

INFECÇÃO COM TROFOZOÍTOS DE *Ichthyophthirius multifiliis*
(CILIOPHORA) EM *Poecilia vivipara* (POECILIIDAE)
COMO HOSPEDEIRO EXPERIMENTAL

LUCIANA GHIRALDELLI,^{1A} WASHINGTON DE BARROS ADAMANTE,^{2B} MAURÍCIO LATERÇA MARTINS,^{1C}
JOSÉ LUIZ PEDREIRA MOURIÑO,^{1,4} APARÍCIO AUGUSTO RODRIGUES STREIT,^{2A}
ALEXANDER CAMARAS BERESTINAS,³ CLAUDIO LOUREIRO^{4A} E CLAIRE JULIANA FRANCISCO⁵

1. Laboratório de Diagnóstico e Patologia em Aqüicultura, Departamento de Aqüicultura, CCA, UFSC, Florianópolis, SC
2. Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce, Departamento de Aqüicultura, UFSC, Florianópolis, SC
3. Laboratório de Piscicultura Marinha, Departamento de Aqüicultura, CCA, UFSC, Florianópolis, SC
4. Laboratório de Camarões Marinhos, Departamento de Aqüicultura, CCA, UFSC, Florianópolis, SC
5. Centro de Aqüicultura, UNESP, Jaboticabal, SP

Bolsistas: a Mestrado CAPES, bMestrado CNPq, c Produtividade em Pesquisa CNPq

Correspondência: Maurício L. Martins – Departamento de Aqüicultura, CCA, UFSC, Rod. Admar Gonzaga 1346,
88040-900, Florianópolis, SC, Brasil. E-mail: mlaterca@cca.ufsc.br

RESUMO

Este trabalho estudou o grau de parasitismo em *Poecilia vivipara* infectado experimentalmente com trofozoítos de *Ichthyophthirius multifiliis*. Em frascos de 400 mL de água com aeração constante foram acondicionados quatro peixes, com duas réplicas e adicionadas as quantidades de 0, 1, 2, 4, 8, 16 e 20 trofozoítos/peixe. Os valores médios da temperatura da água, pH e oxigênio dissolvido foram de 19,5±0,39°C, 6,35±0,09 e 7,02±0,45mg/L, respectivamente. Antes de se proceder à infecção, os animais foram tratados com solução de formalina 1:4000 durante uma hora por dois dias consecutivos. Obtiveram-se os parasitos de cinco alevinos de *Salminus brasiliensis* infectados, mantidos em placas

de Petri com água por trinta minutos. Coletaram-se os trofozoítos com pipeta Pasteur e adicionou-se o número respectivo em cada tratamento. Para evitar que os parasitos ficassem aderidos às placas, cada uma foi mantida no respectivo frasco durante o período. Após sete dias, os peixes foram sacrificados e examinados, exceto os expostos a 20 trofozoítos/peixe, os quais morreram em dois dias. O valor médio do tratamento com 20 trofozoítos/peixe foi significativamente maior (P<0,05) do que os tratamentos 0, 1, 2, 4, 8 e 16. Indica-se o inóculo entre 1 e 16 trofozoítos/peixe como viável para o estudo de infecção experimental na espécie estudada, pelo fato de os peixes permanecerem parasitados durante todo o período experimental.

PALAVRAS-CHAVE: *Ichthyophthirius multifiliis*, infecção experimental, *Poecilia vivipara*.

ABSTRACT

INFECTION WITH TROPHOZOITES OF *Ichthyophthirius multifiliis* (CILIOPHORA) IN *Poecilia vivipara*
(POECILIIDAE) AS AN EXPERIMENTAL HOST

This experiment studied the parasitic degree in *Poecilia vivipara* experimentally infected by *Ichthyophthirius multifiliis* trophozoites. In flasks with 400 mL of water, four fish were maintained with constant aeration in two replicates and added 0, 1, 2, 4, 8, 16 and 20

trophozoites/fish. Mean values of water temperature, pH and dissolved oxygen were 19.5±0.39°C, 6.35±0.09 and 7.02±0.45mg/L, respectively. Before experimental infection the fish were treated with formalin solution 1:4000 for 1 hour in two consecutive days. The parasites were obtained from

five infected *Salminus brasiliensis* that were maintained into Petri dishes with water for 30 minutes. Trophozoites were collected with pipette and the respective number of inoculums added. To avoid the parasite adherence, the plates were maintained into the respective flask. After seven days all fish were killed for exam, except for treatment 20

trophozoites/fish in which mortality occurred in two days. The mean value of treatment with 20 trophozoites/fish was significantly higher ($P < 0.05$) than 0, 1, 2, 4, 8 and 16. It is suggested that 1 to 16 trophozoites/fish is practicable to the study of experimental infection, by the fact that these fish were maintained parasitized during whole period.

