

ISOLAMENTOS DE BACTÉRIAS E VÍRUS EM PEIXES DE ÁGUAS DO MUNICÍPIO DE SANTA MARIA E ARREDORES*

BACTERIAL AND VIRAL ISOLATIONS FROM FISHES FROM THE WATER OF SANTA MARIA COUNTY AND SURROUNDINGS

Terezinha Flores Canabarro**
Deodoro Atlante Brandão****

Rudi Weiblen***
Dolores Spanevello*****

RESUMO

Bactérias e vírus de peixes de águas do município de Santa Maria e arredores foram isolados, sendo comparados com os descritos na literatura como agentes etiológicos das doenças infecto-contagiosas dos peixes. Foram examinados 160 peixes, coletados nas quatro estações do ano, em rios, açudes e tanques de piscicultura. Estes peixes pertenciam à populações aparentemente saudáveis. Para os exames bacteriológicos foram coletadas amostras diretamente dos rins e de lesões externas e internas quando presentes, num total de 232. Os exames destas amostras resultaram no isolamento e identificação de 21 diferentes gêneros de bactérias. Das bactérias isoladas, 11 são relatadas como patogênicas para os peixes, sendo estas *Aeromonas hydrophila*, *Plesiomonas shigelloides*, *Edwardsiella tarda*, *Flavobacterium* spp., *Pseudomonas* spp., *Vibrio* spp., *Pasteurella* spp., *Micrococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Acinetobacter* spp., e *Streptococcus* spp. Para os exames virológicos foram usadas amostras de fígado, baço, gônadas e outros órgãos que mostrassem alterações macroscópicas, num total de 255. Estes materiais foram passados frente à linha celular Epitelioma Papiloso de Carpa (EPC) e dois materiais apresentaram efeito citopatogênico. A sétima passagem destes materiais em cultivo celular foi preparada para microscopia eletrônica, sendo evidenciadas partículas virais. Estas partículas estavam localizadas no citoplasma das células e mediam aproximadamente 50nm de diâmetro.

Palavras-chave: peixes, bactérias, vírus.

SUMMARY

In the present work bacteria and virus were

isolated from fishes and compared with those described in the literature as causing infectious diseases. One hundred and sixty fishes were collected during four seasons from rivers, dams and ponds. All the fishes were from apparently normal populations. Kidney samples and external or internal lesions when present were submitted for bacteria isolation and totalized 232. Twenty-one different bacteria were isolated and identified. Eleven of those are described as pathogenic for fishes: *Aeromonas hydrophila*, *Plesiomonas shigelloides*, *Edwardsiella tarda*, *Flavobacterium* spp., *Pseudomonas* spp., *Vibrio* spp., *Pasteurella* spp., *Micrococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Acinetobacter* spp., and *Streptococcus* spp.. Two hundred and fifty-five materials were used for virological examination mainly liver, spleen and gonad. The samples were passed in the Epitelioma Papillosum of Carpa (EPC) cell line. Two samples showed cytopathic effect after inoculation in the cell system. The seventh passage that still had cytopathic effect were prepared for electron microscopy examination. Viral particles with approximately 50nm were observed in the cytoplasm of the cell.

Key Words: fishes, bacterias, virus.

INTRODUÇÃO

Os peixes, mais que as outras espécies de animais, são extremamente dependentes das condições ambientais para sua sobrevivência. Isto porque o meio aquático pode apresentar muitas variações que debilitam os peixes, tornando-os vulneráveis a vários tipos de doenças, como por exemplo, as doenças nutricionais, parasitárias e infecto-contagiosas.

As populações de peixes em criações intensivas

* Parte da dissertação de mestrado apresentada pelo primeiro autor ao Curso de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e parcialmente financiado pelo CNPq.

** Zootecnista, Departamento de Microbiologia e Parasitologia da UFSM, 97119-900 - Santa Maria, RS.

*** Médico Veterinário, Professor Titular do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Departamento de Microbiologia e Parasitologia da UFSM. Pesquisador do CNPq.

**** Biólogo, Professor Titular do Departamento de Zootecnia da UFSM.

***** Técnico de Laboratório em Bacteriologia, Departamento de Microbiologia e Parasitologia da UFSM.

estão muito mais expostas às doenças, devido ao regime de alimentação, confinamento e densidade populacional, fatores estes que podem tornar o meio ambiente bastante diferente do natural, embora doenças também ocorram em peixes de vida livre. Nas criações racionais, as doenças infecto-contagiosas são responsáveis por grandes perdas econômicas. Nos países onde a piscicultura alcançou altos níveis de desenvolvimento, existe uma grande preocupação com o estudo e diagnóstico destas doenças, quer no sentido de tratá-las, bem como no de efetivar medidas profiláticas. Segundo POST (1987) as doenças infecto-contagiosas são responsáveis por mortalidade ao redor de 60 a 80% dos peixes envolvidos, podendo em alguns casos chegar a 100%. Assim sendo, vários países como Estados Unidos, França, Inglaterra, Itália e Espanha, entre outros, possuem legislação que tornam certas doenças infecto-contagiosas como de declaração obrigatória. As doenças não são resultado do simples contato entre hospedeiro e agente patogênico, e sim de uma interação entre hospedeiro, agente e meio ambiente (Sniesko apud WALTERS & PLUMB, 1980).

