

**GIANA BASTOS GOMES**

**COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DE EXAME A FRESCO,  
HISTOPATOLOGIA E PCR, NO DIAGNÓSTICO DA HEPATOPANCREATITE  
NECROSANTE (NHPB), NO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei*.**

**RECIFE  
2008**

**GIANA BASTOS GOMES**

**COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DE EXAME A FRESCO,  
HISTOPATOLOGIA E PCR, NO DIAGNÓSTICO DA HEPATOPANCREATITE  
NECROSANTE (NHP), NO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei*.**

Dissertação apresentada ao **Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária** da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de **Mestre em Ciência Veterinária**.

Orientador: **Dra. Emiko Shinozaki Mendes**, Depto. de Medicina Veterinária, da UFRPE.

**RECIFE  
2008**

Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária

Parecer da comissão examinadora da defesa de dissertação de mestrado de  
**GIANA BASTOS GOMES**

**COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DE EXAME A FRESCO, HISTOPATOLOGIA E PCR,  
NO DIAGNÓSTICO DA HEPATOPANCREATITE NECROSANTE (NHP), NO CAMARÃO  
*Litopenaeus vannamei*.**

Área de concentração: **Medicina Preventiva**

A comissão examinadora, composta pelos professores abaixo, sob a presidência do primeiro, considera o(a) candidato(a) **GIANA BASTOS GOMES** como aprovado.

Recife, 28 de fevereiro de 2008.

---

Profa. Dra. Emiko Shinozaki Mendes (DSc, UFRPE)  
Orientadora

---

Prof. Dr. Eudes de Souza Correia (DSc, UFRPE)  
1º Examinador

---

Prof. Dr. Paulo de Paula Mendes (DSc, UFRPE)  
2º Examinador

---

Profa. Dra. Maria Raquel Coimbra (DSc, UFRPE)  
3º Examinador

---

Prof. Dr. Fernando Leandro dos Santos (DSc, UFRPE)  
Suplente

**“A vida está cheia de um potencial verdadeiramente incompreensível (...) na maioria dos casos, nossas ditas limitações nada mais são que nossa própria decisão de nos limitarmos.”**

**Daisaku Ikeda**

**“Impossível é apenas uma palavra, usada por gente fraca, que prefere viver no mundo em que está em vez de usar o poder que tem para mudá-lo. Impossível não é um fato, é uma opinião. Impossível não é uma declaração, é um desafio. Impossível é hipotético. Impossível é temporário. Nada é impossível”.**

**Autor desconhecido**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, sinceramente, a todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, especialmente:

A Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) – Departamento Medicina Veterinária, Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária;

Ao Laboratório de Sanidade de Organismos Aquáticos (LASOA), no Departamento de Medicina Veterinária pela realização das análises laboratoriais;

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo;

A Professora Dr<sup>a</sup>. Emiko Shinozaki Mendes, por toda orientação, incentivo, dedicação e paciência;

Ao Professor Dr. Fernando Leandro dos Santos, pela co-orientação, amizade, prestatividade e principalmente por todos os ensinamentos adquiridos no decorrer da pesquisa;

Ao Professor Dr. Paulo de Paula Mendes, pela disponibilidade, boa vontade e atenção, contribuindo com seus conhecimentos a este trabalho;

A Professora Dr<sup>a</sup>. Raquel Coimbra, pela prestatividade, receptividade e gentileza durante a realização do experimento.

Ao pessoal do Laboratório de Genética Aplicada (LAGA) do Departamento de Pesca e Aqüicultura, pela cumplicidade e ajuda nos momentos necessários, principalmente à Karine Kelly pela dedicação durante a realização da pesquisa.

A todos os amigos do LASOA, pela paciência, ajuda e pelos momentos especiais, principalmente a querida amiga Lílian Góes, pela amizade, dedicação e carinho nos momentos difíceis, a meiga e admirável Verônica Arns pelas conversas sinceras e pelos conselhos e a amiga Suely Bezerra, pelo respeito, apoio e pelas longas conversas, que sempre me fortaleceram, quando mais precisei.

A todos os amigos, funcionários, graduandos da UFRPE que contribuíram para a realização deste trabalho;

Principalmente ao meu anjo, amigo e amado marido, José Antonio, que me apoiou, incentivou e sempre acreditou em mim até mesmo quando eu não acreditava!  
Muito obrigada!

## SUMÁRIO

Lista de tabelas .....	7
Lista de figuras.....	8
Lista de abreviaturas.....	9
Resumo.....	10
Abstract.....	11
1. Introdução .....	12
2. Objetivos.....	13
3. Revisão da literatura.....	14
3.1 Características Etiológicas.....	15
3.2 Epidemiologia.....	16
3.3 Sinais Clínicos.....	18
3.4 Diagnóstico.....	20
3.5 Controle e Profilaxia.....	22
4. Referência Bibliográfica.....	24
5. Artigo científico.....	30
1. Resumo.....	32
2. Introdução.....	33
3. Material e Métodos.....	34
4. Resultados.....	38
5. Discussão.....	42
6. Conclusão.....	45
7. Referências .....	46

<b>LISTA DE TABELAS</b>
-------------------------

Tabela 1: Grau de severidade das alterações do hepatopâncreas do camarão <i>Litopenaues vannamei</i> .....	35
Tabela 2: Quantificação de lipídeos nos túbulos do hepatopâncreas do camarão <i>Litopenaues vannamei</i> .....	36
Tabela 3: Lesões observadas no exame a fresco em amostras PCR positivas em negativas (NHPB).....	38
Tabela 4: Porcentual de lesões observadas no HP de animais PCR positivos e negativos (NHPB) na histopatologia.....	41

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Túbulos do Hepatopâncreas com ausência de lipídeos, desprendimento celular e estrangulamento dos túbulos.....	19
Figura 2:	Lesão granulomatosa (A) característica de NHPB e infiltração hemocítica (B), (H&E 40x).....	20
Figura 3:	Relação entre o percentual de amostras com PCR positivas e negativas (NHPB) e a alteração nos túbulos (em graus).....	39
Figura 4:	Relação entre o percentual de amostras com PCR positivas e negativas (NHPB) e a quantidade de lipídeo nos túbulos (em graus).....	40



## LISTA DE ABREVIATURAS

ABCC: Associação Brasileira dos Criadores de Camarão.

FAO: Food and Agriculture Organization.

HH: Hepatopancreatite Hemocítica.

HP: Hepatopâncreas

Davidson's AFA: fixador composto por Álcool, Formol, Ácido acético.

ddH<sub>2</sub>O: água ultrapura

NHP: Hepatopancreatite Necrosante.

NHPB: Hepatopancreatite Necrosante por Bactéria.

OIE: Organização Mundial de Saúde Animal.

IHHNV: Vírus da Necrose Infecciosa Hipodermal e Hematopoiética.

WSSV: White Spot Síndrome Vírus/ Síndrome do Virus da Mancha Branca

## RESUMO

No Brasil, o cultivo do camarão branco do Pacífico *Litopenaeus vannamei* tem melhores resultados na região nordeste devido às condições climáticas, à qualidade da água e a existência de áreas estuarinas favoráveis ao cultivo de peneídeos. No entanto, a carcinicultura brasileira se desenvolveu de forma rápida e desordenada, favorecendo a manifestação de enfermidades de etiologias variadas. A Hepatopancreatite Necrosante é uma doença causada por uma bactéria intracelular da ordem Rickettsia (NHPB), que se destaca entre as enfermidades de origem bacteriana responsáveis por altas mortalidades e prejuízos econômicos por ser uma doença de difícil controle e diagnóstico. Assim sendo, objetivou-se comparar duas técnicas tradicionais, exame a fresco e histopatologia, com um método molecular, a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), no diagnóstico da NHPB em camarões *L. vannamei*. Foram coletados 154 camarões em intermuda de viveiros de engorda de uma fazenda do litoral sul do estado do Rio Grande do Norte/Brasil. O hepatopâncreas de cada animal foi retirado e dividido em três partes, sendo uma imediatamente examinada a fresco em microscópio óptico e as outras duas fixadas para posteriores análises histopatológicas e de PCR. Os parâmetros observados no exame a fresco foram coloração, quantidade de lipídeos, deformação nos túbulos, desprendimento celular e melanização, enquanto na histopatologia se observou infiltração hemocítica, edema, lesões granulomatosas e atrofia dos túbulos. Os animais PCR positivos tenham apresentado menor média na quantidade de lipídeos, maior média no grau de deformações nos túbulos e maior porcentual de indivíduos apresentando lesões no hepatopâncreas (desprendimento celular, melanização, infiltração hemocítica, lesões granulomatosas e atrofia dos túbulos) quando comparados aos indivíduos PCR negativos. Não houve relação significativa ( $P \geq 0,05$ ) entre o resultado da PCR com as variáveis analisadas nos exames a fresco e histopatológico. Um porcentual significativo de indivíduos PCR negativos também apresentou lesões e anormalidades no hepatopâncreas, possivelmente relacionados a outras etiologias que não NHPB. Conclui-se que não há relação significativa entre as técnicas de análise a fresco, histopatologia e PCR no diagnóstico da NHPB e dessa forma, as técnicas de exame a fresco e a histopatologia isoladamente, não devem ser usadas como técnicas de diagnóstico desta doença.

**Palavras-chave:** *Rickettsia*, diagnóstico, exame a fresco, histopatologia, PCR.

<b>ABSTRACT</b>
-----------------

In Brazil, the culture of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* achieves better results in the northeast region due to its tropical climate, suitable water quality and the existence of estuarine areas suitable for penaeid culture. However, Brazilian shrimp farming has developed rapidly and disorderly, favoring the outbreak of epizootics from varied etiologies. The Necrotizing Hepatopancreatitis is a disease caused by an intracellular bacterium from the Rickettsia order (NHPB), which stands out among shrimp bacterial epizootics responsible for high mortalities and economical losses due to its difficult control and diagnosis. In the light of this, the aim of this work is to compare two traditional techniques, the wet-mount and histopathology analyses, with a molecular method, the Polymerase Chain Reaction (PCR), for the diagnosis of NHPB in *L. vannamei*. One hundred and fifty four intermolt shrimp were collected from grow-out ponds of a farm located in the south of Rio Grande do Norte State/Brazil. The hepatopancreas of each animal was divided into three parts, being one readily wet-mounted and examined under a light microscope and the other two fixed and preserved for later histopathology and PCR analyses. The parameters observed in wet-mount analysis were color, amount of lipids, deformation of tubules, loosen cells and melanization; while parameters observed in histopathology were hemocytic infiltration, edema, granulomatous lesions and atrophy of tubules. PCR positive animals presented mean lower lipid levels, mean higher score for deformation of tubules and a higher percentage of individuals presenting hepatopancreatic lesions (loosen cells, melanization, hemocytic infiltration, granulomatous lesions and tubules atrophy) than PCR negative animals. No significant relation ( $P \geq 0,05$ ) was found among PCR results and those parameters observed in wet-mount or histopathology. A significant percentage of PCR negative individuals also presented hepatopancreatic lesions and abnormalities, possibly related to other etiology rather than NHPB. This work concludes that no significant relation among wet-mount, histopathology and PCR techniques to diagnose NHPB can be assumed; therefore, neither wet-mount examination nor histopathology should be used alone as diagnostic techniques for this disease.

