é mais acentuada nas cepas virulentas de *P. damselae subsp piscicida.* Os métodos desenvolvidos pelas bactérias envolvem os sideróforos que permitem captar o ferro do

grupamento heme da hemoglobina e da ferritina e utilizá-lo para a própria multiplicação (VALE et al., 2002). O ferro participa também da expressão do material capsular. A *P. damselae subsp piscicida* semeada em meio suplementado ou não com ferro foi analisada pela microscopia eletrônica e observou-se que a quantidade de material capsular era significativamente maior nas bactérias semeadas em meio com ferro (VALE et al., 2001).

Outro fator importante da patogenicidade é a capacidade da *P. damselae subsp piscicida* sintetizar os produtos extracelulares (ECP) com efeitos citotóxicos, hemolíticos e de fosfolipase que culminam com necrose das células (BAKOPOULOS et al., 2004; LIU; LIN; LEE, 2003;). A inoculação de ECP foi letal para cobias com 10g com DL50 de 1,26µg do ECP/grama de peso corpóreo do peixe (LIU; LIN; LEE, 2003).

Os achados necroscópicos da pasteurelose dependem da forma clínica e são semelhantes, independente da espécie afetada (MAGARIÑOS et al., 1996). Na forma aguda, geralmente não são observadas alterações externas, mas quando presentes caracterizam-se por leve enegrecimento do corpo e/ou discreta hemorragia na cabeça e brânquias. Na forma crônica da infecção natural, verificaram-se alterações em órgãos internos, principalmente, fígado, baço e rim, caracterizadas pela presença de nódulos esbranquiçados, com cerca de 0,5 a 3,5 milímetros de diâmetro (SHIMADA et al., 2011).

Na microscopia, observaram-se filamentos branquiais secundários colapsados e na parte basal, colônias de bactérias no interior dos vasos sanguíneos. O rim, baço e fígado apresentavam necrose multifocal e acumulação de bactérias nos capilares e espaço intersticial (livres e/ou no interior de fagócitos). Os nódulos correspondiam às lesões granulomatosas compostas pelas células epitelióides que circundavam um centro necrótico contendo colônias de bactérias e detritos celulares (NAGANO et al., 2009).

O diagnóstico de pasteurelose geralmente é baseado em métodos microbiológicos (WANG et al., 2013). Para o isolamento da bactéria podem ser utilizados meios de cultura como tryptic soybean ágar (TSA), brain heart infusion ágar (BHIA) e ágar sangue, todos com adição de 1% a 3% de cloreto de sódio (NaCl), ou em marine ágar 2216E. A incubação é realizada em condição de

aerofilia em temperatura que varia entre 22ºC e 28ºC. Dependendo da temperatura utilizada para a incubação, o tempo para o isolamento da bactéria pode variar de 2 a 4 dias. Para a identificação rápida da bactéria utiliza-se o sistema miniaturizado colorimétrico baseado em provas bioquímicas (kit API-20E). Embora, a *P. damselae subsp piscicida* não esteja incluída no índice de código do kit todas as cepas apresentam padrão similar e não se observa reação falso-positiva ou falso-negativa (SANTOS et al., 1993).

O diagnóstico definitivo é realizado pela reação em cadeia pela polimerase e sequenciamento de genes 16S RNA ribossômico (OSÓRIO et al., 1999, 2005).

Apesar de a pasteurelose representar séria ameaça para a piscicultura marinha, ainda não há medidas preventivas eficientes contra a doença (ANDREONI; MAGNANI, 2014).

## 2.3 Esteatose hepática em peixes marinhos

O fígado desempenha função importante no metabolismo lipídico como síntese e degradação de ácidos graxos que são realizados pelas enzimas lipogênicas e lipolíticas, respectivamente (CARVALHO; FERNANDES, 2008). O desenvolvimento da esteatose ocorre quando a ingestão excessiva (ou desequilibrada) de lipídios excede a capacidade metabólica dos hepatócitos (TACON, 1996).

O desequilíbrio nutricional é comum em peixes marinhos cultivados resultante da utilização de dieta artificial (SPISNI et al., 1998); inclusão de óleos vegetais (ALEXIS, 1997) e deficiência de ácidos graxos essenciais (AGE) (MONTERO et al., 2001).

Os fragmentos de fígado de *gilthead seabream* (*Sparus aurattus*) e *sea bass* (*Dicentrarchus labrax*) alimentados com dieta natural e artificial por 67 e 53 dias, respectivamente, foram coletados para análise histológica. Os peixes alimentados com dieta artificial desenvolveram esteatose mais severa e extensa. Com a introdução da dieta natural verificou-se, após dois meses, a regressão da

esteatose, caracterizada microscopicamente pela redução da extensão da lesão (SPISNI et al., 1998).

O efeito da substituição do óleo e farinha de peixe por óleos vegetais e os respectivos níveis de inclusão foi verificado na dieta de peixes marinhos como *seabass* (*D. labrax*) e *giltheah seabream* (*S. aurata*). Neste estudo verificou-se que os óleos vegetais, como de soja e de oliva, não atenderam os requerimentos de ácidos graxos essenciais para as espécies estudadas, se usados sozinhos como suplemento de óleo, resultando em severo acúmulo de lipídio nos hepatócitos. Esta alteração foi suprimida quando a dieta foi suplementada com óleo de peixe (ALEXIS, 1997).

A alteração pode ser observada também em peixes marinhos com exposição crônica aos diversos poluentes aquáticos como, inseticidas (BRAUNBECK et al., 1990), herbicidas e metais pesados (CHEN et al., 2013; PESONEN; ANDERSSON, 1997) por ser o fígado responsável também pelo metabolismo de xenobióticos (SOLÉ et al., 2009).

Os metais pesados como cobre, zinco, ferro, manganês que por um lado são elementos essenciais para as reações químicas dos organismos vivos podem desenvolver alterações funcionais e morfológicas hepáticas nas exposições crônicas às quantidades superiores às fisiológicas (PESONEN; ANDERSSON, 1997).

O efeito no metabolismo lipídico hepático, após exposição crônica à concentrações de 57 e 118µg/L de cobre durante 30 dias, foi estudado em *Synechogobius hasta.* Na coloração com *oil red* O mostrou extensa esteatose hepática associado ao aumento das enzimas das vias metabólicas lipogênicas responsáveis pela síntese de lipídios (CHEN et al., 2013)

O fígado com esteatose apresenta palidez e aumento de volume do parênquima e consistência mole. Na histologia, observa-se macrovacúolos bem delimitados no citoplasma dos hepatócitos com deslocamento do núcleo para a periferia (SPISNI et al., 1998).

Embora o fígado possua grande reserva funcional, esteatose extensa e severa que afeta mais de 70% do parênquima hepático pode desenvolver insuficiência hepática e causar elevada taxa de mortalidade e retardo no

crescimento. O mecanismo de defesa pode ser afetado já que o fígado sintetiza vários componentes do sistema imune como imunoglobulinas, complemento, proteínas da fase aguda da inflamação (ROBERTS, 1989).

## 2.4 Histofisiologia de peixes teleósteos

A análise histológica dos órgãos permite detectar sinais das doenças que não são identificadas no exame macroscópico e auxiliar na supervisão da saúde dos peixes embora não seja considerado diagnóstico definitivo (GENTEN; TERWINGHE; DANGUY, 2009).

### 2.4.1 Brânquias

Os peixes possuem em cada lado da cabeça, quatro arcos branquiais protegidos pelo opérculo. De cada arco irradiam-se duas fileiras de filamentos ou lamelas primárias. Perpendicularmente às estas lamelas encontram-se as lamelas secundárias com extensa área revestida por epitélio delgado (Figura 2). Esta característica permite eficiente absorção de oxigênio e liberação de gás carbônico, mas também torna as brânquias vulneráveis à invasão dos patógenos e ação dos contaminantes. Outras funções incluem controlar as trocas de íons sódio e água e excretar resíduos de nitrogênio como a amônia. Por isso, o dano estrutural das brânquias causam deficiência na osmorregulação e dificuldade respiratória (MUMFORD et al., 2007).

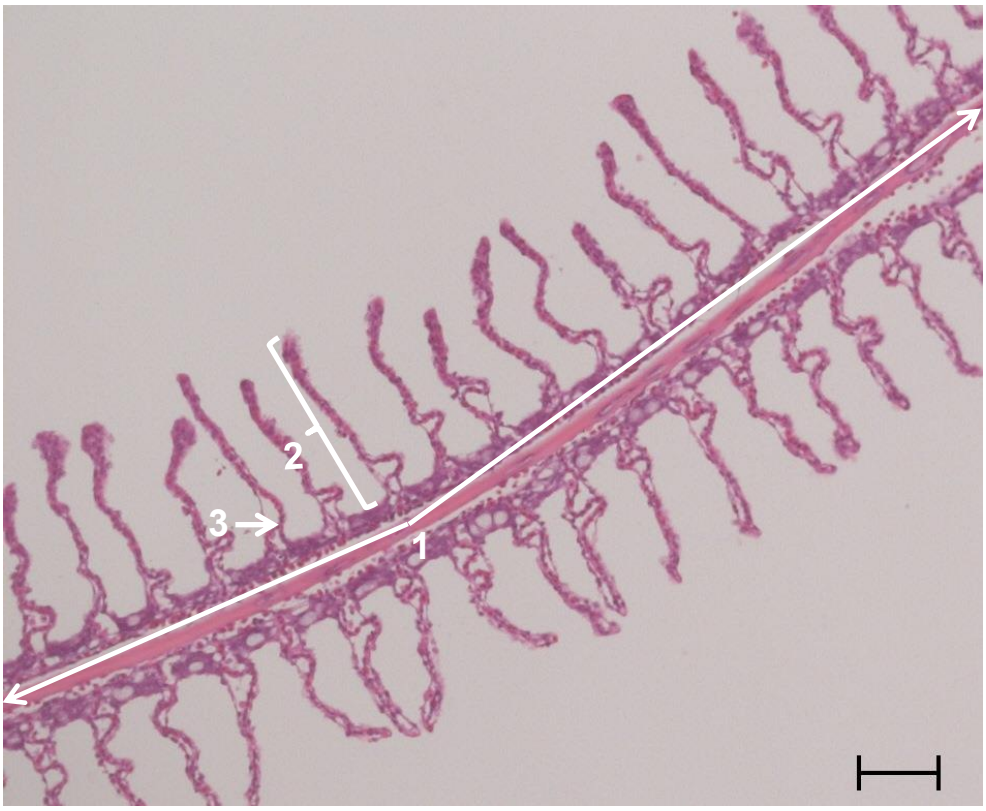



Figura 2. Fotomicrografia da brânquia normal de cobia (*Rachycentron canadum*). Corte longitudinal da lamela primária (1) e lamelas secundárias (2) contendo capilares (3). HE. Barra=50µm.

### 2.4.2 Coração

O coração dos peixes localiza-se na região caudo-ventral da cavidade branquial. O sangue bombeado pelo coração segue para as os arcos branquiais onde ocorre a oxigenação pela difusão através do epitélio das lamelas branquiais. Em seguida, o sangue flui para a aorta dorsal, artérias e capilares periféricos e retorna para o coração onde passa pelas quatro câmaras na seguinte sequencia: *sinus* venoso, átrio, ventrículo e bulbo arterioso (Figura 3). A parede consiste de três camadas de tecido: o epicárdio, o miocárdio e o endocárdio (GENTEN; TERWINGHE; DANGUY, 2009; HOAR, FARREL; HANDALL, 1992).

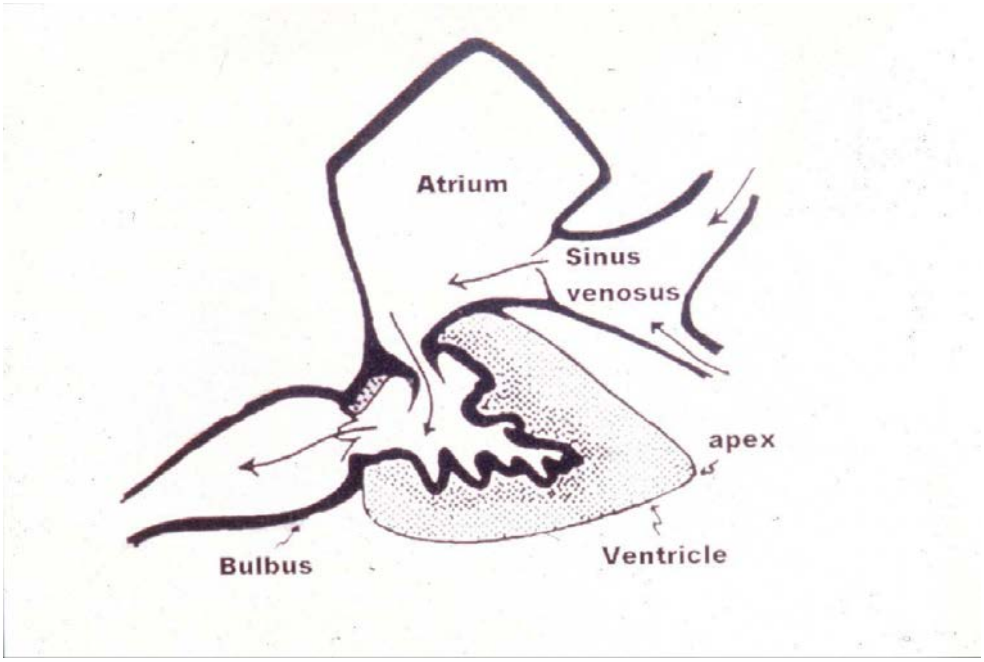



Figura 3. Estrutura anatômica do coração e o fluxo de sangue nas câmaras de peixes teleósteos. Fonte: MUMFORD et al., 2007.

### 2.4.3 Cecos pilóricos

O ceco pilórico é um saco cego com início na válvula pilórica do estômago e possui função de digestão e absorção. É estrutura presente em várias espécies como salmonídeos e em cobias. A estrutura histológica é caracterizada pelas quatro camadas que consistem na mucosa, submucosa, camada muscular e adventícia. A mucosa é constituída de epitélio, lâmina própria e muscular da mucosa (MUMFORD et al., 2007).

### 2.4.4 Fígado

O fígado é órgão relativamente grande e marrom avermelhado envolvido pela cápsula de Glisson, mas pode se apresentar pálido em peixes cultivados devido à ingestão de dieta artificial e desequilíbrio nutricional (INFANTE et al., 2008).

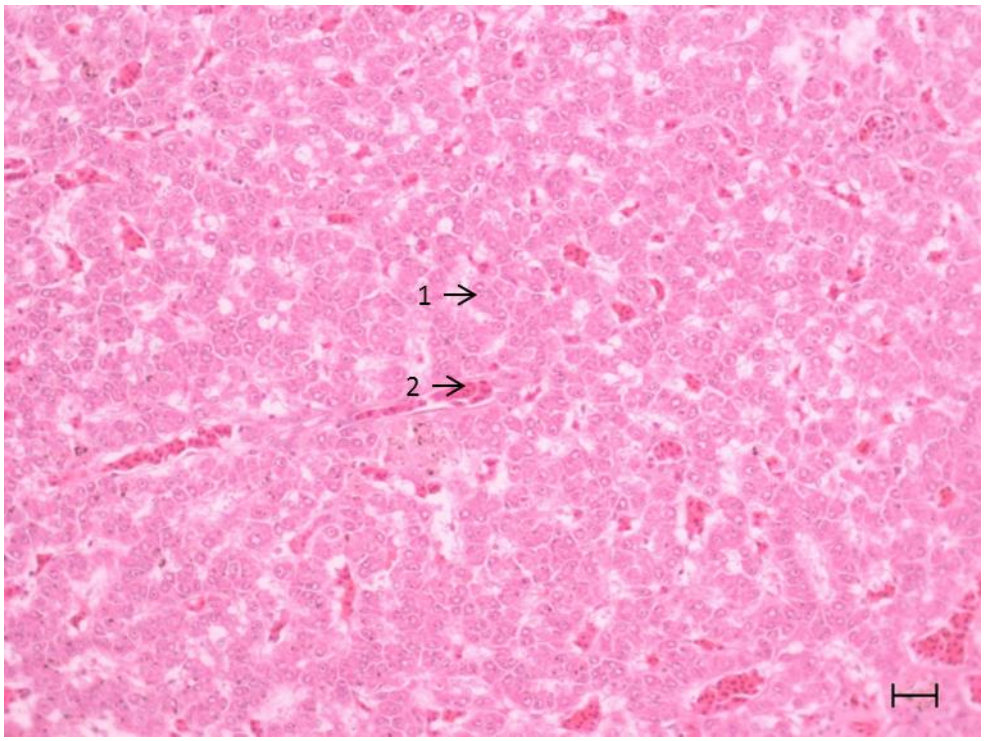



Figura 4. Fotomicrografia do fígado normal de cobia (*Rachycentron canadum*). 1- hepatócitos, 2- sinusoide. HE. Barra=100µm.

Os hepatócitos (Figura 4-1) são as principais células que compõem o fígado. Eles apresentam formato poligonal com núcleo proeminente e, forma cordões distribuídos de maneira irregular entre os sinusoides. Diferente dos mamíferos, os cordões de hepatócitos, os lóbulos e o espaço Porta são pouco evidentes no fígado dos peixes (WOLF; WOLFE, 2005).

Os sinusoides são os capilares dilatados (Figura 4-2) responsáveis por transportar nutrientes e oxigênio aos hepatócitos e remover os metabólitos. Na parede destes capilares localizam-se as células de Kuppfer, macrófagos que captam e inativam os microrganismos provenientes do intestino antes de atingirem o organismo (MUMFORD et al., 2007).

O tecido hepático exerce função central no metabolismo, conversão e transferência de nutrientes para tecidos periféricos, produz e secreta bile no intestino para a digestão de gordura, excreta os metabólitos e participa dos processos de detoxificação (NOWAK; BRUNO, BRYAN et al., 2001).