POST (1966) descreve a temperatura da água como fator preponderante no surgimento de surtos epizooticos em populações de peixes. Pelo fato de serem animais poiquilotérmicos, as mudanças bruscas de temperatura reprimem o sistema imunológico destes animais.

NIETO et al (1984) descrevem que as bactérias causadoras de doenças em peixes, são patogênicas obrigatórias quando não forem normais ao meio aquático e patogênicas facultativas quando forem encontradas facilmente na superfície do corpo do peixe ou em seu intestino. Os vírus e as rickettsias são os menores microrganismos patogênicos e se caracterizam por proliferarem somente dentro de uma célula viva (FREI, 1971). Dentre estes, vários são responsáveis por doenças em peixes. EIRAS et al (1988) citam como de declaração obrigatória em Portugal, as doenças bacterianas: Furunculose (FUR), Doença Renal Bacteriana (BKD) e Doença da Boca Vermelha (ERM); as viroses: Necrose Pancreática Infecciosa (IPN), Necrose Hematopoiética Infecciosa (IHN), Septicemia Hemorrágica Viral (VHS) e a Viremia Primavera da Carpa (SVC); as parasitárias: Doença do Rodopio (mixosomose) e Doença Renal Proliferativa (etiologia ainda não definida). As bactérias causadoras de doenças em peixes são, em sua grande maioria, gram-negativas. Representando a família Vibrionaceae, são importantes os gêneros *Aeromonas*, *Plesiomonas* e *Vibrios* pertencentes à Enterobacteriaceae, os gêneros *Edwardsiella* e *Yersinia*, espécies de *Flexibacter* das Cytofagaceae são tidas como patogênicas oportunistas. (BULLOCK et al, 1971). Podem ser também patogênicas, *Flavobacterium* sp., *Acinetobacter* sp., *Streptococcus* sp., *Pasteurella* sp., *Pseudomonas* sp., e *Micrococcus* sp., segundo

McDANIEL (1979), PLUMB (1979) e BULLOCK et al (1971). A *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio*, *Yersinia ruckeri* e *Renibacterium*, esta última pertencente à Corynebacteriaceae, são especialmente importantes por produzirem doenças em salmonídeos (POST, 1987).

O conhecimento mais amplo das doenças virais dos peixes e seus agentes etiológicos, ocorreu no período de 1951 a 1978 segundo PILCHER & FRYER (1980). Estes autores citam que após o desenvolvimento de cultivo de linhas celulares de peixes, foi possível diagnosticar surtos epizooticos em criatórios e populações de peixes selvagens, os quais não eram causados por bactérias, fungos ou protozoários. Isto resultou no isolamento e identificação de 11 diferentes vírus causadores de doenças em peixes e em outras 16 manifestações clínicas, a forte evidência de etiologia viral.

KLINKE (1982) cita que a anamnese e lesões macroscópicas são suficientes para indicação de infecção viral em peixes, porém para o diagnóstico definitivo deve-se fazer a identificação do vírus. Segundo o mesmo autor, a identificação pode ser direta, sem o cultivo do vírus, utilizando a técnica de imunofluorescência ou microscopia eletrônica. Ainda, direta com o cultivo de vírus, usando-se para isto cultivos primários ou linhas celulares permanentes. WOLF & QUIMBY (1962) cultivaram a primeira linha celular de peixe em 1960. RUSSEL et al (1975) ressaltam que todas as linhas celulares utilizadas no diagnóstico viral, devem estar livres de micoplasma, podendo-se utilizar a imunofluorescência para efetivar este controle. A idade do cultivo celular tem influência direta na produção de vírus (AHNE, 1978).

No Brasil, nada ou quase nada se sabe quanto ao envolvimento de agentes bacterianos ou virais nas mortalidades de peixes, pois não foram encontrados relatos de diagnósticos laboratoriais com a finalidade de detectar estes agentes infecciosos. Em relação a este tema, encontrou-se editada no país apenas uma publicação de BOTELHO & ABREU (1971) sobre doenças e tratamentos de peixes ornamentais, a qual baseia-se somente nas manifestações clínicas. Assim os objetivos deste trabalho foram tentar o isolamento e identificação de bactérias e vírus em peixes de águas do município de Santa Maria e arredores, e compará-los com os descritos na literatura como patogênicos para os peixes. Ainda, através da adaptação dos métodos diagnósticos para doenças infecto-contagiosas dos peixes, abrir caminhos para estudos futuros das possíveis enfermidades que possam estar presentes em peixes das águas de nossa região e assim buscar métodos de tratamentos preventivos e curativos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 160 peixes capturados vivos ou

moribundos, ou recentemente mortos, de açudes, rios e tanques da região de Santa Maria, independente de tamanho, peso, sexo, idade e espécie. Os peixes foram capturados nos açudes e tanques da Companhia Rio-grandense de Saneamento de Santa Maria (CORSAN), rios Ibicuí e Guaçupi na localidade de São Martinho, rio Vacacaí na localidade do Passo do Verde, rio São Sepé no município de São Sepé e açudes de Camobi, Pains e São Martinho, todos do município de Santa Maria.

As coletas foram realizadas nas quatro estações do ano no período entre junho de 1988 a dezembro de 1990. Os métodos de captura, transporte, identificação e necropsia dos peixes foram descritos por CANABARRO (1991).

