

JOANNA DOURADO

**VIBRIOSE EM CAMARÕES MARINHOS (*Litopenaeus vannamei*, Boone
1931) CULTIVADOS NO LITORAL DE PERNAMBUCO, BRASIL.**

RECIFE

2009

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

JOANNA DOURADO

**VIBRIOSE EM CAMARÕES MARINHOS (*Litopenaeus vannamei*, Boone
1931) CULTIVADOS NO LITORAL DE PERNAMBUCO, BRASIL.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Veterinária.

Orientadora:
Profa. Dra. Emiko Shinozaki Mendes
Co-orientador:
Prof. Dr. Paulo de Paula Mendes

RECIFE

2009

Ficha catalográfica

D739v Dourado, Joanna
Vibriose em camarões marinhos (*Litopenaeus vannamei*,
Boore 1931) cultivados no litoral de Pernambuco, Brasil /
Joanna Dourado. – 2009.
47 f. : il.

Orientador: Emiko Shinozaki Mendes
Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) -
Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de
Medicina Veterinária.
Inclui referências bibliográficas.

CDD 636.089607

1. *Litopenaeus vannamei*
2. Vibriose
3. Hepatopâncreas
4. Enfermidade
5. Carcinocultura
6. Zoonose
- I. Mendes, Emiko Shinozaki
- II. Título

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**VIBRIOSE EM CAMARÕES MARINHOS (*Litopenaeus vannamei*, Boone
1931) CULTIVADOS NO LITORAL DE PERNAMBUCO, BRASIL.**

Dissertação de Mestrado elaborada por

JOANNA DOURADO

Aprovada em/...../.....

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Emiko Shinozaki Mendes
Orientadora – Departamento de Medicina Veterinária

Prof. Dr. Paulo de Paula Mendes
Co-orientador - Departamento de Pesca e Aqüicultura da UFRPE

Prof. Dr. Fernando Leandro dos Santos
Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Profa. Dra. Maria Raquel Coimbra
Departamento de Pesca e Aqüicultura da UFRPE

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais:
pessoas mais importantes de minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado à oportunidade de estar no mundo e por todos os momentos maravilhosos que tenho tido em minha vida;

À Profa. Dra. Emiko Shinozaki Mendes, pela orientação, confiança, empenho, compreensão e, acima de tudo, exigência; Ao Prof. Dr. Paulo de Paula Mendes, meu co-orientador, pela disposição e ajuda na análise estatística;

Ao Prof. Dr. Fernando Leandro dos Santos e a Profa. Dra. Maria Raquel Coimbra, por aceitarem participar da banca de defesa desta dissertação, proporcionando discussões e sugestões que servirão para crescimento, aprendizado e incentivo à pesquisa;

Aos amigos que fiz durante a realização deste trabalho, no Laboratório de Sanidade de Animais Aquáticos (LASAq), Danilo Mendes, Dulcilene Lacerda, Eduardo Oliveira, Fernanda Meireles, Lílian Góes, Rejane Luna, Verônica Arns, Virgínia Pedrosa, Vitor Gama, Héliida Melo, Paulo Pessoa e em especial, Andréa Barretto e Bruno Cerqueira, pela constante colaboração em todas as etapas desta pesquisa;

Aos estatísticos Paula Shinozaki Mendes e Roberto Manghi, pela paciência, empenho e auxílio na execução das análises estatísticas;

A Sérgio Alcântara, pelo carinho, dedicação, disponibilidade, interesse, incentivo e paciência nos meus “maus” momentos! Graças a sua presença foi mais fácil passar pelos dias de desânimo e cansaço! Essas palavras são pouco para demonstrar toda ajuda que me ofereceu!

Não podia deixar de agradecer aos meus pais Ricardo e Auxiliadora, e minhas irmãs Renata e Roberta, pelo apoio incondicional, amor e carinho que sempre me deram. Sei que estão orgulhosos de mim por ter concluído mais esta fase, e este trabalho é em parte para vocês. Especialmente quero agradecer aos meus pais pela confiança que me deram ao longo dos meus anos de vida, sei que é a vocês que devo o fato de ser aquilo que sou hoje;

A todos os meus amigos e amigas, que mesmo estando um pouco ausente, sempre estiveram me aconselhando e incentivando com carinho e dedicação;

A Roberto Citelli pela ajuda com as imagens;

Aos funcionários do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE, em especial a Dona Márcia e Cleide;

A FINEP pelo auxílio financeiro ao projeto de pesquisa, através do projeto RECARCINE e fornecimento de bolsa de estudo;

A todos que fazem a coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária pela atenção;

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução dessa pesquisa.

RESUMO: A carcinicultura mundial tem enfrentado nos últimos anos vários impactos causados por enfermidades, que contribuíram para a queda dos índices de desenvolvimento na produção de camarão marinho cultivado. Além das perdas causadas devido às enfermidades, ressalta-se que algumas espécies de vibrio são agentes zoonóticos, ou seja, podem causar doenças também em humanos. Dada a importância das bactérias do gênero *Vibrio* para a carcinicultura e saúde pública, objetivou-se avaliar camarões marinhos, associar os achados clínicos com a presença de bactérias do gênero *Vibrio* e identificar as espécies isoladas da água dos viveiros e de camarões marinhos (*Litopenaeus vannamei*) cultivados no litoral do estado de Pernambuco. As amostras foram coletadas em quatro carciniculturas do litoral e as análises laboratoriais compreenderam pesquisa e identificação de bactérias do gênero *Vibrio* no hepatopâncreas e na água dos viveiros, e identificação de alterações através do exame a fresco. Para o isolamento das espécies foi utilizado o meio de cultivo Ágar Tiosulfato Citrato Sais de Bile Sacarose (TCBS) e as colônias selecionadas foram posteriormente submetidas a provas bioquímicas. Foram analisados no total 480 camarões, destes 424 (88,33%) apresentaram um ou mais tipos de alteração. Foi identificado um total de 903 alterações, sendo a mais freqüente a da musculatura (329; 36,43%) e a menos freqüente a alteração dos túbulos do hepatopâncreas (121; 13,40%). Com relação ao ciclo de cultivo, foi observado o maior número de alterações (503; 55,7%) no período de estio. Levando-se em consideração a média de peso dos camarões verificou-se 540 (59,8%) alterações quando os mesmos estavam com peso médio de 8 g. Do total de animais analisados 314 (65,42%) apresentavam vibrio e uma ou mais alteração no exame a fresco. Foi obtido um total de 643 isolados de *Vibrio*, sendo 38 de amostras de água dos viveiros e 605 isolados de camarão. A espécie mais abundante foi *V. mediterranei* (21,31%), considerada espécie ambiental e não patogênica para o camarão, e as espécies de menor predominância foram *V. campbellii*, *V. rotiferianus*, *V. shiloni*, *V. splendidus*, *V. tapetis* e *V. wodanis* (0,16%). Foi verificada uma dependência entre as alterações encontradas no exame a fresco e a presença de vibrio, concluindo-se que o referido exame, associado à análise microbiológica é uma importante ferramenta que deve ser utilizada no monitoramento da saúde dos animais. Verificou-se também uma ampla variedade de espécies patogênicas e não patogênicas de vibrio nas amostras estudadas, que podem eventualmente estar relacionados a infecções nos camarões e nos humanos, representando um risco para a carcinicultura e para a saúde pública respectivamente.

Palavras-chave: *Litopenaeus vannamei*, vibriose, hepatopâncreas, enfermidade, carcinicultura, zoonose.

ABSTRACT: Shrimp farming all over the world has been affected in the last years by many diseases, that have contributed to the development indexes decline in the production of farmed marine shrimp. On top of the losses due to diseases, it's important to mention that some of the vibrio species are zoonotic agents, meaning they can also cause diseases in humans. Given the importance of bacteria of the genus *Vibrio* to shrimp farming and public health, the aim of this study was to evaluate marine shrimp, correlate the clinical findings with the presence of the vibrio bacteria and identify the isolated species in the water of the ponds of cultivated marine shrimp in Pernambuco. The samples were collected from four coastal farms and the laboratory analysis consisted of the research and identification of the vibrio bacteria in the hepatopancreas and in the water of the tanks, and identification of any alteration by examination of fresh samples. Thiosulphate citrate bile salt agar (TCBS) was used as the culture media and the selected colonies were later biochemically tested. Four hundred and eighty shrimps were analyzed, of those 424 (88.33%) showed to have vibrio and one or more alterations. There were identified a total of 903 alterations, the most frequent of muscle tissue (329; 36.43%) and the least frequent of the hepatopancreas tubules (121; 13.40%). When analyzing the growth cycle, it was observed the largest number of alterations (503; 55.7%) in the dry season. Taking into account the weight of the shrimps, it was observed 540 (59.8%) alterations when the average weight was 8g. Out of all the analyzed animals, 314 (65.42%) showed to have vibrio, being 38 samples from the ponds water and 605 shrimp isolated. The most abundant species was *V. mediterranei*, (21.31%), considered an environmental species non pathogenic to shrimp, and the least abundant species were *V. campbellii*, *V. rotiferanus*, *V. shiloni*, *V. splendidus*, *V. tapetis* and *V. wodanis* (0.16 %). A dependency between the alterations found on the exam and the presence of the vibrio was noticed, showing that the aforementioned exam, combined to microbiological analyzes, is an important tool that should be used when monitoring the farms. It was also noticed a great variety of pathogenic and non pathogenic species of vibrio in the studied samples. Such microorganisms could, eventually, be related to shrimp and human infections, which could represent a risk for shrimp farming and public health respectively.

Key-words: *Litopenaeus vannamei*, vibriosis, hepatopancreas, disease, shrimp farms, zoonosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão de Literatura

- Figura 1 – Vista superior do camarão *Litopenaeus vannamei* com seus principais órgãos e estruturas do cefalotórax e abdome. 16
- Figura 2 – Vista lateral do camarão *Litopenaeus vannamei* com seus principais órgãos e estruturas do cefalotórax e abdome. 16
- Figura 3 - A – Colônias de *Vibrio* spp. sacarose positiva em ágar TCBS; B – Colônias de *Vibrio* spp. sacarose negativas em ágar TCBS; C – Colônias de *Vibrio* spp. com fermentação “parcial” da sacarose em ágar TCBS. 20

Artigo Científico

- Figura 1 – Relação entre a presença/ausência de alterações observadas no exame a fresco e a presença/ausência de vibrio. 36

LISTA DE TABELAS

Revisão de Literatura

- Tabela 1 – Principais funções dos órgãos e tecidos dos camarões. 16
- Tabela 2 – Gêneros e espécies da família Vibrionaceae. 19

Artigo Científico

- Tabela 1 – Quantidade e localização das alterações verificadas no exame a fresco de camarões marinhos *Litopenaeus vannamei* cultivados em fazendas do litoral de Pernambuco. 34
- Tabela 2 - Presença de vibrio e alterações no exame a fresco de camarões marinhos *Litopenaeus vannamei* cultivados em fazendas do litoral de Pernambuco. 35
- Tabela 3 - Espécies de *Vibrio* isoladas de amostras de água e de camarões marinhos em fazendas de engorda situadas no litoral do estado de Pernambuco no período chuvoso e de estio. 37

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	14
2.1 Geral	14
2.2 Específicos	14
3. REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1 Histórico da carcinicultura	15
3.2 <i>Litopenaeus vannamei</i>	15
3.3 Carcinicultura no Nordeste brasileiro	17
3.4 Enfermidades	17
3.5 <i>Vibrio</i> sp	18
3.6 Vibriose	21
3.7 Métodos de diagnóstico	22
3.8 Zoonose	22
REFERÊNCIAS	24
ARTIGO CIENTÍFICO	29

1 – INTRODUÇÃO

A criação de camarão ou carcinicultura é um das áreas da aquicultura que mais se destaca no setor pesqueiro mundial, tanto pela inclusão social, através da viabilização de oportunidades para empreendedores, como pela geração de empregos, renda e divisas para as populações desfavorecidas do meio rural litorâneo dos países em desenvolvimento.