KEY WORDS: *Ichthyophthirius multifiliis*, experimental infection, *Poecilia vivipara*.

INTRODUÇÃO

Ichthyophthirius multifiliis Fouquet, 1876 é um importante protozoário ciliado ectoparasito causador da “doença dos pontos brancos” que se aloja na epiderme e brânquias de peixes (MARTINS et al., 2002). Ectoparasito de baixa especificidade de hospedeiro permanece no epitélio da superfície corporal ou brânquias até alcançar cerca de 1 mm, no qual deixa o hospedeiro para se desenvolver em tomonte e posteriormente liberar terontes infectantes (BUCHMANN et al., 2001). Tem sido motivo de diversos estudos envolvendo a resposta do hospedeiro, tanto tecidual como por mecanismos específicos e não específicos.

Está entre os principais parasitos que causam perdas na produção de peixes ornamentais (THILAKARATNE et al., 2003). Sua presença provoca prejuízos na alevinagem de *Clarias macrocephalus* Günther, 1864 (TAK-SENG et al., 1987), na reprodução de *Oncorhynchus nerka* Walbaum, 1792 (TRAXLER et al., 1998) podendo ser encontrado associado a bacterioses em *Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792 e *Oreochromis aureus* Steindachner, 1864 (CASAS et al., 1997).

No Brasil, BÉKÉSI (1992) comunicou sua presença em *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818); *Prochilodus cearensis* Steindachner, 1875 e *Cichla ocellaris* Bloch & Schneider, 1801 no Nordeste; TAVARES-DIAS et al. (2001) em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887; *Leporinus macrocephalus* Garavello & Britski, 1988; híbrido tambacu (*P. mesopotamicus* x *C. macropomum*), *Brycon cephalus* Günther, 1869; *Tilapia rendalli* Boulenger, 1897; *Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758 e *Cyprinus carpio*

Linnaeus, 1758 mantidos em pesque-pagues em Franca, São Paulo.

A infecção experimental com *I. multifiliis* foi realizada com sucesso em *C. carpio* (HINES & SPIRA, 1973), em *Ictalurus punctatus* Rafinesque, 1818 (EWING et al., 1986), em *Poecilia latipinna* Lesueur, 1821 (McCALLUM, 1985), em *Ameioba splendens* Miller e Fitzsimons, 1971 (CLAYTON & PRICE, 1988), em *Chelone labrosus* Risso, 1827 (BURGESS & MATTHEWS, 1994) e no híbrido tambacu e *L. macrocephalus* (SOUZA et al., 2001).

Este trabalho analisou o grau de parasitismo em *Poecilia vivipara* Bloch & Schneider, 1801 (Poeciliidae) infectado experimentalmente por *I. multifiliis*, objetivando determinar o número adequado de trofozoítos/peixe para o estudo da evolução da enfermidade em peixes ornamentais.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Diagnóstico e Patologia em Aqüicultura, Departamento de Aqüicultura, CCA, UFSC em junho de 2004. Antes de se proceder à infecção experimental, os peixes foram tratados com solução de formalina 1:4000 durante uma hora por dois dias consecutivos (SOUZA et al., 2001). Após o tratamento foram examinados para se certificar de que estivessem isentos de parasitos. Em quatorze frascos contendo 400 mL de água decolorificada, com aeração constante, foram mantidos quatro indivíduos da espécie *P. vivipara*, adicionados 0, 1, 2, 4, 8, 16 e 20 trofozoítos/peixe em duas réplicas.