Todas as lesões foram processadas para exame bacteriológico. Precedendo o exame interno, o animal recebia uma desinfecção com gaze estéril embebida em álcool. Com o auxílio de tesoura e pinça estéril era feita uma incisão na linha ventral média do peixe, sem romper o intestino. No exame interno foram observados tamanho, forma e coloração dos órgãos, levando-se em conta a espécie do peixe. Todas as lesões e alterações de cada peixe examinado, eram anotadas em ficha protocolo. O rim foi o órgão escolhido para exame bacteriológico, conforme indicação de BULLOCK et al (1971), McDANIEL (1979) e POST (1987), sendo este processado em todos os peixes analisados. As lesões externas e internas, quando foram detectadas, e o rim de todos os peixes foram semeados individualmente em Trypticase Soy Agar (TSA) (DIFCO), Brain Heart Infusion (BHI) (DIFCO) e Agar Sangue Azida (ASA) (DIFCO) e MacConkey (DIFCO), distribuídos em placa de petri, cada placa continha 20ml do respectivo meio de cultura. Os métodos de semeadura, inoculação e identificação bacteriana foram descritos por CANABARRO (1991).

O exame virológico dos peixes foi realizado a partir de amostras de fígado, baço e gônadas, sendo também processado qualquer outro órgão ou tecido que apresentasse alteração. A metodologia utilizada para os exames virológicos encontra-se descrita por CANABARRO (1991). Utilizou-se a linha celular Epitelioma Papiloso de Carpa (EPC). Eram preparados tubos com 1ml de suspensão celular em MEM (Minimal Essential Medium) enriquecido com 10% de Triptosa Fosfato e suplementado com 10% de soro fetal bovino. A inoculação do material era realizada no momento da distribuição do cultivo celular nos tubos. O inóculo constava de 0,2ml da diluição 1:20 do material suspeito. A diluição era feita previamente com o mesmo meio utilizando 2x antibiótico. Os materiais foram inoculados com duas repetições e incubados em estufa a 26°C durante 7 dias. Tubos testemunhas, contendo apenas cultivo celular, eram mantidos nas mesmas condições. Todos os tubos eram observados diariamente em microscópio invertido, para detectar a presença de efeito citopatogênico (ECP). A leitu-

ra diária era anotada em fichas controle. No final do sétimo dia, os tubos eram congelados a -18°C, e posteriormente reinoculados, efetuando-se assim a segunda passagem do material em cultivo celular (2 EPC). Os materiais sem efeito citopatogênico, na segunda passagem, foram considerados negativos. Aqueles que mostravam algum tipo de alteração no cultivo celular, em passagens sucessivas, eram reinoculados até a 7ª passagem (ECP), sendo esta então preparada para microscopia eletrônica para visualização de partículas virais.

Para a análise estatística dos isolamentos bacterianos, utilizou-se a análise da variância e teste de Tukey ao nível de 5%, para detectar diferenças significativas. Para análise da variância os dados foram transformados pela fórmula $\sqrt{X + 0,5}$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos peixes examinados foram isoladas 21 bactérias de diferentes gêneros, pertencentes às famílias: Vibrionaceae, Rhizobiaceae, Achromobacteriaceae, Corynebacteriaceae, Brucellaceae, Micrococcaceae, Enterobacteriaceae, Streptococcaceae e Pseudomonadaceae.

As bactérias isoladas, bem como os percentuais de prevalência nas diferentes estações do ano, constam nas Tabelas 1 e 2.

Na família das Vibrionaceae encontram-se os gêneros *Aeromonas*, *Plesiomonas* e *Vibrio*. No presente trabalho, dos microrganismos isolados e identificados, 43 foram *Aeromonas hydrophila*, as quais representam 18,5% das amostras analisadas, perfazendo 30,2% dos isolamentos. Deste percentual, 18% ocorreram na primavera, 22% no verão, 31,2% no outono e 11,2% no inverno. Estes achados não são surpresa, pois segundo McDANIEL (1979) a ocorrência da *Aeromonas hydrophila* em peixes de água doce de todas as partes do mundo é esperada. Isto é reforçado por KLINKE (1982) que descreve a *Aeromonas hydrophila* como normal em águas, principalmente com sobrecarga orgânica, podendo ser o caso do presente trabalho. Já NIETO et al (1984) descrevem que as bactérias causadoras de doenças em peixes, são patogênicas obrigatórias, quando não forem normais ao meio aquático, e patogênicas facultativas quando forem encontradas facilmente neste meio e conseqüentemente encontradas na superfície do corpo e intestino dos peixes. A maioria das *Aeromonas hydrophila* neste trabalho, foi isolada de órgãos internos, principalmente dos rins, e considerando os achados de NIETO et al (1984), pode-se classificar esta bactéria como patogênica facultativa em peixes de nossa região, embora os isolamentos aqui realizados fossem de peixes aparentemente normais, ou seja, os animais não pertenciam a populações que apresentassem surtos epizooticos.