Os números da carcinicultura a nível mundial são bastante expressivos, pois segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), a produção cresceu de 917.273 t em 1996 para 2.733.134 t em 2005, correspondendo a um incremento médio de 13,38% ao ano e representando 45% da produção mundial de camarão. No Brasil, a partir de 1995, iniciou-se uma nova fase para a carcinicultura, motivada pela introdução do camarão marinho (*Litopenaeus vannamei*), natural do Oceano Pacífico. Embora tenha sido trazido para o Brasil no início da década de 80, somente a partir de 1995 começou a ser produzido comercialmente e as exportações atingiram o pico em 2003 com aproximadamente 245 milhões de dólares. A partir desse ano iniciou-se uma crise no setor, e dentre os vários problemas encontrados pela carcinicultura brasileira a partir de 2004, destacam-se a aplicação de sobretaxas na exportação do camarão brasileiro imposta pelos Estados Unidos, as enchentes de 2004, enfermidades e a forte desvalorização do dólar americano, os quais contribuíram com maior ou menor intensidade para as perdas do setor.

Entre as enfermidades, as de origem bacterianas e virais são as que mais afetam o camarão de cultivo. Dentre as infecções de origem bacteriana, destacam-se as vibrioses que são ocasionadas por microrganismos patogênicos e oportunistas encontrados na água e no sedimento, podendo também fazer parte da microbiota intestinal de camarões sadios. A ocorrência da doença é resultado da predisposição dos camarões a estirpes patogênicas de *Vibrio*, decorrente de um fator estressante.

Entre as principais espécies que causam maiores prejuízos estão o *Vibrio harveyi*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *Photobacterium damsela*. O impacto da vibriose é variável, mas em alguns casos pode alcançar até 70% da população cultivada.

De maneira geral, a maior parte dos diagnósticos em camarões baseia-se na evolução da doença, análises macro e microscópicas e no comportamento animal, além da microbiologia e biologia molecular.

Tendo em vista a relevância da vibriose para atividade, objetivou-se pesquisar e identificar espécies da família Vibrionaceae, em camarões marinhos *Litopenaeus vannamei* e na água dos viveiros de carciniculturas do litoral pernambucano.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Detectar vibriose e identificar as espécies de vibrio que acometem camarões marinhos (*Litopenaeus vannamei*) cultivados no litoral de Pernambuco.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar alterações, através do exame a fresco, na cutícula, musculatura, túbulos do hepatopâncreas e nas brânquias de camarões marinhos;
- Isolar e identificar espécies de vibrio em camarões marinhos cultivados em quatro fazendas de engorda do litoral pernambucano;
- Verificar a dependência entre a presença de vibrio e as alterações identificadas no exame a fresco de camarões marinhos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Histórico da carcinicultura

O cultivo de camarão teve sua origem histórica no Sudeste da Ásia em viveiros abastecidos por marés, sendo cultivado como subproduto da criação de peixes. Nos anos 30 do século passado, o pesquisador japonês Motosaku Fujinaga obteve o completo desenvolvimento larval da espécie *Marsupenaeus japonicus*, dando início a uma carcinicultura moderna (BRASIL, 2001).

Esta atividade, no entanto, só ganhou posição de destaque no cenário mundial a partir dos anos 70, quando houve uma ampla propagação das técnicas industriais de engorda de camarão. Nos anos 80, com a crescente demanda e o valor econômico em ascensão, a produção de camarões em cativeiro evoluiu rapidamente (NUNES, 2001).

No Brasil, a criação de camarão marinho em viveiros iniciou-se em 1978, com a espécie exótica *M japonicus*. A década de 80 foi marcada pelas inúmeras tentativas de adaptação de algumas espécies de camarão nos viveiros nordestinos, falta de financiamento e inexistência de tecnologias adequadas. Apenas em 1996, com o cultivo da espécie *Litopenaeus vannamei* o Brasil começou a expandir sua produção de camarão marinho (BRASIL, 2001; ROCHA, 2003).

3.2 *Litopenaeus vannamei*

O camarão da espécie *L. vannamei*, também conhecido como “camarão branco do Pacífico” é um crustáceo que pertence à ordem Decapoda e a família Penaeidae, encontrado naturalmente na costa americana do Pacífico que se estende do Peru ao México (BARBIERI JÚNIOR e OSTRENSKY NETO, 2002; MARTINS, 2003).

Estes animais possuem o corpo alongado e comprimido lateralmente, dividido em cefalotórax (cabeça) e abdome (cauda). No cefalotórax encontram-se os principais órgãos funcionais e apêndices utilizados no processo de alimentação e locomoção, sendo os do abdome adaptados para o nado (NUNES e MARTINS, 2002). As principais características anatômicas do camarão são mostradas nas Figuras 1 e 2 e as principais funções de seus órgãos e apêndices são apresentadas na Tabela 1.

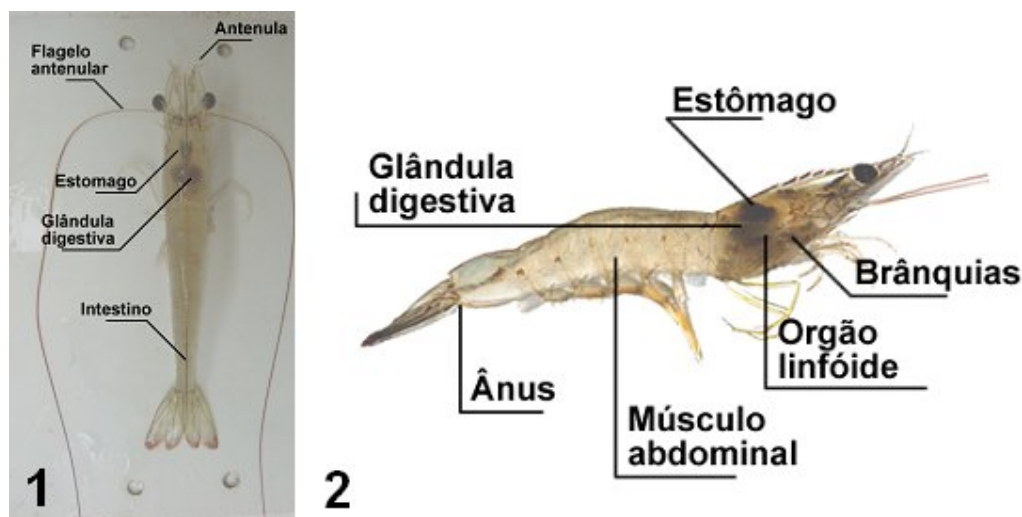


Figura 1 e 2 – Vistas superior e lateral do camarão *Litopenaeus vannamei* com seus principais órgãos e estruturas do cefalotórax e abdome. (Adaptado de: www.institutohorus.org.br / www.seajoy.com, 2009)

Tabela 1 – Principais funções dos órgãos e tecidos dos camarões

Órgão/Estrutura	Função Principal
Músculo abdominal	Movimentação rápida para trás com a finalidade de escapar de predadores
Antena	Órgão sensitivo, orientação, detecção e localização de alimentos
Glândula antenal	Excreção e balanço osmótico
Antenula	Quimiorrecepção
Exoesqueleto	Barreira protetora e estrutura de suporte
Boca, esôfago e estômago	Ingestão, mastigação e armazenamento temporário de alimento
Brânquias	Respiração, excreção, osmoregulação e fagocitose
Glândula digestiva ou hepatopâncreas	Digestão, absorção de nutrientes e armazenamento
Órgão linfóide	Possivelmente para captura de antígenos e fagocitose
Mandíbulas e maxilas	Órgãos sensitivos e desintegração do alimento
Intestino	Absorção de nutrientes e excreção
Pereiópodos e pleópodos	Locomoção, captura e manipulação de alimento

Fonte: Nunes e Martins (2002).

Devido sua importância para a aquicultura e a excelente qualidade da carne destacando-se seu sabor característico, firmeza e coloração, o *L. vannamei* tornou-se uma espécie bem conhecida e aceita no mercado internacional. Em função disso, o cultivo dessa espécie vem despertando um interesse crescente dos investidores e produtores de grande parte da América do Sul, Central e até da China. No Brasil, a introdução dessa espécie foi fundamental para o desenvolvimento da carcinicultura. Além da boa aceitação no mercado, a espécie possui grande capacidade de adaptação às mais variadas condições de cultivo, apresentando alto rendimento e elevada densidade de estocagem, em águas híper ou oligohalinas (águas com salinidade entre 0,5 e 0,6 g/L) (BARBIERI JUNIOR e OSTRENKY NETO, 2002).

3.3 Carcinicultura no Nordeste brasileiro

O cultivo do camarão marinho em cativeiro é uma das atividades do agronegócio brasileiro mais representativa na Região Nordeste (NUNES et al., 2005). De acordo com Moraes (2002) é a região brasileira em que se encontram as melhores condições para a carcinicultura devido às altas temperaturas, com variação anual em torno de 22 a 30°C, e a relativa estabilidade climática. Essas condições estão ainda aliadas a uma ampla extensão de terras às margens do litoral, boa qualidade da água e disponibilidade de mão de obra barata indicando um considerável potencial para a expansão dessa atividade.

A região Nordeste, no ano de 2003, detinha cerca de 91% dos produtores brasileiros, com uma área de 14.824 ha e uma produção de 90.100 t. Diante deste cenário, a carcinicultura assumiu o segundo lugar entre as exportações do setor primário desta região (MAEDA, 2002). No entanto, vale ressaltar que a crise setorial compreendida ente 2004 e 2007 registrou uma queda nas exportações brasileiras de 58.455 t para 15.515 t (ROCHA, 2008).

3.4 Enfermidades

De acordo com Chiu et al. (2007), a carcinicultura vem sofrendo problemas relacionados com questões ambientais, resultando em estresse para os animais e subsequente aumento da incidência de doenças, contribuindo para a queda dos índices de desenvolvimento na produção de camarão marinho cultivado (ALVES e MELLO, 2007).