Durante o experimento monitoraram-se o pH, a temperatura e o oxigênio dissolvido na água dos diferentes tratamentos. Os parasitos foram obtidos

a partir de cinco alevinos de “dourado” parasitados, *Salminus brasiliensis* Cuvier, 1816 com comprimento médio de 9,2+1,7 cm, os quais foram mantidos em placas de Petri com água por trinta minutos segundo metodologia de SOUZA et al. (2001). Os parasitos que se desprenderam da superfície do corpo do “dourado” foram cuidadosamente coletados com pipeta Pasteur sob estereomicroscópio e transferidos para placas de Petri para que fossem adicionados aos respectivos tratamentos. Para evitar que os parasitos ficassem aderidos às placas, mantendo-se cada uma com o devido número de trofozoítos no respectivo frasco, onde permaneceu durante sete dias.

Passados sete dias da inoculação, os peixes foram sacrificados e fixados. Peixes que morreram no decorrer do experimento foram coletados e fixados em formol 10% para posterior análise. Para a determinação de diferença significativa entre os tratamentos, empregou-se o método de Scheffe ($P<0.05$). Analisaram-se as diferenças encontradas entre os tratamentos através do teste de Dunn (ZAR, 1996) e os dados com o programa SigmaStat para Windows, versão 2.0 da Jandel Corporation.

RESULTADOS

As variáveis de qualidade da água verificadas durante o experimento foram analisadas através da ANOVA, não sendo observada diferença significativa entre os tratamentos. Os valores médios para a temperatura da água, pH e concentração de oxigênio dissolvido nos recipientes durante o período experimental foram de 19,5±0,39°C, 6,35±0,09 e 7,02±0,45mg/L.

A técnica de obtenção de trofozoítos do peixe doador, a qual seguiu a metodologia de SOUZA et al. (2001), foi adequada e com sucesso.

A Tabela 1 mostra o número de trofozoítos contados na superfície do corpo dos peixes em cada um dos tratamentos. Observou-se que três dos oito animais que não foram inoculados apresentaram 12,6+1,5 trofozoítos/peixe, fato que se deve à presença acidental de um peixe infectado que saltou de outro tratamento. Apesar da contaminação no grupo que não recebeu inóculo, o número de

trofozoítos foi significativamente menor quando comparado aos inóculos com 1, 2, 4, 8 e 16 trofozoítos.

TABELA 1. Valores médios da contagem de trofozoítos de *Ichthyophthirius multifiliis* sete dias pós-infecção com os respectivos inóculos em *Poecilia vivipara*. Letras distintas indicam diferença significativa entre os inóculos ($P<0,05$)

Inóculos de trofozoítos/peixe	Contagem de parasitos sete dias depois
0	12,6+1,5 a
1	124,6+2,4 bc
2	252,2+31,8 c
4	418,1+12,8 d
8	425,6+35,2 d
16	363,8+44,3 d
20	3.074,0+4,1 e

O valor médio de parasitos do tratamento com 20 trofozoítos/peixe foi significativamente maior ($P<0,05$) do que os tratamentos controle, 1, 2, 4, 8 e 16. No entanto, o inóculo com 20 trofozoítos provocou morte de todos os animais em dois dias.

Observa-se ainda a semelhança que houve entre os tratamentos que receberam 4, 8 e 16 trofozoítos que ao final de sete dias apresentaram 418,1; 425,6 e 363,8 trofozoítos, respectivamente.

DISCUSSÃO

A temperatura é um dos principais fatores determinantes no sucesso do ciclo de vida do parasito. Segundo NOE & DICKERSON (1995), quando o parasito é mantido a 9°C, seu desenvolvimento é mais lento do que a 20°C, sem afetar sua capacidade de infecção. No entanto, EWING et al. (1986) verificaram maior desenvolvimento do parasito a 24°C. Neste ensaio, observou-se um bom desenvolvimento dos parasitos pós-infecção avaliado pela curva crescente de acordo com os inóculos.

A técnica de infecção experimental empregada seguindo as recomendações de SOUZA et al. (2001), os quais obtiveram os parasitos a partir de

Hoplosternum littorale Hancock, 1828 (Callichthyidae) como peixe doador, foi também adequada neste ensaio com *S. brasiliensis*. Convém salientar, no entanto, que este tipo de metodologia pode variar de acordo com a espécie de peixe utilizada.

Analisando-se os dados e diante do fato de a contaminação acidental nos animais não inoculados não ter provocado mortalidade nos animais deste grupo, a contaminação não prejudicou a interpretação dos resultados e a observação da curva inóculo-resposta. O inóculo com 20 trofozoítos/peixe foi extremamente alto para este peixe ornamental, está dentro da faixa de 0 a 40 trofozoítos/0,16 cm² de superfície corporal utilizado por McCALLUM (1985), mas inviável para o estudo do curso de uma infecção.