**Key words:** *Rickettsia*, diagnosis, wet mount, histopathology, PCR.

## 1. INTRODUÇÃO

Mundialmente, os camarões cultivados e capturados alcançaram uma produção de 6,092 milhões de toneladas no ano de 2005, das quais 43,92 % foram oriundos de cultivos (FAO, 2007). O Brasil obteve a liderança na produtividade mundial no ano de 2003, sendo responsável pela maior produção (90.190 t) do camarão *Litopenaeus vannamei* do hemisfério ocidental. No entanto, a partir deste mesmo ano começou a ocorrer a primeira queda na produção brasileira, devido, principalmente, ao aparecimento do vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV), a baixa cotação do dólar e a taxação promovida pelos Estados Unidos contra o produto brasileiro.

O crescimento da carcinicultura brasileira ocorreu de forma desordenada com os produtores cultivando camarões sem a observação necessária dos procedimentos adequados, como o uso de elevada densidade de estocagem, somado às condições inadequadas das instalações e de manejo, além da má qualidade da água do cultivo. Tais práticas culminam no aumento da possibilidade de desencadeamento de sérios problemas como o aparecimento das enfermidades, que podem ter etiologias variadas, como os vírus, fungos, protozoários, bactérias. Entre as enfermidades de origem bacteriana que podem acometer os camarões, destaca-se a Hepatopancreatite Necrosante, que tem merecido grande destaque nos últimos anos devido às enormes perdas econômicas ocasionadas aos produtores de todo Nordeste.

A NHPB é uma enfermidade severa que acomete peneídeos, podendo ocasionar mortalidades muito altas nos tanques afetados. Ela também é motivo para muitas discussões, tanto entre produtores, técnicos e pesquisadores devido à confusão na detecção da mesma, uma vez que na maioria dos casos ela é confundida com o diagnóstico da vibriose, doença também bacteriana, causada pelo gênero *Vibrio*.

Apesar de já se passarem mais de 20 anos, desde o aparecimento dessa enfermidade, ainda são escassos os estudos sobre o tema, principalmente em relação a seu diagnóstico, controle e tratamento, portanto, fazendo-se necessárias muitas pesquisas para que estes pontos sejam melhor esclarecidos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Verificar a confiabilidade das técnicas de exame a fresco e histopatologia, no diagnóstico da Hepatopancreatite Necrosante (NHPB) ocasionada por *Rickettsia*.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Testar a técnica de exame a fresco na detecção da NHPB;
- Testar a técnica de histopatologia no diagnóstico da NHPB;
- Comparar as técnicas de exame a fresco, histopatologia e PCR, no diagnóstico da NHPB, no camarão *Litopenaeus vannamei*.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

No ano de 2005, o maior produtor mundial de camarão marinho cultivado foi a China com 1.024.949 toneladas, sendo seguida pela Tailândia (375.320) e Vietnã (327.200). Nas Américas, o Equador teve a maior produção com 130.000, sendo seguido pelo México com 72.279 e o Brasil com 65.000t. No Brasil, o *Litopenaeus vannamei* constitui a principal espécie utilizada em cultivo comercial de camarão marinho. O estado do Rio Grande do Norte, em especial, reúne as condições geográficas favoráveis devido às condições climáticas, qualidade da água e temperatura, bem como a existência de áreas estuarinas, extremamente propícias para o cultivo de peneídeos, liderando a produção nacional com 26 mil toneladas (ABCC, 2007).

Apesar de o Nordeste apresentar todas as condições climáticas para o desenvolvimento da carcinicultura, a produção desses animais nos últimos anos passou a apresentar problemas com o aparecimento das enfermidades, como a Hepatopancreatite Necrosante (NHPB), que pode ser definida como a inflamação e necrose do hepatopâncreas (HP), foi verificada inicialmente no Texas, EUA, nos anos 80 e subseqüentemente, em muitos países da América do Sul, como Peru, Equador, Venezuela, Panamá e Brasil (AGUIRRE-GUZMÁN ASCENCIO- VALLE, 2000; ARANGUREM et al., 2006).

Trata-se de uma doença bacteriana severa que acomete camarões marinhos brancos, sendo responsável por causar danos na produção de camarões marinhos nas Américas, tendo limitado gravemente a produção desses animais no Texas, onde ocorreram mortalidades entre 20-95% (FRELIER et al., 1992b; LOY et al., 1996), na América Central e do Sul, como em Tumbes, Peru, em que ocorreram mortalidades entre 70-90% (LIGHTNER et al., 1992). Infecções por *Rickettsia*, que causam NHPB têm causado sérios prejuízos econômicos também na carcinicultura brasileira, principalmente em cultivos com condições ambientais inadequadas (BUCHELI et al., 2004).

A NHPB é causada por uma bactéria da ordem *Rickettsia*, que compreende um largo e diverso grupo de organismos, sendo freqüentemente patogênicos para uma ou mais espécies hospedeiras, podendo causar apenas alterações discretas dos tecidos

afetados assim como, na maioria dos casos, pode ocasionar alterações severas e malignas nas espécies acometidas (ELSTON, 1986; FRYEIR e LANNAN, 1994).

### 3.1 CARACTERÍSTICAS ETIOLÓGICAS

O agente etiológico da NHPB é uma bactéria intracelular obrigatória pequena, membro das  $\alpha$ -Proteobacteria, do tipo *Rickettsia*, que reside e se multiplica nas células epiteliais dos túbulos do hepatopâncreas (HP) de camarões marinhos infectados (LOY et al., 1996a; BRADLEY-DUNLOP et al., 2004). As *Rickettsias* são bactérias Gram-negativas, pleomórficas, ou seja, podem variar em forma e tamanho. São microrganismos que lembram morfologicamente indivíduos da ordem Rickettsiales (FRELIER et al., 1992a; LOY et al., 1996b).

As  $\alpha$ -Proteobactérias foram descritas inicialmente como três microrganismos: uma bactéria do tipo rickettsia, pleomórfica com forma de bastão, outra bactéria com forma helicoidal e outra sendo uma bactéria filamentosa (KROL et al., 1991). Análises morfológicas mais recentes evidenciaram a presença de uma bactéria simples presente em duas formas distintas (FRELIER et al., 1992a, LIGHTNER et al., 1992, VINCENT et al., 2004). A forma predominate é a de bastão, do tipo rickettsia, sem flagelos e ocasionalmente exibindo uma zona de constricção transversa indicativa de replicação por fissão binária (FRELIER et al., 1992a, VINCENT et al., 2004). Lightner et al. (1992) relataram que a forma helicoidal possui oito flagelos no ápice basal e um ou possivelmente dois flagelos na crista. Uma forma confusa, intermediária, exibindo morfologia de ambas variantes é observada ocasionalmente nas células epiteliais de hepatopâncreas infectados, o que sugere a replicação da forma de bastão na forma helicoidal. Segundo Frelier et al. (1992a) e Loy et al. (1996b), esta forma intermediária apresenta uma membrana citoplasmática trilaminar com ondulações e um envelope externo.

As *Rickettsias* são bactérias que só se reproduzem dentro das células, porque necessitam de um sistema enzimático que gere energia suficiente para sua reprodução e de um citoplasma rico que estabilize sua membrana celular incomum. São consideradas bactérias verdadeiras devido à estrutura semelhante às bactérias Gram-negativas. Esta característica (reprodução intracelular) dificulta sua identificação, pois é difícil cultivá-la pelos métodos microbiológicos rotineiros (GIL et al., 2001). Segundo Lightner (1996) e Braasch et al. (1999), as tentativas de cultivo desta bactéria pelos métodos bacteriológicos tradicionais, não têm apresentado bons resultados.

Segundo Mauel e Miller (2002), durante a década de 90, membros de um grupo de bactérias intracelulares obrigatórias, do tipo *Rickettsia* (RLO- rickettsia like organism) foram reconhecidos como importantes patógenos de peixes. Este tipo de bactéria ocorre globalmente tanto em peixes de águas doce quanto salgada. A mais antiga identificação de RLO em peixes foi realizada por Mohamed (1939), na espécie *Tetrodon fohaka* encontradas no Rio Nilo, no Egito.

Uma identificação de RLO em peixes foi feita por Davies (1986) quando o mesmo observou bactérias coccoídes em vacúolos ligados a membranas, em linfócitos de peixes da espécie *Callianymus lyra* em águas costeiras da região de Wales. Estes microrganismos ocorrem freqüentemente em brânquias e epitélio digestivo de moluscos marinhos, sendo nestes casos benignas (FRYER e LANNAN, 1994).

Contrariamente, alguns trabalhos citam que as RLO seriam diretamente responsáveis pela mortalidade em moluscos marinhos e teriam um papel importante na doença destes animais (NORTON et al., 1993; MOORE et al., 2000; WU e PAN, 1999a,c, 2000). Sabe-se que as *Rickettsias* não matam as células do hospedeiro pela produção de toxinas, mas a penetração das mesmas nas células hospedeiras causa danos que podem destruí-las (WINKLER, 1990; ROMERO et al., 2000).

### **3.2 EPIDEMIOLOGIA**

Um aspecto muito importante da NHPB, em camarões marinhos, é que esta doença está associada a condições de elevada salinidade e temperatura. Períodos prolongados de altas temperaturas (> 29° C) e mudanças na salinidade (entre 20-40 ‰) precederam o desenvolvimento da NHPB no Texas (FRELIER et al., 1992a, LIGHTNER, 1996, LOY et al., 1996a). Apesar de a NHPB ser uma doença capaz de causar severas mortalidades e transtornos financeiros em criações de camarão cultivado ela não está na lista de doenças consideradas de notificação obrigatória pela OIE (OIE, 2001). Um dos fatores que contribuem para a NHPB não ser considerada uma doença de grande importância aos crustáceos está relacionada à sua presença com estas condições ambientais específicas (Lightner, 1996).

De acordo com Vincent (2004), há transferência oral do agente etiológico em camarões sadios, havendo mortalidade induzida por NHPB a partir dos 18° até o 41° dia após exposição ao agente, não havendo recuperação dos animais infectados. Além disso, os sintomas da enfermidade já podem ser visíveis duas ou três semanas após infecção.



Em trabalho realizado por Frelier (1992b), foi constatado que a transmissão da NHPB através da água não é eficiente, sendo necessário um reservatório para a transmissão desta bactéria intracelular.

Segundo Leclercq et al. (2004), diversas espécies de crustáceos como caranguejos, copépodes, *Callinasa* spp, podem ser consideradas como reservatórios de espécies da bactéria de NHP, especialmente o *Lepidophthalmus* spp., pequeno crustáceo, que pode mover-se profundamente nos sedimentos de viveiros e persistir por longos períodos de secagem.