A qualidade da água de cultivo do camarão deve ser considerada em todos os aspectos para garantia sanitária do produto. O principal propósito em se manejar a qualidade da água de qualquer sistema de cultivo é regular e manter ótimas condições para

o crescimento dos organismos (VILLALÓN, 1991). Segundo Fonseca e Rocha (2004), a manutenção dos níveis ideais da qualidade da água é de extrema importância para evitar o aparecimento de doenças nos animais em cultivo.

As enfermidades são um dos principais fatores limitantes na carcinicultura e têm causado prejuízos ao redor do mundo. Como ocorre em outros animais, as doenças do camarão resultam do desequilíbrio entre o organismo, o ambiente e o patógeno. Quando ocorrem mudanças bruscas no meio ambiente, o sistema de defesa do organismo fica debilitado, devido ao gasto energético extra empregado na sua adaptação às novas condições; dessa forma, ele se torna mais vulnerável ao ataque de um patógeno presente no meio (PEREIRA et al., 2004).

As altas densidades populacionais, usualmente requeridas nos cultivos, propiciam o rápido alastramento dos agentes infecciosos, resultando geralmente em mortalidades maciças e levando, por consequência, a prejuízos econômicos incalculáveis (BARRACO, 2004).

Diferentes espécies de patógenos oportunistas têm sido reportadas como causa de grandes prejuízos para carcinicultura (LIGHTNER, 1996). De acordo com Ruangpon e Kitao (1991), as bactérias do gênero *Vibrio* são incriminadas como os principais agentes causadores de infecções bacterianas em camarões.

Lightner (1993) relatou que um dos grandes problemas em cultivo de camarão é a ação patogênica de espécies do gênero *Vibrio*. Estas bactérias são comuns no ambiente marinho, podendo ainda ser encontradas no estômago, brânquias e cutícula de camarões selvagens e de cultivo.

3.5 *Vibrio* sp

Segundo Rodrick (1991), os víbrios são bactérias Gram negativas e anaeróbicas facultativas de ocorrência mundial. Morfologicamente são definidos como bacilos esporogênicos, finos ou com uma única curvatura rígida. São móveis e muitos têm um único flagelo polar quando se desenvolvem em meio líquido.

De acordo com informações divulgadas pela *Association of Vibrio Biologists* (AVIB, 2009) métodos para identificação de grupos ou espécie-específicos recentemente desenvolvidos estão proporcionando novas descobertas sobre a ecologia da Vibrionaceae em que o número de membros ainda está sendo expandido. Atualmente, o número de espécies aceitas para a família é de 105, distribuídas em oito gêneros: *Aliivibrio* (quatro espécies), *Catenococcus* (uma espécie), *Enterovibrio* (quatro espécies), *Grimontia* (uma

espécie), *Listonella* (duas espécies) *Photobacterium* (15 espécies com duas subespécies), *Salinivibrio* (cinco espécies com três subespécies) e *Vibrio* (71 espécies com duas subespécies) (Tabela 2).

Tabela 2 – Gêneros e espécies da família Vibrionaceae

GENÊROS	ESPÉCIES
<i>Aliivibrio</i>	<i>A. fischeri</i> , <i>A. logei</i> , <i>A. salmonicida</i> , <i>A. Wodanis</i>
<i>Catenococcus</i>	<i>C. thiocycli</i>
<i>Enterovibrio</i>	<i>E. calviensis</i> , <i>E. coralii</i> , <i>E. norvegicus</i> , <i>E. nigricans</i>
<i>Grimontia</i>	<i>G. hollisae</i>
<i>Listonella</i>	<i>L. anguillarum</i> , <i>L. pellagia</i>
<i>Photobacterium</i>	<i>P. angustum</i> , <i>P. ganghwense</i> , <i>P. lipolyticum</i> , <i>P. aplysiae</i> , <i>P. halotolerans</i> , <i>P. lutimaris</i> , <i>P. aquimaris</i> , <i>P. iliopiscarium</i> , <i>P. phosphoreum</i> , <i>P. damsela damsela</i> , <i>P. indicum</i> , <i>P. profundum</i> , <i>P. damsela piscicida</i> , <i>P. kishitanii</i> , <i>P. rosenbergii</i> , <i>P. frigidophilum</i> , <i>P. leiognathi</i>
<i>Salmonicida</i>	<i>S. costicola costicola</i> , <i>S. costicola alcaliphilus</i> , <i>S. costicola vallismortis</i> , <i>S. proteolyticus</i> , <i>S. siamensis</i>
<i>Vibrio</i>	<i>V. aerogenes</i> , <i>V. aestuarianus aestuarianus</i> , <i>V. aestuarianus francensis</i> , <i>V. agarivorans</i> , <i>V. albensis</i> , <i>V. alginolyticus</i> , <i>V. areninigrae</i> , <i>V. azureus</i> , <i>V. brasiliensis</i> , <i>V. breoganii</i> , <i>V. campbellii</i> , <i>V. chagasii</i> , <i>V. cholerae</i> , <i>V. cincinnatiensis</i> , <i>V. comitans</i> , <i>V. coralliilyticus</i> , <i>V. crassostreae</i> , <i>V. cyclitrophicus</i> , <i>V. diabolicus</i> , <i>V. diazotrophicus</i> , <i>V. ezurae</i> , <i>V. fluvialis</i> , <i>V. fortis</i> , <i>V. furnissii</i> , <i>V. gallicus</i> , <i>V. gazogenes</i> , <i>V. gigantis</i> , <i>V. halioticoli</i> , <i>V. harveyi</i> , <i>V. hepatarius</i> , <i>V. hispanicus</i> , <i>V. ichthyenteri</i> , <i>V. inusitatus</i> , <i>V. kanaloae</i> , <i>V. lentus</i> , <i>V. litoralis</i> , <i>V. mediterranei</i> , <i>V. metschnikovii</i> , <i>V. mimicus</i> , <i>V. mytili</i> , <i>V. natriegens</i> , <i>V. navarrensis</i> , <i>V. neonatus</i> , <i>V. neptunius</i> , <i>V. nereis</i> , <i>V. nigripulchritudo</i> , <i>V. ordalii</i> , <i>V. orientalis</i> , <i>V. pacinii</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. pectenocida</i> , <i>V. pelagius</i> , <i>V. penaeocida</i> , <i>V. pomeroyi</i> , <i>V. ponticus</i> , <i>V. porteresiae</i> , <i>V. proteolyticus</i> , <i>V. rarus</i> , <i>V. rhizosphaerae</i> , <i>V. rotiferianus</i> , <i>V. ruber</i> , <i>V. rumoiensis</i> , <i>V. scopthalmi</i> , <i>V. sinaloensis</i> , <i>V. splendidus</i> , <i>V. superstes</i> , <i>V. tapetis</i> , <i>V. tasmanienis</i> , <i>V. tubiashii</i> , <i>V. vulnificus</i> , <i>V. xuii</i>

FONTE: AVIB, 2009.

As principais espécies do gênero *Vibrio* que representam risco para o cultivo dos peneídeos são *Vibrio alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. campbellii*, *V. carchariae*, *V. damsela*, *V. harveyi*, *V. ordalii*, *V. parahameolyticus*, *V. salmonicida*, *V. splendidus* e *V. vulnificus* (RODRICK, 1991; ALVAREZ et al., 1995; LIGHTNER, 1996;).

Algumas espécies de vibrio possuem a capacidade de fermentar a sacarose quando inoculados em Ágar Tiosulfato Citrato Sais de Bile (TCBS). Tais espécies são identificadas pela coloração amarela das colônias, já as que não possuem tal capacidade, ou seja, não fermentam a sacarose são macroscopicamente identificadas pela coloração verde. Outras espécies podem apresentar as duas colorações em uma mesma colônia, fermentando “parcialmente” a sacarose. Há também espécies que podem apresentar sorovares sacarose positiva e sorovares sacarose negativa (Figura 3). É importante ressaltar que esta capacidade de fermentar ou não a sacarose não está relacionada com a patogenicidade da bactéria e, portanto, a presença de um tipo ou de outro não indica a gravidade da situação (MENDES, 2005).

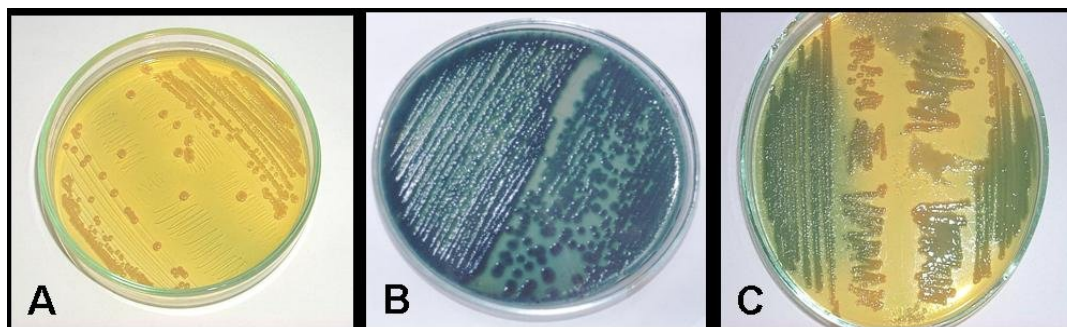


Figura 3: A – Colônias de *Vibrio* spp. sacarose positiva em ágar TCBS; B – Colônias de *Vibrio* spp. sacarose negativas em ágar TCBS; C – Colônias de *Vibrio* spp. com fermentação “parcial” da sacarose em ágar TCBS (MENDES, 2005).

Várias espécies de vibrio podem apresentar luminescência quando submetidas à luz ultravioleta, podendo ocorrer variações entre sorovares de uma mesma espécie. Semelhante ao que ocorre com a cor das colônias, não é possível determinar a patogenicidade de um vibrio para os camarões avaliando-se a presença da luminescência. Para uma identificação segura das espécies é necessário a realização de provas bioquímicas (ALVES, 2004).

3.6 Vibriose

A vibriose ou “Síndrome da Gaivota” pode acometer todos os estágios de vida do camarão, atingindo até 90% de mortalidade nas fases de pós-larvas e juvenis (NUNES e MARTINS, 2002; MORALES-COVARRUBIAS, 2008). Pode ser caracterizada como infecção localizada ou sistêmica, afetando todos os órgãos e tecidos (ROQUE et al. 2001). Quando localizada apresenta lesões melanizadas na carapaça e/ou abscessos pontuais no hepatopâncreas. Na vibriose crônica, camarões mortos ou moribundos podem sofrer canibalismo rapidamente contaminando outros indivíduos na população (NUNES e MARTINS, 2002).

Na fase inicial podem-se observar opacidade muscular e trato digestivo vazio. Com a progressão da enfermidade encontram-se camarões com expansão dos cromatóforos, inflamação do hepatopâncreas e luminescência. Nas infecções locais ou cuticulares observam-se manchas marrons ou pretas que podem ser eliminadas no momento da muda se forem superficiais, todavia, se estas forem profundas o quadro pode progredir para uma vibriose sistêmica. Os camarões podem apresentar ainda desorientação, hemolinfa turva com tempo de coagulação alterado, aglomeração nas margens do viveiro, coloração avermelhada dos apêndices, flexão do terceiro segmento abdominal, brânquias e apêndices melanizados e apatia (BARBIERI JR e OSTRENSKY NETO, 2001; GALLI et al., 2001; MORALES-COVARRUBIAS, 2008).