O fígado é susceptível a alterações causadas por substâncias tóxicas e distúrbios nutricionais. (VELKOVA-JORDANOSKA; KOSTOSKI, 2005). A necrose

é a alteração mais frequente e observada em situações tóxicas de origem viral, bacteriana, micótica, e quando pesticidas ou metais pesados se encontram presentes na água (ROBERTS, 2001).

### 2.4.5 Baço

O baço é um dos tecidos hematopoiéticos que suprem a necessidade da ausência de linfonodos e de medula óssea em peixes, junto com o rim. O órgão localiza-se próximo à curvatura maior do estômago ou nas flexuras do intestino. Embora na maioria seja único, em algumas espécies podem ser divididas em dois ou mais baços menores (IWAMA; NAKANISHI, 1996).

As funções do baço incluem: filtração de sangue, destruição de células alteradas e senescentes, e armazena hemácias para uso imediato. Portanto, as alterações neste órgão são observadas em inflamações sistêmicas, desordens hematopoiéticas e distúrbios metabólicos (MUMFORD et al., 2007).

O baço é envolvido por delgada cápsula fibrosa que delimita o parênquima. A maior parte do parênquima é constituída pela polpa vermelha composta pelo sistema de cordões esplênicos formados por célula semelhantes aos fibroblastos e capilares sinusoidais. A polpa branca consiste principalmente de células linfoides presentes ao redor das arteríolas, centros de melanomacrófagos e células elipsoides. Nos teleósteos, a polpa branca e a vermelha encontram-se difusos no parênquima (GENTEN; TERWINGHE; DANGUY, 2009).

### 2.4.6 Rim

O rim dos peixes teleósteos localiza-se na região retroperitonial aderido à porção ventral da coluna vertebral. O órgão é dividido em duas porções: o rim anterior, cefálico ou hematopoiético e o posterior, caudal ou excretório. Os ureteres fundem-se posteriormente e formam a bexiga que excretam a urina pelos ductos urinários para o orifício localizado no ânus.

A unidade funcional do rim caudal é o néfron que varia em tamanho e comprimento entre os peixes marinhos e de água doce e os eurialinos. Todavia, a arquitetura celular básica é similar. Assim, cada néfron é formado pelos corpúsculos renais onde ocorre a formação do ultrafiltrado do sangue que flui para o sistema de túbulo para formar a urina. A principal função do rim caudal é a osmorregulação de água e sal bem como de excreção de resíduos nitrogenados que é realizado também pelas brânquias. Em peixes marinhos, o balanço hidroeletrolítico é mantido pela conservação da água nos túbulos distais e eliminação de sal pelos túbulos proximais (MUMFORD et al., 2007).

O rim cefálico possui poucos túbulos e o estroma é composto por células tronco indiferenciadas, células adrenocorticais e centros de melanomacrófagos, que são observados também no interstício do rim caudal. A função hematopoiética ocorre com predomínio no rim cefálico e no interstício do rim posterior onde serve também como suporte para os túbulos renais e glomérulos (GENTEN; TERWINGHE; DANGUY, 2009).

### 2.4.7 Centros de melanomacrófagos

Os centros de melanomacrófagos (CMM) são comumente nodulares e consiste em agrupamento de macrófagos pigmentados delimitado por cápsula argirofílica delgada que são encontrados próximos aos vasos sanguíneos no baço, no rim e no fígado. Os pigmentos podem ser melanina, hemossiderina, lipofuscina e ceróide presentes isolados ou associados (AGIUS, 1985; MANRIQUE et al., 2014).

A aparência morfológica do CMM pode variar entre diferentes espécies, órgãos e em diferentes condições fisiológicas dentro da mesma espécie como: idade, jejum, degradação tecidual, metabolismo de hemoglobina e ferro, condições inflamatórias e processos imunológicos como a fagocitose de antígenos (MESSEGUER et al., 1994).

As funções sugeridas para CMM estão associados com reciclagem de material endógeno e exógeno, detoxificação, acúmulo de patógenos resistentes

como *Mycobacterium* sp. e processamento de antígenos na resposta imune (GENTEN; TERWINGHE; DANGUY, 2009).

## 3. OBJETIVOS

### 3.1 GERAL

Estabelecer diagnóstico de elevada mortalidade em juvenis de cobias (*Rachycentron canadum)* criados em tanques-rede no litoral norte do Estado de São Paulo-Brasil.

### 3.2 ESPECÍFICOS

- Caracterizar as alterações morfológicas em cortes histológicos de tegumento, brânquias, coração, fígado, baço, rim e cecos pilóricos de juvenis de cobias.

- Realizar exame bacteriológico do cérebro, coração, fígado, baço e rim de juvenis de cobias com alterações morfológicas.

- Realizar coleta e identificação de parasitas da superfície externa de juvenis de cobias.

- Analisar os lipídios totais e o conteúdo de ácidos graxos essências na ração comercial oferecida aos juvenis de cobias.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local da coleta de juvenis de cobias e das amostras biológicas

Os juvenis de cobias com comprimento total e peso médio de (27,5 ± 2,3) centímetros e (229,6 ± 84,4) gramas foram obtidos em maricultura comercial localizada na ilha do Saco do Poço, em Ilhabela (23°48'54"S 45°22'14"O) no litoral norte do Estado de São Paulo. O trajeto da praia do Perequê onde

embarcávamos em lancha, até o destino na ilha do Saco tinha duração de uma hora contornando Ilhabela pelo norte (Figura 5).

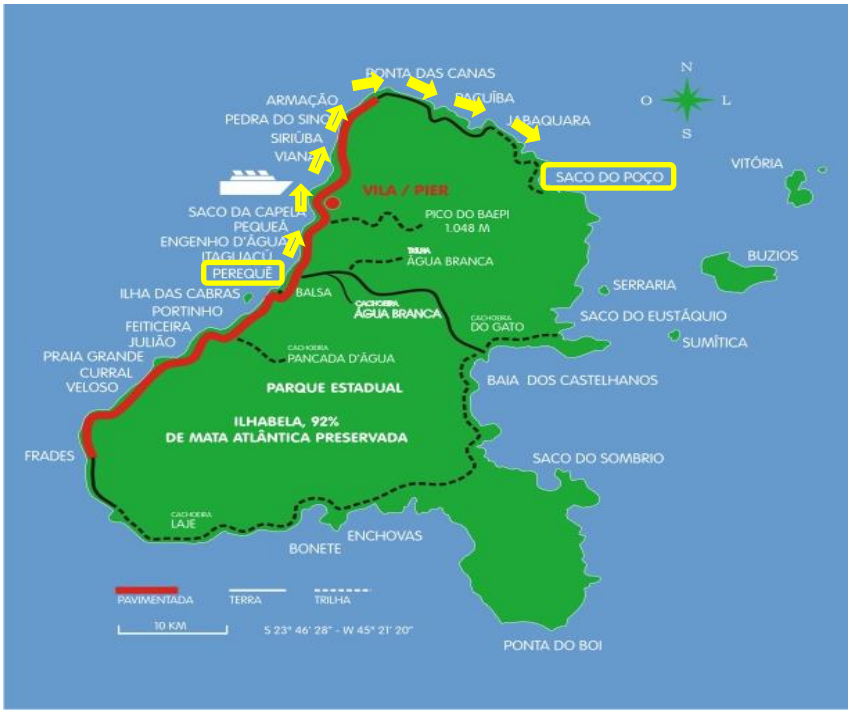



Figura 5. Mapa mostrando o trajeto realizado para chegar à ilha do Saco do Poço onde se situava a maricultura em Ilhabela, no litoral norte do Estado de São Paulo. Fonte: www.datailhamoveis.com.br

A maricultura iniciou o primeiro ciclo de engorda de cobias em novembro de 2010 colocando 24.000 alevinos com peso acima de 1,5 grama, distribuídos em dois tanques-rede circulares com capacidade de dez metros cúbicos. Os alevinos eram provenientes do único produtor de alevinos de cobias, em 2010, situado no bairro da Bexiga em Ilhabela.

Em janeiro de 2011, a maricultura entrou em contato com o laboratório de Ictiopatologia da Unesp/Jaboticabal devido à elevada mortalidade dos juvenis de cobias. Para identificar a causas da mortalidade, em março, a equipe coletou amostras biológicas de oito peixes para análise histopatológica. Após a análise constatou-se presença de lesões granulomatosas sugestivas de pasteurelose, doença bacteriana causada pela *Photobacterium damselae* subsp *piscicida*. Diante da suspeita, dos dezessete, treze e oito peixes destinados para a coleta de órgãos para análise histopatológica nos meses de maio, julho e setembro,

respectivamente, cinco peixes foram destinados para coleta de amostras para isolamento e identificação da bactéria (Tabela 1).

As amostras biológicas foram coletadas em laboratório móvel montado a 150 metros dos tanques-rede (Figura 6). Nos meses das coletas, a temperatura foi o único parâmetro obtido da água e apresentou variação de 19º C a 28º C.

Tabela 1. Juvenis de cobias criados em tanques-rede no litoral norte do Estado de São Paulo, 2011 utilizados para coleta de amostras biológicas destinadas às análises bacteriológica e histopatológica. Jaboticabal-SP, 2015.

| | Peixes coletados para as análises | |
|---|---|---|
| Mês da coleta | Bacteriologia | Histopatologia |
| Março | - | 8 |
| Maio | 5 | 17 |
| Julho | 5 | 13 |
| Setembro | 5 | 8 |

4.2 Anamnese, biometria e eutanásia de juvenis de cobias

Durante as visitas foram obtidas dados sobre a produção, manejo alimentar e sanitário de cobias da maricultura situada no litoral norte do Estado de São Paulo.

Somente os peixes letárgicos que nadavam isolados na superfície, com sinais clínicos de lesões erosivas e ulcerativas em nadadeiras e tegumento e despigmentação do tegumento foram capturados com puçá e destinados para a necropsia e coleta das amostras biológicas.

A eutanásia dos juvenis de cobias foi realizada pelo aprofundamento do plano anestésico com cloridrato de benzocaína na dose de 100 mg $L^{-1}$, de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e aprovada pelo Comissão de Ética no Uso de Animais da Unesp/Jaboticabal (Protocolo nº 016000/12) (Anexo 1).

Os dados de peso (g) e comprimento (cm) de juvenis de cobias foram obtidos em peixes coletados em maio e setembro.



Figura 6. Casa localizada na encosta da montanha onde foi montada o laboratório móvel para coleta das amostras de juvenis de cobias destinadas às análises bacteriológica e histopatológica, 2011. Cortesia: Profa. Dra. Julieta Rodini Engrácia de Moraes.

## 4.3 Identificação parasitológica

Os parasitas observados durante a análise macroscópica externa de juvenis de cobias foram fixados e conservados de acordo com as técnicas descritas por Eiras, Takemoto e Pavanelli (2006) e enviados ao laboratório de Ictioparasitologia da Universidade Estadual de Maringá, para identificação.

## 4.4 Exame bacteriológico

Antes de proceder à análise macroscópica dos órgãos, os fragmentos de cérebro, coração, fígado, baço e rim foram coletados assepticamente (n=15), colocados cada um, em tubos Falcon estéreis contendo quarenta mililitros de caldo BHI (Brain Heart Infusion) (Difco®) e mantidos refrigerados. Os tubos foram colocados em caixas de isopor contendo gelo e enviados via Sedex para o laboratório de Camarões Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) onde foi entregue no máximo 48 horas após a postagem.

No laboratório, os órgãos foram semeados em placas de Petri contendo ágar BHI (Brain Heart Infusion) adicionado de 1% NaCl (Difco®) e incubado a 28º C por 48h. As colônias puras foram repicadas em placas contendo tryptone soy agar (TSA) adicionado com 5% de sangue de carneiro (Difco®) e 1% de NaCl e/ou BHI (Brain Heart Infusion) (Difco®) adicionado de 1% NaCl (Difco®). As culturas puras foram colocadas em tubos Falcon contendo tryptone soy broth (TSB) (Himmedia®) e glicerol adicionado de 1% de NaCl e congeladas em *ultrafreezer* (- 80º C).

A bactéria foi caracterizada pelo kit API20E, sistema miniaturizado de identificação rápida e colorimétrica composta de 20 provas bioquímicas (BioMerieux® SA, France). O diagnóstico definitivo foi realizado pela reação em cadeia pela polimerase (PCR) no laboratório de Doenças de Animais Aquáticos (Aquavet) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) de acordo com o protocolo descrito por Mian et al., 2009.

Cinco fragmentos de fígado foram colocados em tubos contendo solução fisiológica e enviados para Universidade Federal de São Carlos onde se realizou a pesquisa para *Mycobacterium*.

## 4.5 Análise histopatológica

Após o exame macroscópico, os fragmentos de tegumento, brânquias, coração, fígado, rim, baço e cecos pilóricos foram coletados e fixados em formalina tamponada 10%, por 48 horas. A conservação posterior foi feita em álcool 70% até o momento do processamento histológico de rotina realizado no laboratório de Ictiopatologia do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV/Unesp.

Os fragmentos de órgãos emblocados em parafina foram seccionados em cinco micrômetros de espessura e corados pelos métodos de Hematoxilina-Eosina e *Ziehl-Neelsen* (LUNA, 1968). Os fragmentos de fígado congelados em nitrogênio líquido foram seccionados no criostato em cinco micrômetros e corados pelo método *Sudan-Black* (PEARSE, 1968) que confere coloração negra aos glóbulos de gordura quando há suspeita de esteatose.

A coloração de tricrômio de Masson foi utilizada para evidenciar as fibras colágenas do tecido conectivo que circunda as lesões granulomatosas. O exame dos cortes histológicos e as alterações estruturais descritas foram realizados com o auxílio de microscópio de luz (Carl Zeiss Primo Star®) e as fotomicrografias das alterações histológicas obtidas com o auxílio do *software* Axio Vision®.

### 4.6 Extração de lipídio total e composição de ácidos graxos na ração

A ração fornecida para os cobias criados em maricultura de Ilhabela foi submetida à análise de composição dos ácidos graxos realizada no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (USP).

Os lipídios totais foram extraídos com clorofórmio: metanol: água (2:1:0,5) de acordo com o método de Bligh e Dyer (1959) e a mensuração realizada de acordo com Folch et al. (1957).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Anamnese e biometria

As principais queixas do maricultor eram o retardo no crescimento e a elevada mortalidade. A maricultura iniciou a criação de cobias para engorda em novembro de 2010 com aproximadamente 24.000 alevinos. Na última visita realizada em setembro de 2011 restavam cerca de 500 peixes que resultou em taxa de mortalidade aproximada de 97,9%.

Diante ao alto índice de mortalidade, os proprietários forneceram aos peixes, o antibiótico florfenicol (Aquaflor®) durante 10 dias, veiculados na ração. Todavia não observaram efeitos sobre os sinais clínicos e nem diminuição da mortalidade.

De início, os alevinos foram distribuídos em dois tanques-rede circulares com flutuadores de PEAD (polietileno de alta densidade) com

capacidade de 10m$^3$ (Figura 7) e posteriormente, em quatro tanques com as mesmas características.

Os peixes eram alimentados duas vezes ao dia até a saciedade, com ração comercial para peixes carnívoros (Anexo 3). Pelo fato dos cobias criados em Angra dos Reis apresentarem um ótimo crescimento com a alimentação baseada em rejeito da pesca (*by catch*), que são peixes não comercializados, a maricultura de Ilhabela adotou a inclusão do rejeito, a partir de julho de 2011. O rejeito da pesca era triturado em liquidificador ou cortada em pedaços menores com faca para facilitar a apreensão pelos juvenis de cobias.

A limpeza das telas dos tanques-rede era realizada a cada 15 dias para remoção de macroalgas e matéria orgânica e, evitar a adesão de agentes patogênicos como bactérias e parasitas. Para a substituição, a tela suja era envolvida pela tela limpa, e em seguida, a suja era desamarrada dos flutuadores sem manipular os peixes, evitando dessa maneira, o estresse. As telas sujas eram estendidas sobre rocha situada na encosta da montanha e submetidas à lavagem com lavadora de alta pressão.

Os dados biométricos de peso (g) e comprimento total (cm) dos cobias coletados estão listados na Tabela 1.

Tabela 2. Média e desvio padrão do comprimento total (cm) e do peso (g) de cobias coletadas no Litoral Norte do Estado de São Paulo em maio e setembro de 2011.

| **Mês** | **Comprimento (cm)** | **Peso (g)** |
|---|---|---|
| maio (n=17) | 27,5 ± 6,4[a] | 132,5 ± 43,1[a] |
| setembro (n=8) | 28,0 ± 2,6[a] | 153,3 ± 48,5[a] |

Como pode ser observado, o valor médio das medidas de comprimento e peso dos peixes avaliados não se alteraram nos períodos avaliados o que demonstra retardo no crescimento, indicativo de doença na criação.



Figura 7. Tanque-rede circular com flutuadores de PEAD (seta) da maricultura comercial situada no litoral Norte do Estado de São Paulo, 2011. Cortesia: profa. Dra. Julieta Rodini Engrácia de Moraes.

## 5.2 Exame bacteriológico

A caracterização e identificação da bactéria isolada pelo kit API20E e a reação em cadeia pela polimerase foram compatíveis com a *Photobacterium damselae* subsp *piscicida* (Anexo 2).

## 5.3 Alterações macroscópicas

No exame externo constatou-se aumento de volume abdominal decorrente do acúmulo de líquido no celoma, lesões erosivas e ulcerativas no tegumento e nadadeiras, com exposição óssea (Figura 8A), despigmentação do tegumento (Figura 8B), atrofia muscular.

Os parasitas, *Neobenedenia melleni* (Figura 9A) e *Tuxophorus caligodes* (Figura 9B), foram identificados em dez e quatro peixes, respectivamente, e estavam presentes principalmente na cabeça.

O fígado de aproximadamente 94% dos juvenis de cobias apresentava aumentado de volume, amarelado e consistência macia e friável (Figura 10A).

Todos os fígados examinados apresentavam nódulos esbranquiçados difusos ou multifocais com cerca de três milímetros de diâmetro (Figura 10B). Em 15% dos peixes foram observados rim aumentado e com nodulações por todo o parênquima (Figura 11). Nos demais órgãos não foram constatados alterações macroscópicas.