A NHPB afeta tanto animais em estágio juvenil quanto adulto, não sendo registrados casos em pós-larvas. Segundo Lightner (1996), a enfermidade pode desenvolver-se em *Litopenaeus setiferus*, *L. stylirostris*, *Farfantepenaeus aztecus*, *F. californiensis*, mas principalmente em *Litopenaeus vannamei*, sendo a espécie *L. stylirostris* menos susceptível. Vincent et al. (2004) citaram que a transmissão da doença não ocorre de forma satisfatória quando se injeta o agente, no entanto, a transmissão através da ingestão de material infectado ou canibalismo de camarões mortos infectados, parece ser a forma de infecção natural.

A bactéria causadora de NHP infecta as células do hepatopâncreas, que é a maior glândula digestiva do camarão. Este contém muitos tipos de células, incluindo células do tipo E, R, F e B (GIBSON e BARKER, 1979). As células E caracterizam-se pela atividade mitótica, sendo a fonte de formação dos outros tipos de células e estão localizadas na porção mais distal do hepatopâncreas (VOGT, 1994). Segundo Almohanna e Nott (1987), as células do tipo R armazenam lipídeos e glicose, sendo estas as células encontradas em maior quantidade. Existem ainda, as células tipo F que secretam enzimas digestivas e são encontradas em menor quantidade e as células do tipo B, que realizam a digestão intracelular, acumulam e transportam nutrientes (AL-MOHANNA e NOTT, 1986).

Entre poucos estudos existentes sobre a patogênese da bactéria da Hepatopancreatite Necrosante, Vicent e Lotz (2005) relataram que é possível observar um aumento no número de células hepatopancreáticas no desenvolvimento da infecção pela bactéria da NHPB o que sugere que deve haver multiplicação e dispersão bacteriana associada com os danos causados ao tecido. Além disso, nas células já maduras pode-se observar a bactéria, ainda no início da infecção. Isso não sugere que estes microrganismos tenham preferência por um tipo de célula. No entanto, observa-se que as células do tipo E são menos suscetíveis a infecção que os outros tipos celulares.

Fatores exógenos, como temperatura e salinidade, interagem com fatores internos (nível nutricional, nível de stress, imunidade), no desenvolvimento da epizootia da NHPB (VINCENT, 2004). De acordo com Morales-Covarrubias (2004), no México a enfermidade tem afetado tanto animais nos viveiros, assim como reprodutores nos laboratórios de maturação, especialmente as fêmeas que sofreram processo de ablação. A mortalidade nessas fêmeas foi maior quando comparada com aquelas que receberam injeções de hormônio e do grupo controle. Isto sugere que um fator estressante adicional, como uma ablação, pode agravar a infecção por NHPB, resultando em doença e mortalidade (MORALES, 2006).

Morales-Covarrubias (2004) observaram que a doença se manifesta principalmente nos meses de abril a agosto, mas sua alta prevalência é observada nos meses de setembro e outubro, com altas mortalidades dos camarões cultivados no México. Le Moullac et al. (2000) também relataram a influência das mudanças ambientais, juntamente com ablação induzindo alterações da resposta imune em crustáceos, tanto em termos de número de hemócitos, como na fagocitose e na ativação do sistema profenoloxidase em camarões cultivados.

### **3.3 SINAIS CLÍNICOS**

Devido à inflamação crônica que ocorre nas células do epitélio do hepatopâncreas, este órgão torna-se pálido e atrofiado. As células hepatopancreáticas aparecem hipertrofiadas e com grande aglomerado bacteriano no citoplasma. As células infectadas perdem a funcionalidade e se tornam necróticas, gerando uma forte resposta inflamatória, que resulta na formação de múltiplas lesões granulomatosas no hepatopâncreas. Este quadro causa severos problemas no camarão, pois o hepatopâncreas tem um papel muito importante na realização das funções digestivas, como absorção e metabolismo de nutrientes. Essa disfunção pode alterar significativamente o desenvolvimento do animal (GIL et al., 2001).

Os camarões afetados apresentam-se letárgicos, anoréxicos, com baixo crescimento, há diminuição no consumo de ração e elevado fator de conversão alimentar. O exoesqueleto encontra-se amolecido, corpo flácido, cutícula frouxa, brânquias escurecidas, aspecto escuro devido à expansão dos cromatóforos nas bordas dos urópodos e pleópodos, resultando em mortalidade. O trato digestivo encontra-se vazio devido ao processo inflamatório crônico (BROCK e MAIN, 1994).

Segundo Frelie et al. (1992a), pode-se classificar a infecção de NHPB, em três estágios, tanto com relação à análise a fresco como às alterações histopatológicas, como se pode visualizar nas Figuras 1 e 2. Estágio 1: caracterizado por dispersão dos túbulos hepatopancreáticos exibindo grupos de células contendo bactéria intracelular, mas sem infiltração hemocítica. Estágio 2: caracterizado por numerosos túbulos hepatopancreáticos enrugados, hipertróficos ou com epitélio atenuado com ectasia tubular, poucos túbulos necróticos, alguma descamação luminal das células epiteliais e ocasionalmente infiltração hemocítica. Estágio 3: caracterizado por numerosos túbulos hepatopancreáticos necróticos dispersos, com falta de epitélio intacto e descamação das células epiteliais, densa infiltração hemocítica, melanização e fibrose. Uma diminuição na quantidade de lipídeos no hepatopâncreas é progressivamente observada do estágio 1 ao 3 de NHPB.



Figura 1: Túbulos do hepatopâncreas com ausência de lipídeos, desprendimento celular e estrangulamento dos túbulos.

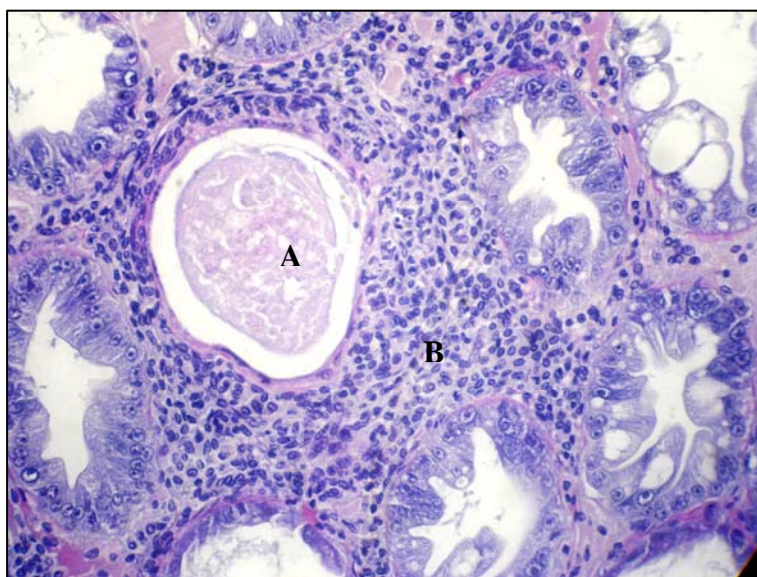


Figura 2: Lesão granulomatosa (A) característica de NHPB e infiltração hemocítica (B), (H&E 40x).

### 3.4 DIAGNÓSTICO

Sabe-se que para o diagnóstico da infecção por NHPB pode-se utilizar tanto o hepatopâncreas (HP) como também as fezes. Nas técnicas de biologia molecular e histopatologia ocorre a morte do animal para que se faça a análise do tecido do HP. No entanto, um método não destrutivo para detecção da NHPB foi descrito por Briñez et al. (2003) utilizando-se fezes de reprodutores de *L. vannamei*. Além disso, Vincent e Lotz (2005) detectaram o DNA da NHPB em fezes de camarões juvenis e quando comparam a quantidade de NHPB encontrada no HP e nas fezes de um mesmo animal, observaram que no HP este número é maior.

A análise a fresco é uma técnica utilizada, principalmente no campo, para monitorar o estado de saúde dos animais e também para realização de diagnósticos presuntivos no laboratório. A técnica consiste na dissecação do camarão em todos seus estágios, com o propósito de serem observadas as alterações que ocorrem nos órgãos e tecidos. No entanto, não deve ser considerado como um diagnóstico definitivo, uma vez que sua interpretação baseia-se principalmente na perícia do técnico que realiza o exame, sendo indicada a confirmação das suspeitas através de exame mais elaborados como a histopatologia e a PCR (MORALES-COVARRUBIAS, 2004).

Segundo Lightner (1996) e Morales-Covarrubias (2004), na análise a fresco do tecido do hepatopâncreas, pode-se verificar que, na fase aguda da doença, há atrofia do hepatopâncreas, maior desprendimento celular, células com núcleos hipertrofiados, coloração pálida, textura mole e edematosa, melanização, atrofia dos túbulos necrose das células e dos túbulos. Na fase crônica da doença, há uma menor melanização, com atrofia dos túbulos, necrose das células e túbulos. A quantidade de lipídeos fica comprometida quando ocorre NHPB, podendo se verificar a ausência ou uma quantidade reduzida de gotículas dos mesmos ao longo dos túbulos do hepatopâncreas, nos casos mais graves.

Segundo Lightner e Redman (1998), os métodos de detecção de patógenos e de diagnóstico de doenças mais utilizados pelos patologistas e por laboratórios de diagnóstico, têm sido atualmente revisados, porque as técnicas utilizadas ainda se baseiam nos métodos clássicos. Entre os mais importantes se destacam a observação de sinais clínicos característicos, além de testes laboratoriais como, exames diretos ao microscópio, microbiologia clássica com isolamento dos agentes etiológicos, histopatologia e histoquímica.

Especificamente em relação à Hepatopancreatite Necrosante, os métodos laboratoriais mais utilizados no seu diagnóstico são os exames a fresco, a histopatologia, as sondas gênicas (LOY e FRELIER, 1996; LIGHTNER, 1996), a hibridização *in situ* (LIGHTNER, 1996) e a PCR. Esta última técnica de diagnóstico, tem tido aplicação no diagnóstico de muitas enfermidades de camarões, principalmente nas viroses. Mas esta técnica também tem sido muito utilizada para a detecção de patógenos como a bactéria da NHPB. Nessa técnica, pequenas partes indetectáveis de DNA podem ser amplificadas para produzir quantidades detectáveis de pedaços do DNA (LOY et al., 1996; LIGHTNER e REDMAN, 1998).

Outra forma muito comum de diagnóstico para detecção de lesões sugestivas da doença é a histopatologia que analisa partes de tecidos. Alterações histopatológicas em camarões positivos para NHPB incluem atrofia do HP com moderada ou severa atrofia da mucosa dos túbulos, além de lesões granulatomatosas multifocais envolvendo um ou mais túbulos. Mas pode-se também, utilizar sondas moleculares ou genéticas, como Dot Blot ou hibridização *in situ*, as quais têm sido utilizadas com sucesso para detecção viroses de camarões como IHHNV e WSSV, mas também para detecção da bactéria da NHPB (LIGHTNER, 1996; LOY et al., 1996b; BRIÑEZ et al., 2003; NUNAN et al., 2003a).