Os presentes resultados estão de acordo com as observações de McCALLUM (1985), o qual também notou relação direta da mortalidade com a severidade da doença. Isto se confirmou com a morte de todos os peixes do grupo que recebeu 20 trofozoítos/peixe em dois dias pós-infecção. Apesar dos animais deste último grupo terem morrido, a infecção experimental com trofozoítos de *I. multifiliis* em *P. vivipara* mostrou-se viável, corroborando os resultados de EWING et al. (1986), sendo possível a manutenção da infecção nos peixes que receberam 1 a 16 inóculos durante sete dias. A manutenção do grau de parasitismo é ferramenta importante no estudo das diferentes respostas do hospedeiro diante do parasito. Neste sentido, os inóculos de 1 a 16 trofozoítos/peixe se mostraram viáveis de serem reproduzidos neste peixe ornamental, pelo menos durante o período de sete dias. Esta observação é reforçada pelos resultados obtidos por HINES & SPIRA (1973), os quais observaram que peixes expostos a 40 trofozoítos de *I. multifiliis* permaneceram vivos durante 24 dias pós-infecção, sendo que os expostos a 400 trofozoítos apresentaram taxa de infecção progressiva a partir de 16 dias, com mortalidade de todos os animais, 24 dias pós-infecção.

McCALLUM (1985) verificou que pocilídeos expostos aos inóculos entre 0 a 20 e 20 a 40 trofozoítos apresentaram maiores taxas de

sobrevivência durante dez dias. Doses elevadas, segundo este autor, entre 80 e 250 parasitos provocaram mortalidade mais rapidamente aos cinco dias pós-infecção. Os presentes resultados corroboraram as observações de McCALLUM (1985), porém os inóculos de 1 a 16 trofozoítos permitiram ao final dos sete dias a obtenção de 124,6 a 363,8 trofozoítos sem causar mortalidade durante o período experimental.

SOUZA et al. (2001) não observaram mortalidade em nenhum dos peixes oito dias após a infecção com 2, 4, 8 e 16 trofozoítos/peixe. Neste ensaio, o inóculo com 20 trofozoítos/peixe provocou mortalidade de todos os animais do tratamento. Isto se deve provavelmente ao fato de que SOUZA et al. (2001) utilizaram o híbrido tambacu e *L. macrocephalus*, que são peixes de cultivo e de maior porte. A utilização de trofozoítos para infecção experimental foi determinada segundo estudos prévios de SOUZA et al. (2001), na qual foi a melhor forma e mais viável de se proceder. Embora exista o problema de não se conhecer exatamente quantos terontes seriam liberados pelos trofozoítos no período do experimento, os resultados mostraram consistência.

A grande variação individual observada é fato comum de ocorrer em infecções experimentais como também verificado nos experimentos de HINES & SPIRA (1973) e DAVIS et al. (2002), principalmente pela resposta individual de cada espécime. Esta resposta está diretamente relacionada à imunidade inata, como verificado por BUCHMANN et al. (2001).

Tendo em vista a homogeneidade nos valores médios de trofozoítos nos animais que receberam inóculos de 1 a 16 trofozoítos/peixe, indica-se este intervalo como o adequado para se realizar uma infecção experimental em *P. vivipara*. Os peixes que receberam 20 trofozoítos/peixe alcançaram a capacidade limite máxima de contaminação, verificada pelo valor médio de 3.074 trofozoítos, provocando mortalidade de todos os animais, não sendo interessante para estudos sobre o curso de uma infecção parasitária. A importância da padronização de um número adequado de trofozoítos por peixe se deve ao fato de manter os

animais vivos durante o período experimental. Com este procedimento é possível o estudo de diferentes respostas do hospedeiro perante a infecção, bem como a utilização de diferentes variáveis aquáticas e de desafios para o entendimento da resposta peixe/infecção.