## 5.4 Alterações microscópicas

No presente trabalho, as alterações histológicas foram observadas no fígado, cecos pilóricos e rim e eram caracterizadas como, degenerativa, necrótica e inflamatória.

### 5.4.1 Fígado

Todos os fígados coletados em março, maio e julho apresentavam extensas áreas contendo vacuolização bem definida no citoplasma dos hepatócitos acompanhado de deslocamento do núcleo para a periferia (Figura 12A). A coloração de *Sudan Black* realizada nos cortes congelados de fígado corou os vacúolos do citoplasma dos hepatócitos em negro confirmando o quadro de esteatose (Figura 12B).

Com a inclusão do rejeito da pesca observou-se redução da severidade e da extensão da área do tecido hepático afetado pela esteatose. A redução foi caracterizada pelo predomínio de hepatócitos com microvacúolos no citoplasma e áreas contendo hepatócitos de aspecto normal (Figura 13A). Ainda se verificou nestes fígados, congestão dos sinusóides principalmente próximos à superfície do órgão (Figura 13B).

Em 92% dos peixes foram observados granulomas com centro necrótico contendo aglomerações de bactérias (Figura 14 A e B), delimitadas por camadas de células epitelioides, macrófagos, raros linfócitos e extensa fibroplasia (Figura 15A e B). A coloração de *Ziehl Neelsen* não identificou os bacilos álcool ácido resistentes (Figura 16). Os estágios de formação do granuloma com inicio nas áreas de necrose de hepatócitos e posterior infiltração e formação de densos

agrupados de macrófagos também estavam presentes (Figura 17). Todos os peixes com granulomas apresentavam canalículos biliar com necrose do epitélio e infiltrado macrofágico.

### 5.4.2 Rim

Todos os cortes histológicos correspondiam ao rim caudal. Cerca de 50% dos peixes apresentavam hiperplasia do centro de melanomacrófagos (Figura 18A). Extensas áreas de necrose contendo material arroxeado foram observadas no rim de peixes que apresentavam nódulos esbranquiçados (Figura 18B). Os granulomas com as mesmas características daqueles presentes no fígado foram observados em 18% dos peixes.

### 5.4.3 Cecos pilóricos

Cerca de 50% dos peixes apresentavam granulomas nos cecos pilóricos. Além disso, observou-se necrose do epitélio de revestimento acompanhado de infiltrado inflamatório acentuado na mucosa e submucosa do órgão (Figura 19).

### 5.4.4 Coração e baço

O infiltrado inflamatório com predomínio de linfócitos e macrófagos foi observado no epicárdio de aproximadamente 34% dos peixes (Figura 20). No baço observou-se depleção linfoide da polpa branca em 4,5% dos peixes (Figura 21).

### 5.4.5 Brânquias

Das brânquias de 35 peixes analisadas, todos apresentavam hiperplasia segmentar multifocal das lamelas secundárias (Figura 22A). Em dois peixes foram observados parasitas compatíveis com *Trichodina* sp sendo que um deles apresentava cerca de 20 parasitas inseridas nas lamelas secundárias ou livres entre elas (Figura 22B).

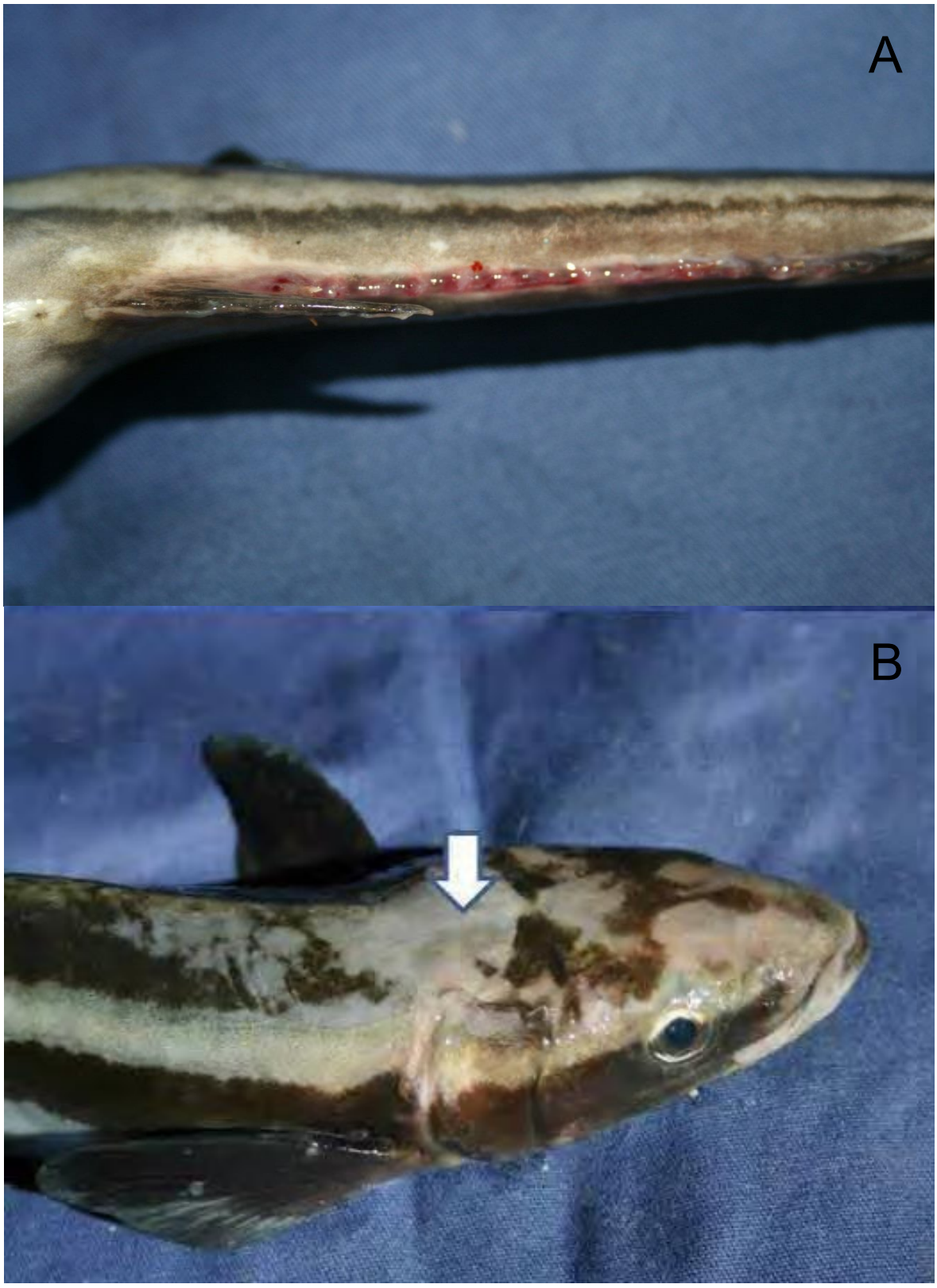



Figura 8. Alterações macroscópicas em juvenis de cobias *Rachycentron canadum* criados em tanques-rede no litoral norte do Estado de São Paulo, 2011. (A) Ulceração da nadadeira dorsal com exposição óssea. (B) Despigmentação do tegumento (seta). Cortesia: Prof. Dr. Flávio Ruas de Moraes.

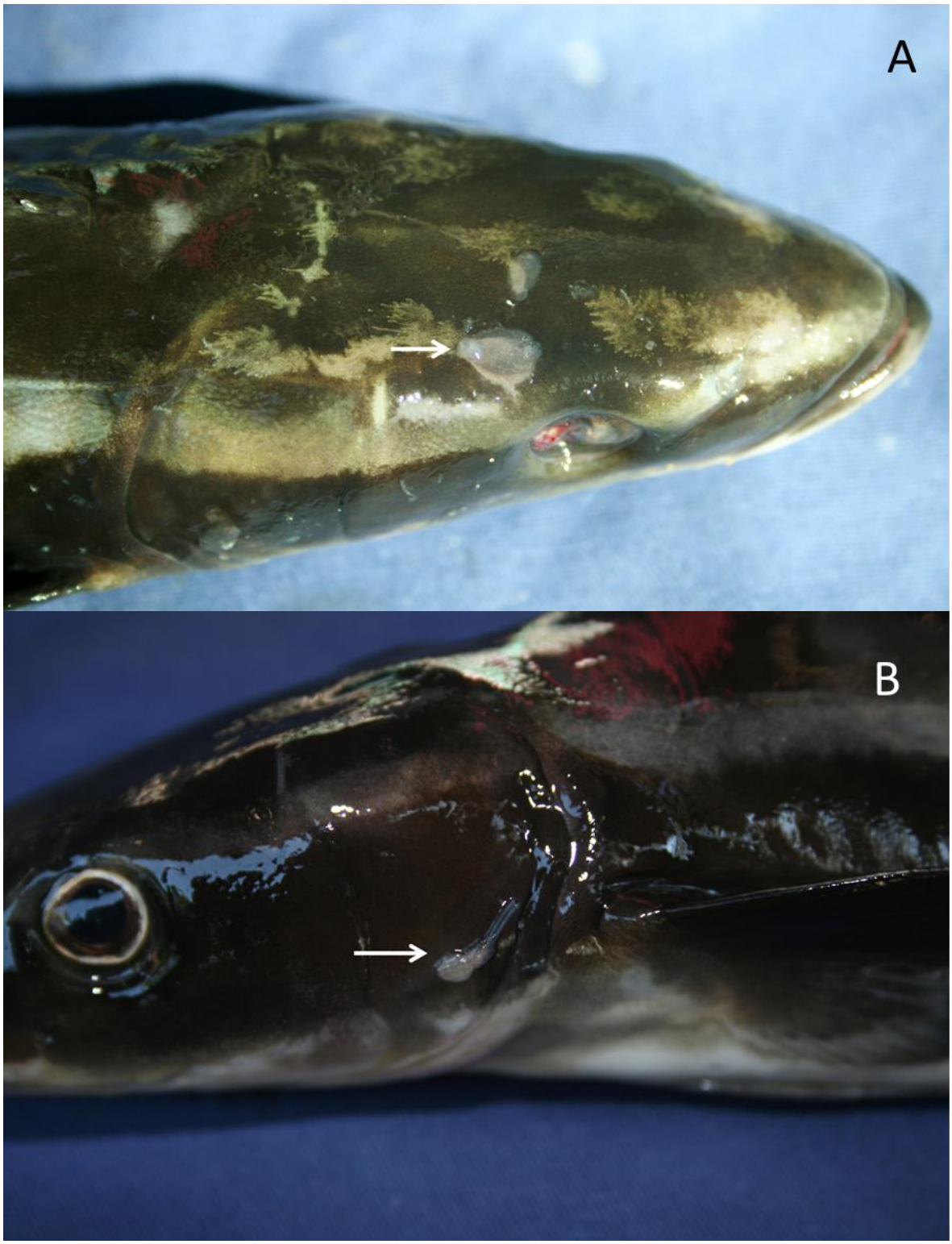



Figura 9. Parasitas encontrados em juvenis de cobias *Rachycentron canadum* criados em tanques-rede no litoral norte do Estado de São Paulo, 2011. (A) *Neobenedenia melleni* (seta) (B) *Tuxophorus caligodes.* Cortesia: Prof. Dr. Flávio Ruas de Moraes.

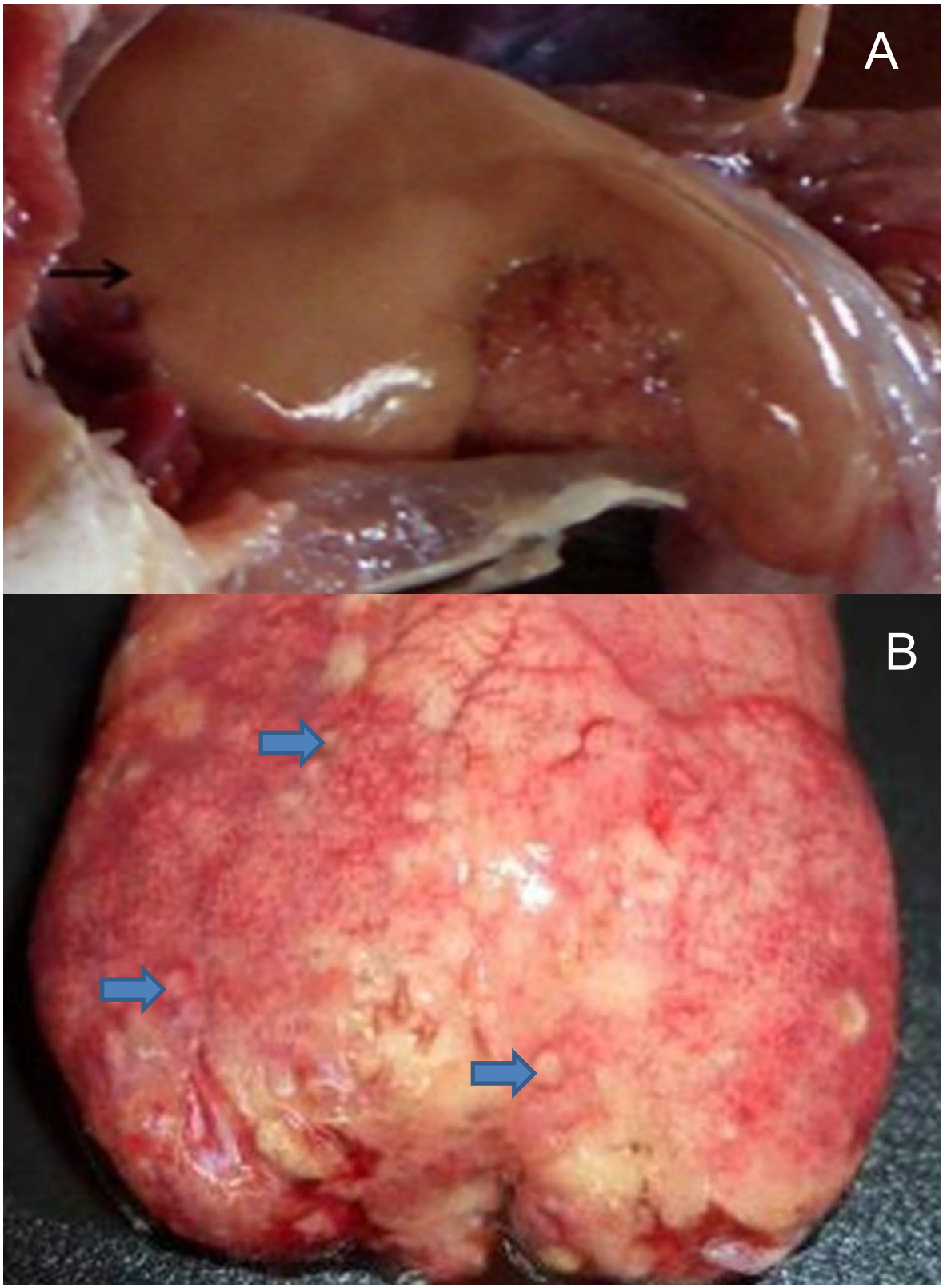



Figura 10. Alterações macroscópicas em juvenis de cobias *Rachycentron canadum* criados em tanques-rede no litoral norte do Estado de São Paulo, 2011. (A) Fígado aumentado de volume e amarelado (B) Nódulos esbranquiçados no fígado (setas). Cortesia: Prof. Dr. Flávio Ruas de Moraes.



Figura 11. Alterações macroscópicas em juvenis de cobias *Rachycentron canadum* criados em tanques-rede no litoral norte do Estado de São Paulo, 2011. Rim aumentado e com nodulações esbranquiçadas (seta). Cortesia: Prof. Dr. Flávio Ruas de Moraes.

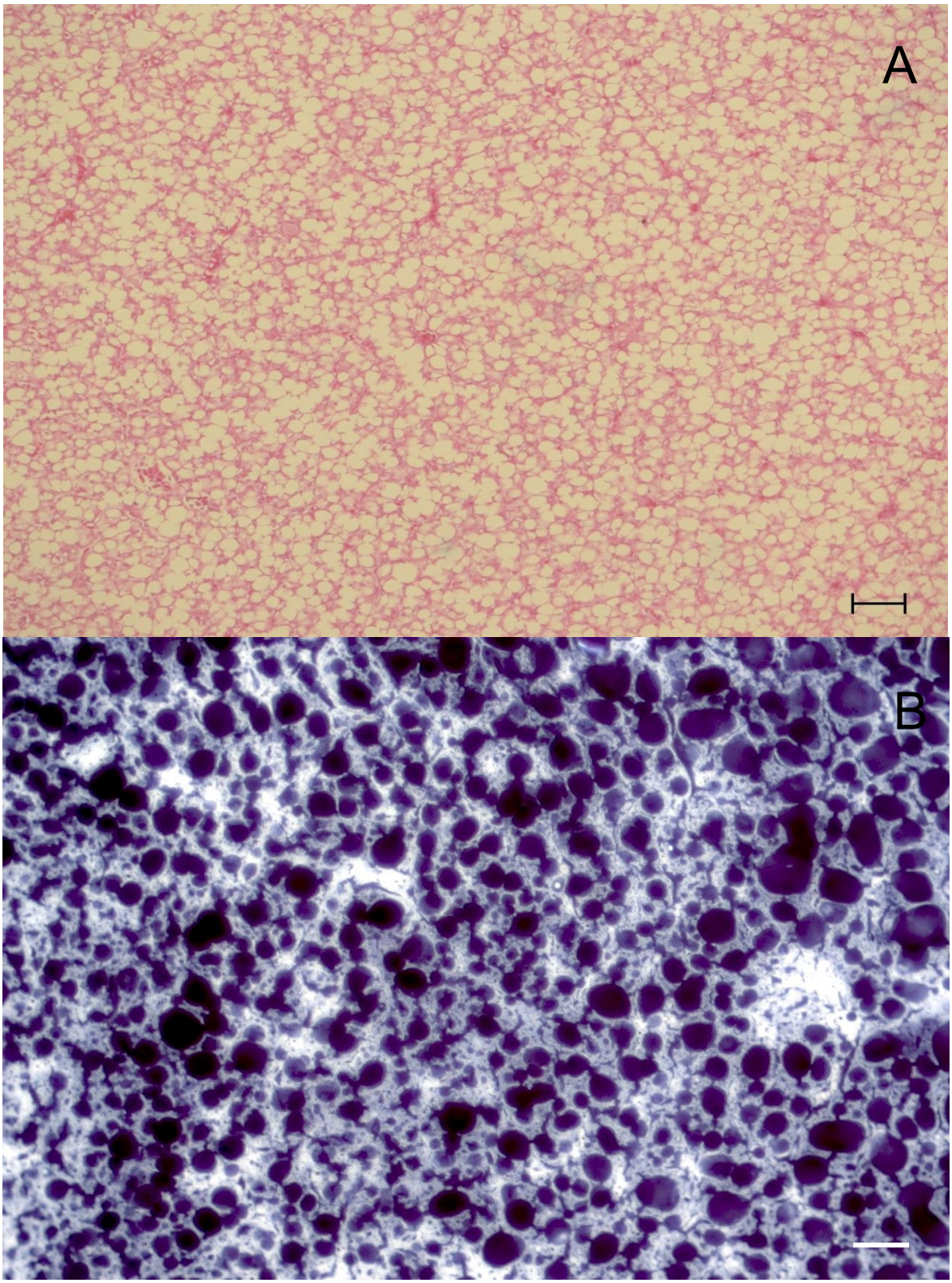



Figura 12. Fotomicrografia do fígado de juvenis de cobias *Rachycentron canadum* criados em tanques-rede no litoral norte do Estado de São Paulo, 2011. (A) Hepatócitos com predomínio de macrovacúolos no citoplasma. Coloração: hematoxilina e eosina. Barra = 50µm. (B) Vacúolos de lipídios corados em negro. Coloração: *Sudan Black*. Barra = 20µm.