Ao infectarem experimentalmente camarões marinhos com *Vibrio alginolyticus* Esteve e Herrera (2000) verificaram alterações histológicas no hepatopâncreas dos animais antes da apresentação dos primeiros sinais. Os autores concluíram que a pesquisa de vibrio no hepatopâncreas pode servir de indicador da saúde do camarão.

Como relatado anteriormente problemas com vibriose ocorrem quando condições de estresse surgem no cultivo, tais como a queda de oxigênio, altas densidades de estocagem, manuseio impróprio do estoque, lesões na cutícula dos camarões, subalimentação e altas concentrações de compostos nitrogenados no ambiente de cultivo (NUNES e MARTINS, 2002).

Em alguns casos os víbrios podem não ser a causa primária da mortalidade do camarão, estando presentes, oportunisticamente. Em outros casos podem ser mais patogênicos e ser uma significativa causa de mortalidade (CHANRATCHAKOOL et al., 1995).

As medidas contra essa enfermidade são tomadas na maioria das vezes, como respostas emergenciais, levando ao uso indiscriminado dos antibióticos, dificultando a

análise e diagnóstico das doenças, o que ocasiona o desenvolvimento de bactérias resistentes (SKJERMO e VADSTEIN, 1999; HOLMSTRÖM et al. 2003; RIBEIRO, 2005).

Na aquicultura asiática uma medida profilática bastante utilizada é a aplicação de hidróxido de cálcio $[Ca(OH)_2]$ em viveiros de cultivo para combater doenças e melhorar a qualidade da água, pois o mesmo possui propriedades antimicrobianas (FAIRWEATHER, 1999; MOURIÑO et al., 2008).

De acordo com Ligther (1996), os diversos tipos de tratamento de água, a alta densidade de camarões nos viveiros e o aumento da oferta de matéria orgânica como a ração não consumida pelos animais e animais mortos, podem alterar a microbiota do cultivo, promovendo a multiplicação de microrganismos oportunistas. A avaliação da qualidade da água deve constar como medida preventiva nas carciniculturas.

Malpartida et al. (2004), citaram que para uma adequada manutenção dos viveiros de engorda de camarão, a qualidade do solo também deve ser considerada. Os teores elevados de matéria orgânica no solo podem propiciar e acentuar a proliferação de enfermidades devido às condições inadequadas em que os camarões são cultivados. Deve haver um cuidado na preparação do viveiro (desinfecção, secagem, revolvimento e calagem) objetivando a eliminação de organismos potencialmente patogênicos.

3.7 Métodos de diagnóstico

Na carcinicultura, os diagnósticos são baseados nas informações obtidas na anamnese, nos achados clínicos, no resultado da análise microbiológica, no exame histopatológico e técnicas moleculares. O exame clínico fundamenta-se na inspeção *in situ* dos animais com posterior realização de exame mais detalhado dos camarões (GAMEZ, 2001; MORALES-COVARRUBIAS, 2008).

De acordo com Morales-Covarrubias (2004), o exame clínico é utilizado para monitorar o estado de saúde dos camarões e realizar diagnósticos presuntivos no laboratório e no campo. Consiste na dissecação do camarão em todos seus estágios, para observar as alterações e patógenos presentes nos órgãos e tecidos. São coletados para realização deste exame, brânquias, hepatopâncreas, intestino, músculo e gônadas.

3.8 Zoonose

Além das perdas causadas à carcinicultura, devido às enfermidades, ressalta-se que algumas espécies de *Vibrio* são agentes zoonóticos, ou seja, podem causar doenças

também em humanos, que podem ir desde uma diarreia auto-limitante a casos de óbito por septicemia, sendo estas infecções comumente de origem alimentar, decorrentes da ingestão de alimentos contaminados ingeridos crus ou mal cozidos (RIBEIRO, 2005).

Shehane e Sizemore (2002), Nishigushi e Nair (2003) e Panicker et al. (2004) afirmaram que dentre as várias espécies pertencentes ao gênero *Vibrio*, naturais de ambientes marinhos e estuarinos, *V. cholera*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. cincinnatiensis*, *V. metschnikovii*, são as principais causadoras de gastroenterite e em alguns casos, septicemia em humanos. Outra espécie também incriminada, de acordo com Landgraf et al., (1996), é o *V. mimicus*.

Além dos distúrbios gastrointestinais, o *V. vulnificus* também pode causar infecções em feridas cutâneas em pacientes imunologicamente comprometidos (SHEHANE e SIZEMORE, 2002; PARVATHI et al., 2004). Tison (1999) afirmou que o *V. alginolyticus* também é frequentemente associado a ferimentos na pele quando expostas ao ambiente marinho.

Huss (2003) afirmou que embora muitos autores refiram-se aos microrganismos do gênero *Vibrio* como patogênicos, nem sempre são, pois para grande parte das espécies ambientais faltam os fatores de colonização necessários para sua aderência e penetração, para produzir toxinas, além de outros determinantes necessários para causar a doença.

REFERÊNCIAS

ALVAREZ, J. D.; AUSTIN, B.; ALVAREZ, A. M.; REYES, H. **Aislamiento de *Vibrio harveyi* a partir de paguaras (*Chaetodipterus faber*) bajo cultivo en la costa oriental de Venezuela.** 1995. Disponível em: <<http://www.ceniap.gov.ve/publica/divulga/fd61/vibrio.html>. Acesso em: 25/01/2009>.

ALVES, C.A.B. **Concentração mínima inibitória da enrofloxacina e da oxitetraciclina sobre víbrios isolados em larvicultura de camarão: teste “in vitro”.** 2004. Relatório do estágio supervisionado obrigatório do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife.

ALVES, C. S.; MELLO, G. L. **Manual para o monitoramento hidrobiológico em fazendas de cultivo de camarão.** Federação de Agricultura do Estado de Pernambuco – FAEPE, Comissão estadual da carcinicultura – COMCARCI, Serviço de apoio às micros e pequenas empresas em Pernambuco – SEBRAE/PE. Recife, 2007.

AVIB – Association of Vibrio biologists. 2009. Disponível em: <www.vibriobiology.net> Acesso em: 25/01/2009.

BARBIERI JUNIOR, R. C.; OSTRENSKY NETO, A. **Camarões marinhos - maturação, reprodução e larvicultura.** Viçosa – Minas Gerais: Aprenda Fácil Editora. v.1, 233p. 2001.

BARBIERI JUNIOR, R. C.; OSTRENSKY NETO, A. **Camarões marinhos - engorda.** Viçosa – Minas Gerais: Aprenda Fácil Editora. v. II, 2002.

BARRACO, M. A. M. Mecanismos de resistência a doenças em crustáceos. **Sanidade de organismos aquáticos.** São Paulo: Livraria Varela, p. 51-74, 2004.

BRASIL. Departamento de Pesca e Aquicultura. **Plataforma tecnológica do camarão marinho cultivado: segmento de mercado**. Brasília: MAPA/SARC/DPA.CNPq/ABCC, 2001.

CHANRATCHAKOOL, P.; TURNBULL, J.F.; FUNGE-SMITH, S.; LIMSUWAN, C. **Health management in shrimp ponds**. Aquatic Animal Health Research Institute Department of Fisheries. Kasetsart University Campus. Bangkok, 1995.

CHIU, C.; GUU, Y.; LIU, C.; PAN, T.; CHENG, W. Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 23, p. 364 – 377, 2007.

ESTEVE, M.; HERRERA, F.C. Hepatopancreatic alterations in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) (Crustácea: Decapoda: Penaeidae) experimentally infected with a *Vibrio alginolyticus* strain. **Journal of Invertebrates Pathology**. v. 76, p.1-5, 2000.

FAIRWEATHER, D.J. Development of a bath challenge system to study component causes, and preventive treatments, of epizootic ulcerative syndrome (eus) in snakehead fish (*Channa striata*). 1999. 88p. Dissertação de Mestrado. Universidade de Plymouth.

FONSECA, C.; ROCHA, I.P. Cartilha de boas práticas de manejo na fazenda para prevenir e controlar enfermidades do camarão *Litopenaeus vannamei* no Brasil. 2004. Disponível em: <<http://www.abccam.com.br/Cartilha%20IMNV.pdf>> . Acesso em 25 jan. 2009. 62p.

GALLI, L. et al. **I Curso básico de bacteriologia**. 2001. 42p.

HOLMSTRÖM, K.; GRASLUND, S.; WAHLSTROM, A.; POUNGSHOMPOO, S.; BENGTSOON, B.E.; KAUTSKY, N. Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health. **International Journal of Food Science and Technology**. v. 38, p. 255 – 266, 2003.

HUSS, H.H. Garantia da qualidade dos produtos da pesca. **FAO. Documento técnico sobre as pescas**. Roma, 1-176. 2003.

LANDGRAF, M.; LEME, K. B. P.; GARCIA-MORENO, M. L. Occurrence of emerging pathogenic *Vibrio spp* in seafood consumed in São Paulo city, Brazil. **Revista de Microbiologia**. v.27, p.126-130, 1996.

LIGHTNER, D. V. Diseases of cultured penaeid shrimp. In: J.P. McVey. **CRC Handbook of mariculture**. Crustacean aquaculture. Baton Rouge: CRC Press, v.1; p.393-486. 1993.

LIGHTNER, D.V. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. **World aquaculture society**. Baton Rouge: Louisiana. 1996. 304p.

MAEDA, M. Microbial communities and their use in aquaculture. Microbial approaches to aquatic nutrition within environmentally sound a aquaculture production systems. **World Aquaculture Society**. Ceng-Shenglee: Pat O” Bryen. 2002. 187p.

MALPARTIDA, J.; VINATEA, L.; SEIFFERT, W.; BELTRAME, E. Qualidade do solo pode prevenir enfermidades. **Revista Panorama da Aqüicultura**. v. 14, p. 53-56, 2004.

MARTINS, P. C.C. Influência das condições ambientais e das técnicas do manejo de produção sobre a ocorrência de enfermidades no cultivo de camarão marinho *Litopenaeus vannamei*, no Estado do Ceará. 2003. 117 p. Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais. Universidade Federal de São Carlos. São Paulo.

MENDES, E. S.; MENDES, P.P.; GÓES, L.M.N.B.; BEZERRA, S.S.; VIEIRA, K.P.B.A. Os víbrios na carcinicultura. **Revista Panorama da Aqüicultura**. v.91. p.26 – 29. 2005.

MORALES-COVARRUBIAS, M.S. Métodos de diagnóstico. In: MORALES-COVARRUBIAS, M.S. **Enfermedades del camarón: detección mediante análisis en fresco e histopatología**. México: Trillas, 2004. p. 23 – 34.

MORALES-COVARRUBIAS, M.S. Enfermidades bacterianas. In: MORALES, V.; CUÉLLAR-ANJEL, J. (eds.) **Guia Técnica - Patología e inmunología de camarones penaeidos**. Panamá: Rep. de Panamá . 2008. p. 117 – 134.