A técnica de hibridização *in situ* também tem sido utilizada como forma de proporcionar a classificação filogenética, assim como, distinguir espécies de bactérias sem especificar grupos genômicos (LOY et al., 1996). As infecções por NHPB podem ser confirmadas pela hibridização *in situ* com uma prova complementar de DNA e por PCR, mas anticorpos monoclonais também têm sido desenvolvidos para detecção de NHPB (LIGHTNER e REDMAN, 1998; BRADLEY-DUNLOP et al., 2004).

Atualmente, o método de diagnóstico utilizado, com resultados mais precisos e eficientes, é a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e exame do tecido afetado através da microscopia eletrônica. Estas técnicas ainda têm custo elevado, principalmente por necessitarem de material e equipamentos específicos, além de mão-de-obra especializada (GIL et al., 2001). A PCR, descrita por Kary Mullis em 1985, envolve a síntese *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença de uma enzima DNA polimerase termorresistente, a *Taq* polimerase, originária da bactéria *Thermus aquaticus*. A reação ocorre pelo nivelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos (*primers*), utilizados como inicializadores que delimitam a seqüência de DNA, alvo da amplificação. Assim, quando a seqüência do DNA do vírus ou bactéria é conhecida, os *primers* podem ser sintetizados para se anelarem a esta seqüência e através da PCR, quantidades deste DNA poderão ser amplificadas até níveis detectáveis. A PCR não só permite o diagnóstico na fase crônica da doença, como também possibilita a coleta de grandes amostragens sem o sacrifício do animal (NUNAN et al., 1994). Mais recentemente, a PCR em tempo real tem sido utilizada para quantificar a bactéria da NHP e permitir a identificação do agente mais rapidamente até mesmo nos estágios iniciais da doença (VINCENT e LOTZ, 2005).

### **3.5 CONTROLE E PROFILAXIA**

O monitoramento das características físico-químicas da água é um fator de extrema importância para a profilaxia de muitas enfermidades, tendo grande relevância para a epidemiologia da NHPB. Outro ponto importante é o vazão sanitário dos viveiros entre ciclos (secagem completa do solo) e a correta preparação dos mesmos neste período, o que inclui a oxidação da camada superficial através de gradeamento, a desinfecção de áreas úmidas com cal virgem e o controle do teor de matéria orgânica do solo com nitrato de sódio e/ou adição de bactérias redutoras de matéria orgânica, além da obtenção de pós-larvas oriundas de matrizes livres de NHPB (LIGHTNER, 1996).

Atualmente, apenas uma droga antimicrobiana está aprovada pelo MAPA (Ministério da Agricultura e Abastecimento) para uso exclusivo na aquicultura, porém não para camarões, sendo também aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA), embora alguns estudos estejam em processo de finalização para a liberação de drogas para o controle e tratamento de doenças desses animais (LIGHTNER, 1996; REED et al., 2004). De acordo com Reed et al., (2000), a oxitetraciclina (OTC), devido a seu amplo espectro antimicrobiano e alta potência, é muito usada como antibiótico de eleição contra infecções bacterianas em peixes cultivados, apresentando bons resultados quando usada em camarão de cultivo para o tratamento de infecções da vibriose e da NHP. A OTC foi o primeiro antimicrobiano aprovado pela FDA para cultivos de peixes e foi aprovada nos EUA para uso em lagostas, mas também tem sido utilizada em cultivos de camarão apresentando bons resultados.

De acordo com Frelie et al. (1994), o tratamento com oxitetraciclina na ração contendo uma proporção de 1,5g /kg de alimento e usado por 14 dias foi efetivo no tratamento da doença se administrada quando há diagnóstico precoce da infecção. No entanto, ainda se sabe pouco sobre a disposição e farmacocinética da OTC no organismo de crustáceos (REED et al., 2004).

À medida que a indústria da aquicultura cresce, aumenta também a preocupação com o uso indiscriminado de drogas e possíveis riscos para a saúde humana, assim como os impactos ambientais que podem ser ocasionados pelos resíduos das mesmas (REED et al., 2004).

Apesar de a Hepatopancreatite Necrosante ter sido identificada há pelo menos 20 anos no camarão marinho cultivado, estudos sobre a doença e, principalmente, em relação ao seu diagnóstico, ainda são poucos, sendo o maior problema o fato de a bactéria causadora ser exclusivamente intracelular, ou seja, não pode ser cultivada *in vitro* pelos meios de cultivo convencionais. O tratamento com antibiótico não é recomendado por não existir droga antimicrobiana aprovada no Brasil, além dos riscos para a saúde humana e os impactos ambientais ocasionados pelos resíduos das mesmas. Dessa forma, é possível considerar que o controle da NHP fica restrito ao manejo das fazendas, principalmente ao controle da qualidade da água utilizada nos cultivos e do monitoramento de seus parâmetros, de forma que se mantenha o conforto dos animais.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIRRE-GUZMÁN, G., ASCENCIO-VALLE, F. Infectious disease in shrimp species with aquaculture potential. *Resent Res. Devl. Microbiology.* v.4, p. 333–348. 2000.
- AL-MOHANNA, S.Y., NOTT, J.A. B-cells and digestion in the hepatopancreas of *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda). **Journal Marine Biological Association.** Madras, v. 66, p.403-414, 1986.
- AL-MOHANNA, S.Y., NOTT, J.A. R-cells and digestive cycle in *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda). **Marine Biology,** Vladivosk, v. 95, p.129-137, 1987.
- ARANGUREN, L.F., BRIÑEZ, B., ARAGÓN, L., PLATZ, C., CARABALLO, X., SUAREZ, A., SALAZAR, M. Necrotizing hepatopancreatitis (NHP) infected *Penaeus vannamei* female broodstock: Effect on reproductive parameters, nauplii and larvae quality. **Aquaculture.** Amsterdam, v.258, p. 337–343. 2006.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE CAMARÃO (ABCC): <http://www.abccam.com.br/estat18.htm>. Acesso em 15 de novembro de 2007.
- BRAASCH, D.A., ELLENDER, R.D., MIDDLEBROOKS, B.L. Cell cycle components and their potential on the development of continuous *in vitro* penaeid cell replication. **Methods in Cell Science,** Norwell, v. 21, p. 255-261, 1999.
- BRANDLEY-DUNLOP, D.J., PANTOJA, C., LIGHTNER, D.V. Development of monoclonal antibodies for the detection of necrotizing hepatopancreatitis in penaeid shrimp. **Diseases of Aquatic Organisms** Oldendorf/Luhe, v. 60, p. 233-240, 2004.
- BRIÑEZ, B., ARANGUREN, F., SALAZAR, M. Fecal samples as DNA source for the diagnosis of necrotizing hepatopancreatitis (NHP) in *Penaeus vannamei* broodstock. **Diseases of Aquatic Organisms,** Oldendorf/Luhe, v.69, p.55-72, 2003.
- BROCK, J.A., MAIN, K.L. A guide to the common problems and disease of cultured *Penaeus vannamei* . **World Aquaculture Society,** Baton Rouge, v. p.116. 1994.
- BUCHELI, P., SAMPAIO, J., GARCIA, F., CORREA, M. A Necrose Hepatopancreática (NHP) do *Litopenaeus vannamei*: caracterização e diagnóstico



preliminar pelo método de avaliação da deterioração de tecidos (ADT). **Panorama da Aqüicultura**, Rio de Janeiro, n.86, P.31-38, 2004.

DAVIES, A.J. A rickettsia-like organism from dragonets, *Callionymus lyra* L. (Teleostei: Callionymidae) in Wales. **European Association of Fish Pathologists**, [s.n.], v. 6, p. 103, 1986.

FAO. FISHERY INFORMATION, DATA AND STATISTICS UNIT. **FishStat plus**: universal software for fishery statistical time series. Version 2.3. Rome, 2007. Disponível em: <<http://www.fao.org/fi/statist/FISOFT/FISHPLUS.asp>>. Acesso em: 12 dezembro 2007.

FAO, FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. In: 31<sup>st</sup> Session Conference: The State of Food and Agriculture, Rome, 70p. 2001.

FRYER, J.L., LANNAN, C.N. Rickettsial and chlamydial infection of freshwater and marine fishes, bivalves and crustaceans. **Zoological Studies**, Taipei, v. 33, p. 95-107, 1994.

FRELIER, P.F., SIS, R.F., BELL, T.A., LEWIS, D.H. Microscopic and ultrastructural studies of Necrotizing Hepatopancreatitis in pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) cultured in Texas. **Veterinary Pathology**, Baltimore, v. 29, p. 269-277, 1992a.

FRELIER, P.F., LOY, J.K., KRUPPENBAUCH, B. Transmission of Necrotizing Hepatopancreatitis in *Penaeus vannamei*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 61, p. 44-48, 1992b.

FRELIER, P.F., LOY, J.K., LAWRENCE, A.L., BRAY, W.A., BRUMBOUGH, G.W. Status of necrotizing hepatopancreatitis in Texas farmed shrimp, *Penaeus vannamei*. **U.S. Marine Shrimp Farming Program 10th anniversary review**. Mississippi, p55-58, Ed. McIlwain, 1994.

GIBSON, R., BARKER, P.L. The decapod hepatopancreas. **Oceanography and Marine Biology**, Aberdeen, v. 17, p. 285-346, 1979.

GIL, B.G., ROQUE, A., FLORES, A.L.G. Las Enfermedades en la Camaronicultura. In: Osuna, F.P. (Ed), **Camaronicultura y medio ambiente**, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México. México, p. 271-296. 2001.

- JOHNSON S.K. Handbook of shrimp diseases. **College Station**, Tex A&M .1990.
- KROL, R.M., HAWKINS, W.E., OVERSTREET, R.M. Rickettsial and mollicute infections in hepatopancreatic cells of cultured Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.57, p. 362-370, 1991.
- LECLERCQ, G., ZAMBRANO, D., ESCOBAR, A., CEDEÑO, V., MOTTE, E., BOULO, V., MIALHE, E. Analysis, prevention of NHP in Panama, Ecuador, Peru shrimp farms. **Global Aquaculture Advocate**, St. Louis, p. 86-87, 2004.
- LE MOULLAC, G., HAFFNER, P. Environmental factors affecting the immune responses in Crustacea. **Aquaculture**, Amsterdam, v.191, p.121-131, 2000.
- LIGHTNER, D.V., REDMAN, R.M., BONAMI, J.R. Morphological evidence for a single bacterial etiology in Texas Necrotizing Hepatopancreatitis in *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). **Diseases of Aquatic Organisms**, Oldendorf/Luhe, v. 13, p. 235-239, 1992.
- LIGHTNER, D. V. A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. **World Aquaculture Society**, Louisiana. 1996.
- LIGHTNER, D.V., REDMAN, R.M. Shrimp diseases and current diagnostic methods. **Aquaculture**, Amsterdam, v.164, p. 201-220, 1998.
- LIGHTNER, D.V. Diagnosis of Shrimp Diseases with Emphasis on the Black Tiger Shrimp (*Penaeus Monodon*). [S.l.: s.n.], 1999.
- LOY, J.K., FRELIER, P.F. Specific, Nonradioactive detection of the NHP bacterium in *Penaeus vannamei* by *in situ* hybridization. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v.8, p. 324-331, 1996.
- LOY, J.K., FRELIER, P.F., VARNER, P., TEMPLETON, J.W. Detection of the etiologic agent of necrotizing hepatopancreatitis in cultured *Penaeus vannamei* from Texas and Peru by polymerase chain reaction. **Diseases of Aquatic Organisms**, Oldendorf/Luhe, v.25, p. 117-122, 1996a.
- LOY, J.K., DEWHIRST, F.E., WEBER, W., FRELIER, P.F., GARBAR, T.L., TASCA, S.I., TEMPLETON, J.W. Molecular phylogeny and *in situ* detection of the etiologic agent of Necrotizing Hepatopancreatitis in shrimp. **Applied and Environment Microbiology**, Washington, v. 62 , p. 3439-3445, 1996b.

