UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA

SUSCEPTIBILIDADE DE ALGUMAS ESPÉCIES DE *Vibrio* ISOLADAS DA HEMOLINFA DE CAMARÕES *Litopenaeus vannamei* A DIFERENTES ANTIMICROBIANOS.

GIUSEPPE DE SOUZA CESÁRIO

TRABALHO SUPERVISIONADO (MONOGRAFIA) APRESENTADO AO DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA DO CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ, COMO PARTE DAS EXIGÊNCIAS PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE ENGENHEIRO DE PESCA.

FORTALEZA - CEARÁ - BRASIL
Dezembro/2007

COMISSÃO EXAMINADORA:

Profª. Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira, D.Sc.
Orientador/Presidente

Norma Suely Evangelista Barreto, D.Sc.
Membro

Oscarina Viana de Sousa, D.Sc.
Membro

VISTO:

Prof. Moisés Almeida de Oliveira, D.Sc.
Chefe do Departamento de Engenharia de Pesca

Prof. Raimundo Nonato de Lima Conceição, D.Sc.
Coordenador do Curso de Engenharia de Pesca

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C414s Cesário, Giuseppe de Souza.
Susceptibilidade de algumas espécies de vibrio isoladas da hemolinfa de camarões Litopenaeus vannamei a diferentes antimicrobianos / Giuseppe de Souza Cesário. – 2007.
44 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2007.
Orientação: Profa. Dra. Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira.

1. Camarão (Crustáceo) - Brasil, Nordeste. 2. Camarão - Criação. 3. Camarão - Hemolinfa. 4. Engenharia de Pesca. I. Título.

CDD 639.2

AGRADECIMENTOS

A Deus pela fé, sabedoria e força para ir em busca dos meus objetivos.

Aos meus pais que sempre me incentivaram a estudar.

À minha querida esposa, Hozana Patrícia, pelo amor e dedicação a mim, na qual a tenho como exemplo de força de vontade e determinação.

À professora Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira, pela oportunidade de realização deste trabalho no Laboratório de Microbiologia Ambiental e do pescado, no LABOMAR.

A todos os integrantes do Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado pela amizade e repasse de conhecimentos: Osca, Norma, Gleire, Cristiane, Rosa, Fran, Anahy, Camila, Dannielle, Cláudia, Fábio Roger, Darliane, Carlos e Rafael, e em especial a Edirsana, minha "co-orientadora" pela sua paciência e tempo disponibilizado para a realização deste trabalho. Ao buda, do laboratório de oceanografia geológica, pela amizade e ajuda na confecção do mapa.

Enfim, a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Canção do Vibrio resistente

Sou resistente
porque alguém me fez assim.
Ou foi ELE, ou alguém que
no meu habitat
usou o que não deveria usar.
Se já nasci assim tenho
que agradecer.
Afinal, escapo de desaparecer
nas profundezas da água.
Se me fizeram assim
por desleixo, ou por ilegalidade,
agradeço também.
Se existe o forte é porque existe o fraco.
Sou forte e me orgulho.
Não penso no homem.
Sou egoísta.
Quero é me dividir
e encher os rios e os camarões
com meu veneno.
Afinal, meu sonho de consumo
é tão somente: a multiplicação.

Regine Limaverde

SUMÁRIO

RESUMO vi
LISTA DE FIGURAS vii
LISTA DE QUADROS viii
LISTA DE TABELAS ix
1. INTRODUÇÃO 01
2. REVISÃO DE LITERATURA 04
2.1. Histórico do cultivo do *Litopenaeus vannamei* 04
2.2. Características do camarão *Litopenaeus vannamei* 05
2.3. Adversidades no cultivo do camarão 05
2.4. *Vibrio* 07
2.5. Vibrioses 08
2.6. A resposta imune em crustáceos 09
2.6.1. Hemograma 10
2.6.2. Sistema fenoloxidase 11
2.7. Antibióticos 12
2.7.1 Resistência no meio ambiente 14
2.7.2. Mecanismos de resistência bacteriana a antimicrobianos 15
3. MATERIAL E MÉTODOS 16
3.1. Obtenção das amostras 16
3.2. Preparação das amostras 17
3.3. Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos 17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 20
5. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES 30
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 31