MOURIÑO, J.L.P.; BUGLIONE NETO, C.C; VIEIRA, F.N; RAMIREZ, C.; SEIFFERT, W.Q.; MARTINS, M.L.; PEDROTTI, F.S.; SCHVEITZER, R. Uso de hidróxido de cálcio no controle de vibrionáceas em viveiros de cultivo do camarão *Litopenaeus vannamei* em Santa Catarina. **Boletim do Instituto de Pesca**. v. 34, n. 1, p. 159 – 162, 2008.

NUNES, A.J.P. O cultivo do camarão *Litopenaeus vannamei* em águas oligohalinas. **Revista Panorama da Aqüicultura**. v. 66, p. 17 – 23, 2001.

NUNES, A. J. P.; MARTINS, P. C. Avaliando o estado de saúde de camarões marinhos na engorda. **Revista Panorama da Aqüicultura**. v. 72, p. 23 – 33, 2002.

NUNES, A.J.P; GESTEIRA, T.C.V; OLIVEIRA, G.G; LIMA, R.C.; MIRANDA, P.T.C.; MADRID, R.M. Princípios para boas práticas de manejo (BPF) na engorda de camarão marinho no Estado do Ceará. Instituto de Ciências do Mar (Labomar/UFC). Programa de Zoneamento Ecológico Exclusivo (ZEE) do Estado do Ceará, Fortaleza. Ceará. 109p. 2005.

PANICKER, G.; CALL, D. R.; KRUG, M. J.; BEJ, A. K. Detection of pathogenic species in shellfish by using multiplex PCR and DNA microarray. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 70, p. 7436 - 7444, 2004.

PARVATHI, A.; KUMAR, H. S.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. Detection and enumeration of *Vibrio vulnificus* in oysters from two estuaries along the southwest coast of India, using molecular methods. **Applied and Environmental Microbiology**. v.70, p.6909-6913, 2004.

PEREIRA, A. M. L.; LEGAT, A. P.; LEGAT, J. F. A.; CASTRO, P. F. Biossegurança em fazendas de camarão. Revista da ABCC, ano 6, n.1, 2004.

RIBEIRO, C. M. F. Aspectos gerais da vibrose em camarão marinho. Recife: Faculdade Frassinetti do Recife – FAFIRE, 2005. 40p. Especialização em Microbiologia. Aspectos gerais da vibrose em camarão marinho. Faculdade Frassinetti do Recife - FAFIRE2005. 40

f. Pós- graduação Especialização em Microbiologia - Faculdade Frassinetti do Recife- FAFIRE, Recife- PE.

ROCHA, I.P. Desempenho da carcinicultura brasileira em 2007: desafios e oportunidades para 2008. Revista da ABCC. p. 20 – 23, Março 2008.

RODRICK, G. E. **Microbiology of marine food products**. New York: AVI Book, 1991. 285p.

ROQUE, A.; MOLINA-AJA, A.; BOLÁN-MEJÍA, C.; GOMES-GIL, B. In vitro susceptibility to 15 antibiotics of vibrios isolated from penaeid shrimps in Northwestern México. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 17. p. 383 - 387. 2001.

RUANGPON, L.; KITAO, T. *Vibrio* bacteria isolated from black tiger shrimp, *Penaeus vannamei* Fabricius. **Journal of Fish Diseases**. v.14, p.383 – 388, 1991.

SHEHANE, D. S.; SIZEMORE, R. K. Isolation and preliminary characterization of bacteriocins produced by *Vibrio vulnificus*. **Journal of Applied Microbiology**. v.92, p. 322 -328, 2002.

SKJERMO, J. e VADSTEIN, O. Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. **Aquaculture**. V. 177, p. 333-343, 1999.

TISON, D.L. *Vibrio*. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER; M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R. H. (eds.) **Manual of Clinical Microbiology**. 7th. Edition. 1999. p. 497-506.

VILLALÓN, J. R. **Practical manual for semi-intensive commercial production of marine shrimp**. NOAA/ ESDC: USA. 1991. 89p.

ARTIGO

“Associação entre a presença de vibrio e alterações observadas no exame a fresco de camarões marinhos cultivados no litoral de Pernambuco”

Manuscrito a ser submetido à:
Journal of Invertebrate Pathology
ISSN: 0022-2011
Imprint: ACADEMIC PRESS

“Associação entre a presença de vibrio e alterações observadas no exame a fresco de camarões marinhos cultivados no litoral de Pernambuco”

Joanna Dourado¹, Andréa Christianne Gomes Barretto¹, Bruno Cerqueira do Nascimento²,
Paula T. Shinozaki Mendes³, Roberto F. Manghi³, Emiko Shinozaki Mendes⁴

¹Pós-graduandos do Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da UFRPE, ² Médico veterinário, ³ Acadêmico do curso de Estatística da UFPE, ⁴Professora adjunto da UFRPE.

Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)/Departamento de Medicina Veterinária (DMV) - Laboratório de Sanidade de Animais Aquáticos (LASAQ), R. Dom Manoel de Medeiros, s/n - Dois Irmãos 52171-900 - Recife/PE - Brasil. (joannadourado@hotmail.com)

RESUMO

Diante da crescente demanda por conhecimentos sobre os problemas que a carcinicultura vem enfrentando nos últimos anos, e dada a importância dos vibrios para esta atividade e para a saúde pública, objetivou-se avaliar camarões marinhos cultivados no litoral pernambucano e associar os achados clínicos com a presença de bactérias da família Vibrionaceae. As amostras foram coletadas em quatro fazendas de engorda e as análises laboratoriais compreenderam identificação de alterações através do exame a fresco e pesquisa e identificação de vibrio no hepatopâncreas e na água do cultivo. Para o isolamento foi utilizado o meio de cultivo Ágar Tiossulfato Citrato Sais de Bile Sacarose (TCBS) e as colônias selecionadas, posteriormente, foram submetidas a provas bioquímicas. Foram analisados 480 camarões, dos quais 314 (65,42%) apresentavam vibrio e uma ou mais alterações. Verificou-se que as alterações observadas no exame a fresco são dependentes da presença do vibrio. Das espécies identificadas, a de maior predominância foi o *V. mediterranei* (21,31%). Pode-se concluir que o exame a fresco, associado à análise microbiológica, é uma importante ferramenta que pode ser utilizada no monitoramento da saúde dos camarões cultivados, e que existe uma ampla variedade de espécies patogênicas e não patogênicas de vibrio tanto na água de cultivo e quanto nos camarões, representando um risco para a carcinicultura e para a saúde pública, respectivamente.

Palavras-chave: *Litopenaeus vannamei*, vibriose, hepatopâncreas, enfermidade, carcinicultura, zoonose

ABSTRACT

The objective was to evaluate cultivated sea shrimp (*Litopenaeus vannamei*) on the coastal waters of Pernambuco and link the findings with the presence of the bacteria *Vibrio*. The samples were collected from 4 shrimp farms on the coastal waters of Pernambuco and analysed in the laboratory for vibrio in the hepatopancreas and identification of any alteration by the examination of fresh samples. Four hundred and eighty shrimp samples were examined and of these 314 (65.42%) had vibrio and one or more alterations. It was concluded that microbiological analysis is an important tool which must be used in monitoring the shrimp farms on the coastal waters of Pernambuco.

Key-words: *Litopenaeus vannamei*, vibriosis, hepatopancreas, disease, shrim farms, zoonosis

INTRODUÇÃO

O cultivo de camarão marinho em cativeiro é uma das atividades do agronegócio brasileiro mais representativa na região Nordeste (NUNES et al., 2005). Porém, como relatado Chiu et al. (2007), a carcinicultura vem sofrendo nas últimas duas décadas problemas relacionados com a degradação dos viveiros devido a intensificação da atividade, resultando no aumento da incidência de enfermidades induzidas pelo estresse.

As bactérias do gênero *Vibrio* fazem parte da microbiota normal dos peneídeos. (AGUIRRE-GUZMÁN et al., 2001), no entanto são incriminadas como os principais agentes causadores de infecções bacterianas em camarões (RUANGPON & KITAO, 1991). De acordo com Gámez et al. (2004), as espécies desse gênero podem provocar mortalidade em até 100% dos animais após 24 horas do aparecimento da infecção. Roque et al. (2001) afirmam que a vibriose pode ser caracterizada como infecção localizada ou sistêmica, afetando todos os órgãos e tecidos.

Na carcinicultura, os diagnósticos são baseados nas informações obtidas na anamnese, nos achados clínicos, no resultado da análise microbiológica, no exame histopatológico e técnicas moleculares. O exame clínico fundamenta-se na inspeção *in situ* dos animais com posterior realização de exame mais detalhado dos camarões (GAMEZ, 2001; MORALES-COVARRUBIAS, 2008).

Além das perdas causadas à carcinicultura, devido às enfermidades, ressalta-se que algumas espécies de *vibrio* são agentes zoonóticos, ou seja, podem causar doenças também em humanos (RIBEIRO, 2005). Panicker et al. (2004) afirmaram que dentre as várias espécies pertencentes ao gênero *Vibrio*, naturais de ambientes marinhos e estuarinos, o *V. vulnificus*, o *V. parahaemolyticus* e o *V. cholerae* são as principais causadoras de gastroenterite e em alguns casos, septicemia em humanos.

Diante da crescente demanda por conhecimentos sobre os problemas que a carcinicultura vem enfrentando nos últimos anos, e dada a importância dos *vibrios* para esta atividade e para a saúde pública, objetivou-se avaliar camarões marinhos cultivados no litoral pernambucano e associar os achados clínicos com a presença de bactérias da família Vibrionaceae.

MATERIAL E MÉTODOS

As coletas de água e camarão foram realizadas no período de maio a dezembro de 2008 em quatro fazendas de engorda (A, B, C e D) situadas no litoral do estado de Pernambuco. Foi escolhido aleatoriamente um viveiro em cada propriedade para o acompanhamento de dois ciclos de produções seguidos, sendo um no período de estio e outro

no período chuvoso. Em cada ciclo foram realizadas duas coletas por fazenda, quando os animais apresentavam média de peso igual a 4 e 8 g, totalizando 16 coletas. De cada amostra foi selecionado aleatoriamente 30 camarões obtendo-se um total de 480 animais.

As amostras de água foram envasadas em recipientes estéreis e acondicionadas em caixas isotérmicas e os camarões foram transportados vivos em sacos plásticos apropriados contendo água do viveiro sob aeração constante. As análises foram realizadas no Laboratório de Sanidade de Animais Aquáticos (LASAq) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

Os animais foram pesados e em seguida realizou-se o exame a fresco, de acordo com o método citado por Morales-Covarrubias (2004). Foram pesquisadas alterações na cutícula, na musculatura, nos túbulos do hepatopâncreas e nas brânquias concomitantemente a pesquisa de vibrio no hepatopâncreas.