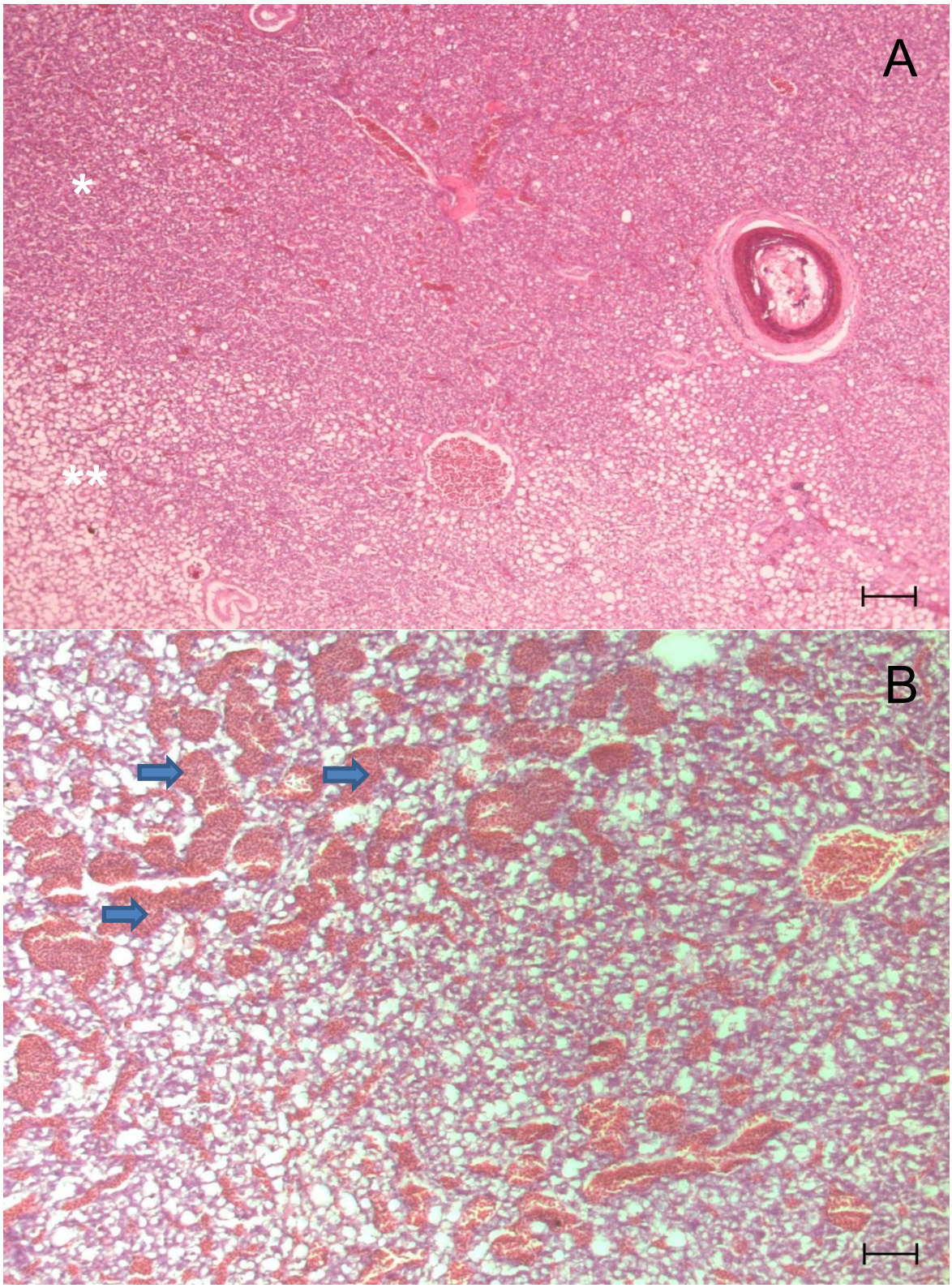



Figura 13. Fotomicrografia do fígado de juvenis de cobias *Rachycentron canadum* criados em tanques-rede no litoral Norte do Estado de São Paulo, 2011. (A) Área de hepatócitos com aspecto normal (*) e com microvacúolos no citoplasma (**). Barra = 100µm. (B) Congestão dos sinusóides (setas). Coloração: hematoxilina e eosina. Barra = 50µm.

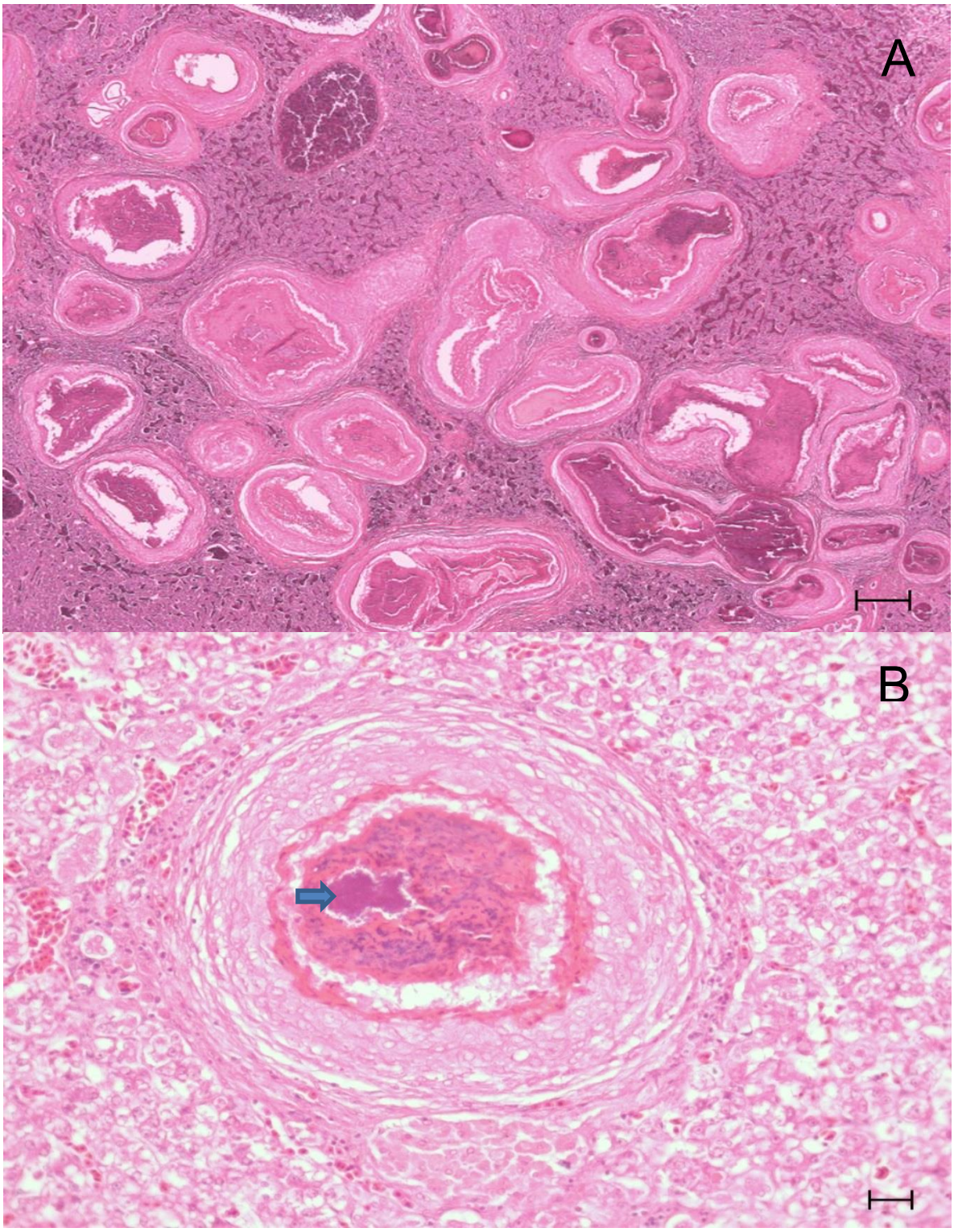



Figura 14. Fotomicrografia do fígado de juvenis de cobias *Rachycentron canadum* criados em tanques-rede no litoral norte do Estado de São Paulo, 2011. (A) Granulomas de diferentes estágios e tamanhos localizados no parênquima. Barra = 200µm. (B) Lesão granulomatosa com centro necrótico contendo aglomeração de bactérias (seta). Coloração de hematoxilina e eosina. Barra = 20µm.

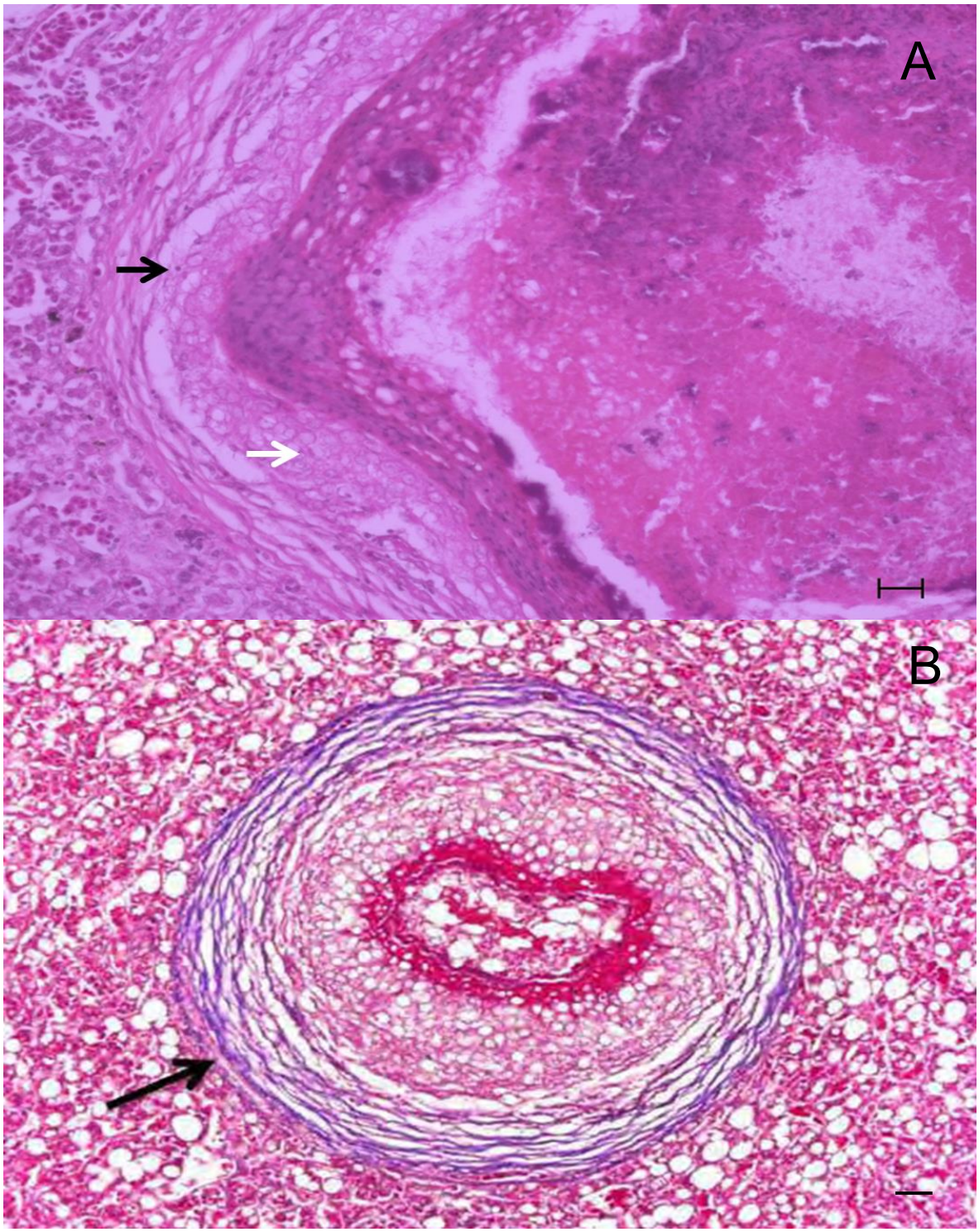



Figura 15. Fotomicrografia do fígado de juvenis de cobias *Rachycentron canadum* criados em tanques-rede no litoral norte do Estado de São Paulo, 2011. (A) Granuloma delimitado por camadas de células epitelioides e macrófagos (seta branca), raros linfócitos (seta preta). Coloração: hematoxilina e eosina. Barra = 20µm. (B) Granuloma com espessa camada de fibras colágenas (seta). Coloração: tricômio de Masson. Barra = 50µm.

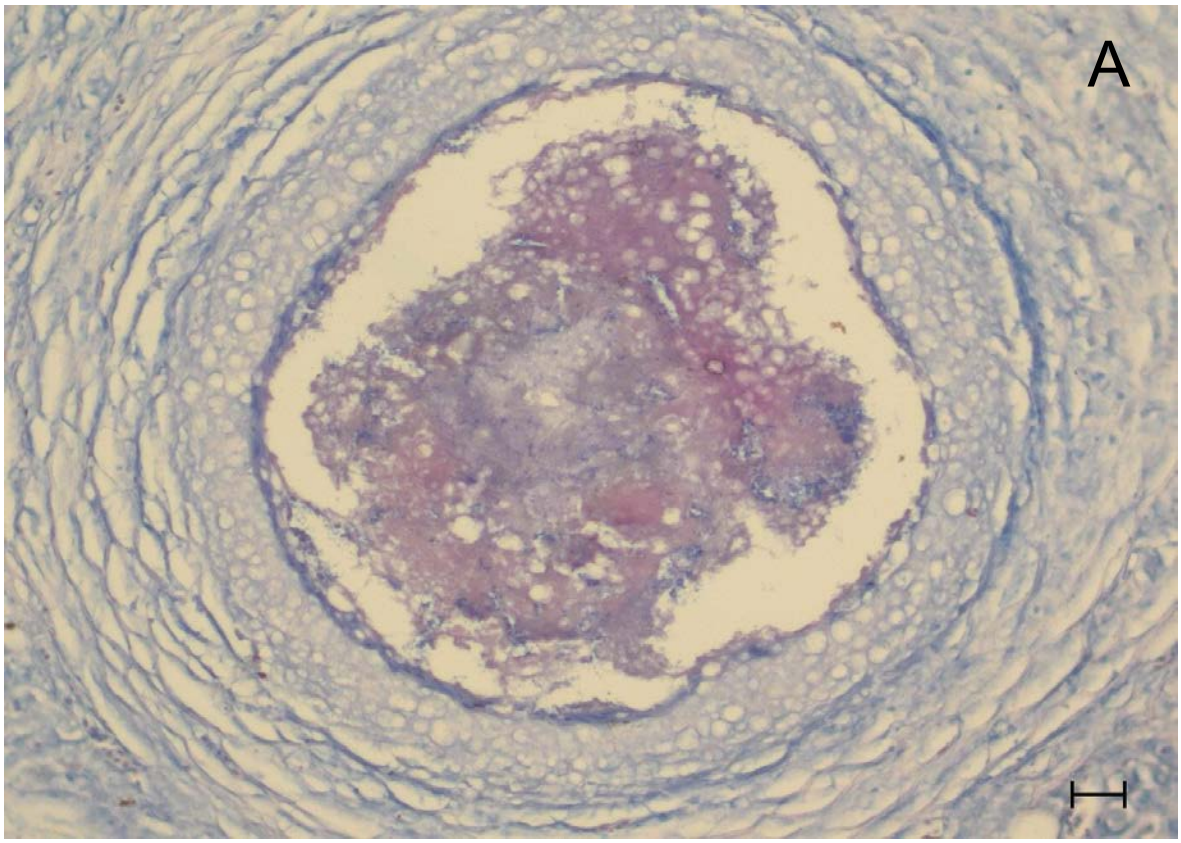



Figura 16. Fotomicrografia do granuloma em fígado de juvenis de cobias *Rachycentron canadum* criados em tanques-rede no litoral norte do Estado de São Paulo, 2011. Granuloma negativo para bacilos álcool ácido resistente. Coloração de Ziehl-Neelsen. Barra = 20µm.