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar o comportamento de 27 cepas de *Vibrio* quanto à susceptibilidade a 10 antimicrobianos. Para a realização do teste antimicrobiano foram utilizadas 27 cepas de *Vibrio* isoladas da hemolinfa de camarão *Litopenaeus vannamei* provenientes de três fazendas de cultivo localizadas nas cidades de Acaraú, Aracati e Granja, municípios do Estado do Ceará. Foram utilizadas cinco cepas de *V. alginolyticus*, uma de *V. carchariae*, doze de *V. harveyi*, uma de *V. vulnificus* e oito de *V. parahaemolyticus*. Todas as cepas apresentaram sensibilidade para Ciprofloxacin, Cloranfenicol, Florfenicol, Ácido nalidíxico, Nitrofurantoína e Sulfazotrim. Vinte e cinco cepas (92,59%) apresentaram sensibilidade para Oxitetraciclina e Tetraciclina e vinte e duas (81,48%) para Amicacina. Vinte cepas (74,07%) apresentaram resistência para Ampicilina e duas (7,41%) foram resistentes tanto para Oxitetraciclina como Tetraciclina. Cinco cepas (18,51%) apresentaram comportamento intermediário frente a Amicacina e uma a Ampicilina. Uma cepa de *V. harveyi* apresentou múltipla resistência aos antimicrobianos Ampicilina, Oxitetraciclina e Tetraciclina. Com base nos resultados obtidos, constatou-se que a maioria das cepas das diferentes espécies testadas (74,07%) foram resistentes a Ampicilina e que a sensibilidade das cepas de *Vibrio* isoladas da hemolinfa de *Litopenaeus vannamei* apresentou-se alta à maioria dos antibióticos testados. A múltipla resistência também foi constatada neste estudo. É preciso que sejam adotadas medidas preventivas contra o abuso de drogas nas fazendas de cultivo, como a realização de testes para traçar o perfil de resistência aos antimicrobianos e principalmente atentar para um manejo adequado nos cultivos.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01	Mapa das localidades das fazendas de carcinicultura em Granja, Acaraú e Aracati - Estado do Ceará, de onde procederam as amostras de camarão *Litopenaeus vannamei*.	16
FIGURA 02	Fluxograma do antibiograma	19
FIGURA 03	Percentual de susceptibilidade a antimicrobianos de cepas de *V. alginolyticus* (%) isoladas da hemolinfa de camarão *Litopenaeus vannamei* proveniente de três fazendas de cultivo situadas em Aracati, Acaraú e Granja no Estado do Ceará.	22
FIGURA 04	Percentual de susceptibilidade a antimicrobianos de cepas de *V. harveyi* (%) isoladas da hemolinfa de camarão *Litopenaeus vannamei* proveniente de três fazendas de cultivo situadas em Aracati, Acaraú e Granja no Estado do Ceará.	23
FIGURA 05	Percentual de susceptibilidade a antimicrobianos de cepas de *V. parahaemolyticus* (%) isoladas da hemolinfa de camarão *Litopenaeus vannamei* proveniente de três fazendas de cultivo situadas em Aracati, Acaraú e Granja no Estado do Ceará.	25
FIGURA 06	Percentual de resistência a 10 antimicrobianos de 27 cepas de Vibrio (%) isoladas da hemolinfa de camarão *Litopenaeus vannamei* proveniente de três fazendas de cultivo situadas em Aracati, Acaraú e Granja no Estado do Ceará.	26
FIGURA 07	Percentual de susceptibilidade das 27 cepas de Vibrio (%) isoladas da hemolinfa de camarão *Litopenaeus vannamei* proveniente de três fazendas de cultivo situadas em Aracati, Acaraú e Granja no Estado do Ceará.	27
FIGURA 08	Percentual das 27 cepas de Vibrio (%) isoladas da hemolinfa de camarão *Litopenaeus vannamei* proveniente de três fazendas de cultivo situadas em Aracati, Acaraú e Granja no Estado do Ceará, com perfis sensíveis, resistentes e intermediárias quando testados com 10 antimicrobianos.	28

LISTA DE QUADROS

QUADRO 01 Padrão de interpretação do teste de difusão com medidas dos halos e resultados para sensibilidade, resistência, e comportamento intermediário das cepas testadas frente aos antimicrobianos escolhidos. 18

SUSCEPTIBILIDADE DE ALGUMAS ESPÉCIES DE *Vibrio* ISOLADAS DA HEMOLINFA DE CAMARÕES *Litopenaeus vannamei* A DIFERENTES ANTIMICROBIANOS.