A *Plesiomonas shigelloides*, também pertencente à família *Vibrionaceae*, foi recentemente diagnosticada como responsável por surtos septicêmicos em peixes, mostrando altos índices de mortalidade (CRUZ et al, 1986). Esta bactéria foi quantitativamente o segundo gênero mais isolado das 232 amostras processadas neste trabalho, representando 21,1% do total dos isolamentos. Segundo CRUZ et al (1986), a *Plesiomonas shigelloides* está normalmente presente na água e surtos epizooticos repentinos podem ocorrer quando os peixes são estressados devido às condições ambientais desfavoráveis, como elevação de temperatura e acúmulo de matéria orgânica. Embora não houvesse surtos epizooticos de mortalidade no presente trabalho, não se pode desprezar a importância destes isolamentos, uma vez que condições ambientais desfavoráveis e estresse podem ocorrer em nosso meio. O aumento da temperatura, citado por JOHANSON (1978) e CRUZ et al (1986) como fator desencadeante de surtos bacterianos em peixes, pode ser observado neste trabalho, pois o percentual de isolamento de *Plesiomonas shigelloides* foi mais expressivo com a elevação de temperatura (Tabela 2). Estes resultados são importantes, pois sabe-se que quando criados intensivamente, os peixes tornam-se susceptíveis às enfermidades, sendo a elevação de temperatura um fator pré-disponente BULLOCK et al, 1971).

O gênero *Vibrio* também pertencente à *Vibrionaceae*, foi isolado das amostras deste trabalho. Embora tenha ocorrido com baixo percentual acredita-se na importância deste isolamento, pois o *Vibrio sp.* é um dos principais agentes patogênicos em peixes e foi isolado dos rins de um exemplar de Jundiá (*Rhandia sp.*). Por outro lado, as manifestações clínicas produzidas pela *Vibrio sp.*, são muito semelhantes às resultantes nas infecções por *Aeromonas hydrophila*, bem como a proximidade de suas características bioquímicas. A

TABELA 1- Isolamentos bacterianos obtidos de 160 peixes coletados de águas de Santa Maria e arredores nas várias estações do ano.

BACTÉRIAS	PRIMA- VERA	VERÃO	OUTONO	INVERNO	TOTAL
Sem crescimento	15	16	17	42	90a**
<i>Aeromonas hydrophila</i> *	9	8	15	11	43 b
<i>Plesiomonas shigelloides</i> *	12	6	7	5	30 bc
<i>Flavobacterium sp.*</i>	1	1	1	7	10 cd
<i>Providencia sp.</i>	1	0	2	6	9 cd
<i>Pseudomonas sp.*</i>	1	0	0	7	8 d
<i>Chromobacterium sp.</i>	1	0	0	6	7 d
<i>Pasteurella sp.*</i>	1	1	1	4	7 d
<i>Klebsiella sp.</i>	1	2	0	1	4 d
<i>Escherichia coli</i>	2	0	1	0	3 d
<i>Citrobacter freundii</i>	1	0	1	1	3 d
<i>Staphylococcus sp.</i>	3	0	0	0	3 d
<i>Hafnia alvei</i>	0	0	0	2	2 d
<i>Micrococcus sp.*</i>	0	0	0	2	2 d
<i>Enterobacter sp.</i>	1	1	0	0	2 d
<i>Serratia sp.</i>	0	0	2	0	2 d
<i>Corynebacterium sp.*</i>	0	1	0	1	2 d
<i>Acinetobacter sp.*</i>	0	0	0	1	1 d
<i>Streptococcus sp.*</i>	1	0	0	0	1 d
<i>Edwardsiella tarda</i> *	0	0	1	0	1 d
<i>Vibrio sp.*</i>	0	0	0	1	1 d
<i>Shigella sp.</i>	0	0	0	1	1 d
TOTAL DE SEMEADURAS	50	36	48	98	232
TOTAL DE PEIXES COLETADOS	30	28	33	69	160

* Bactérias descritas como patogênicas

** a, b, c, d - Letras diferentes representam diferenças significativas ao nível de 5% (TUKEY).

TABELA 2- Percentuais de isolamentos bacterianos obtidos de 160 peixes coletados de águas de Santa Maria e arredores nas várias estações do ano.

BACTÉRIAS	PRIMA- VERA	VERÃO	OUTONO	INVERNO	TOTAL
Sem crescimento	30,00	43,20	35,40	42,82	38,79a**
<i>Aeromonas hydrophila</i> *	18,00	22,20	31,25	11,20	18,53 b
<i>Plesiomonas shigelloides</i> *	24,00	16,20	14,50	5,10	12,93 bc
<i>Flavobacterium sp.*</i>	2,71	2,70	2,00	7,10	4,32 cd
<i>Providencia sp.</i>	2,00	0,00	4,10	6,10	3,87 cd
<i>Pseudomonas sp.*</i>	2,00	0,00	0,00	7,10	3,44 d
<i>Chromobacterium sp.</i>	2,00	0,00	0,00	6,10	3,01 d
<i>Pasteurella sp.*</i>	2,00	2,70	2,00	4,00	3,01 d
<i>Klebsiella sp.</i>	2,00	5,40	0,00	1,00	1,72 d
<i>Escherichia coli</i>	4,00	0,00	2,00	0,00	1,29 d
<i>Citrobacter freundii</i>	4,00	0,00	0,00	1,00	1,29 d
<i>Staphylococcus sp.</i>	6,00	0,00	0,00	0,00	1,29 d
<i>Hafnia alvei</i>	0,00	0,00	0,00	2,00	0,86 d
<i>Micrococcus sp.*</i>	0,00	0,00	0,00	2,00	0,86 d
<i>Enterobacter sp.</i>	2,00	2,70	0,00	0,00	0,86 d
<i>Serratia sp.</i>	0,00	0,00	4,10	0,00	0,86 d
<i>Corynebacterium sp.*</i>	0,00	2,70	0,00	1,00	0,86 d
<i>Acinetobacter sp.*</i>	0,00	0,00	0,00	1,00	0,43 d
<i>Streptococcus sp.*</i>	2,00	0,00	0,00	0,00	0,43 d
<i>Edwardsiella tarda</i> *	0,00	0,00	2,00	0,00	0,43 d
<i>Vibrio sp.*</i>	0,00	0,00	0,00	1,00	0,43 d
<i>Shigella sp.</i>	0,00	0,00	0,00	1,00	0,43 d
TOTAL DE SEMEADURAS	50	36	48	98	232
TOTAL DE PEIXES COLETADOS	30	28	33	69	160