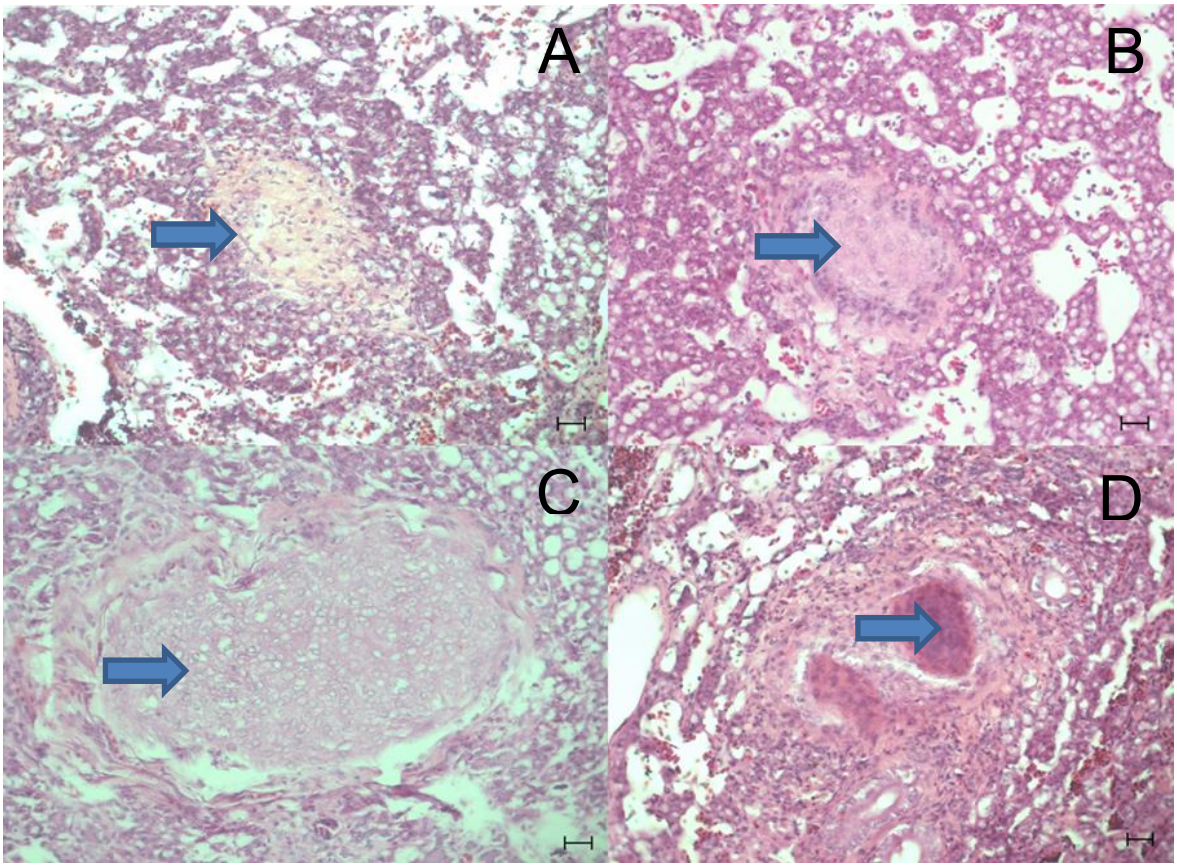



Figura 17. Fotomicrografia do fígado de juvenis de cobias *Rachycentron canadum* criados em tanques-rede no litoral norte do Estado de São Paulo, 2011. (A) Área de necrose dos hepatócitos (seta). Barra = 20µm. (B) Infiltrado de macrófagos na área de necrose dos hepatócitos (seta). Barra = 20µm. (C) Aglomerado denso de macrófagos (seta). Barra = 20µm. (D) Áreas de necrose no aglomerado de macrófagos (seta). Coloração: hematoxilina e eosina. Barra = 20µm.

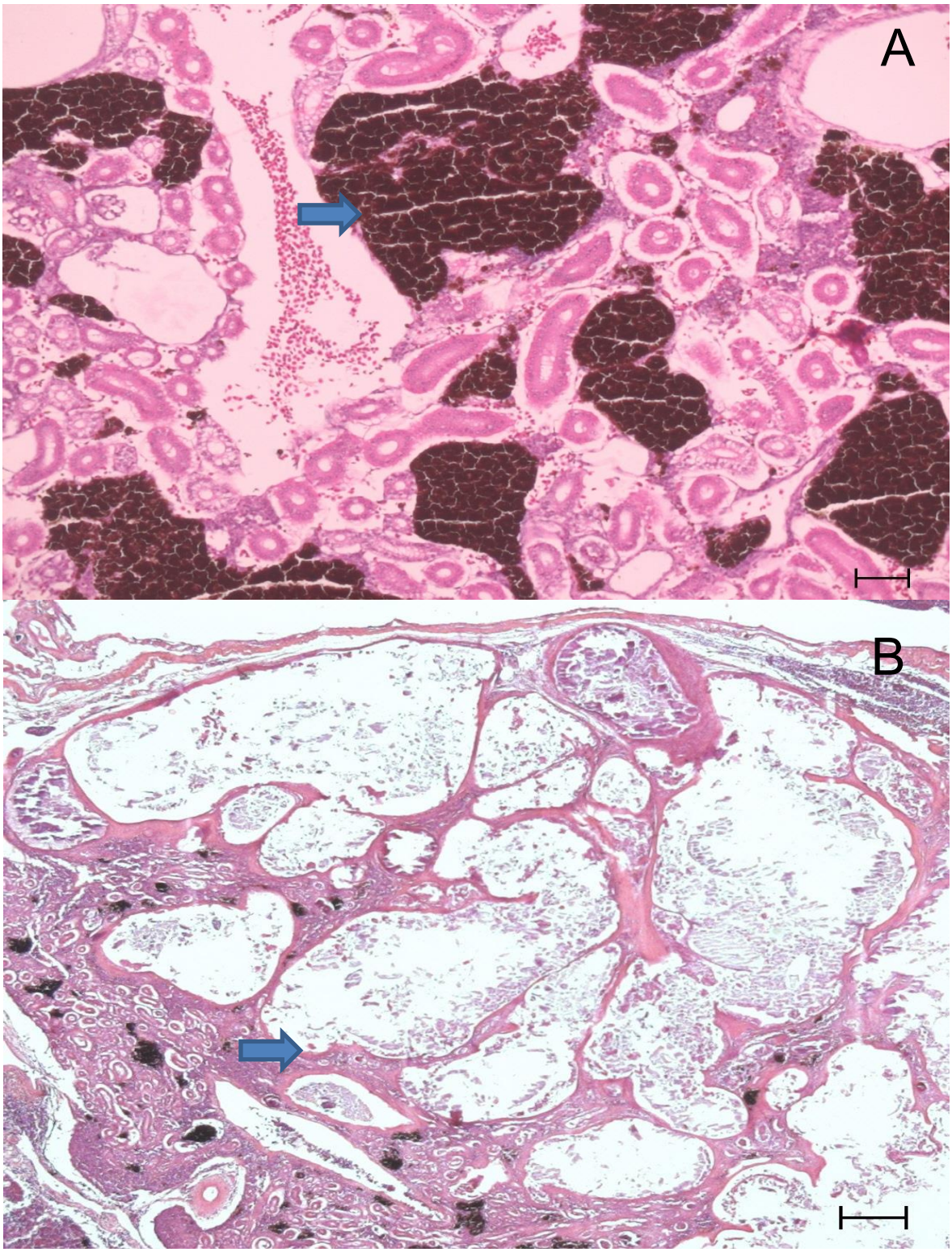



Figura 18. Fotomicrografia do rim caudal de juvenis de cobias *Rachycentron canadum* criados em tanques-rede no litoral norte do Estado de São Paulo, 2011. (A) Hiperplasia dos centros de melanomacrófagos (seta). Barra = 50µm. (B) Extensas áreas de necrose no parênquima (seta). Coloração: hematoxilina e eosina. Barra = 100µm.

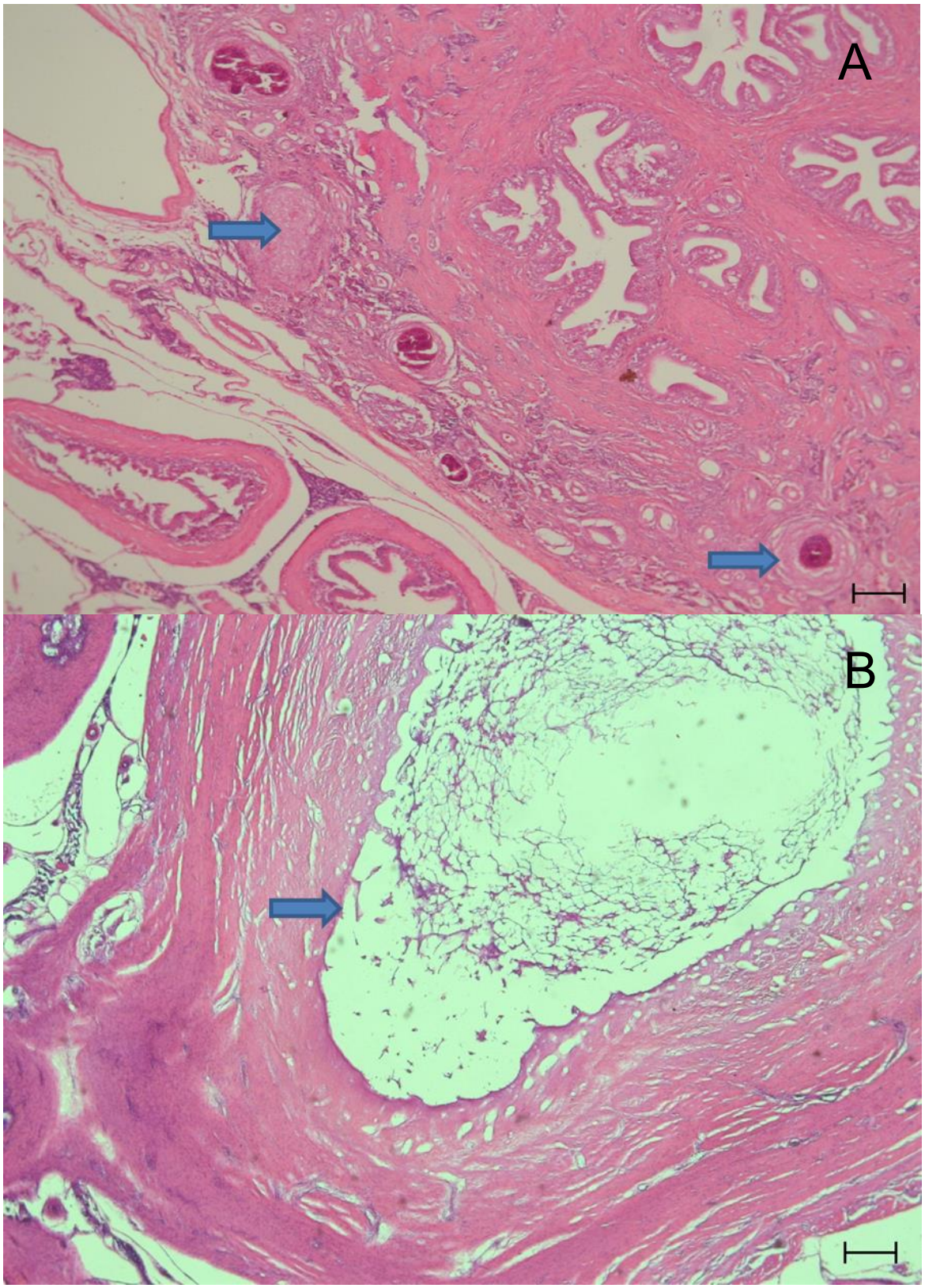



Figura 19. Fotomicrografia dos cecos pilóricos de juvenis de cobias *Rachycentron canadum* criados em tanques-rede no litoral norte do Estado de São Paulo, 2011. (A) Granulomas em diferentes estágios (setas). Barra = 100µm. (B) Necrose e descamação total do epitélio de revestimento (seta). Coloração: hematoxilina e eosina. Barra = 100µm.

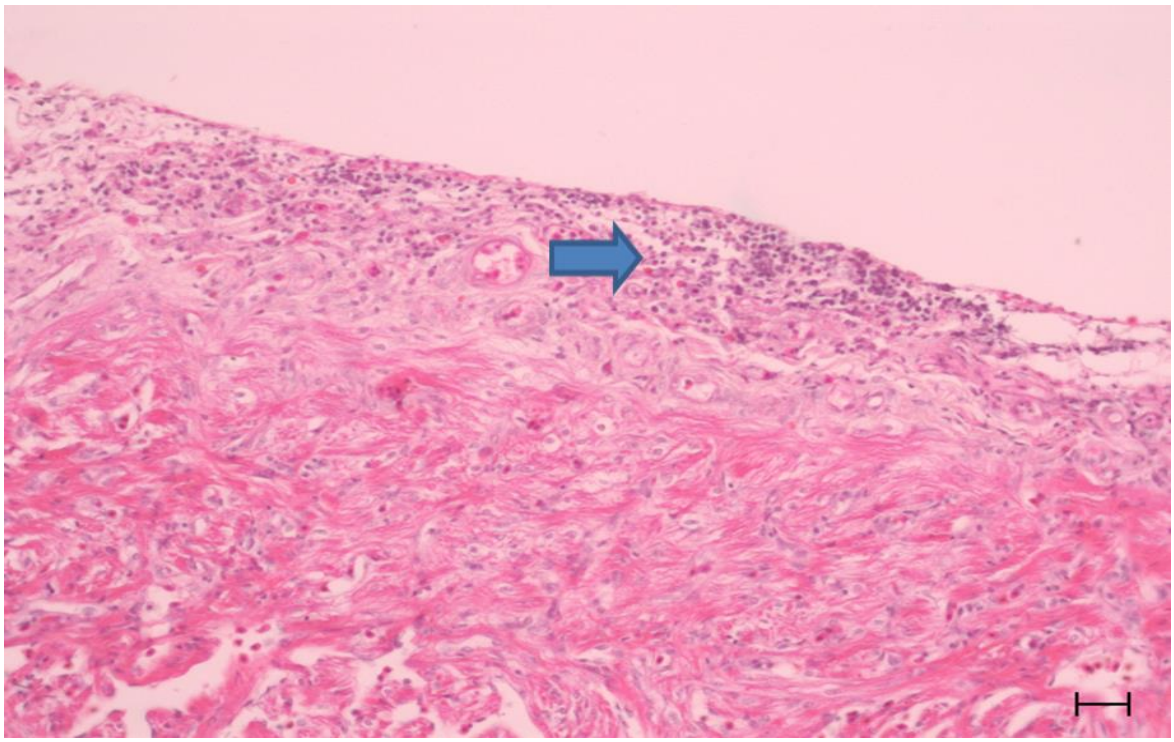


Figura 20. Fotomicrografia do coração de juvenis de cobias *Rachycentron canadum* criados em tanques-rede no litoral norte do Estado de São Paulo, 2011. Infiltrado inflamatório com predomínio de linfócitos e macrófagos localizado no epicárdio (seta). Coloração: hematoxilina e eosina. Barra = 20µm.

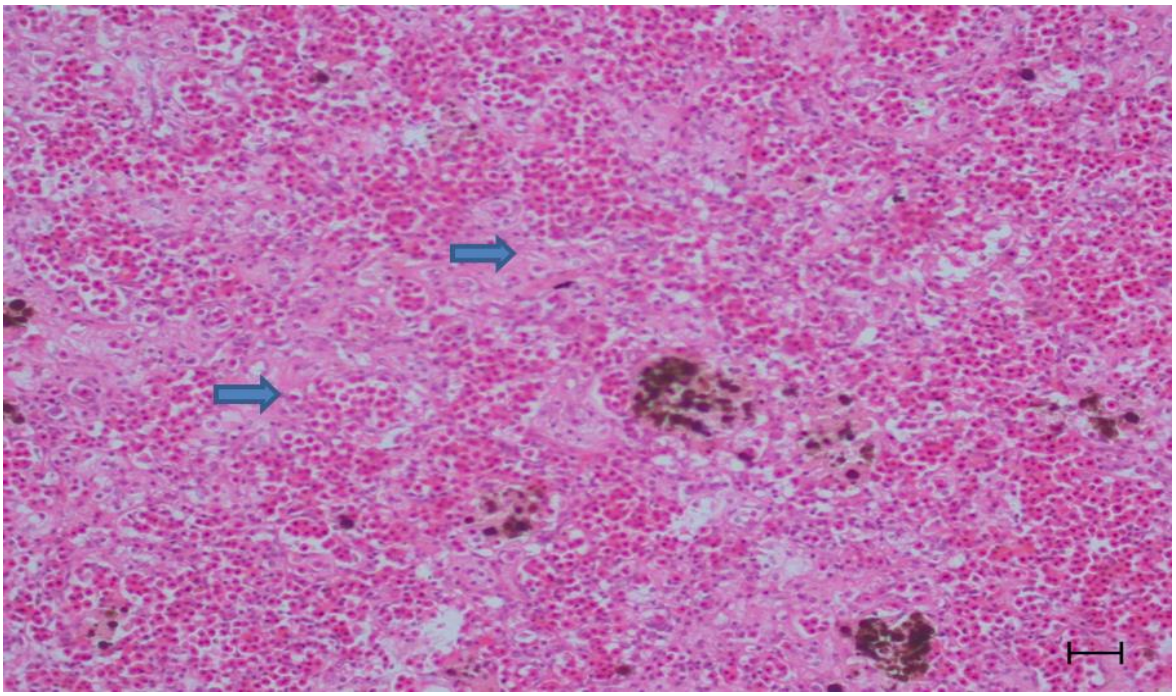


Figura 21. Fotomicrografia do baço de juvenis de cobias *Rachycentron canadum* criados em tanques-rede no litoral norte do Estado de São Paulo, 2011. Depleção linfoide da polpa branca (seta). Coloração: hematoxilina e eosina. Barra = 20µm.