LUNA, L.G. **Manual of histological staining methods of the armed forces institute of pathology.** New York, v. 1, p. 258, 1968.

MAUEL, M.J., MILLER, D.L. Piscirickettsiosis and piscirickettsiosis-like infections in fish: a review. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 87, p. 279-289, 2002.

MOHAMED, Z. The discovery of a rickettsia in a fish. **Technic Science Service. Veterinary Section.** Cairo , v. 214, p.6 , 1939.

MOORE, J.D.,ROBBINS, T.T., FRIEDMAN, C.S. The role of Rickettsia-like prokaryote in withering syndrome in California red abalone, *Haliotis rufescens*. **Journal of Research**, New York, v. 19, p. 525-526, 2000.

MORALES-COVARRUBIAS, M.S., CHAVEZ-SÁNCHEZ, C. Histopathological on wild broodstock of white shrimp *Penaeus vannamei* in the Platanitos área adjacent to San Blas, Nayaril, México. **Journal of the World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v. 30, p. 192-200, 1999.

MORALES-COVARRUBIAS, M.S. **Enfermedades del camarón: detección mediante análisis en fresco e histopatología. ( Diseases shrimp detection by means of gross analysis and histopathology).** Mexico, Ed. Trillas, 122pp. 2004.

MORALES-COVARRUBIAS, M.S., OSUMA DUARTE, A.G., GARCIA GASCA, A., LIGHTNER, D.V. Prevalence of Necrotizing Hepatopancreatitis in female broodstock of white shrimp *Penaeus vannamei* with unilateral eyestalk ablation and hormone injection. **Journal of Aquatic Animal Health**, Bethesda, v. 18, p. 019-025, 2006.

NORTON, J.H., SHEPHERD, M.A., LONG, H.M., PRIOR, H.C. Parasites of the Giant Clams (Tridacnidae): biology and mariculture of giant clams. **Australian Centre of International Agricultural Research.** Canberra a.c.t. (Australia), p. 18-23, 1993a.

NORTON, J.H., SHEPHERD, M.A., ABDON NAGUTT, M.R., LINDSAY, S. Mortalities in the giant clam, *Hippopus hippopus* associated with rickettsiales-like organisms. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 62, p. 207-209, 1993b.

NUNAN L. M.; POULOS B.T.; LIGHTNER D.V. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) used for the detection of Taura Syndrome Virus (TSV) in experimentally infected shrimp. **Diseases of Aquatic Organisms**, Oldendorf/Luhe, v.34, p.87-91. 1994.

NUNAN, L.M., NOBLE, B., LE GROUMELLE, M., LIGHTNER, D.V. Experimental infection of *Penaeus vannamei* by a rickettsia-like bacterium (RLB) originating from *Penaeus monodom*. **Diseases of Aquatic Organisms**, Oldendorf/Luhe, v. 54, p. 43-48, 2003a.

OIE. International aquatic animal health code, Fish, Molluscs and Crustaceans Third ed. Office International des Epizooties. 192 pp. 2001.

PEREIRA, A.M.L., SANTOS, M.L. **Relatório do Treinamento em Patologias de Camarões Marinhos**. Parnaíba, p.19-29, 2003.

REED, L. SIEWICKI T. C., SHAH J. C. Pharmacokinetics of oxytetracycline in the white shrimp, *Litopenaeus setiferus*, **Aquaculture**, Amsterdam, v. 232, p. 11-28. 2004.

ROMERO, X., TURNBULL, J.F., JIMENEZ, R. Ultrastructure and Cytopathology of Rickettsia-like Organism causing systemic infection in the Redclaw Crayfish, *Cherax quadricarinatus*. (Crustacea: Decapoda), in educador. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 76, p. 95-104, 2000.

VINCENT, A. Advances in research on NHP. U.S. Marine Shrimp Farming Program Industry. **Briefs**, New York, v. 10, p 3-7, 2004.

VINCENT, A., BRELAND, V.M., LOTZ, J.M. Experimental infection of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* with Necrotizing Hepatopancreatitis (NHP) bacterium by per os exposure. **Diseases of Aquatic Organisms**, Oldendorf/Luhe, v. 61, p. 227-233, 2004.

VINCENT, A. G; LOTZ, J.M. Time course of necrotizing hepatopancreatitis (NHP) in experimentally infected *Litopenaeus vannamei* and quantification of NHP-bacterium using real-time PCR. **Diseases of Aquatic Organisms**, Oldendorf/Luhe, v. 67, p. 163-169, 2005.

VOGT, G. Life-cycle and functional cytology of the hepatopancreatic cells of *Astacus astacus* (Crustacea: Decapoda). **Zoomorphology**, Berlin, v. 114, p. 83-101, 1994.

WINKLER, H.H. Rickettsia species (as organisms). **Annual Review Microbiology**, Palo Alto, v. 44, p. 131-153, 1990.

WU, X.Z.; PAN, J.P. Studies on Rickettsia-like organism disease of tropical marine pearl oyster I: The fine structure and morphogenesis of *Pinctada maxima* pathogen rickettsia-like organism. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 73, p. 162-172, 1999 a

WU, X.Z.; PAN, J.P. Studies on Rickettsia-like organism disease of tropical marine pearl oyster, *Pinctada maxima* and *P. funcata* IV. On histo-cytopathology of RLO disease. **Acta. Oceanologica Sinica**, [ s.n.], v. 21, p. 93-98, 1999c.

WU, X.Z.; PAN, J.P. An intracellular prokaryotic microorganism associated with lesion in the oyster, *Crassostrea ariakensis* Gould. **Journal of Fish Diseases**, Edinburgh, v. 23, p. 409-414, 2000.

## **5. ARTIGO CIENTÍFICO**

O artigo científico intitulado “Comparação entre as técnicas de exame a fresco, histopatologia e PCR, no diagnóstico da Hepatopancreatite Necrosante (NHPB), no camarão *Litopenaeus vannamei*”, será submetido a revista Aquaculture.

1 **Comparação entre as técnicas de exame a fresco, histopatologia e PCR, no**  
2 **diagnóstico da Hepatopancreatite Necrosante (NHPB), no camarão *Litopenaeus***  
3 ***vannamei*.**  
4

5 Giana Bastos Gomes; Verônica Arns da Silva; Suely Santos Bezerra; Karine Kelly

6 Cavalcanti Oliveira; Paulo de Paula Mendes; Fernando Leandro dos Santos; Emiko

7 Shinozaki Mendes\*

8

9 Universidade Federal Rural de Pernambuco. End. Av. Dom Manuel de Medeiros s/n,

10 Dois Irmãos. Recife/PE, Brasil (81) 3320-6419

11

12 \*Autor correspondente. Tel.: +55 81 3320 6419; E-mail: esmendes@yahoo.com.br

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27 **RESUMO**

28

29       Entre as enfermidades de origem bacteriana que podem acometer os camarões  
30 destaca-se a Hepatopancreatite Necrosante (NHPB), doença de difícil controle e  
31 diagnóstico causada por uma bactéria intracelular da ordem Rickettsia. Sendo assim,  
32 objetivou-se relacionar estatisticamente duas técnicas tradicionais, o exame a fresco e a  
33 histopatologia, com um método molecular, a Reação de Cadeia de Polimerase (PCR),  
34 no diagnóstico da NHPB no camarão marinho *Litopenaeus vannamei*. Foram coletados  
35 154 camarões oriundos de uma fazenda do litoral sul do estado do Rio Grande do  
36 Norte/Brasil. O hepatopâncreas de cada indivíduo foi retirado e dividido em três partes,  
37 sendo uma utilizada para exame a fresco e as outras duas fixadas para posteriores  
38 análises de histopatologia e PCR. As características analisadas ao exame a fresco foram:  
39 coloração, quantidade de lipídeos, deformação nos túbulos, desprendimento celular e  
40 melanização. Na histopatologia visualizou-se infiltração hemocítica, edema, lesões  
41 granulomatosas e atrofia dos túbulos. Verificou-se menor quantidade de lipídeos, maior  
42 grau de deformações nos túbulos e um maior percentual de hepatopâncreas com  
43 desprendimento celular, além de melanização, infiltração hemocítica e lesões  
44 granulomatosas em indivíduos PCR positivos para NHPB do que em animais PCR  
45 negativos. Apesar disso, não houve relação significativa ( $P \geq 0,05$ ) entre o resultado da  
46 PCR com as variáveis analisadas no exame a fresco e histopatologia, uma vez que um  
47 percentual significativo de indivíduos PCR negativos também apresentaram lesões.  
48 Estas lesões podem estar relacionadas a outras etiologias que não NHPB. Desse modo,  
49 conclui-se que as técnicas de exame a fresco, histopatologia e PCR isoladamente, não  
50 devem ser usadas para o diagnóstico desta doença.

51

52 **Palavras-chave:** *Rickettsia*, Diagnóstico, Exame a fresco, Histopatologia, PCR.

53

54

55

56

57

58

59



## 60 1. Introdução

61

62 O crescimento desordenado do cultivo do camarão branco *Litopenaeus*  
63 *vannamei* no Brasil, foi acompanhado por diversos problemas, ocasionados  
64 principalmente pelo manejo inadequado (densidades elevadas, instalações impróprias,  
65 má qualidade da água) e a busca incessante por lucros. Como consequência disso, houve  
66 o aparecimento das enfermidades e entre estas a Hepatopancreatite Necrosante causada  
67 por bactéria (NHPB), destaca-se não só por causar prejuízos econômicos aos produtores  
68 do Nordeste brasileiro, mas também por ocasionar muita discussão a respeito do seu  
69 diagnóstico, prevenção e tratamento.

70 A NHPB é uma doença causada por uma bactéria intracelular obrigatória, Gram-  
71 negativa, pleomórfica, membro das  $\alpha$ -Proteobacteria e do tipo *Rickettsia*, que reside e se  
72 multiplica nas células epiteliais dos túbulos do hepatopâncreas (HP) de camarões  
73 marinhos infectados (Loy et al., 1996a; Bradley-Dunlop et al., 2004).