* Bactérias descritas como patogênicas

** a, b, c, d - Letras diferentes representam diferenças significativas ao nível de 5% (TUKEY).

importância de peixes portadores na transmissão da doença também é relevante segundo o descrito por McDANIEL (1979).

O gênero *Flavobacterium* pertence à família *Acetivibrionaceae* foi isolado de 10 amostras dos peixes coletados. Destas observações, sete foram obtidas no inverno e um isolamento em cada uma das outras estações do ano. Segundo FARKAS (1985), *Flavobacterium* sp. é responsável pela doença bacteriana das brânquias e infecta peixes principalmente quando a temperatura da água mostra-se mais baixa. A ocorrência desta bactéria no presente estudo, pode indicar o possível aparecimento da doença bacteriana das brânquias nos peixes desta região principalmente no inverno e início da primavera.

A família das *Enterobacteriaceae* abriga um grande número de espécies bacterianas estreitamente relacionadas entre si e que habitam o intestino grosso do ser humano e animais, solo, água e materiais em decomposição (JOKLIK et al, 1986). Em peixes, segundo HAWKE (1979), encontra-se a *Edwardsiella tarda*, pertencente a esta família e responsável pela infecção sistêmica conhecida como "Emphysematous putrefactive disease". Embora no presente trabalho esta bactéria tenha ocorrido com prevalência reduzida (2% dos isolamentos no outono e 0,7% do total dos isolamentos) a presença desta deve ser considerada e desperta interesse, pois fezes de outras espécies podem tornar-se fonte de contaminação segundo JOKLIK et al (1986). Fica aqui a preocupação pela prática da alimentação de peixes com fezes de animais em criações semi-intensivas. Os outros gêneros de *Enterobactérias* isoladas neste trabalho, que são: *Providencia* spp., *Hafnia alvei*, *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp. e *Shigella* spp., ocorreram em baixos percentuais como pode ser observado na Tabela 1 e 2 e não são relatadas como causadoras de doenças em peixes. Entretanto WHITE et al (1973) citam que esporadicamente as *Enterobactérias* podem ser responsáveis por alguma mortalidade em peixes.

A *Pasteurella* gênero pertencente à família *Bruceellaceae* possui um amplo espectro de infecção, causando enfermidade em animais e no ser humano, entretanto, também compõe a flora normal de vários animais domésticos (JOKLIK et al, 1986). A *Pasteurelose* foi diagnosticada em várias espécies de peixes de estuários e marinhos segundo McDANIEL (1979). Citada pelo mesmo autor, a *Pasteurella piscicida* é descrita como responsável por doença em peixes de água salobre ou salgada. No presente estudo ocorreram 7 isolamentos de *Pasteurella* spp. e mesmo não sendo comprovada a patogenicidade das bactérias isoladas, registra-se a ocorrência deste gênero nas amostras de peixes coletados nas águas de Santa Maria e arredores.

A família *Pseudomonadaceae* está representada

neste trabalho pelo isolamento de *Pseudomonas* spp. . O gênero *Pseudomonas* se compõe de um grande número de bacilos gram-negativos, não fermentativos, aeróbicos, que habitam o solo e água, onde são importantes na decomposição de matéria orgânica (JOKLIK et al, 1986). Estes autores citam 35°C como temperatura ótima para o crescimento deste gênero de bactéria, podendo ocorrer também a 42°C. Entretanto BOOTSMA (1986) cita temperaturas inferiores a 20°C para o aparecimento da *Red spot disease* a qual tem como agente etiológico a *Pseudomonas anguilliseptica*. Os isolamentos no presente trabalho ocorreram a 27°C, temperatura esta mais próxima à descrita por BOOTSMA (1986). MEYER & COLLAR (1964) relatam o isolamento de *Pseudomonas* sp. de *White Catfish* moribundos que apresentavam lesões pronunciadas e estando estes peixes também infestados pelo protozoário *Ichthyophthirius multifiliis*. Embora os autores não tenham conseguido identificar a espécie desta bactéria, citam que as características eram bastante próximas às da *Pseudomonas fluorescens* a qual é patogênica para os peixes. Assim sendo, levando em conta os relatos dos diferentes autores, e uma vez que os isolamentos realizados neste estudo foram provenientes dos rins de peixes que apresentavam também apodrecimento de barbatanas, a observação de *Pseudomonas* sp., pode indicar a possibilidade de manifestações de doenças causadas por este gênero de bactéria em peixes de nossa região.

O gênero *Staphylococcus* não é citado na literatura como importante nas doenças de peixes, entretanto, foram isolados dos peixes amostrados neste trabalho. O *Staphylococcus* sp. foi isolado em peixes coletados na primavera e representou 2,1% dos isolamentos totais. Pela ausência de relatos de sua importância patogênica apenas cita-se o isolamento deste gênero no presente estudo.