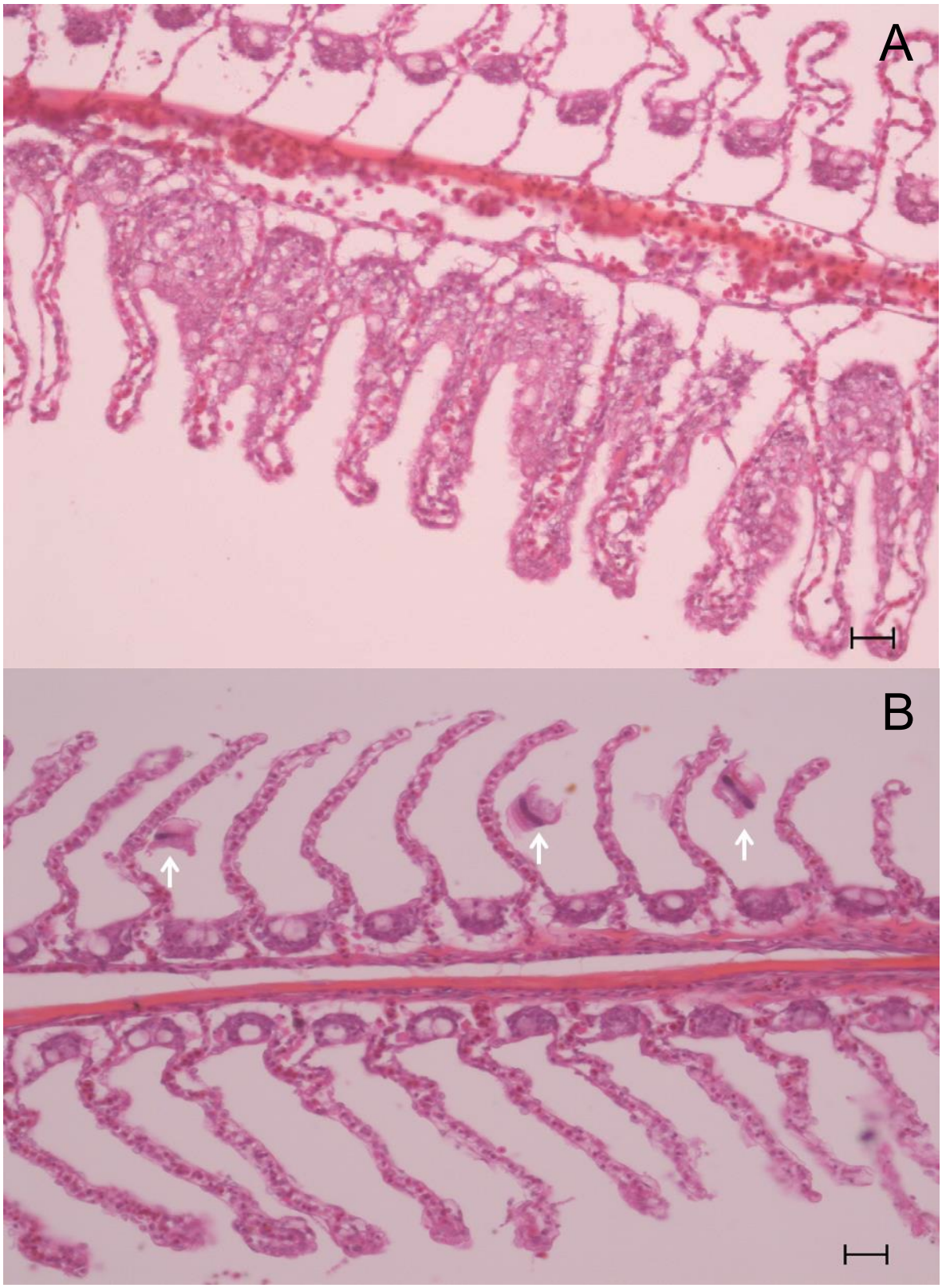



Figura 22. Fotomicrografia da brânquia de juvenis de cobias *Rachycentron canadum* criados em tanques-rede no litoral Norte do Estado de São Paulo, 2011. (A) Hiperplasia e fusão do epitélio das lamelas secundárias. Barra = 20µm. (B) *Trichodina* sp livres entre as lamelas secundárias (setas). Coloração: hematoxilina e eosina. Barra = 20µm.

5.5 Análise da composição de ácidos graxos na ração

A análise identificou desequilíbrio na proporção de ácidos graxos. A quantidade de ácido oleico era maior que o ácido docosahexaenóico (DH) (Anexo 4) baseada na composição descrita pelo Spisni et al., 1998 (Tabela 3).

Tabela 3. Valor de referência de ácido oleico e ácido docosahexaenoico quantificado em dieta natural de peixes marinhos (Spisni et al., 1998) comparado com o valor encontrado na ração comercial oferecida aos juvenis de cobias criados em tanques-rede no litoral norte do Estado de São Paulo, estudado no presente trabalho.

| | ácido oleico | ácido docosahexaenoico |
|---|---|---|
| Presente trabalho | 23,43 | 8,41 |
| Dieta natural | 5,62-14,31 | 6,04-11,03 |

## 6 DISCUSSÃO

A pasteurelose é ameaça para a piscicultura marinha devido à elevada mortalidade como observado neste estudo. A ausência de hospedeiros específicos contribui para a disseminação do agente e dificulta o controle. Aliada a estes aspectos, não há medicamento eficaz para efetuar o tratamento (LIU; LIN; LEE, 2003; MAGARIÑOS et al., 2003).

No presente estudo, a caracterização microscópica dos granulomas foi fundamental para o plano diagnóstico. Os granulomas contendo centro necrótico e aglomerações de bactérias delimitadas por células epitelioides e fibroplasia são compatíveis com a lesão descrita para a infecção pelo *Photobacterium damselae* subsp *piscicida* (AUSTIN; AUSTIN, 2007; LIU; LIN; LEE, 2003).

A inflamação crônica pode estar associada com a produção pela *P. damselae* subsp *piscicida* de superóxido dismutase e catalase, que inativam as espécies reactivas de oxigénio (ROS) sintetizadas pelos macrófagos durante o metabolismo aeróbio ou explosão respiratória após a fagocitose. Além de evitar a morte, o mecanismo permite a bactéria evadir da resposta imunológica e se

manter viável no meio intracelular, multiplicar-se e retornar para o sangue após a fagocitose dando continuidade a infecção (BARNES et al., 1999).

A micobacteriose e a nocardiose são as principais doenças que devem ser incluídas no diagnóstico diferencial da infecção pelo *P. damselae* subsp *piscicida* devido à semelhança das lesões anatomopatológica (ISHIKAWA et al., 2001; MAGARIÑOS et al., 1994;). A nocardiose provoca granulomas branco-amarelados que envolvem vários órgãos e inclusive, o tegumento. O diagnóstico é baseado em características morfológicas de crescimento de colônias em ágar, propriedades bioquímicas das bactérias, análise histológica, imuno-histoquímica e PCR (CHEN et al., 2000). A micobacteriose apresenta granulomas com necroe caseose e calcificação. As células gigantes multinucleadas estão ausentes na maioria dos casos (GAUTHIER et al., 2003). A coloração de *Ziehl-Neelsen* mostra bactérias álcool ácido resistente. Neste estudo, a micobacteriose e a nocardiose foram descartados pela característica da bactéria em cultura, a identificação bioquímica, coloração de *Ziehl-Neelsen* negativo, e análise molecular.

As áreas focais de necrose observados no fígado e rim, e no epitélio dos cecos pilóricos pode ter relação com os produtos extracelulares com efeitos citotóxicos e fosfolipolíticos secretados pela *P. damselae subsp piscicida* (BAKOPOULOS et al., 2004).

A necrose de epitélio dos cecos pilóricos e canalículos biliares observados nos cobias do presente trabalho indica afinidade da *P. damselae subsp piscicida* para adesão ao epitélio. Em *gilthead seabream, seabass* e *turbot*, a *P. damselae subsp piscicida* mostrou alta afinidade para adesão à mucosa intestinal (MAGARIÑOS et al., 1996). Este processo promove a liberação de toxinas bacterianas e precede a invasão das células do hospedeiro, processos essenciais no início da infecção (KLEMEN et al., 2010). Isto sugere que o intestino seja a porta de entrada da infecção nos cobias e o primeiro local de instalação e desenvolvimento de lesões deste agente (SALZE et al., 2008).

No presente estudo, duas espécies de parasitas foram identificadas na superfície dos juvenis de cobias, monogênea *Neobenedenia melleni* e copépode *Tuxophorus caligodes.* Apesar dos parasitas serem comuns tanto em peixes marinhos cultivados quanto de vida livre tornou-se problema a partir da

intensificação da produção. Os parasitas são responsáveis pela mortalidade devido à ação direta e por predispor a infecções secundárias bacterianas decorrentes de lesões no tegumento. Ainda podem ocasionar perdas devido ao retardo no crescimento e gastos associados com tratamento (JOHNSON et al., 2004).

A alteração histológica caracterizada pela presença de vacúolos bem definidos no citoplasma de hepatócitos é compatível com esteatose (SPISNI et al., 1998). O *Sudan Black* é o corante utilizado para demonstrar lipídios neutros (BRAUNBECK et al., 1990; BURT et al., 1998) e confirmou a presença desta macromolécula nos hepatócitos do presente trabalho. As informações a respeito de esteatose em organismos aquáticos, especificamente em peixes marinhos, são escassas. A esteatose hepática observada neste estudo é reflexo do distúrbio metabólico e nutricional em cobias. A análise da ração identificou elevada quantidade de ácido oleico. Em peixes de água doce, a degradação do excesso deste ácido graxo (AG) ocorre predominantemente em peroxissomos. Os peixes marinhos apresentam dificuldade em proliferar estas organelas o que contribui para o acúmulo de AG e desenvolvimento da esteatose (SPISNI et al., 1998).

Os lipídios, especialmente os ácidos graxos (AG), desempenham importante função na nutrição de peixes. O alimento natural para peixes de água doce é rico em AG, tais como ácido linoleico e linolênico, e o alimento natural para peixes marinhos é rico em ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido docosahexaenoico (DHA) (LI; SINCLAIR; LI, 2011). Esta diferença na dieta e a habilidade dos peixes marinhos converterem os AG em DHA e EPA reflete no requerimento específico para AG de cada espécie (SARGENT; TOCHER; BELL, 2002; TOCHER, 2010). EPA e DHA são fundamentais para o ótimo crescimento e desenvolvimento

O acúmulo de gordura no fígado pode ser processo fisiológico ou patológico. No entanto, verifica-se grande variação na habilidade de diferentes espécies de peixes para estocar lipídios, dificultando o estudo. *Dicentrarchus labrax* normalmente estoca lipídios no fígado e *Sparus aurata* no tecido adiposo. Quantidades maiores que 45-50% e 10-12% respectivamente, no fígado destas espécies devem ser considerados patológicos (MCCLELLAND et al., 1995). No entanto, não há estudos sobre o acúmulo de lipídios no tecido de cobias.

Embora os xenobióticos não tenham sido estudados neste trabalho, a esteatose hepática foi observada em peixes expostos a agentes tóxicos como hidrocarbonetos aromáticos, metais pesados (SHAW; HAND, 2006), percloreto de sódio (BURCU; SEMA; OOZLEM, 2009).

Em seres humanos, a atividade física é uma das formas de prevenir a esteatose hepática (PINTO et al., 2012). Ao fazer uma analogia com os peixes, os cobias por serem predadores carnívoros e não possuírem bexiga natatória apresenta hábito natatório ativo (SHAFFER; NAKAMURA, 1989). Ao confina-los em tanques-rede restringe a natação e consequentemente, o gasto de energia. Desta forma, os ácidos graxos acabam acumulando no organismo principalmente no fígado.

A necrose multifocal dos hepatócitos observada neste estudo também ocorre em processos de intoxicação já que o fígado dos peixes é altamente suscetível à ação dos produtos químicos por apresentar o fluxo sanguíneo e o fluxo biliar, mais lentos (GINGERICH, 1982). Desta maneira, as substâncias tóxicas permanecem por mais tempo no órgão e causam a lesão (CAMPOS; MORAES, MORAES, 2008).

Embora o fígado possua elevada reserva funcional, as lesões que comprometam mais de dois terços do parênquima hepático podem levar a sinais de insuficiência, como retardo no crescimento e predisposição a infecções por patógenos oportunistas, e geralmente acarreta elevada mortalidade (SPISNI et al., 1998; CABALLERO et al., 2004) como foi observado no presente estudo. O retardo no crescimento foi observado ao comparar as médias de peso e comprimento dos peixes coletados em maio e setembro.

A temperatura da água ao longo do ano é fator importante a ser considerado na escolha do local para criação de cobias, já que influenciam no crescimento, na sobrevivência e na conversão alimentar. A faixa ideal para os cobias encontra-se entre 27º C e 29º C (SUN; CHEN; HUANG, 2006). Neste estudo verificou variação de temperatura entre 19º C e 29º C podendo ser um dos fatores que restringem o bom desempenho da espécie.

O retardo no crescimento pode ser ainda atribuído à baixa palatabilidade e qualidade da ração comercial oferecida aos cobias. Na

comparação de juvenis de cobias alimentados com dieta artificial e sardinha verificou-se após dois meses peso de 90g e 200g, respectivamente. (ROMBENSO; MOREIRA; MIRANDA-FILHO, 2009). Isto demonstra que a dieta artificial não atende as exigências da espécie.

Neste estudo, os peixes apresentavam retardo no crescimento, desequilíbrio nutricional de ácidos graxos, moderada a severa esteatose hepática que pode ter predisposto a infecção pelo *P. damselae* subsp. *pisicida.*

## 7 ARTIGOS CIENTÍFICOS

A análise das alterações microscópicas de cobias coletados na maricultura em Ilhabela resultou em dois artigos científicos. Um trata da pasteurelose, doença bacteriana que causa elevada mortalidade e ameaça a piscicultura marinha no mundo e as possíveis condições predisponentes (Anexo 5) e o segundo, descreve sobre a esteatose hepática em cobias (Anexo 6).

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, F.; VIVAS, J.; PADILLA, D.; VEJA, J.; BRAVO, J.; GRASSO, V.; REAL, F. Invasion and survival of *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* in non-phagocytic cells of gilthead sea bream, *Sparus aurata* L. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 32, p. 535-541, 2009.

AGIUS, C. Phylogenetic development of melano-macrophage centers in fish. **Journal of Zoology**, v. 191, p.11-31, 1980

ALEXIS, M. N. Fish meal and fish oil replacers in Mediterranean marine fish diets. In: Tacon, A; Basurco, B., Eds. Feeding Tomorrow's Fish, **Proceedings of the Workshop of the CIHEAM Network on Technology of Aquaculture in the Mediterranean (TECAM) Cahiers Options Méditerranéennes**, v. 22, p. 183-204, 1997.

ANDREONI, F.; MAGNANI, M. Photobacteriosis: prevention and diagnosis. **Journal of Immunology Research**, 7p., 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/793817>

AUSTIN, B.; AUSTIN, D. A. 2007. Bacterial Fish Pathogens: Diseases of Farmed and Wild Fish. 4 Ed,. London, Spinger-Praxis:4 57 p.

AVCI, H.; BIRINCIOĞLU, S.; EPIKMEN, E. T.; DERELI, M. Comparative histopathological and immunohistochemical evaluations in juvenile sea bass (*Dicentrarhus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) naturally infected with *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida.* **Revue Médecine Vétérinaire**, v. 164, p. 72-79, 2013.

BAKOPOULOS, V.; HANIF, A.; POULOS, K.; GALEOTTI, M.; ADAMS, A.; DIMITRIADIS, G. J. The effect of in vivo growth on the cellular and extracelular componentes of the marine bacterial pathogen *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida*. **Journal of Fish Diseases***,* Oxford, v. 27, p. 1-13, 2004.

BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. **Espécies nativas para a piscicultura no Brasil.** Editora da UFSM, Santa Maria, 2010. 608p.

BARNES, A. C.; BALEBONA, M. C.; HORNE, M. T. Superoxide dismutase and catalase in *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* and their roles in resistance to reactive oxygen species. **Journal Fish Diseases**, v. 145, p. 483-494, 1999.

BARTON, B.; IWAMA, G. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. **Annual Review Fish Diseases**, v. 1, p. 3-26, 1991.

BENETTI, D. D.; ORHUN, M. R.; SARDENBERG, B.; O'HANLON, B.; WELCH, A.; HOENIG, R.; ZINK, I.; RIVERA, J. A.; DENLINGER, B.; BACOAT, D.; PALMER, K.; CAVALIN, F. Advances in hatchery and grow-out technology of cobia *Rachycentron canadum* (Linnaeus). **Aquaculture Research**, Oxford, v. 39, p. 701-711, 2008.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal Biochemistry Physiology**, v. 37, p. 911-917, 1959.

BRAUNBECK, T.; GÖRGE, G.; STORCH, V.; NAGEL, R. Hepatic steatosis in zebrafish (*Brachydaneo reri*) induced by long-term exposure to γ-hexachlorocyclohexane. **Ecotoxicology and Environmental Safety,** v. 19, p. 355-374, 1990.

BROGDEN, K.A.; ROTH, J.A., STANTON, T.B.; BOLIN, C.A.; MINION, F.C.; WANNEMUEHLER, M.J. 2000 **Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens**, 3rd edn. ASM Press, Washington DC.

BURCU, K. T.; SEMA, I. U.; OZLEM, O. The effects of sodium perchlorate on the liver of Molly Fish (Poecilia sphenops, Cyprinidae, Teleostei). **African Journal Biotechnology,** v. 8, p. 2640-2644, 2009.

BURT, A. D.; MUTTON, A.; DAY, C. P. Diagnosis and interpretation of steatosis and steatohepatitis. Seminars in Diagnostic Pathology, v. 15, p. 246-258, 1998.

CABALLERO, M. J.; IZQUIERDO, M. S.; KJORSVIK, E.; FERNÁNDEZ, A. J.; ROSENLUND, G. Histological alterations in the liver of sea bream, *Sparus aurata* L., caused by short- or long-term feeding with vegetable oils. Recovery of normal

morphology after feeding fish oil as the sole lipid source. Journal Fish Diseases, v. 27, p. 531-541, 2004.