74 Como essa bactéria tem predileção pelas células do HP, os camarões infectados  
75 possuem este órgão atrofiado, acarretando prejuízo na ingestão de alimentos e,  
76 conseqüentemente, no estoque de lipídeos, interferindo negativamente no seu  
77 desenvolvimento (Arangurem et al., 2006). Apresentam ainda, o exoesqueleto  
78 amolecido, o corpo flácido, a cutícula frouxa e as brânquias escurecidas. Os animais  
79 encontram-se letárgicos, anoréxicos e há um elevado fator de conversão alimentar  
80 (Brock and Main, 1994).

81 Um aspecto muito importante da NHPB, em camarões marinhos, é que ela está  
82 associada às condições de elevada salinidade e temperatura, fato observado no surto  
83 ocorrido no Texas, em que períodos prolongados de altas temperaturas ( $> 29^{\circ}$  C) e  
84 mudanças na salinidade (entre 20-40 ‰) precederam a ocorrência da NHPB (Frelier et

85 al., 1992, Lightner, 1996, Loy et al., 1996), sendo estas características peculiares  
86 também ao clima predominante no Nordeste brasileiro.

87 A NHPB afeta tanto animais em estágio juvenil quanto adulto, não tendo  
88 registros de casos em pós-larvas (Lightner, 1996), ocorrendo a transmissão do agente  
89 pela ingestão de material infectado, de camarões mortos infectados ou por canibalismo  
90 (Vincent et al., 2004).

91 Entre as técnicas que podem ser utilizadas para detecção da NHPB destaca-se a  
92 análise a fresco, a histopatologia, as sondas gênicas, a microscopia eletrônica e a PCR.  
93 A análise a fresco tem sido bastante utilizada a campo para realização de diagnósticos  
94 presuntivos e para o monitoramento da saúde dos animais (Morales-Covarrubias, 2004).

95 Desta forma, objetivou-se relacionar as técnicas de análise a fresco com a  
96 histopatologia e a PCR no diagnóstico da NHPB e avaliar a utilização do exame a fresco  
97 como técnica de detecção desta enfermidade.

98

## 99 **Material e Métodos**

100

### 101 **2.1 Coleta das amostras**

102

103 Foram coletadas 154 camarões em intermuda, com tamanho comercial (peso =  
104 13,0 g) oriundos de uma fazenda localizada no sul do estado do Rio Grande do Norte/  
105 Brasil, onde o estado do Rio Grande do Norte apresenta-se como maior produtor com  
106 uma média de 26.400 de camarão produzidos no ano de 2006 (ABCC, 2007). Os  
107 animais foram provenientes de três viveiros dessa fazenda que possui histórico de  
108 NHPB com altas mortalidades. Após pescados ao acaso com tarrafa, os camarões foram  
109 colocados em baldes com aeração e transportados até o laboratório da fazenda para  
110 análises. Dos animais coletados retirou-se o hepatopâncreas (HP), o qual foi dividido

111 em três partes, sendo duas fixadas para os exames de PCR e histopatologia e a outra  
112 para análise a fresco (Lightner, 1996).

113

## 114 **2.2 Análise a fresco**

115

116 Parte do HP retirado no momento da coleta foi preparado em lâmina com  
117 solução salina a 3,0 % para avaliação direta ao microscópio, segundo método descrito  
118 por Morales-Covarrubias (2004). Ao microscópio observou-se a presença de  
119 melanização, de desprendimento de células do epitélio dos túbulos, alteração tubular  
120 (nódulos hemocíticos e atrofia ou necrose dos túbulos), além da coloração do fluido do  
121 HP (normal, marrom-alaranjado; alterada, incolor, vermelha, amarelo). Uma das  
122 principais características analisadas foi a quantidade de lipídeos nos túbulos, que está  
123 diretamente envolvida com o nível nutricional do animal.

124 Nas Tabelas 1 e 2 são apresentados o grau de severidade das alterações e a  
125 discriminação da quantidade de lipídeos, respectivamente, que podem ser observados no  
126 exame a fresco.

127

128 Tabela 1: Grau de severidade das alterações do hepatopâncreas do camarão *Litopenaeus*  
129 *vannamei*.

130

<b>Grau de severidade</b>	<b>Sinais clínicos</b>
<b>0</b>	Não apresentam sinais de deformação tubular, nem lesões características de síndromes.
<b>1</b>	Presença muito baixa de deformação tubular (1-5/campo/animal). Pouco desprendimento celular
<b>2</b>	Observa-se moderada presença de deformação tubular (6-10/campo/animal). Há mortalidade quando não se aplica tratamento.
<b>3</b>	Observa-se alta presença de deformação tubular (11-20/campo/animal). Detectam-se lesões moderadas e severas com melanização e desprendimento celular e atrofia tubular. Potencialmente letal quando não se aplica tratamento.
<b>4</b>	Grande quantidade de túbulos deformados (> 20/campo/animal). Observam-se severas lesões como necrose, melanização, atrofia e túbulos vazios.

131 Adaptado Morales- Covarrubias, (2004).

132

133

134

135

136 Tabela 2: Quantificação de lipídeos nos túbulos do hepatopâncreas do camarão *Litopenaeus*  
 137 *vannamei*.

Quantidade de lipídeos	Características
0	Ausência total de lipídeos nos túbulos. Quando não se institui tratamento, ocorre alta mortalidade, havendo grande prejuízo no crescimento (100% dos túbulos vazios/campo/animal).
1	Baixa presença de lipídeos nos túbulos (25% do túbulo preenchido com gotículas de lipídeos/campo/animal).
2	Moderada presença de lipídeos nos túbulos (50% do túbulo preenchido com gotículas de lipídeos/campo/animal).
3	Alta presença de lipídeos nos túbulos (75% do túbulo preenchido com gotículas de lipídeos/campo/animal).
4	Repleção total dos túbulos (100% do túbulo preenchido com gotículas de lipídeos/campo/animal).

138

### 139 **2.3 Análise histopatológica**

140

141 A análise histopatológica foi realizada em uma parte de HP que foi fixada em  
 142 solução de Davidson (Bell e Lightner, 1988) no momento da coleta, por 24 h e,  
 143 posteriormente, transferidos para o álcool a 70%. Em laboratório, as amostras foram  
 144 coradas pela técnica da hematoxilina e eosina, segundo o método descrito por Behmer  
 145 (2003), e examinadas à microscopia óptica, observando-se a presença de alterações,  
 146 como a atrofia dos túbulos, infiltração hemocítica, edema e formação multifocal de  
 147 granulomas (Morales-Covarrubias, 2004).

148

### 149 **2.4 Análise por PCR**

150

151 Para as análises de PCR, as amostras foram fixadas com etanol 95% e  
 152 armazenadas em geladeira para posterior análise. Todas as etapas dessa análise, desde a  
 153 extração do DNA, dissolução, amplificação e as reações de PCR e Nested PCR, foram  
 154 conduzidas de acordo com o protocolo recomendado pelo Kit comercial Farming  
 155 IntelliGene Tech Corp. IQ2000™ NHPB Detection and Prevention System. Para a  
 156 extração do DNA foi utilizado EDTA (500mM, pH 8.0), solução DTAB, solução CTAB

157 e ddH<sub>2</sub>O, além de solução dissolvente. As amostras foram centrifugadas à temperatura  
 158 ambiente até o momento em que se passou a utilizar etanol 95% e 70%. Nesta etapa as  
 159 centrifugações foram realizadas a temperatura de - 4°C. Realizaram-se então a reações  
 160 de PCR e Nested PCR e a amplificação da seqüência de genes foi observada  
 161 separadamente por amostras de indivíduos PCR negativo ou positivo de NHPB, como  
 162 descritos pelo fabricante.

163

## 164 **2.5 Análise estatística**

165

166 Para geração do banco de dados e análises estatísticas, relacionou-se a presença  
 167 ou ausência (1 ou 0) da NHPB, pelo processo de PCR, em função das análises  
 168 histopatológicas: atrofia tubular(Hist<sub>Atrof</sub>), infiltração hemocítica (Hist<sub>IH</sub>); edema  
 169 (Hist<sub>Ed</sub>); lesão granulomatosa (Hist<sub>Lg</sub>); e das análises do exame a fresco: quantidade de  
 170 lipídeos (EA<sub>QI</sub>); alteração tubular (EA<sub>At</sub>); desprendimento celular (EA<sub>Dc</sub>); melanização  
 171 (EA<sub>M</sub>); cor do fluido do HP (EA<sub>C</sub>), de acordo com a formatação a seguir:

172

$$173 \quad \text{PCR} = \beta_0 + \beta_1 \text{Hist}_{\text{Atrof}} + \beta_2 \text{Hist}_{\text{IH}} + \beta_3 \text{Hist}_{\text{Ed}} + \beta_4 \text{Hist}_{\text{Lg}} + \beta_5 \text{EA}_{\text{QI}} + \beta_6 \text{EA}_{\text{At}} +$$

$$174 \quad \beta_7 \text{EA}_{\text{Dc}} + \beta_8 \text{EA}_{\text{M}} + \beta_9 \text{EA}_{\text{C}} + e_i$$

175 Em que:  $e_i$  erro associado a iésima observação.

176

177

178 Para selecionar as variáveis significativas ( $P < 0,01$ ) no modelo, utilizou-se o  
 179 processo de *Stepwise Forward* em que a estatística “F” de Senedecor de entrada e saída  
 180 forma ajustados para 4, de acordo com as técnicas descritas em Mendes (2006). As  
 181 análises foram realizadas utilizando-se o programa estatístico Syseapro (versão 1.0).

182

### 183 3. Resultados

184

185 Das 154 amostras de HP analisadas por PCR, 41,6% tiveram resultados positivos  
 186 e 58,4 % negativas, para NHPB. Através do exame a fresco, puderam-se observar  
 187 animais com poucas alterações no HP, mas com sintomas clínicos, como: cutícula  
 188 frouxa, coloração pálida do hepatopâncreas, desprendimento celular, melanização,  
 189 atrofia e estrangulamento tubular (Tabela 3).

190 Tabela 3: Lesões observadas no exame a fresco em amostras PCR positivas e  
 191 negativas (NHPB).

NHPB	NI	Alteração tubular	Quantidade de lipídeo	Desprendimento celular (%)	Melanização (%)	Coloração fluido (%)
PCR+	64	1,86 ± 1,49	2,27 ± 1,28 <sup>a</sup>	79,7 ± 40,6	59,4 ± 49,5	64,1 ± 48,4
PCR -	90	1,34 ± 1,32	2,83 ± 1,30 <sup>b</sup>	62,2 ± 48,8	44,4 ± 50,0	66,7 ± 47,4

192 NI: número de indivíduos.

193 Letras diferentes entre linhas representam valores estatisticamente diferentes, pela  
 194 técnica de análise de variância (P< 0,05).