Os vibrios foram isolados a partir de amostras de água e de hepatopâncreas, utilizando-se a metodologia de plequeamento em superfície descrita por Silva et al. (2000) em meio de cultivo Ágar Tiosulfato Citrato Sais de Bile Sacarose (TCBS), sendo as placas de Petri incubadas a 35-37°C por 18-24 horas. As colônias características foram selecionadas e estocadas em Tryptone Soya Agar (TSA) suplementado com 2,0% de cloreto de sódio (NaCl). A seguir, realizou-se o estudo do perfil bioquímico através das provas de crescimento a 0, 1, 3, 6, 8 e 10% de NaCl, oxidase, vermelho de metila, Voges Proskauer, arginina dihidrolase, lisina descarboxilase, ornitina descarboxilase, urease, gelatinase, produção de ácido a partir de sacarose, celobiose, lactose, arabinose, manose e manitol, conforme a orientação de Holt et al. (1994), Buller (2004) e FDA (2004).

Para verificar a independência entre a presença de vibrio e a presença de alterações no exame a fresco dos camarões foi feita uma análise descritiva dos dados, bem como o teste de Qui-quadrado, com nível de significância $\alpha = 0,05$ e o ajuste de um modelo linear generalizado (apresentado abaixo), utilizando-se o software SPSS e o R (ZAR, 1999; CORDEIRO, 2004).

$$\log\left(\frac{P(y=1)}{1-P(y=1)}\right) = X\beta$$

onde: y – variável de interesse; X – conjunto de variáveis explicativas; β – conjunto de parâmetros.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi analisado um total de 480 camarões, cujo resultado está apresentado nas Tabelas 1, 2 e 3. Do total de animais analisados, 424 (88,33%) apresentaram um ou mais tipos de alterações observadas no exame a fresco. Foi identificado um total de 903 alterações, sendo a mais freqüente a da musculatura (329; 36,43%) e a menos freqüente a alteração dos túbulos do hepatopâncreas (121; 13,40%). De acordo com Mendes (2007), alterações no hepatopâncreas podem estar relacionadas ao manejo nutricional e a presença de patógenos. Esteve e Herrera (2000) afirmaram que a análise do hepatopâncreas pode ser utilizada no monitoramento da saúde dos camarões, pois alterações histológicas deste órgão podem ser detectadas antes do aparecimento dos primeiros sinais da vibriose.

Com relação ao ciclo de cultivo, foi observado o maior número de alterações (503; 55,7%) no período de estio. Levando-se em consideração a média de peso dos camarões, verificou-se 540 (59,8%) alterações quando os mesmos estavam com peso médio de 8 g, ficando confirmada a suposição de que a sustentabilidade dos animais aos patógenos aumenta com o aumento do tempo de cultivo.

Entre as fazendas analisadas, o melhor resultado do exame a fresco (menor número de alterações) foi observado nos animais da fazenda C, no período de estio, quando os camarões apresentavam média de peso igual a 4 g (17; 1,88%). Quando os camarões apresentavam peso médio de 8 g, nesta mesma fazenda e no mesmo ciclo de cultivo, foram identificadas 91 alterações (10,08%), caracterizando o pior resultado do exame a fresco.

A relação das alterações com a presença de vibrio nos órgãos do camarão é apresentada na Tabela 2. Das quatro fazendas estudadas verificou-se o maior número de camarões com uma ou mais alterações, associado com a presença de vibrio, nas fazendas A (27; 5,63%) e C (29; 6,04%) no período chuvoso e de estio respectivamente, quando os animais apresentavam peso médio igual a 8 g.

Gomez-Gil et al. (1998) sugeriram que pode existir uma variedade de espécies de vibrio no hepatopâncreas de camarões (*Penaeus vannamei*) aparentemente saudáveis, incluindo espécies patogênicas como *V. alginolyticus*, *V. damsela*. Entretanto, Hopkin e Nott (1980) já haviam relatado que não é comum a presença de bactérias no hepatopâncreas, pois tais microrganismos não conseguem ultrapassar a barreira gástrica.

Tabela 1. Quantidade e localização das alterações verificadas no exame a fresco de camarões marinhos *Litopenaeus vannamei* cultivados em fazendas do litoral de Pernambuco.

Alteração		CUT		MUSC		TUB		BRANQ		Total		
		VA	VR	VA	VR	VA	VR	VA	VR	VA	VR	
Fazenda A	PC	4 g	10	1,11	17	1,88	12	1,33	23	2,55	62	6,87
		8 g	11	1,22	23	2,55	4	0,44	22	2,44	60	6,64
	PE	4 g	12	1,33	29	3,21	9	1,00	9	1,00	59	6,53
		8 g	21	2,33	28	3,10	18	1,99	22	2,44	89	9,86
Fazenda B	PC	4 g	0	0,00	8	0,89	9	1,00	9	1,00	26	2,88
		8 g	6	0,66	14	1,55	8	0,89	16	1,77	44	4,87
	PE	4 g	21	2,33	26	2,88	12	1,33	14	1,55	73	8,08
		8 g	21	2,33	21	2,33	6	0,66	8	0,89	56	6,20
Fazenda C	PC	4 g	1	0,11	3	0,33	7	0,78	18	1,99	29	3,21
		8 g	23	2,55	29	3,21	3	0,33	20	2,21	75	8,31
	PE	4 g	3	0,33	8	0,89	0	0,00	6	0,66	17	1,88
		8 g	21	2,33	26	2,88	18	1,99	26	2,88	91	10,08
Fazenda D	PC	4 g	2	0,22	21	2,33	3	0,33	18	1,99	44	4,87
		8 g	19	2,10	26	2,88	0	0,00	15	1,66	60	6,64
	PE	4 g	13	1,44	25	2,77	3	0,33	12	1,33	53	5,87
		8 g	18	1,99	25	2,77	9	1,00	13	1,44	65	7,20
Total		202	22,37	329	36,43	121	13,40	251	27,80	903	100	

CUT = cutícula; MUSC = musculatura; TUB = túbulos do hepatopâncreas; BRANQ = brânquias; PE = período de estio; PC = período chuvoso; VA = valor absoluto; VR = valor relativo (%).

Tabela 2. Presença de vibrio e alterações no exame a fresco de camarões marinhos *Litopenaeus vannamei* cultivados em fazendas do litoral de Pernambuco.

		Presença de <i>Vibrio</i>				Ausência de <i>Vibrio</i>				Total		
		Período chuvoso		Período de estio		Período chuvoso		Período de estio		VA	VR	
		VA	VR	VA	VR	VA	VR	VA	VR			
Fazenda A	Com alteração	4 g	24	5,00	18	3,75	9	1,88	6	1,25	57	11,88
		8 g	27	5,63	28	5,83	1	0,21	2	0,42	58	12,08
	Sem alteração	4 g	2	0,42	0	0	0	0	1	0,21	3	0,63
		8 g	2	0,42	0	0	0	0	0	0	2	0,42
Fazenda B	Com alteração	4 g	11	2,29	16	3,33	9	1,88	14	2,92	50	10,42
		8 g	24	5,00	21	4,38	1	0,21	6	1,25	52	10,83
	Sem alteração	4 g	6	1,25	0	0	4	0,83	0	0	10	2,08
		8 g	4	0,83	3	0,63	1	0,21	0	0	8	1,67
Fazenda C	Com alteração	4 g	15	3,13	4	0,83	8	1,67	9	1,88	36	7,50
		8 g	14	2,92	29	6,04	15	3,13	1	0,21	59	12,29
	Sem alteração	4 g	5	1,04	5	1,04	3	0,63	11	2,29	24	5,00
		8 g	0	0	0	0	0	0	1	0,21	1	0,21
Fazenda D	Com alteração	4 g	16	3,33	19	3,96	13	2,71	7	1,46	55	11,46
		8 g	26	5,42	22	4,58	2	0,42	7	1,46	57	11,88
	Sem alteração	4 g	1	0,21	2	0,42	2	0,42	0	0	5	1,04
		8 g	2	0,42	1	0,21	0	0	0	0	3	0,63
Total			179	37,29	168	35,00	68	14,17	65	13,54	480	100

VA = valor absoluto; VR = valor relativo (%).

Ao se verificar a independência entre as variáveis através do teste Qui-quadrado, obteve-se o valor $p = 0,017$, o que levou a rejeição da hipótese de que as variáveis são independentes, ou seja, existe uma relação entre as presenças de vibrio e alteração verificadas no exame a fresco. Ao selecionar as variáveis para o modelo através do teste de Wald, obteve-se o modelo abaixo descrito, no qual se verifica que a probabilidade de se observar alterações

no exame a fresco e a presença de vibrio nos camarões é estimada em 74%, nas condições do presente estudo.

$$\hat{P}(\text{vibrio} = 1) = \frac{e^{1,0489\text{lesoes}}}{1 + e^{1,0489\text{lesoes}}}$$

Verificou-se que, do total de 480 animais analisados, 314 (65,42%) apresentavam vibrio e uma ou mais alterações. Também se observou que 33 animais (6,88%) apresentavam o vibrio, mas não possuíam alterações (Figura 1).

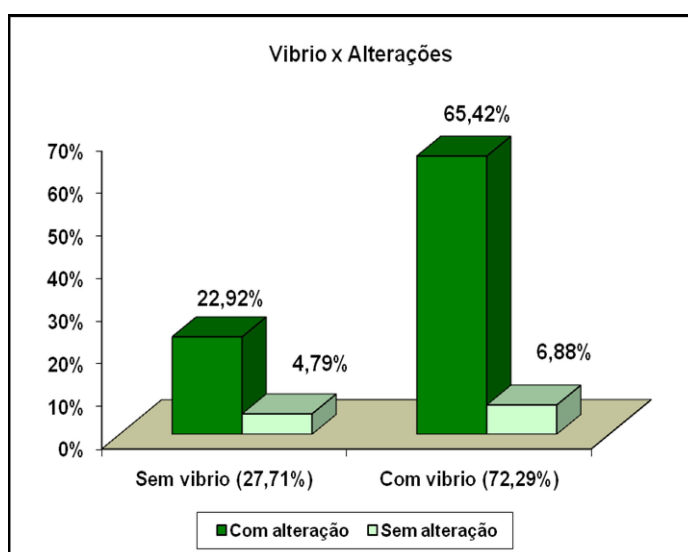


Figura 1 – Relação entre a presença/ausência de alterações observadas no exame a fresco e a presença/ausência de vibrio

A vibriose aparece na maioria dos casos como um problema secundário (CHANRATCHAKOOL et al., 1995; GALLI et al., 2001). Fatores ambientais, como por exemplo, o oxigênio dissolvido e salinidade da água, e de manejo, como a densidade populacional e quantidade disponível de alimento ofertado, que possam levar a uma situação de estresse e queda da imunidade dos camarões podem favorecer a infecção pelo vibrio, ocasionando expressiva mortalidade dos animais, levando a grandes perdas econômicas. (NUNES e MARTINS, 2002; BARRACO, 2004; GALLI et al. 2001).

As espécies isoladas das amostras de água do viveiro e de camarões marinhos *Litopenaeus vannamei*, estão discriminadas na Tabela 3.