CAMPOS, G. M.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R. Histopatologia de fígado, rim e baço de *piaractus mesopotamicus, prochilodus lineatus* e *pseudoplatystoma fasciatum* parasitados por myxosporídios, capturados no Rio Aquidauana, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária,** v. 17, p. 200-205, 2008.

CARVALHO FILHO, A. **Peixes: costa brasileira**. Editora Melro Ltda, São Paulo, 1999. 320p.

CARVALHO, C. S.; FERNANDES, M. N. Effect of copper on liver key enzymes of anaerobic glucose metabolism from freshwater tropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemical Physiology A: Molecular Integrative Physiology**, v. 151, p. 437–442, 2008.

CAVALLI, R. O.; HAMILTON, S. A piscicultura marinha no Brasil - Afinal, quais as espécies boas para cultivar? **Panorama da Aquicultura,** v.17, p.50-55, 2007.

CAVALLI, R. O.; HAMILTON, S. Piscicultura marinha no Brasil com ênfase na produção do beijupirá. **Revista Brasileira de Reprodução Animal (supl).** Belo Horizonte, p.64-69, dez. 2009.

CAYLOR, R. E., BIESIOT, P. M., FRANKS, J. S. Culture of cobia *Rachycentron canadum*: cryopreservation of sperm and induced spawning. **Aquaculture**, v. 125, p. 81-92, 1994.

CHANG, C. F.; YANG, J. H.; CHANG, S. L. Application of dietary â–1, 3–1, 6–glucan in enhancing resistance of cobia (*Rachycentron canadum*) against *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* and *Streptococcus iniae* infections. **Journal of Taiwan Fisheries Research,** v. 14, p. 75–87, 2006.

CHEN, S. C.; LEE, J. L.; LAI, J. C.; GU, Y. W.; WANG, C. T.; CHANG, H. Y.; TSAI, K. W. Nocardiosis in seabass *Lateolablax japonicus* in Taiwan. **Journal Fish Disease**, v. 23, p. 299-307, 2000.

CHEN, L.; YANG, J.; YU, J.; YAO, Z.; SUN, L.; SHEN, Y.; JIN, Q. VFDB: a reference database for bacterial virulence factors. **Nucleic Acids Research**, v. 33, 2005.

CHEN, Q. L.; LUO, Z.; LIU, X.; SONG, Y.F.; LIU, C. X.; ZHENG, J. L.; ZHAO, Y. H. Effects of waterborne chronic copper exposure on hepatic lipid metabolism and metal-element composition in *Synechogobius hasta*. **Archives Environmental Contamination Toxicology**, v. 64, p. 301-15, 2013.

COSTA FILHO, J.; FABREGAT, T. H. P.; ROSA, C. A. V. L. Uma revisão sobre os principais aspectos no cultivo do robalo. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.12, p. 317-325, 2013.

EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M.; PAVANELLI, G. C. **Métodos de estudos e técnicas laboratoriais em parasitologia de peixes**. 2ª ed. Maringá: EDUEM Editora da Universidade Estadual de Maringá, v. 500, 2006. 199 p.

FAULK, C. K.; HOLT, G. J. Response of cobia *Rachycentron canadum* larvae to abrupt or gradual changes in salinity. **Aquaculture**, v. 254, p. 275-283, 2006.

FAO, 2014. The state of world fisheries and aquaculture.

FIGUEIREDO, J. L.; MENEZES, N. A. **Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. III. Teleostei (2)**. São Paulo: Museu de Zoologia da USP, 1980. 90p.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **Journal Biology Chemistry**, v. 226, p. 497-509, 1957.

FRANKS, J. S.; WARREN, J. R.; BUCHANAN, M. V. Age and growth of cobia, *Rachycentron canadum*, from the northeastern Gulf of Mexico. **Fishery Bulletin**, v. 97, p. 459-471, 1999.

GAUTHIER, D. T.; RHODES, M. W.; VOGELBEIN, W. K.; KATOR, H.; OTTINGER, C. A. Experimental mycobacteriosis in striped bass *Morone saxatilis.* **Disease Aquatic Organism**, v. 54, p.105–117, 2003.

GENTEN, F.; TERWINGHE, E.; DANGUY, A. **Atlas of fish histology**. 2009. Ed. Science publishers, 211p.

GINGERICH, W.H. Hepatic toxicology of fishes. In: WEBER, L.F. (ed.) **Aquatic toxicology**, New York: Plenum Press. 1982. p. 55-105.

HOAR, W. S.; FARREL, A. P.; HANDALL, D. J. Fish Physiology: the cardiovascular system. v. XII A, 1992.

INFANTE, J. L. Z.; GISBERT, E.; SARASQUETE, C.; NAVARRO, I.; GUTIÉRREZ, J.; CAHU, C. L. Ontogeny and physiology of the digestive system of marine fish larvae. **Feeding and Digestive Functions of Fishes,** v.1, p281-348, 2008.

ISHIKAWA, C. M.; MATUSHIMA, E. R.; SOUZA, C. W. O.; RANZANI-PAIVA, M. J. T. MIcobacteriose em peixes. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, 27, p. 231 - 242, 2001.

IWAMA, G.; NAKANISHI, T. **The fish immune system: organism and environment.** v. 15, 1996, 380p.

JANSSEN, W. A.; SURGALLA, M.J. Morphology, physiology, and serology of a *Pasteurella* species pathogenic for white perch (*Roccus americanus*). **Journal of Bacteriology,** v. 96, p. 1606-1610, 1968.

JOHNSON, S. C.; TREASURER, J. W.; BRAVO, S.; NAGASAWA, K.; KABATA, Z. A Review of the impact of parasitic copepods on marine aquaculture. **Zoological Studies**, v. 43, n. 2, p. 229-243, 2004.

KIMURA, M.; KITAO, T. On the causative agent of tuberculosis of yellowtail. **Fish Pathology**, v. 6, p. 8-14, 1971.

KLEMEM, P.; VEJBORG, R. M.; HANCOCK, V. Prevention of bacterial adhesion. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 88, p. 451-459, 2010.

KU, C.C.; LU, C.H. Sea cage culture and disease investigation of cobia (*Rachycentron canadum*) in Penghu. **Review Fish Diseases Research**, v. 20, p. 35–46, 2000.

LA MONTE, F. **Marine game fishes of the world**. Doubleday & Co., NY. 190 p., 1952.

LEVIN, B. R.; EDEN, C. S. Selection and evolution of virulence in bacteria: an ecumenical excursion and modest suggestion. **Parasitology,** v. 100, p. 103-115, 1990.

LI, G.; SINCLAIR, A. J.; LI, D. Comparison of lipid content and fatty acid composition in the edible meat of wild and cultured freshwater and marine fish and shrimps from china. **Journal Agriculture Food Chemical**, v. 59, p. 1871-1881, 2011.

LIAO, I. C., HUANG, T. S., TSAI, W. S., HSUEH, C. M., CHANG, S. L., LEAÑO, E. M. Cobia culture in Taiwan: current status and problems. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 237, p. 155–165, 2004.

LIU, P.; LIN, J.; LEE, K. Virulence of *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* in cultured cobia *Rachycentron canadum.* **Journal of Basic Microbiology**, v. 43, p. 499-507, 2003.

LIU, P.C.; LIN, J.Y.; CHUANG, W.H.; LEE, K.K. Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio harveyi* (*V. carchariae*) from the farmed marine cobia fish *Rachycentron canadum* L. with gastroenteritis syndrome. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 495–499, 2004.

LIU, P.; HUNG, S.; CHEN, M.; CHENG, C.; LIN, C.; CHANG, C.; LIN, S.; TU, C.; LIN, Y.; WANG, W. Highly virulent *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* isolated from Taiwan paradise fish, *Macropodus opercularis* (L.), in Taiwan. **African Journal of Microbiology Research,** v. 5, p. 2107-2113, 2011.

LÓPEZ-DÓRIGA, M. V.; BARNES, A. C.; SANTOS, N. M. S.; ELLIS, A. E. Invasion of fish epithelial cells by *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida*: evidence for receptor specificity, and effect of capsule and sérum. **Microbiology**, v. 146, p. 21-30, 2000.

LOPEZ, C.; RAJAN, P. R.; LIN, J. H.; KUO, T.; YANG, H. Disease outbreak in seafarmed Cobia (*Rachycentron canadum*) associated with *Vibrio* spp., *Photobacterium damselae* ssp *piscicida*, monogenean and myxosporean parasites. **Bulletin- European Association of Fish Pathologists**, v.22, p. 206-211, 2002.

LUNA, L. G. 1968. **Manual of Histologic Staining of the Armed Forces Institute of Pathology**. 3rd ed. McGraw-Hill, New York, p.258.

MAGARIÑOS, B.; ROMALDE, J. L; BARJA, J. L.; TORANZO, A. E. Evidence of a dormant but infective state of the fish pathogen *Pasteurella piscicida* in seawater and sediment. **Applied Environmental Microbiology**, v. 60, p. 180-186, 1994.

MAGARIÑOS, B; ROMALDE, J. L.; NOYA, M; BARJA, J. L.; TORANZO, A. E. Adherence and invasive capacities of the fish pathogen *Pasteurella piscicida*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 138, p. 29-34, 1996.

MAGARIÑOS, B.; ROMALDE, J. L.; LÓPEZ-ROMALDE, S.; MORIÑIGO, M. A.; TORANZO, A. E. Pathobiological characterisation of *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* isolated from cultured sole (*Solea senegalensis*). **Bulletin Archive — European Association of Fish Pathologists**, v. 23, p. 183-189, 2003.

MANRIQUE, W.G.; CLAUDIANO, G.S.; PETRILLO, T.R.; CASTRO, M.P.; FIGUEIREDO, M.A.P.; BELO, M.A.A.; MORAES, J.R.E.; MORAES, F.R. Response of splenic melanomacrophage centers of *Oreochromis niloticus* (Linnaeus 1758) to inflammatory stimuli by BCG and foreign bodies. **Journal Applied Ichthyology, (Online), p. 1 - 6, 2014.**

MCCLELLAND, G.; ZWINGELSTEIN, G.; WEBER, J. M.; BRICHON, G. Lipid composition of tissue and plasma in two Mediterranean fishes, the gilt-head sea bream (*Chrysophyrys auratus*) and the European seabass (*Dicentrarchus labrax*). **Canadian Journal Fish Aquatic Science**, v. 52, p. 161–170, 1995.

MENNI, R. C.; RINGUELET, R. A.; ARANBURU, R. H. **Peces marinos de la Argentina y Uruguay.** Edit. Hemisferio sur S.A., 359 p., 1984.

MESSEGUER, J.; LOPEZ-RUIZ, A.; ESTEBAN, M.A. Melano-macrophages of the seawater teleosts, sea bass (*Dicentarchus labrax*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*): morphology, formation and possible function. **Cell Tissue Research**, v. 277, p. 1-10, 1994.

MIAN, G. F.; GODOY, D. T.; LEAL, C. A. G.; YUHARA, T. Y.; COSTA, G. M.; FIGUEIREDO, H. C.P. Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia**. Veterinary Microbiology**, v. 136, p. 180-183, 2009.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA (MPA) 2011. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura**, Brasilia, 60p.

MLADINEO, I.; MILETIC, I.; BOCINA, I. *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* outbreak in cage-reared atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus.* **Journal of Aquatic Animal Health,** v. 18, p. 51–54, 2006.

MONTERO, D.; ROBAINA, L. E; SOCORRO, J.; PANSERI, S.; BELLAGAMA, F.; MORETTI, V. M. Alteration of liver and muscle fatty acid composition in *gilthead seabream* (*Sparus aurata*) juveniles held at high stocking density and fed an essential fatty acid deficient diet. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 24, p. 63-72, 2001.

MUMFORD, F.; HEIDEL, J.; SMITH, C.; MORRISON, J.; MacCONNEL, B.; BLAZER, V. 2007. **Fish Histology and Histopathology,** 357p**.**

NAGANO, I.; INOUE, S.; KAWAI, K.; OSHIMA, S. Repeatable immersion infection with *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* reproducing clinical signs and moderate mortality. **Fisheries Science**, v. 75, p. 707-714, 2009.

NOWAK, B.; BRUNO, D.; BRYAN, J., 2001. **Histopathology Workshops**: Notes and Images (CD-ROM). European Association of Fish Pathologists.

NOYA, M.; MAGARIÑOS, B.; LAMAS, J. Interactions between peritoneal exudate cells (PECs) of gilthead seabream (*Sparus aurata*) and *Pasteurella piscicida*. A morphological study. **Aquaculture***,* Amsterdam, v. 131, p. 11–21, 1995.

NOYA, M; MAGARIÑOS, B.; TORANZO, A. E.; LAMAS, J. Sequential pathology of experimental asteurellosis in *Gilthead seabream*, *Sparus aurata*. A light-and electron microscopic study. **Disease Aquatic Organism**, v. 21, p. 177–186, 1995.

OBA, E. T.; MARIANO, W. S.; SANTOS, L. R. B. Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para o manejo rentável. In: TAVARES-DIAS, M. (Org.). **Manejo e sanidade e peixes em cultivo**. Macapá: Embrapa Amapá, 2009. p. 226-247.

OSÓRIO, C. R.; TORANZO, A. E.; ROMALDE, J. L.; BARJA, J. L. Multiplex PCR assay for *ureC* and 16s *rRNA* genes clearly discriminates between both subspecies of *Photobacterium damselae.* **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 40, 177-183, 1999.

OSÓRIO, C. R.; COLLINS, M. D.; ROMALDE, J. L.; TORANZO, A. E. Variation in 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Regions in *Photobacterium damselae*: a Mosaic-Like Structure. **Advances in Applied Microbiology,** v. 71, n. 2, p. 636-645, 2005.

PESONEN, M.; ANDERSSON, T. B. Fish primary hepatocyte culture; an important model for xenobiotic metabolism and toxicity studies. **Aquatic toxicology**, v. 37, p. 253-267, 1997.

PILLAI, P. K. M**.** Black kingfishes. **Marine Fisheries Information Service. Technical and Extension Series**, Cochin, n. 39, p. 12, 1982.

PINTO, C. G. S; MAREGA, M.; CARMONA, F. G.; D'ÁUREA, C.; CARVALHO, J. A. M.; FIGUEIRA JUNIOR, A. Esteatose hepática e estilo de vida ativo: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento,** v. 20, n. 3, p. 125-134, 2012.

RAJAN, J. P. R.; LOPEZ, C.; LIN, J. H. Y.; YANG, H. L. *Vibrio alginolyticus* infection in cobia (*Rachycentron canadum*) cultured in Taiwan. **Bulletin European Association Fish Pathologists**, v. 21, p. 228– 234, 2001.

ROBERTS, R. J. 2001. **Fish Pathology**. W. B. Saunders. London, 472 p.

ROMALDE, J. L. *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida*: an integrated view of a bacterial fish pathogen**. International Microbiology***,*** v. 5, p. 3–9, 2002.

ROMBENSO, A. N.; MOREIRA, C. B.; MIRANDA-FILHO, K. C.; SAMPAIO, L. A. Avaliação do crescimento de cobia (*Rachycentron canadum*) alimentados com uma dieta comercial e peixe fresco. In: Conferencia latinoamericana sobre cultivo de peces nativos, v.3, 2009, Chascomus. **Anais...** Chascomus: 2009. (CD-ROM).

ROUBACH, R.; CORREIA, E. S.; ZAIDEN, S.; MARTINO, R. C.; CAVALLI, R. O. Aquaculture in Brazil**. World Aquaculture**. v. 34, p. 28-34, 2003.

SAMPAIO, L. A.; TESSER, M. B.; JÚNIOR, W. W. Avanços da maricultura na primeira década do século XXI: piscicultura e carcinocultura marinha. **Revista Brasileira Zootecnia,** Viçosa, v.39, p.102-111, 2010 (supl. especial).

SANTOS, Y.; ROMALDE, J. L.; BANDIN, I.; MAGARIÑOS, B.; NÚNEZ, S.; BARJA, J. L.; TORANZO, A. E. Usefulness of the API-20E system for the identification of bacterial fish pathogens. **Aquaculture***,* v. 116, p. 111–120, 1993.

SALZE, G.; MCLEAN, E.; SCHWARZ, M.H.; CRAIG, S.R. Dietary mannan oligosaccharide enhances salinity tolerance and gut development of larval cobia. **Aquaculture**, v. 274, p. 148–152, 2008.

SALYERS, A. A.; WHITT, D. D. (1994). **Bacterial pathogenesis: a molecular approach.** ASM Press, Washington, DC.

SARGENT, J. R.; TOCHER, D. R.; BELL, J. G. (2002) **The lipids: Fish Nutrition**. (3rd edn), Academic Press, San Diego, USA.

SHAFFER, R. V.; NAKAMURA, E. L. Synopsis of biological data on the cobia *Rachycentron canadum* (Pisces: Rachycentridae). **NOAA Technical Report, National Marine Fisheries Service** 82, 1989.

SHAW, B. J.; HANDY, R. D. Dietary copper exposure and recovery in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus.* **Aquatic Toxicology**, v. 76, p. 111–121, 2006.

SHIMADA, M. T.; SILVA, A. C.; NAPOLEÃO, S. R.; MELLO, H.; MORAES, F. R.; MORAES, J. R. E.; MOURIÑO, J. L. Pasteurelose em juvenis de cobias (*Rachycentron canadum*) criados em tanques-rede no litoral norte do estado de

São Paulo-Brasil. **Anais do XXXVIII Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária (Conbravet)**, Florianópolis, 2011.

SNEDECOR, G. W.; COCHRAN, G. 1974. **Statistical methods**. Ames: Iowa State Univesity Press, 507p.

SNIEZSKO, S. F., BULLOCK, G. L., HOLLIS, E.; BOONE, J. G. *Pasteurella* sp. from an epizootic of white perch (*Roccus americanus*) in Chesapeake Bay tidewater area. **Journal Bacteriology**, v. 88, p. 1814-1815, 1964.