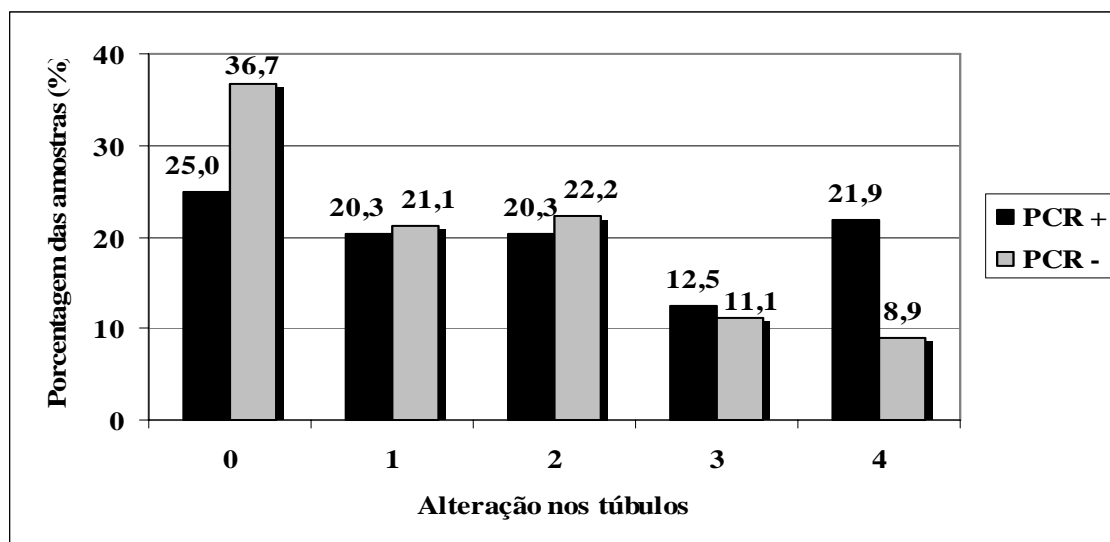
195

196 Os indivíduos PCR positivos apresentaram maior grau de alteração tubular e  
 197 menor quantidade de lipídeos no HP, quando comparados aos indivíduos PCR negativos  
 198 (Tabela 3). Um alto percentual de desprendimento celular e de melanização foram  
 199 observados em indivíduos PCR positivos (79,7 e 59,4%, respectivamente), bem como,  
 200 em animais PCR negativos (62,2% e 44,4%, respectivamente). Em relação à coloração  
 201 do HP, indivíduos PCR negativos apresentaram mais alteração do que os indivíduos  
 202 PCR positivos.

203 Nos camarões que apresentaram positividade na PCR, nenhuma alteração  
 204 tubular (Grau 0) foi observada em 25% das amostras, entretanto, foram verificadas  
 205 grandes alterações (Grau 4) em 21,9% das amostras. Por outro lado, um percentual  
 206 considerável (42,2%) de indivíduos PCR negativos apresentaram alterações

207 significativas nos túbulos (Graus 2, 3 e 4), tendo sido observado um grande número de  
 208 animais com Grau 0 (36,7%) também foi observado (Fig. 3).

209



210  
 211

212 Fig. 3. Relação entre o percentual de amostras com PCR positivas e negativas  
 213 (NHPB) e a alteração nos túbulos (em graus).  
 214

215

216

217

218

219

220

221

222

223

224

225

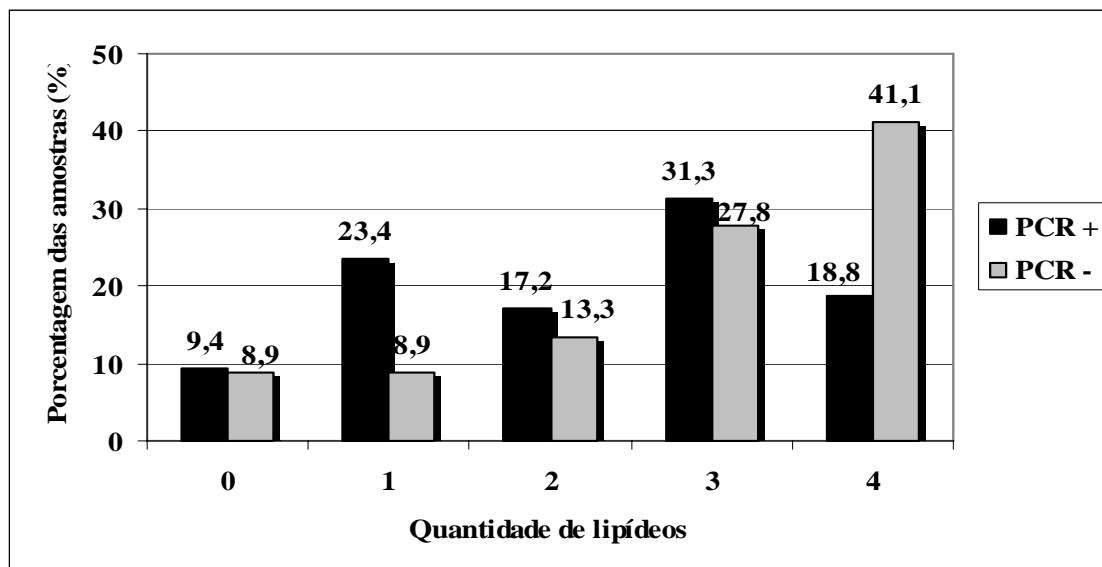
226

227

228

Da mesma forma, em relação às alterações nos túbulos, não ocorreu relação entre a quantidade de lipídeos e os resultados de PCR, cujas porcentagens podem ser visualizadas na Fig. 4. Não foi verificado, nos animais PCR positivos, como seria coerente encontrar um número maior de HP com lipídeos de grau 0, observando-se, verificando-se no entanto, maior percentual de amostras (31,1%) com grau 3. Já nos animais PCR negativos ocorreu o esperado, estando o maior percentual de amostras (41,1%) com grau 4. Verificou-se também que, apesar do alto percentual de amostras se situarem nos graus 3 e 4, em relação a quantidade de lipídeos, tanto nos animais PCR positivos como nos negativos, um percentual significativo dos animais (31,1%) PCR negativo e (50%) PCR positivo, apresentaram graus 0, 1 e 2, que podem ser indicativos de desnutrição.

229



230

231

232 Fig. 4. Relação entre o percentual de amostras com PCR positivas e negativas  
 233 (NHPB) e a quantidade de lipídeo nos túbulos (em graus).

234

235

236

237

238

239 As lesões características da NHPB mais observadas na análise histopatológica,  
 240 foram a presença de infiltração hemocítica, edema e lesões granulomatosas ou  
 241 nodulares. Pôde-se verificar também a presença de necrose dos túbulos e atrofia do  
 242 epitélio celular dos túbulos.

242

243

244

245

246

247

248

249

250

A porcentagem de camarões com infiltração hemocítica foi alta, tanto para amostras PCR positivas (93,8 %), quanto negativas (81,1 %), não havendo diferença significativa entre as mesmas. Da mesma forma, foi observado um percentual significativo de animais, tanto PCR positivos (54,7%), quanto negativos (57,8%), com edema (Tabela 4). A presença de lesão granulomatosa no HP foi a característica observada com menor freqüência em ambos os grupos (positivos e negativos), sendo que nos indivíduos PCR positivos, esta característica foi verificada com maior freqüência, quando comparados com os PCR negativos. A porcentagem de atrofia nos túbulos foi similar entre os indivíduos PCR positivos (51,6%) e os negativos (52,2%).



251  
252  
253  
254

Tabela 4: Porcentual de lesões observadas no HP de animais PCR positivos e negativos (NHPB) na histopatologia.

<b>NHP</b>	<b>NI</b>	<b>Infiltração hemocítica (%)</b>	<b>Edema (%)</b>	<b>Lesão granulomatosa (%)</b>	<b>Atrofia dos túbulos (%)</b>
<b>PCR +</b>	64	93,8 ± 24,4 <sup>a</sup>	54,7 ± 50,2	18,8 ± 39,3	51,6 ± 50,4
<b>PCR -</b>	90	81,1 ± 39,4 <sup>b</sup>	57,8 ± 49,7	10,0 ± 30,2	52,2 ± 50,2

255  
256  
257  
258  
259

NI: número de indivíduos.

Letras diferentes entre linhas representam valores estatisticamente diferentes, pela técnica de análise de variância ( $P < 0,05$ ).

260  
261  
262  
263  
264  
265  
266  
267  
268  
269

Ao se relacionar amostras de PCR positivas com as lesões observadas na análise a fresco (deformação tubular, quantidade de lipídeos, melanização, desprendimento celular e a coloração do hepatopâncreas) e as verificadas na análise histopatológica (infiltração hemocítica, edema, lesão granulomatosa e atrofia dos túbulos), obteve-se a função matemática, com um baixíssimo coeficiente determinístico ( $R^2=0,0718$ ), como descrita abaixo. Isto é indicativo de que não houve relação significativa ( $P < 0,05$ ) entre os resultados de PCR positivo com as lesões encontradas na análise a fresco e na histopatologia. Ainda que de maneira discreta, pôde-se observar também que os parâmetros que influenciaram a PCR positiva foram a quantidade de lipídeos nos túbulos (análise a fresco) e a infiltração hemocítica (histopatologia).

270  
271  
272  
273  
274  
275  
276

$$\text{PCR} = 0,4066 - 0,0744 \text{EA}_{\text{QI}} + 0,2342 \text{Hist}_{\text{IH}}$$

Em que: PCR - Camarões com PCR positivo para NHPB;  $\text{EA}_{\text{QI}}$  – quantidade de lipídeos no exame a fresco;  $\text{Hist}_{\text{IH}}$  – infiltração hemocítica na histopatologia.

#### 277 **4. Discussão**

278

279 Um bom indicativo da saúde do camarão e seu nível nutricional é a quantidade  
280 de lipídeos nos túbulos do HP, que pode ser visualizada pela análise a fresco. Na  
281 quantificação de lipídeos, neste órgão, constatou-se que os animais saudáveis  
282 apresentam túbulos hepatopancreáticos repletos de lipídeos (já que animais saudáveis se  
283 alimentam bem e com alimento propício). Um nível reduzido destes pode ser causado  
284 não apenas por doença como a NHPB, mas também por uma deficiência alimentar e até  
285 mesmo contaminantes na água, como por exemplo, os pesticidas. Além disso, o período  
286 de ecdise do animal também tem influência sobre a quantidade de lipídeos nos túbulos.  
287 Animais no período pré-ecdise apresentam quantidades elevadas de lipídeos nos  
288 túbulos, ocorrendo o inverso no período pós-ecdise, quando os camarões apresentam  
289 quantidades mínimas de lipídeos nos túbulos do HP (Clifford, 1994).

290 Lightner (1996) e Morales-Covarrubias et al. (2006) verificaram a presença de  
291 melanização nos túbulos do HP, ausência de gotículas de lipídeos e de massas  
292 citoplasmáticas da bactéria da NHPB pela análise a fresco. Esta última característica  
293 não foi observada no presente trabalho, porém a presença de desprendimento celular foi  
294 bastante marcante nas amostras analisadas, apesar desta característica não estar  
295 relacionada com o resultado positivo da PCR.