Foi obtido um total de 643 isolados de vibrio, sendo 38 de amostras de água dos viveiros e 605 isolados de camarão. A espécie mais abundante foi o *V. mediterranei* (21,46%), considerada espécie ambiental e não patogênica para o camarão. Em estudos realizados em Kerala, Índia (MANJUSHA et al., 2005) e no Ceará, Brasil (COSTA et al., 2008) as espécies mais isoladas foram *V. anguillarum* e *V. cholerae*, respectivamente, ambas espécies citadas na literatura como patogênicas (JAYASREE et al. 2006). As espécies de menor predominância foram *V. campbellii*, *V. rotiferianus*, *V. shiloni*, *V. splendidus*, *V. tapetis* e *V. wodanis* (0,16%), de acordo com os resultados obtidos por Costa et al. (2008), que ao pesquisarem a diversidade de *Vibrio* também verificaram o *V. splendidus* como uma das espécies de menor abundância. Baffone et al. (2000), Hosseini et al. (2004) e Parisi et al. (2004) relataram que o *V. alginolyticus* tem sido descrito como sendo a espécie mais isolada de crustáceos.

Dentre as espécies consideradas patogênicas para os camarões, de acordo com Rodrick (1991), Alvarez et al. (1995), Lightner (1996) e Jayasree et al. (2006), foram isoladas *V. alginolyticus* (5,44%), *V. campbellii* (0,16%), *V. harveyi* (4,20%), *V. ordali* (1,56%), *V. parahaemolyticus* (2,49%), *V. salmonicida* (0,78%), *V. splendidus* (0,16%) e *V. vulnificus* (7,15%). Longyant et al. (2008) ao verificarem através da imuno-histoquímica as estirpes de vibrio de camarões *P. vannamei* acometidos pela vibriose, citaram que o *V. vulnificus* e o *V. parahaemolyticus* foram as espécies mais incriminadas nas infecções do hepatopâncreas dos animais. Os *V. harveyi* e *V. parahaemolyticus* foram identificados como as principais espécies encontradas no hepatopâncreas de *Penaeus monodon*, antes de ocorrer mortalidade em massa (SUNG et al., 2001).

Verificou-se uma maior variedade de espécies nas amostras de água no período chuvoso (58,33%), período em que se verifica menor temperatura da água e menor salinidade devido às chuvas. O contrário foi observado por de Barbieri et al. (1999) e Pfeffer et al. (2003), que encontraram uma correlação positiva entre a temperatura da água e a diversidade de espécies de *Vibrio*, ou seja, quanto maior é a temperatura da água maior é a diversidade de vibrios. Acredita-se que o resultado obtido no presente estudo seja devido a uma pequena variação na temperatura da água dos viveiros analisados, pois os referidos autores relatam variações de temperatura de 20°C.

Diversas espécies de vibrio são consideradas patogênicas para o homem. De acordo com Shehane & Sizemore (2002) e Nishigushi & Nair (2003), o *V. cholera*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. cincinnatiensis*, *V. metschnikovii* e *V. mimicus* podem causar doenças entéricas. Dentre estas espécies citadas

anteriormente, a única que não foi isolada nas amostras coletadas na presente pesquisa foi o *V. cholerae*. Segundo Noriega-Orozco et al. (2007) a presença de espécies patogênicas de vibrio em camarões pode significar um risco a saúde dos consumidores, especialmente nas regiões onde os mesmos são consumidos crus. Isolados de *V. parahaemolyticus* são responsáveis por gastroenterites usualmente associadas ao consumo de pescados crus ou mal cozidos. Na América do Norte as ostras são comumente a principal fonte de infecção (DePaola et al., 2003).

CONCLUSÕES

Diante da dependência entre as lesões constatadas no exame a fresco e a presença de vibrio, conclui-se que o referido exame, associado à análise microbiológica, é uma importante ferramenta que pode ser utilizada no monitoramento da saúde dos camarões cultivados.

Existe uma ampla variedade de espécies patogênicas e não patogênicas de vibrio tanto na água de cultivo e nos camarões marinhos (*Litopenaeus vannamei*), que podem eventualmente estar relacionadas a infecções nos camarões e no humano, representando um risco para a carcinicultura e para a saúde pública, respectivamente.

REFERÊNCIAS

Alvarez, J. D.; Austin, B.; Alvarez, A. M.; Reyes, H. **Aislamiento de *Vibrio harveyi* a partir de paguaras (*Chaetodipterus faber*) bajo cultivo en la costa oriental de Venezuela.** 1995. Disponível em: <<http://www.ceniap.gov.ve/publica/divulga/fd61/vibrio.html>. Acesso em: 25/01/2009>.

Aguirre-guzmán, G.; Vazquez-Juarez, R.; Ascencio, F. Differences in the susceptibility of american white shrimp larval substages (*Litopenaeus vannamei*) to four *Vibrio* species. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.78, n.4, p.215-219, 2001.

Baffone, W; Pianetti, A; Bruscolini, F; Barbieri, E; Citterio, B. Occurrence and expression of virulence-related properties of *Vibrio* species isolated from widely consumed seafood products. **International Journal of Food Microbiology**, v.54, p.9-18, 2000.

Barbieri, E; Falzano, L; Fiorentini, C; Pianetti, A; Matarrese, P; Casiere, A; Katouli, M; Kühn, I; Möllby, R; Bruscolini, F; Donelli, G. Occurrence, diversity, and pathogenicity of halophilic *Vibrio* spp. and non-O1 *Vibrio cholerae* from estuarine waters along the Italian Adriatic Coast. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.2748–2753,1999.

Barraco, M. A. M. Mecanismos de resistência a doenças em crustáceos. **Sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo: Varela, p. 51-74, 2004.

Buller, N. B. **Bacteria from fish and other aquatic animals: a practical identification manual**. CABI Publishing:Cambridge. 361p. 2004.

Chanratchakool, P.; Turnbull, J.F.; Funge-Smith, S.; Limsuwan, C. **Health management in shrimp ponds**. Aquatic Animal Health Research Institute Department of Fisheries. Kasetsart University Campus. Bangkok, 1995.

Chiu, C.; Guu, Y.; Liu, C.; Pan, T.; Cheng, W. Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. **Fish & Shellfish Immunology**, v.23, p.364 – 377, 2007.

Cordeiro, G.M.; Lima Neto, E.A. **Modelos paramétricos**. Recife: FINEP, 2004. 246 p.

Costa, R.A.; Vieira, G.H.F.; Silva, G.C.; Vieira, R.H.S.F.; Sampaio, S.S. Susceptibilidade “in vitro” a antimicrobianos de estirpes de *Vibrio* spp isoladas de camarões (*Litopenaeus vannamei*) e de água de criação destes animais provenientes de uma fazenda de camarões no Ceará – Nota prévia. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.45, n.6, p.458-462, 2008.

Depaola, A.; Nordstrom, J.L.; Bowers, J.C.; Wells, J.G.; Cook, D.W. Seasonal abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Alabama oysters. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.1521–1526, 2003.

Esteve, M.; Herrera, F.C. Hepatopancreatic alterations in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) (Crustácea: Decapoda: Penaeidae) experimentally infected with a *Vibrio alginolyticus* strain. **Journal of Invertebrates Pathology**. v. 76, p.1-5, 2000.

Food And Drug Administration. **Bacteriological analytical manual online**. Gaithersburg: AOAC International, 8.ed., revision A. c.9. 2004. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-9.html>. Acesso em Dezembro de 02/10/2008>

Galli, L. et al. **I Curso básico de bacteriologia**. 2001. 42p.

Gámez, C.I.; Galavíz, J.R.G.; Silva, L.G.; Garza, Z.J.M.; Velarde, M.S.T. Detección y prevalencia de *Vibrio* spp em cultivo de camarón *Litopenaeus vannamei* en Sonora durante o ciclo 2003. **Revista Salud Pública y Nutrición**, n. 6, 2004.

Gamez, C.I. Manual de practicas de laboratorio de sanidad de camarón. **Instituto Tecnológico de Sonora**. 2001. p.18-23.

Gomez-Gil, B.; Tron-Mayen, L.; Roque, A.; Turnbull, J.F.; Inglis, V.; Guerra-Flores, A.L. Species of *Vibrio* isolated from hepatopâncreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**. v.163, p.1-9, 1998.

Holt, J.G. et al. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. Maryland: Henslyl, 9ª ed. p.192-193. 1994.

Hopkin, S.P., Nott, J.A. Studies on the digestive cycle of the shore crab *Carcinus maenas* _L.. with special reference to the B cells in the hepatopancreas. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v.60, p.891–907, 1980.

Hosseini, H; Cheraghali, M.A; Yalfani, R; Razavilar, V. Incidence of *Vibrio* spp. in shrimp caught off the south coast of Iran. **Food Control**, v.15, p.187–190, 2004.

Jayasree, L.; Janakiram, P.; Madhavi, R. Characterization of *Vibrio* spp. associated with diseased shrimp from culture ponds of Andhra Pradesh (Índia). **Journal of the World Aquaculture Society**, v.37, p. 523-532, 2006.

Lightner, D.V. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. **World aquaculture society**. Baton Rouge: Louisina. 1996. 304p.

Longyant, S.; Rukpratanporn, S.; Chaivisuthangkura, P.; Suksawad, P.; Srisuk, C.; Sithigorngul, W.; Piyatiratitivorakul, S.; Sithigorngul, P. Identification of *Vibrio* spp. in vibriosis *Penaeus vannamei* using developed monoclonal antibodies. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 98, p. 63-68, 2008.

Manjusha, S.; Sarita, G.B.; Elyas, K.K.; Chandrasekaran, M. Multiple antibiotic resistances of *Vibrio* isolates from coastal and brackish water areas. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v.1, n.4, p.201-206, 2005.

Mendes, E.S.; Barretto, A.C.G.; Góes, L.M.N.B., Guimarães, J.M.; Nascimento, D.L.; Diniz Filho, R.S.; Mendes, P.P. Avaliação do exame a fresco em camarões marinhos *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) associado à contagem e identificação de *Vibrio* spp. em água de cultivo. **Revista Medicina Veterinária**. v.1, p.7-15, 2007.

Morales-Covarrubias, M.S. Métodos de diagnóstico. In: Morales-Covarrubias, M.S. **Enfermedades del camarón: detección mediante análisis en fresco e histopatología**. México: Trillas, 2004. p. 23 – 34.

Morales-Covarrubias, M.S. Enfermidades bacterianas. In: Morales, V.; Cuéllar-Anjel, J. (eds.) **Guia Técnica - Patología e inmunología de camarones penaeidos**. Panamá: Rep. de Panamá . 2008. p.117 –134.

Nishigushi, M.K.; Nair, V.S. Evolution of symbiosis in the Vibrionaceae: a combined approach using molecules and physiology. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.53, p.2019-2026, 2003.

Noriega-Orozco, L.; Acedo-Félix, E.; Higuera-Ciapara, I.; Jiménez-Flores, R.; Cano, R. Pathogenic and non pathogenic *Vibrio* species in aquaculture shrimp ponds. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, v. 49, n.3 – 4, p.60–67, 2007.