O *Micrococcus* sp. também incluído na família *Micrococcaceae* (como gênero anterior), é citado por Conroy apud BULLOCK et al (1971), como possível agente etiológico em trutas enfermas na Argentina. A observação deste gênero no presente trabalho, ocorreu no inverno e representa 3,5% dos isolamentos nesta estação do ano. Registra-se a observação deste microrganismo em peixes analisados, uma vez que são poucas as informações sobre a ocorrência do mesmo.

O gênero *Corynebacterium* pertencente à família *Corynebacteriaceae*, possui importância na etiologia das doenças em peixes. Os isolamentos de *Corynebacterium* spp. ocorreram em 2,7% das observações realizadas no verão e 1% no inverno. O agente etiológico da *Bacterial Kidney Disease* (BKD) foi identificado como sendo do gênero *Corynebacterium* sem ter sido possível determinar a espécie por vários anos. Posteriormente foi aceita a classificação *Corynebacterium salmoninarum* (POST, 1987 e BULLOCK et al, 1971). Em 1980 um novo gêne-

ro e espécie foi aceite oficialmente como agente causador da BKD a *Renibacterium salmoninarum*, ficando incluído na família *Corynebacteriaceae* (POST, 1987; SARAIVA, 1986).

As bactérias gram-positivas como citam ROBINSON & MEYER (1966), poucas vezes são reportadas como agentes etiológicos com patogenicidade para peixes. Entretanto, estes mesmos autores relatam o isolamento de *Streptococcus* sp. de surtos epizooticos confirmando-se como causador da enfermidade, tornando-se este gênero da família *Streptococcaceae* indutor de doenças em peixes. No presente trabalho foi isolado *Streptococcus* sp. dos rins de um peixe coletado na primavera, embora não houvesse evidência de lesões internas ou externas.

O *Acinetobacter* sp. é um microrganismo responsável por grandes perdas em criatórios pelo fato de infectar ovos de peixes como descreve PLUMB (1979). O isolamento de *Acinetobacter* sp. foi efetuado dos rins de um peixe capturado no inverno.

Amostras de fígado, baço, ovário ou testículos de 160 peixes coletados nas águas dos arredores de Santa Maria, foram passados em cultivos celulares de Epitelioma Papiloso de Carpa (EPC), perfazendo um total de 255 materiais.

Como resultado destas inoculações, dois materiais demonstraram efeito citopatogênico, observados desde as principais passagens dos materiais e persistindo até a sétima passagem. Esta passagem, identificada com 7 EPC, foi posteriormente preparada para microscopia eletrônica. No microscópio eletrônico foram evidenciadas um número considerável de partículas virais, com diâmetro variando entre mais ou menos 31,7nm a 63nm, localizadas no citoplasma ds células (Figura 1). As outras 253 amostras de materiais não apresentaram efeito citopatogênico após sucessivas passagens em cultivo celular, sendo considerada negativa para atividade viral frente a linha celular EPC.

O isolamento das partículas virais ocorreram de ovário de peixes coletados de um açude da localidade de Camobi, distrito de Santa Maria, em 30 de maio de 1989. Os referidos peixes, pertenciam à espécie *Tambicú* (*Astyanax bimaculatus lacustris*). Não houve crescimento bacteriano nos meios *MacConkey*, *Brain Heart Infusion*, *Tripticase Soy Agar* e *Ágar Sangue Azida* das amostras dos rins destes dois exemplares.

Segundo KLINKE (1982), a linha celular EPC tem seu crescimento ótimo a 25°C, entretanto, o mesmo autor cita em outro capítulo de sua publicação, que células de Ciprinídeos multiplicam-se bem em temperaturas de 25°C a 30°C. A adaptação da linha celular EPC em nosso laboratório, efetivou-se em estufa numa temperatura a 27°C.

As células de peixes de água doce podem ser cultivadas com os meios TC 199, L15 e MEM que tam-