296 Encontrou-se um elevado percentual de indivíduos com níveis significativos de  
297 desnutrição (Graus 0, 1 e 2 de lipídeos), principalmente nos animais PCR positivos.  
298 Outros fatores, tanto ambientais como de manejo, que não a presença da bactéria da  
299 NHPB, podem ter interferido nesses resultados, uma vez que indivíduos PCR negativos  
300 também apresentaram níveis significativos de desnutrição. A deformação nos túbulos e  
301 o desprendimento celular são alterações que podem caracterizar a NHPB, porém não

302 são específicas desta doença, podendo estar presentes em outras enfermidades ou em  
303 outros casos, como na vibriose, em casos de intoxicação, em períodos de ecdise ou até  
304 mesmo nos problemas nutricionais (del Río- Rodríguez et al., 2006)

305 Lightner e Redman (1998) afirmaram que a presença de vários agentes  
306 etiológicos ou fatores, como agentes tóxicos, deficiência nutricional, alterações  
307 ambientais, entre outros, às vezes causam falso diagnóstico de certas enfermidades.  
308 Dificilmente se encontra apenas um agente que cause a doença, o normal é encontrar  
309 mais de um agente etiológico de doença (infeccioso ou não), em apenas um animal ou  
310 em populações de camarões com enfermidades. As infecções virais são tipicamente  
311 acompanhadas por infecções bacterianas secundárias e infestações epicomensais, que  
312 podem muitas vezes causar a morte de um animal já comprometido inicialmente pela  
313 infecção causada por vírus.

314 Ficou demonstrado que o exame a fresco apesar de ser uma técnica muito  
315 importante para o monitoramento sanitário do cultivo, não deve ser usado para o  
316 diagnóstico da NHPB, como exame principal, devido a suas limitações e subjetividade,  
317 uma vez que a interpretação das lesões e o julgamento dos graus das mesmas podem ser  
318 variáveis, a critério de quem realiza a análise. Entretanto, Morales-Covarrubias et al.  
319 (2006) citaram que esta técnica é uma ferramenta de alta precisão e confiabilidade na  
320 detecção precoce da NHPB em camarões cultivados, apresentando a grande vantagem  
321 do curto tempo para a realização desta análise e da sua utilização para um estudo  
322 epizootiológico desta doença.

323 Morales-Covarrubias (2004) reportaram que os achados histopatológicos que  
324 caracterizam a fase aguda da doença são a atrofia severa dos túbulos, formação  
325 multifocal de granulomas (afetando um ou mais túbulos do HP), infiltração hemocítica  
326 (IH), podendo haver, em alguns casos, células epiteliais dentro dos granulomas e estes

327 estarem hipertrofiadas, com massas bacterianas no citoplasma e alterações no epitélio  
328 tubular. Durante a fase crônica podem ser visualizados túbulos do HP muitos atrofiados,  
329 podendo haver formação de nódulos hemocíticos melanizados. Estas características  
330 foram as mais observadas, com relevância para a infiltração hemocítica, edema e lesões  
331 granulomatosas em um ou mais túbulos, havendo ainda massas bacterianas no  
332 citoplasma e atrofia dos túbulos, que caracterizam a fase aguda da doença.

333         Apesar de em muitas amostras não se ter observado lesões granulomatosas da  
334 NHPB, isso pode não significar que histologicamente não exista a lesão. Muitas vezes, o  
335 processo bioquímico da doença no organismo do animal ainda não ultrapassou as  
336 barreiras teciduais e desta forma, as lesões ainda não podem ser observados  
337 histologicamente. Além disso, pode ser que a parte de tecido fixado para histopatologia  
338 não tenha sido afetado por estes processos bioquímicos e desta maneira, também não  
339 sejam visualizados ao microscópio. Ressalta-se que, como na análise a fresco, os  
340 achados de histopatologia (infiltração hemocítica, edema e atrofia dos túbulos) não são  
341 específicos da NHPB, uma vez que estas alterações também podem ser visualizadas em  
342 outros processos, como intoxicações (Jones et al., 2000).

343         A grande dificuldade da identificação do agente causal da NHPB é a  
344 impossibilidade de cultivar a bactéria (tipo *Rickettsia*) pelos métodos bacteriológicos  
345 tradicionais, não havendo seu isolamento nos animais infectados, uma vez que a  
346 *Rickettsia* é estritamente intracelular. Por esta razão, a PCR é uma ferramenta  
347 importante no diagnóstico desta doença, permitindo detectar estas bactérias não  
348 cultiváveis mesmo quando há um grande número de amostras para serem analisadas,  
349 simultaneamente. A PCR em tempo real é um procedimento mais recente que permite  
350 quantificar a bactéria da NHP no tecido dos camarões e pode ser considerada uma

351 técnica de diagnóstico potencial desta enfermidade, principalmente por sua grande  
352 sensibilidade e especificidade (Vincent e Lotz , 2005) .

353         Apesar da confiabilidade na técnica de PCR, é importante ressaltar que os  
354 *primers* utilizados para esta análise são espécie-específico, o que significa que se o  
355 agente causador da doença for diferente daquele encontrado no *primer* específico, ou se  
356 houver mais de uma espécie causando o problema, o resultado será falso negativo. Além  
357 disso, um resultado positivo de PCR não significa que a enfermidade esteja realmente  
358 ocorrendo, significa apenas que o agente pesquisado está presente naquele organismo.  
359 De acordo com Lightner e Redman (1998), o hospedeiro pode variar de acordo com a  
360 espécie, idade, estágio de vida, status nutricional, imunidade, assim como o patógeno  
361 também varia, de acordo com sua virulência, concentração e habilidade de transpor as  
362 barreiras de imunidade do hospedeiro. Da mesma forma, o ambiente em que o animal  
363 vive também pode mudar com a densidade populacional, qualidade da água e do solo do  
364 viveiro, entre outros. Com este conceito, a simples presença de um agente em uma  
365 amostra enviada a um laboratório de diagnóstico, não significa necessariamente a  
366 manifestação da doença.

367

## 368 **5. Conclusão**

369

370

371         Conclui-se que não há relação significativa entre as técnicas de análise a fresco,  
372 histopatologia e PCR no diagnóstico da NHPB e dessa forma, as técnicas de exame a  
373 fresco e a histopatologia isoladamente, não devem ser usadas como técnicas de  
374 diagnóstico desta doença.

375

376

377 **Referências**

378

379

380 Aranguren, L.F., Briñez, B., Aragón, L., Platz, C., Caraballo, X., Suarez, A., Salazar, M.

381 2006. Necrotizing hepatopancreatitis (NHP) infected *Penaeus vannamei* female

382 broodstock: Effect on reproductive parameters, nauplii and larvae quality.

383 Aquaculture. 258, 337-343.

384 ABCC - Associação Brasileira de Criadores de Camarão: [www.abccam.com.br](http://www.abccam.com.br). Acesso

385 em 15 de novembro de 2007.

386 Behmer, O.A., Tolosa, E. M. C., Freitas Neto, A. G., Rodrigues, C. J., 2003. Manual de

387 técnicas para histologia normal e patológica. Manole. Barueri. 331pp.

388 Bell T.A., Lightner D.V., 1988. A handbook of normal penaeid shrimp histology. World

389 Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.

390 Brandley-Dunlop DJ, Pantoja, C., 2004. Development of monoclonal antibodies for the

391 detection of necrotizing hepatopancreatitis in penaeid shrimp. Dis. Aquat. Org. 60,

392 233-240.

393 Brock, J.A., Main, K.L., 1994. A guide to the common problems and disease of cultured

394 *Penaeus vannamei*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, 116 pp.

395 Clifford, H.C., 1994. Semi-Intensive sensation: A case Study in Marine Shrimp Pond

396 Management. World Aquaculture 25(3): 6-12; 98-104.

397 del Río-Rodríguez, R.E., Soto-Rodríguez, S., Lara-Flores, M., Cu-Escamilla, A.D.,

398 Gomez-Solano, M.I., 2006. A necrotizing hepatopancreatitis (NHP) outbreak in a

399 shrimp farm in Campeche: A first case report. Aquaculture. 255, 606-609.

400 Frelief, P.F., Sis, R.F., Bell, T.A., Lewis, D.H., 1992. Microscopic and ultrastructural

401 studies of Necrotizing Hepatopancreatitis in pacific white shrimp (*Penaeus*402 *vannamei*) cultured in Texas. Veterinary Pathology. 29, 269-277.

- 403 Jones, T.H; Hunt, R.D; King, N.W., 2000. Patologia veterinária. Manole. Barueri.  
404 1415pp.
- 405 Lightner, D. V., 1996. A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases  
406 of cultured penaeid shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.
- 407 Lightner, D.V., Redman, R.M., 1998. R.M. Shrimp diseases and current diagnostic  
408 methods. Aquaculture. 164, 201-220.
- 409 Loy, J.K., Dewhirst, F.E., Weber, W., Frelter, P.F., Templeton, J.W., 1996. Molecular  
410 phylogeny and in situ detection of the etiologic agent of necrotizing  
411 hepatopancreatitis in shrimp. Appl. Environ. Microb. 62, 3439–3445.
- 412 Mendes, P. P., Mendes, E.S., Bezerra, A. M., 2006. Análise estatística dos parâmetros  
413 aquícolas, com fins a otimização da produção. In: Reunião Anual da Sociedade  
414 Brasileira de Zootecnia, 43. João Pessoa, SBZ (Anais dos Simpósios). Suplemento  
415 especial da Revista Brasileira de Zootecnia. 35, 886-903.
- 416 Morales-Covarrubias, M.S., 2004. Enfermedades del camarón: detección mediante  
417 análisis en fresco e histopatología. (Diseases shrimp detection by means of gross  
418 analysis and histopathology). Trillas. Mexico City. 122 pp.
- 419 Morales-Covarrubias, M.S., Osuma-Duarte, A.G., Garcia-Gasca, A., Lightner, D.V.,  
420 Mota-Urbina, J.C., 2006. Prevalence of Necrotizing Hepatopancreatitis in female  
421 broodstock of white shrimp *Penaeus vannamei* with unilateral eyestalk ablation and  
422 hormone injection. Journal of Aquatic Animal Health, Bethesda, 18, 019-025.
- 423 Vincent, A., Breland, V.M., Lotz, J.M., 2004. Experimental infection of Pacific white  
424 shrimp *Litopenaeus vannamei* with Necrotizing Hepatopancreatitis (NHP)  
425 bacterium by per os exposure. Dis. Aquat. Org. 61, 227-233.

426 Vincent, A. G; Lotz, J.M., 2005. Time course of necrotizing hepatopancreatitis (NHP)  
427 in experimentally infected *Litopenaeus vannamei* and quantification of NHP-  
428 bacterium using real-time PCR. Dis. Aquat. Org. 67, 163-169.