Nunes, A.J.P.; Gesteira, T.C.V.; Oliveira, G.G.; Lima, R.C.; Miranda, P.T.C.; Madrid, R.M. **Princípios para boas práticas de manejo (BPF) na engorda de camarão marinho no**

Estado do Ceará. Instituto de Ciências do Mar (Labomar/UFC). Programa de Zoneamento Ecológico Exclusivo (ZEE) do Estado do Ceará, Fortaleza. Ceará. 109p. 2005.

Nunes, A. J. P.; Martins, P. C. Avaliando o estado de saúde de camarões marinhos na engorda. **Revista Panorama da Aqüicultura.** v. 72, p. 23 – 33, 2002.

Panicker, G.; Call, D.R.; Krug, M.J.; Bej, A.K. Deteccion of pathogenic species in shellfish by using multiplex PCR and DNA microarray. **Applied and Environmental Microbiology,** v.70, p.7436-7444, 2004.

Parisi, A.; Normando, G.; Andante, N.; Dambrosio, A.; Montagna, C.; Quaglia, N.; Celano, G.V.; Chiocco, D. Market survey of *Vibrio* spp. and other microorganisms in Italian Shellfish. Research Note. **Journal of Food Protection,** v.67, p.2284–2287. 2004.

Pfeffer, C.S.; Hite, F.M.; Oliver, J.D. Ecology of *Vibrio vulnificus* in Estuarine Waters of Eastern North Carolina. **Applied and Environmental Microbiology,** v.69, p.3526–3531, 2003.

Ribeiro, C. M. F. **Aspectos gerais da vibrose em camarão marinho.** Recife: Faculdade Frassinetti do Recife – FAFIRE, 2005. 40p. Especialização em Microbiologia.

Rodrick, G. E. **Microbiology of marine food products.** New York: AVI Book, 1991. 285p

Roque, A.; Molina-Aja, A.; Bolán-Mejía, C.; Gomes-Gil, B. In vitro susceptibility to 15 antibiotics of vibrios isolated from penaeid shrimps in Northwestern México. **International Journal of Antimicrobial Agents.** v. 17. p.383-387. 2001.

Ruangpon, L.; Kitao, T. *Vibrio* bactéria isolated from black tiger shrimp, *Penaeus vannamei* Fabricius. **Journal of Fish Disease,** v.14, p.383-388, 1991.

Shehane, D.S.; Sizemore, R.K. Isolation and preliminary characterization of bacteriocins produced by *Vibrio vulnificus*. **Applied and Environmental Microbiology,** v.92, p.322-328, 2002.

Silva, N.; Silveira, N.F.A.; Junqueira, V.C.A.; Catanúsio Neto, R. **Manual de métodos de análise microbiológica da água**. Campinas: ITAL/Núcleo de Microbiologia, 2000. 99p.

Sung, H.H., Hsu, S.F., Chen, C.K., Ting, Y.Y., Chao, W.L. Relationships between disease outbreak in cultured tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and the composition of *Vibrio* communities in pond water and shrimp hepatopancreas during cultivation. **Aquaculture**, v.192, p.101–110, 2001.

Zar, J. H. **Biostatistical analysis**. 4th. New Jersey: Prentice Hall. 1999. 663 p.

Journal of Invertebrate Pathology

Guide for Authors

The *Journal of Invertebrate Pathology* publishes articles on all aspects of original research concerned with the causation and manifestation (including immunologic responses) of infectious and noninfectious diseases of invertebrates, the suppression of such diseases in beneficial species, and the use of these pathogens in controlling undesirable species such as agricultural pests and vectors of pathogens transmissible to other organisms. In addition, this journal publishes the results of biochemical, physiological, morphological, genetic, and ecological studies related to the etiologic agents of diseases of invertebrates. The journal is particularly dedicated to the publication of contributions of a basic and fundamental nature, although it will accept suitable articles pertaining to the applications of invertebrate pathology. The editor-in-chief and members of the Editorial Board will examine contributions from any qualified worker in any country of the world.

Submission of Manuscripts

It is a condition of publication that all manuscripts must be written in clear and grammatical English and be submitted to the *Journal of Invertebrate Pathology* Web site at <http://ees.elsevier.com/jip>. Minimal exceptions will be allowed. Authors who are unable to provide an electronic version should contact the Editorial Office prior to submission [e-mail: jip@elsevier.com; telephone: (619) 699-6348; or fax: (619) 699-6859].

The accompanying letter should be in Word (.doc) format and should outline the basic findings of the paper and their significance.

Authors are also asked to suggest the names (along with e-mail addresses) of three to five potential reviewers.

For revised papers, please include a letter (.doc) to the Editor indicating changes to the manuscript, an editable file (a Word document is preferred) for text and tables, .tif or .eps files for all artwork. There are no submission fees or page charges.

Manuscripts are accepted for review with the understanding that no substantial portion of the study has been published or is under consideration for publication elsewhere and that its submission for publication has been approved by all of the authors and by the institution where the work was carried out. Manuscripts that do not meet the general criteria or standards for publication in *Journal of Invertebrate Pathology* will be immediately returned to the authors, without detailed review.

English language help service: Authors who are not sure of proper English usage must have their manuscripts checked by one or more persons proficient in English. Failure to use proper English can result in a manuscript being rejected without review. For a list of providers of English editing services, please refer to www.elsevier.com/locate/languagepolishing

Upon acceptance of an article, authors will be asked to transfer copyright (for more information on copyright, see <http://www.elsevier.com/authorsrights>). This transfer will ensure the widest possible dissemination of information. A letter will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript. A form facilitating transfer of copyright will be provided after acceptance.

If material from other copyrighted works is included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: contact Elsevier Global Rights Department, P.O. Box 800, Oxford OX5 1DX, UK; phone: (+44) 1865 843830, fax: (+44) 1865 853333, e-mail: permissions@elsevier.com.

US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting ("Public Access") policy. Elsevier facilitates author response to the NIH voluntary posting request (referred to as the NIH "Public Access Policy"; see <http://www.nih.gov/about/publicaccess/index.htm>) by posting the peer-reviewed author's manuscript directly to PubMed Central on request from the author, 12 months after formal publication. Upon notification from Elsevier of acceptance, we will ask you to confirm via e-mail (by e-mailing us at NIHauthorrequest@elsevier.com) that your work has received NIH funding and that you intend to respond to the NIH policy request, along with your NIH award number to facilitate processing. Upon such confirmation, Elsevier will submit to PubMed Central on your behalf a version of your manuscript that will include peer-review comments, for posting 12 months after formal publication. This will ensure that you will have responded fully to the NIH request policy. There will be no need for you to post your manuscript directly with PubMed Central, and any such posting is prohibited.

The *Journal of Invertebrate Pathology* publishes the following types of articles:

Regular Articles. Manuscripts for Regular Articles are full-length papers that report the results of a large and well-defined study. There is no page limit, but this type of article is usually in the range of eight published pages.

Short Communications. Manuscripts for Short Communications should be 1500 or fewer words and contain not more than two illustrations or two tables, or one of each. Manuscripts should contain an abstract of not more than 100 words. References should be kept to a minimum and should be styled according to the guidelines in the section on References.

Minireviews. Manuscripts for Minireviews typically range from four to six published pages and provide a succinct review of important and recent developments in any field of invertebrate pathology.

Forum Articles. Manuscripts for Forum Articles typically range from one to four published pages and focus on a topical issue in invertebrate pathology. It is the intent of Forum Articles to stimulate discussion of controversial or unresolved issues relevant to all aspects of invertebrate pathology.

Preparation of Manuscripts

Manuscripts should be double-spaced throughout, and a line-numbering program should be used so that all lines on all pages bear consecutive numbers. With respect to style, a useful writing guide is the latest edition of the CBE Style Manual, published by the Council of Biology Editors. This manual should also be used as a guide to most abbreviations employed. Proprietary substances and trade names must be accompanied (at the first mention) by the chemical name. Pages should be numbered consecutively and organized as follows:

The **Title Page** (p. 1) should contain the article title, authors' names and complete affiliations, footnotes to the title, and the address for manuscript correspondence (including e-mail address and telephone and fax numbers).

The **Abstract** (p. 2) must be a single paragraph that summarizes the main findings of the paper in less than 250 words. After the abstract a list of up to 10 **keywords** that will be useful for indexing or searching should be included. The keywords should include the taxonomic designations of organisms, both host and pathogen(s), mentioned in the text and the major subject matter, e.g., castration, parasitic; biological control; or nuclear polyhedrosis virus, pathogenicity of. The names of enzymes, substrates, and other important compounds should also appear in the list of keywords.

The **Introduction** should be as concise as possible, without subheadings.

Materials and methods should be sufficiently detailed to enable the experiments to be reproduced.

Results and Discussion may be combined and may be organized into subheadings.

Acknowledgments should be brief and should precede the references.

References should be cited in the text by name and date. Only articles that have been published or are in press should be included in the references. Unpublished results or personal communications should be cited as such in the text. The names of journals should be abbreviated according to *Chemical Abstracts Service Source Index*. Please use the following style:

Becnel, J.J., 1997. Complementary techniques: preparations of entomopathogens and diseased specimens for more detailed study using microscopy. In: Lacey, L.A. (Ed.), *Manual of Techniques in Insect Pathology*. Academic Press, San Diego, pp. 337-353.

Schneider, M., Dom, A., 2001. Differential infectivity of two *Pseudomonas* species and the immune response in the milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus* (Insecta: Hemiptera). *J. Invertebr. Pathol.* 78, 135-140.

Tanada, Y., 1992. *Insect Pathology*. Academic Press, San Diego.

Figures. Number figures consecutively with Arabic numerals. Please visit our Web site at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions> for detailed instructions on preparing electronic artwork. In composing photographic illustrations such as micrographs, especially where multiple micrographs are presented, figures should be composed as plates that combine two or more illustrations per figure. The width of these plates should be composed so that they are equal to either one or two columns of a journal page.

Illustrations in **color** in the printed issue can be accepted only if the authors defray the cost. However, if together with your accepted article, you submit usable color figures, then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.

For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Please note: Because of technical complications that can arise in converting color figures to "gray scale" (for the printed version

should you not opt for color in print), please submit in addition usable black-and-white files corresponding to all the color illustrations.

Tables should be numbered consecutively with Arabic numerals in order of appearance in the text. Type each table double-spaced on a separate page with a short descriptive title typed directly above and with essential footnotes below.

Nomenclature. Binomial Latin names should be used in accordance with International Rules of Nomenclature. The first time a binomial is used, it should be fully spelled out. In papers largely taxonomic in nature the names (fully spelled out) of the authors of the scientific names should be used. Otherwise, the names of authors should be omitted.

Identification of Pathogens. Pathogens should be identified using current methods accepted for each pathogen group. Molecular methods should be used to identify pathogens being described for the first time where these methods are standard for the field.

Preparation of Supplementary Material

Elsevier now accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer additional possibilities for publishing supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips, and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect (<http://www.sciencedirect.com>). To ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. Please note, however, that supplementary material will not appear in the printed journal.

Proofs

PDF proofs will be e-mailed to the corresponding author. To avoid delay in publication, only necessary changes should be made, and corrections should be returned promptly.