SOLÉ, M.; RODRÍGUEZ, S.; PAPIOL, V.; MAYNOU, F.; CARTES, J. E. Xenobiotic metabolism markers in marine fish with different trophic strategies and their relationship to ecological variables. **Comparative Biochemistry Physiology. Toxicology and Pharmacology**. v. 149, p. 83-89, 2009.

SPISNI, E.; TUGNOLI, M.; PONTICELLI, A.; MORDENTI, T.; TOMASI, V. Hepatic steatosis in artificially fed marine teleosts. **Journal of Fish Diseases**, v. 21, p. 177-184, 1998.

SUN, L.; CHEN, H.; HUANG, L. Effect of temperature on growth and energy budget of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). **Aquaculture**, v. 261, p.872-878, 2006.

TACON, A. G. J. Lipid Nutritional Pathology in Farmed Fish. **Archives in Animal Nutrition,** v. 49, p. 33-39, 1996.

TOCHER, D. R. Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. **Aquaculture Research**, v. 41, p. 717–732, 2010.

TORANZO, A. E.; BARREIRO, S.; CASAL, J. F.; FIGUERAS, A.; MAGARIÑOS, B.; BARJA, J. L. Pasteurellosis in cultured gilthead seabream (*Sparus aurata*): first report in Spain. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 99, p. 1-15, 1991.

TORANZO, A.E., MAGARIÑOS, B., ROMALDE, J.L. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. **Aquaculture,** v. 246, p. 37-61, 2002.

UENO, T. On two rare pelagic fishes, *Luvarus imperiaUs* and *Rachycentron canadum,* recently captured at Yoichi, Hokkaido, Japan. **Japanese Journal of Ichthyology,** v. 12, p. 99-103, 1965.

VALE, A.; ELLIS, A. E.; SILVA, M. T. Electron microscopic evidence that expression of capsular polysaccharide by *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* is dependent on iron availability and growth phase. **Disease Aquatic Organism**, v. 44, p. 237-240, 2001.

VALE, A.; MAGARIÑOS, B.; ROMALDE, J. L.; LEMOS, M. L.; ELLIS, A. E.; TORANZO, A. E. Binding of haemin by the fish pathogen *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida*. **Disease Aquatic Organism**, v. 48, p. 109-115, 2002.

VALE, A.; MARQUES, F.; SILVA, M. T. Apoptosis of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) neutrophils and macrophages induced by experimental infection with *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida.* **Fish Shellfish Immunology**, London, v. 15, p. 129–144, 2003.

VELKOVA-JORDANOSKA, L.; KOSTOSKI, G. Histopathological analysis of liver in fish (*Barbus meridionalis petenyi* heckel) in reservoir trebenita. **Natural Croatian,** v. 14, 147-153, 2005.

WANG, R.; FENG, J.; SU, Y.; YE, L.; WANG, J. Studies on the isolation of *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* from diseased golden pompano (*Trachinotus ovatus* Linnaeus) and antibacterial agents sensitivity. **Veterinary Microbiology,** v. 162, p. 957–963, 2013.

WOLF, J. C.; WOLFE, M. J. A Brief Overview of Nonneoplastic Hepatic Toxicity in Fish. **Toxicologic Pathology**, v. 33, p. 75–85, 2005.

# ANEXOS

## Anexo 1 – Certificado do comitê de ética no uso de animais.

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal

**CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº 016000/12 do artigo científico intitulado **"Infecção por *Photobacterium damselae* subsp. piscicida em juvenis de cobias (*Rackycentron canadum*) criados no Brasil"**, sob a responsabilidade da Profª Drª Julieta Rodini Engrácia de Moraes está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 06 de agosto de 2012.

Jaboticabal, 09 de agosto de 2012.

Andrigo Barboza De Nardi

**Prof. Dr. Andrigo Barboza De Nardi**
**Coordenador - CEUA**

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal - SP - Brasil
Tel. 16 3209 2600 - fax 16 3202 4275 www.fcav.unesp.br

## Anexo 2 – Diagnóstico molecular da *Photobacterium damselae* subsp *piscicida*

AQUAVET
LABORATÓRIO DE DOENÇAS DE ANIMAIS AQUÁTICOS

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**
**ESCOLA DE VETERINÁRIA**
**DEPARTAMENTO DE MED. VET. PREVENTIVA**
**AQUAVET – LAB. DE DOENÇAS DE ANIMAIS AQUÁTICOS**

**RESULTADO DE EXAMES LABORATORIAIS**

| | |
|---|---|
| **Propriedade:** Departamento de Patologia Veterinária, Universidade Estadual Paulista (UNESP) Campus Jaboticabal. | |
| **Telefone:** (16) 98117-0144 | **Data de recebimento:** 01/09/2014 |
| **Município:** Jaboticabal | **Estado:** SP |
| **Solicitante:** Prof. Julieta Rodini Engrácia de Moraes | |
| **Material enviado:** um isolado bacteriano de origem não informada. Esse foi enviado em placa de petri com meio sólido. | |
| **Quadro Clínico:** não se aplica. | |

**Exames realizados:**

**Identificação dos isolados bacterianos:** a amostra recebida foi repicada em Agar sangue e incubada a 28°C por 48 horas. Posteriormente, o DNA total da amostra foi extraído com kit DNeasy (Qiagen, Alemanha). O gene 16S RNA ribossômico foi amplificado e sequenciado de acordo com Mian et al. (2009). As sequências foram analisadas pelo algoritmo BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) para determinação da espécie bacteriana. O limite fixado para determinação da espécie bacteriana foi de 98% de similaridade na análise de BLAST (Mian et al., 2009).

**Resultados:**

**Bacteriologia**: a identificação do isolado avaliado é descrita na tabela 1. A sequência do gene 16S RNA ribossômico da amostra similaridade superior à 98% na análise de BLAST com amostras de referência *Photobacterium damselae* subespécie *piscicida* disponíveis no Genbank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

**Tabela 1**: amostra, espécie bacteriana e método diagnóstico.

| Amostra | Espécie Bacteriana | Identidade BLAST | Método Diagnóstico |
|---|---|---|---|
| Amostra 1 | *Photobacterium damselae* subespécie *piscicida* | 99% | PCR gene RNA16S e sequenciamento |

Belo Horizonte, 22 de Setembro de 2014.

**Carlos Augusto Gomes Leal**
Prof. Adjunto I, Dr., Médico Veterinário CRMV-MG nº. 9014
AQUAVET- Laboratório de Doenças de Animais Aquáticos
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária
Universidade Federal de Minas Gerais
(31) 3409-2120/2126/ carlosleal@vet.ufmg.br

**Referências**

Mian, G.F., Godoy, D.T., Leal, C.A.G., Yuhara, T.Y., Costa, G.M. and Figueiredo, H.C.P. Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia. **Veterinary Microbiology**, v. 136, p. 180-183, 2009.

**Anexo 3 - Composição bromatológica da ração comercial oferecida aos juvenis de cobias criados em tanques-rede do litoral Norte do Estado de São Paulo.**

| Componente | % |
|---|---|
| Proteína bruta | 47,52 |
| Lipídio | 11,31 |
| Fibra bruta | 1,33 |
| Matéria mineral | 11,80 |

**Anexo 4. Composição de ácidos graxos e lipídio total da ração para juvenis de cobias criados em tanques-rede do litoral Norte do Estado de São Paulo.**

| Lipídio total e ácidos graxos | % |
|---|---|
| Lipídio total (%, peso seco) | |
| n-3 HUFA na ração (%, peso seco) | 17,36 |
| DHA na ração (%, peso seco) | 8,41 |
| EPA na ração (% do total de ácidos graxos) | 4,37 |
| Ácidos graxos (% do total de ácidos | |
| 14:0 | 3,20 |
| 16:0 | 22,70 |
| 18:0 | 5,94 |
| Total saturados | 31,84 |
| | |
| 14:1 | 0,20 |
| 15:1 | 0,11 |
| 16:1 | 6,35 |
| 18:1 | 23,43 |
| 20:1n-9 | 0,92 |
| 20:1n11 | 0,44 |
| Total monoinsaturados | 31,45 |
| | |
| 18:2n-6 | 14,71 |
| 18:3n-6 | 0,15 |
| 18:3n-3 | 1,34 |
| 20:2n-6 | 0,38 |
| 20:3n-6 | 0,18 |
| 20:4n-6 | 1,44 |
| 20:3n-3 | 0,13 |
| 20:4n-3 | 0,29 |
| 20:5n-3 | 4,37 |
| 21:5n-3 | 0,12 |
| 22:3n-6 | 0,50 |
| 22:4n-6 | 0,52 |
| 22:5n-3 | 1,40 |
| 22:6n-3 | 8,41 |
| Total poliinsaturados | 33,94 |
| | |
| Total n-6 PUFA | 16,06 |
| Total n-3 PUFA | 17,89 |
| Total n-3 HUFA | 14,72 |
| Total n-3/Total n-6 | 0,90 |
| DHA + EPA | 12,78 |
| DHA/EPA | 1,92 |

**Anexo 5 – Artigo publicado no periódico Journal Applied Aquaculture - Photobacteriosis outbreak in cage-reared *Rachycentron canadum*: predisposing conditions.**

Journal of Applied Aquaculture



# Photobacteriosis outbreak in cage-reared Rachycentron canadum: predisposing conditions

| | |
|---|---|
| Journal: | *Journal of Applied Aquaculture* |
| Manuscript ID: | WJAA-2014-0103 |
| Manuscript Type: | Original Paper |
| Keywords: | Pasteurellosis, Pathogenesis, Granuloma, Cobia, Clinical case |
| | |

SCHOLARONE™
Manuscripts
For Review Only

URL: http://mc.manuscriptcentral.com/wjaa Email: bradyyj@auburn.edu

Photobacteriosis outbreak in cage-reared *Rachycentron canadum*: predisposing conditions

Julieta R. E. Moraes [1;2], Marina T. Shimada[2], Gustavo S. Claudiano[1], Jefferson Yunis[2], Jose L P Mouriño[3], Jair R.E. Filho[1], Flávio R. Moraes[1]

[1] Department of Veterinary Pathology, FCAV, Unesp, Jaboticabal, SP, Brazil.
[2] Aquaculture Center of Unesp, Caunesp, Jaboticabal, SP, Brazil.
[3]Federal University of Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, SC, Brazil.
*Corresponding author. Tel.: +55 (016) 997568822.

E-mail address: julietaengracia@gmail.com (J R E Moraes).

Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n. Jaboticabal, SP, Brazil. CEP: 14884-900.

RUNNING TITTLE: *Photobacterium damselae* outbreak.

ABSTRACT

The purpose of this study was to report a *Photobacterium damselae* outbreak in young *Rachycentron canadum* in Brazil and discuss the predisposing condition and pathogenesis of the main anatomopathological alterations of the disease. After anamnesis and clinical observations, animals that presented clinical signs were submitted to necropsy. Samples were collected in March, May, July, and September 2011. Macroscopically, the liver was yellowish, softened, and greasy with presence of whitish tubercles multifocal distributed. Some fish also presented tubercles in kidneys and spleen. Microscopically, the tubercles were characterized by chronic lesions with necrotic centers, containing bacterial colonies delimited by macrophages and extensive fibroplasias and steatosis. The results of the microbiological isolation and API 20E kit showed compatibility with *Photobacterium damselae*. Genotypic analysis confirmed the presence of *P. damselae* subsp *piscicida*. The bacterium presented sensitivity only for chloramphenicol and enrofloxacin. This study suggests that steatosis may be an important predisposing factor to photobacteriosis.

**Anexo 6 – Artigo publicado no Journal Veterinary Science Medical Diagnosis – Hepatic steatosis in caged reared Young cobia, *Rachycentron canadum* (Linnaeus, 1766), in Brazil.**

Shimada MT et al., J Vet Sci Med Diagn 2014, 3:2
http://dx.doi.org/10.4172/2325-9590.1000137

Journal of Veterinary Science & Medical Diagnosis

Research Article A SCITECHNOL JOURNAL

# Hepatic Steatosis in Cage-Reared Young Cobia, *Rachycentron canadum* (Linnaeus, 1766), in Brazil

**Shimada MT[1], Claudiano GS[2], Engracia Filho JR[2,4], Yunis J[1], Moraes FR[2], Moreira RG[3] and Moraes JRE[1,2*]**

[1]*Aquaculture Center of Unesp (Caunesp), São Paulo State University (UNESP), SP 14884-900, Brazil*

[2]*Department of Veterinary Pathology, School of Agrarian and Veterinary Sciences, São Paulo State University (UNESP), SP 14884-900, Brazil*

[3]*Department of Physiology, Institute of Biosciences, University of São Paulo, SP, Brazil*

[4]*School of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba/PR, Brazil*

***Corresponding author**: Moraes JRE, Department of Veterinary Pathology, School of Agrarian and Veterinary Sciences, São Paulo State University (UNESP), Via Prof. Paulo Donato Castellane, km 05, Jaboticabal, SP 14884-900, Brazil, Tel: +55 (016) 997852072; E-mail: julietaengracia@gmail.com

**Rec date:** Feb 08, 2014, **Acc date:** May 05, 2014, **Pub date:** May 09, 2014

**Abstract**

This article discusses the pathophysiology of hepatic steatosis in cage-reared cobias from two fish farms with low growth rate record and predisposition to opportunistic diseases. We performed necropsies of cobias with a history of slow growth, high mortality, lethargy, fin ulceration, skin depigmentation, physical deformities, and certain external parasites. Macroscopically, liver volume was increased with pale, softened and friable consistency. Liver samples were collected and fixed in 10% formaldehyde buffer or frozen in liquid nitrogen for histological analysis. Therefore, the samples were stained with hematoxylin-eosin or Sudan black, respectively. The histopathological exam revealed increased volume of hepatocytes, cytoplasmic macrovacuoles with well-defined edges, and peripheral nuclei. Hepatocytes staining with Sudan black showed black-colored vacuoles, a characteristic finding typical of steatosis. After having performed the evaluation of fatty acids in the diet, we verified an imbalance in the proportion of fatty acids, which presented higher quantities of oleic acid than docosahexaenoic acid. This imbalance may have favored the observed accumulation of lipids. After supplementation of fish meal in the diet, a reduction of the severity of steatosis in these fish was observed.

**Keywords:** Teleostei; Saltwater fish; Fatty acids; Liver; Histology

## Introduction

Compared to mammals, fish have greater quantity of vacuolized hepatocytes due to high glycogen or lipid content. However, there is a relation between these altered hepatocytes proportions and the status of fish health [1]. A uniform vacuolization in these cells is a common finding in captive fish, due to artificial feeding that promotes disequilibrium in the influx of fatty acids (FAs) into the hepatocytes, altering their metabolism and use [2].

In lipid metabolism, the liver synthesizes and degrades FAs and esterifies lipids into triglycerides (TGs). An imbalance in the type of FA in the diet can generate fat metamorphosis and steatosis, characterized by the abnormal accumulation of TGs in hepatocytes. Steatosis leads to a pallid liver aspect due to cytoplasmic vacuolization of the hepatocytes. Vacuoles vary in size. However, large vacuoles can dislocate the nuclei to cell's periphery since fat presents greater relative density [3]. There are a few studies available in the literature concerning hepatic steatosis in marine organisms.

Cobia, *Rachycentron canadum*, is a carnivorous marine teleost and the only living representative of Rachycentridae family. Found in tropical and subtropical waters, it is migratory, pelagic, and does not form shoals [4]. Cobia is highly marketable due to its rapid growth and the excellent quality of his fillet. Marine fish farmers have shown increasing interest in this fish [5]. In this study, we describe and discuss the incidence of hepatic steatosis in cage-reared cobia (*R. canadum*) on the coast of Brazil.

## Materials and Methods

59 young cobias, *R. canadum*, (average ~ 280 g) were collected from two fish farms. Water quality parameters were within the comfort range for this species [4] (DO = 5.4 ± 0.2 mg/L, T° = 24.47 ± 5.2 °C and pH = 7.01 ± 0.3). The first sampling was performed in 2011 at a fish farm located on the northern coast of Sao Paulo State (Farm 1). Fish in this farm presented retarded growth and high mortality rates. They were raised in cages and initially were fed commercial feed for carnivorous saltwater fish with 40% of protein. Since July, fish were supplemented with fishmeal. Sample collection and anatomopathological exams were performed in March (n=8), May (n=16), July (n=12), and September (n=8) of this year.

The second fish farm studied was located in the southern coast of Rio de Janeiro (Farm 2). This sampling was performed in June 2012. In this farm, fish were raised in an offshore system of cages and fed a humid paste containing freshwater fish feed and sardines processed at high temperature. These fish showed similar clinical signs of the farm 1. Sample collection was performed preferably in lethargic fish (n=15).

The collected fish from both farms were submitted to necropsy. Liver fragments were collected, fixed in 10% buffered formaldehyde, and processed by a routine protocol of the Fish Pathology Laboratory of Unesp, in order to perform histological slides of fish tissues. Sections of 4 µm thick were stained using hematoxylin and eosin method (HE) and evaluated microscopically. Some liver fragments were frozen in liquid nitrogen, sliced, and stained with Sudan black stain. We also collected ectoparasites for subsequent identification. Histological surface areas were measured using Image Pro Plus software 6.3 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

Aseptic samples of liver were cultivated in brain heart infusion agar (BHI) to microbiological analysis. Bacteria found were characterized and identified biochemically in accordance of Holt et al. [6] and with the API 20E kit (BioMerieux® SA, France). After the biochemical identification of *Photobacterium damselae* subs. *Piscicida*, a PCR was performed following the recommendation of Osorio et al. [7] from 16S rRNA. The resulting sequences were compared with the database of the National Center for Biotechnological Information (NCBI).

Total lipids were extracted using methanol and chloroform (1:2, v/v) according Bligh and Dyer [8] procedure. Total lipid measure was

SciTechnol International Publisher of Science, Technology and Medicine

All articles published in Journal of Veterinary Science & Medical Diagnosis are the property of SciTechnol, and is protected by copyright laws. Copyright © 2014, SciTechnol, All Rights Reserved.