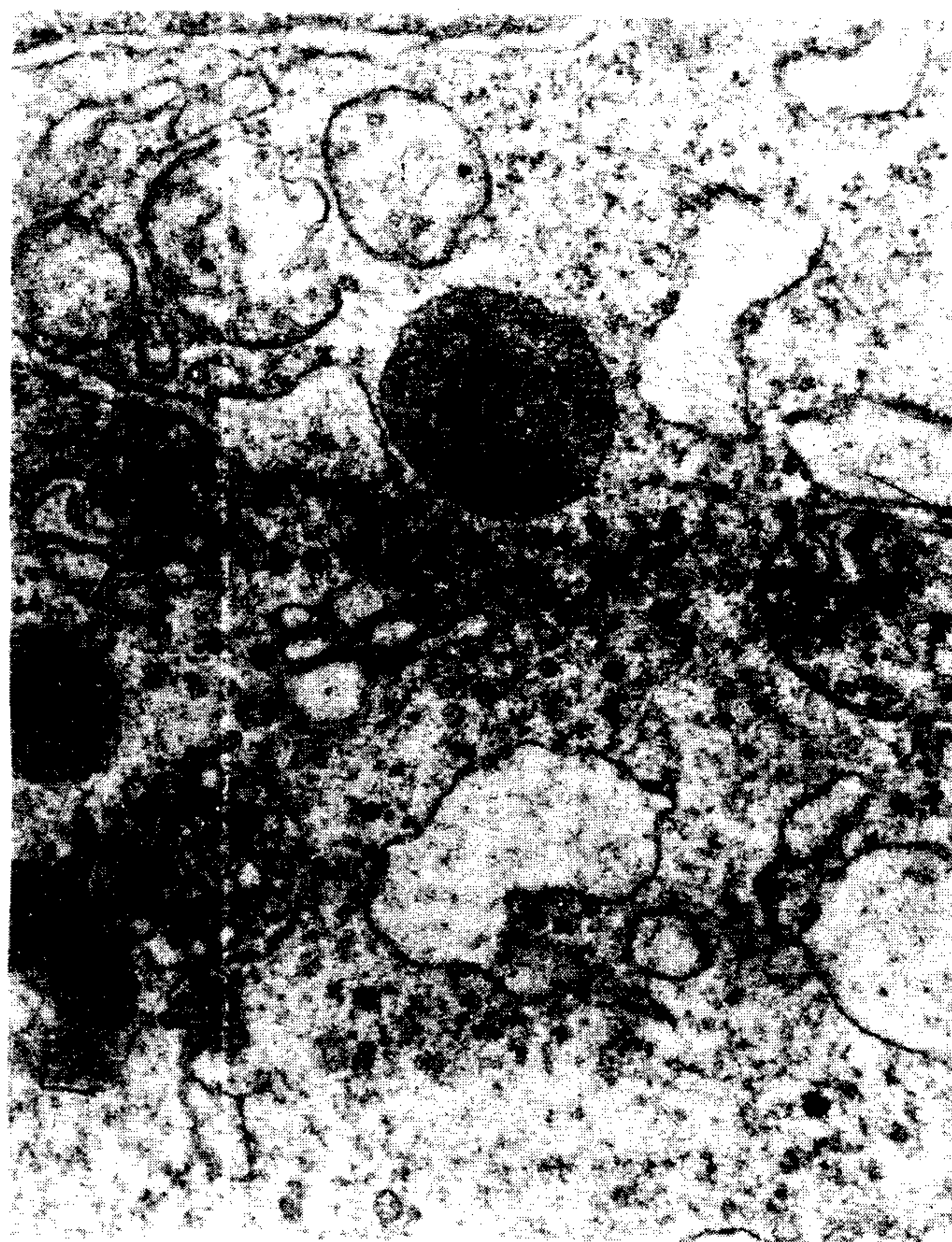


FIGURA 1 - Partículas virais visualizadas na microscopia eletrônica, de material de ovário de tambicú, inoculado na linha celular epitelioma papiloso de carpa.
40.000x Esc.=250nm

bém são utilizados para células de mamíferos, segundo KLINKE (1982), BULLOCK et al (1971) e McDANIEL (1979). Utilizou-se o meio de cultivo *Minimal Essential Medium* (EAGLE), suplementado com 10% de soro fetal bovino e 10% de triptosa fosfato. Após o período de adaptação das células às condições do laboratório a linha celular EPC mostrou-se facilmente subcultivável apresentando confluência total em 24 horas e permitindo subcultivo na proporção de 1:4.

Foram feitas várias tentativas para a obtenção de cultivo primário de células a partir de tecido de ovário e testículo da espécie traíra (*Hoplias malabaricus*), utilizando protocolo de trabalho proposto por KLINKE (1982) e WOLF & QUIMBY (1962), porém com pouco sucesso. Conseguiu-se numa das tentativas o cultivo primário, entretanto, não foi possível o subcultivo destas células.

Os peixes utilizados foram na sua grande maio-

ria, coletados aleatoriamente e tidos aparentemente como sadios; na verdade a expectativa era no sentido da identificação de portadores. Sendo assim nem sempre foi possível tomar todas as precauções quanto aos métodos ideais para conservação em laboratório, de possíveis vírus isolados, por desconhecer-se a identidade dos mesmos e suas características específicas quanto à termolabilidade. Acredita-se que o tipo de conservação empregada no presente trabalho, não foi suficiente para preservar a infectividade do vírus presente nos dois materiais proveniente de Tambicú (*Astyanax bimaculatus lacustris*), pois após estoque de 6 meses a uma temperatura de -18°C não foi possível observar efeito citopatógeno em cultivo celular inoculado com material original ou reinoculações das diferentes passagens anteriormente obtidas, assim sendo não foi possível realizar outros testes que permitissem a identificação definitiva do vírus isolado. Entretanto, foi possível a visualização das partículas virais na microscopia eletrônica.

A técnica de inoculação das amostras suspeitas pelo método convencional, citado por AHNE (1978), KLINKE (1982) e McDANIEL (1979), não pode ser adotado na rotina do presente trabalho, pois resultava no despreendimento do tapete celular durante o período destinado à adsorção de possíveis partículas virais existentes. Suspeitou-se primeiramente serem os materiais inoculados, tóxicos para o cultivo celular, passando-se então a utilizar estes materiais numa diluição 1:20 e efetuou-se a inoculação no momento da distribuição do cultivo celular. Este método mostrou-se satisfatório, ocorrendo uma pequena ação tóxica de alguns materiais na primeira passagem, desaparecendo totalmente nas passagens subsequentes.