REFERÊNCIAS

- BÉKÉSI, L. Evaluation of data on ichthyopathological analyses in the Brazilian Northeast. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 44, n. 6, p. 400-403, 1992.
- BUCHMANN, K.; SIGH, J.; NIELSEN, C. V.; DALGAARD, M. Host responses against the fish parasitizing ciliate *Ichthyophthirius multifiliis*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 100, p. 105-116, 2001.
- BURGESS, P. J.; MATTEWS, R. A. A standardized method for the vivo maintenance of *Cryptocaryon irritans* (Ciliophora) using the grey mullet *Chelon labrosus* as an experimental host. **Journal of Parasitology**, Kansas, v. 80, n. 2, p. 288-292, 1994.
- CASAS, F. C.; ORTIZ, A. A.; OSORIO SARABIA, D.; CHÁVEZ SORIANO, L. A. Infecção por *Aeromonas hydrophila* e *Ichthyophthirius multifiliis* em trucha (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) y tilapia (*Oreochromis aureus*, L) de un centro de acopio de Morelos, Mexico. Estudio patológico. **Veterinaria México**, Mexico, v. 28, n. 1, p. 59-62, 1997.
- CLAYTON, G. M.; PRICE, D. J. *Ichthyophthirius multifiliis*: standardization of the infection-response model in *Ameba splendens* (Miller & Fitzsimons). **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 11, p. 371-377, 1988.
- DAVIS, K. B.; GRIFFIN, B. R.; GRAY, W. L. Effect of handling stress on susceptibility of channel catfish *Ictalurus punctatus* to *Ichthyophthirius multifiliis* and channel catfish virus infection. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 214, p. 55-66, 2002.
- EWING, M. S.; LYNN, M. E.; EWING, S. A. Critical periods in development of *Ichthyophthirius multifiliis* (Ciliophora) populations. **Journal of Protozoology**, Lawrence, v. 33, n. 3, p. 388-391, 1986.
- HINES, R. S.; SPIRA, D. T. *Ichthyophthirius multifiliis* (Fouquet) in the mirror carp, *Cyprinus carpio* L. **Journal of Fish Biology**, London, v. 5, p. 385-392, 1973.
- MARTINS, M. L.; ONAKA, E. M.; MORAES, F. R.; BOZZO, F. R.; PAIVA, A. M. F. C.; GONÇALVES, A. Recent studies on parasitic infections of freshwater cultivated fish in the State of São Paulo, Brazil. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 24, n. 4, p. 981-985, 2002.
- McCALLUM, H. I. Population effects of parasite survival of host death: experimental studies of the interaction of *Ichthyophthirius multifiliis* and its fish host. **Parasitology**, Cambridge, v. 90, p. 529-547, 1985.
- NOE, J. G., DICKERSON, H. W. Sustained growth of *Ichthyophthirius multifiliis* at low temperature in the laboratory. **Journal of Parasitology**, Kansas, v. 81, n. 6, p. 1022-1024, 1995.
- SOUZA, V. N.; MARTINS, M. L.; MORAES, F. R.; KRONKA, S. N. Metodologia de infecção experimental e grau de susceptibilidade do híbrido “tambacu” e *Leporinus macrocephalus* Garavello & Britski (Osteichthyes, Anostomidae) a quatro inóculos de trofozoítos de *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet (Protozoa, Ciliophora). **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 18, n. 3, p. 803-811, 2001.
- TAK-SENG, L.; TAN, E. S. P.; SEE-YONG, W.; ALI, A.; FOO-SEONG, K. Ichthyophthiriasis in catfish (*Clarias macrocephalus* Günther) fingerlings in Penang, Malaysia, imported from Thailand. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 63, p. 315-317, 1987.

TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M. L.; MORAES, F. R. Fauna parasitária de peixes oriundos de “pesque-pague” do município de Franca, São Paulo, Brasil I Protozoários. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 18, p. 67-79, 2001.

THILAKARATNE, I. D. S. I. P.; RAJAPAKSHA, G.; HEWAKOPARA, A.; RAJAPAKSE, R. P. V. J.; FAIZAL, A. C. M. Parasitic infections in freshwater ornamental fish in Sri Lanka. **Diseases of Aquatic Organisms**, Oldendorf, v. 54, p. 157-162, 2003.

TRAXLER, G. S.; RICHARD, J.; McDONALD, T. E. *Ichthyophthyrus multifiliis* (Ich) epizootics in spawning sockeye salmon in British Columbia, Canada. **Journal of Aquatic Animal Health**, Bethesda, v. 10, p. 143-151, 1998.

ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**. 3. ed. New Jersey: Prentice Hall, 1996. 662 p.

Protocolado em: 16 ago. 2005. Aceito em: 18 out. 2006.