CONCLUSÕES

Levando-se em consideração os resultados obtidos no presente trabalho e as condições em que foi realizado, pode-se concluir que: 1) Pelos isolamentos bacterianos obtidos, fica evidenciada em nossa região, a presença de peixes portadores de bactérias patogênicas; 2) Recomenda-se atenção para a ocorrência de surtos epizooticos repentinos que estão na dependência de fator ou fatores que levem os peixes desta região a estresse; 3) Os resultados virológicos demonstram a presença de vírus em animais examinados; 4) No Brasil, esta é a primeira citação da presença de vírus e bactérias patogênicas em peixes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHNE, W. Laboratoriumsdiagnostik fischpathogener viren. *Tierartl Umschau*, v. 5, p. 584, 1978.
- BOOTSMA, R. Bacterial disease of fish: laboratory findings versus diagnosis. In: *Inter Symp Vet Lab Diag*, 1986, The Royal Netherland Vet. Ass., 1986, p. 418-427.
- BOTELHO, G., ABREU, A.B. *Doenças e tratamentos dos peixes ornamentais* São Paulo: editora Nobel, 1971, 125 p.
- BULLOCK, G.L., CONROY, D.A., SNIESZKO, S.F. *Disease of fishes*. New Jersey: T.F.H. Publications, 1971, Book 2 A. 151 p.
- CANABARRO, T.F. *Isolamentos de bactérias e vírus em peixes de águas do Município de Santa Maria e arredores* Santa Maria, 1991, 81 p. Tese (Mestrado em Zootecnia) - Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, RS, 1991.
- CRUZ, M.J., SARAIVA, A., EIRAS, J.C., et al. An outbreak of *Plesiomonas shigelloides* in farmed Rainbow Trout (*Salmo gairdneri* Richardson), in Portugal. *Bull Eur Ass Fish Pathol* v. 6, n. 1, p. 20-22, 1986.
- EIRAS, J.C., SARAIVA, A., CRUZ, C. Sobre a ausência de algumas doenças de peixes de declaração obrigatória em Portugal. *Pull do Inst de Zoo "Dr. Augusto Nobre" Fac. de Ciências do Porto*, n. 200, p. 1-10, 1988.
- FARKAS, J. Filamentous *Flavobacterium* sp. isolated from fish with gill diseases in cold water. *Rev Aquac*, v. 44, p. 1-10, 1985.
- FREI, W. *Patologia Geral para Veterinários* 2 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1971, 33 p.
- HAWKE, J.P. A bacterium associated with disease of pond cultured Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*). *J Fish Res Board* cap. 36, p. 1508-1512, 1979.
- JOHANSON, N. Seasonal variations related to water temperature in the occurrence of some bacterial and protozoan infections in Swedish Salmo Station. *Salmo Res Inst Report*, v. 3, p. 108, 1978.
- JOKLIK, W.K., WILLET, H.P., AMOS, D.B. *Zinsser Microbiologia* 18 ed., Buenos Aires: editora Médica Panamericana, 1986, 1454 p.
- KLINKE, H.H.R. *Enfermidade de Los Peces* 3. ed. Zaragoza Acribia, 1982, 507 p.
- McDANIEL, D. *Procedures for detection and identification of certain fish pathogens* American Fisheries Society, Fish Health Section, 1979, 118 p.
- MEYER, F.P., COLLAR, J.D. Description and treatment of *Pseudomonas* infection in White Catfish. *Appl Microb*, v. 12, n. 3, p. 201-203, 1964.
- NIETO, T.P., TORANZO, A.E., BARJA, J.L. Comparison between the bacterial flora associated with fingerling rainbow Trout cultured in two different hatcheries in the north west of Spain. *Rev Aquac* v. 42, p. 193-206, 1984.

AHNE, W. Laboratoriumsdiagnostik fischpathogener viren.

- PILCHER, K.S., FRYER, J.L. The viral disease of fish: A review through 1978, part 1 - Diseases of proven viral etiology. *CRC Crit Rev in Microb*, p. 287-363, 1980.
- PLUMB, J.A. Principal disease of farm-raised Catfish. *Southern Cooperative Series, Boletim* 225, 1979, 92 p.
- POST, G. Response of Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) to antigens of *Aeromonas hydrophila* *J Fisheries Bd Can*, v. 23, n. 10, p. 1487-1490, 1966.
- POST, G. *Textbook of Fish Health*. New Jersey: T.F.H. Publications, 1987, 288 p.
- ROBINSON, J.A., MEYER, F.P. Streptococcal fish pathogen. *J of Bact*, v. 92, n. 2, p. 512, 1966.
- RUSSEL, W.C., NEWMAN, C., WILLIAMSON, D.H. A simple citochemical technique for demonstration of DNA in cell infected with mycoplasma and viruses. *Nature*, v. 253, p. 461, 1975.
- SARAIVA, A.M.P.M. *Doenças bacteriana renal (BKD), uma síntese*. Porto, Universidade do Porto, 1986, 71 p.
- WALTER, G.R., PLUMB, J.A. Enviromental stress and bacterial infection in Channel Catfish (*Ictalurus punctatus Rafinesque*). *J Biol*, v. 17, p. 177-187, 1980.
- WHITE, F.H., SIMPSON, C.F., WILLIAMS, E. Jr. Isolation off *E. tarda* from aquatic animal species and surface waters in Florida. *J Wildl Dis*, v. 9, p. 204-208, 1973.
- WOLF, K., QUIMBY, M.C. Established enrythermic line of cells in vitro. *Science*, v. 135, p. 1065-1066, 1962.