GIUSEPPE DE SOUZA CESÁRIO

1. INTRODUÇÃO

A aqüicultura tornou-se uma atividade de grande importância para o comércio mundial de pescado garantindo a presença de frutos do mar na alimentação da população e respondendo à crescente demanda global por peixes, camarões, moluscos e outros produtos aquáticos. Com o limite máximo de exploração dos estoques pesqueiros naturais, a produção e o comércio de produtos da aqüicultura crescem em ritmo acelerado (FAO, 2006).

Em 2005, a China foi o principal produtor com 1.024.949 toneladas e, juntamente com a Tailândia, o Vietnã, a Indonésia e a Índia representaram quase 80% de toda a produção mundial (ROCHA; ROCHA, 2007).

O rápido crescimento da carcinicultura nas últimas décadas é conseqüência da crescente demanda por camarão no mercado mundial, da capacidade de gerar altos lucros para as empresas produtoras e da contribuição na geração de emprego e renda para os países produtores (BRASIL, 2001).

No Brasil, o cultivo do camarão marinho é praticado desde os anos 80, mas somente a partir de 1996, tornou-se uma atividade mais competitiva para o mundo, com elevado crescimento anual e alta produtividade (BRASIL, 2001).

No Brasil, em 2006 foram produzidas 65.000 toneladas de camarão cultivado, sendo mantido o mesmo nível de produção em relação a 2005, observando-se uma queda de 27,93% em relação a 2003. A região Nordeste produziu em 2006, 63.750 toneladas de camarão cultivado, ocupando o Rio Grande do Norte, a primeira posição no ranking de produção, com 26.400 toneladas. O Ceará foi responsável pela produção de 22.000 toneladas de camarão cultivado, ocupando o segundo lugar no ranking de produção no país. De janeiro a julho de 2007, o Brasil exportou

12.443.744 toneladas em camarão congelado, sendo 98% deste total exportado para a Europa (ROCHA; ROCHA, 2007).

Segundo dados do Boletim do Comércio Exterior (2007), no acumulado de janeiro a setembro de 2007 as exportações de camarão no Ceará caíram 60,8% em comparação com o mesmo período do ano passado, caindo da quinta para a décima posição na pauta de exportação, sendo o produto que mais contribuiu negativamente com as exportações cearenses, reduzindo em U$$ 25,9 milhões suas exportações.

A perda da competitividade do camarão brasileiro no mercado internacional devido à valorização do Real (R$) em relação ao Dólar (US$) continua sendo o responsável pela desestruturação das exportações do crustáceo. Em agosto de 2007, a perda da receita em reais em relação ao ano de 2003 foi da ordem de 40%, apresentando um aumento significativo nos custos de mão-de-obra, energia e diesel. Entre 2005 e 2006, o mercado interno cresceu significativamente, uma vez que vinha sendo abastecido apenas com camarões frescos, na forma "in natura", despertando a atenção do setor, e, se transformando em alternativa para a crise nas exportações. A média mundial de consumo per capta de camarão em 2006 foi de 700 g. No Brasil, foi de apenas 250 g. O consumo per capta de carnes vermelhas no Brasil foi de 29,6 Kg, o de carne branca foi de 47,7 kg e o de pescados foi de 6,0 Kg sendo que do total de pescados consumido no Brasil, cerca de 180.000 t foram importados, representando um gasto de US$ 445,0 milhões em 2006 (ROCHA; ROCHA, 2007).

Devido às condições dos ecossistemas costeiros do Nordeste, excepcionalmente propícias à aqüicultura em geral, o Brasil é dotado de todas as condições de se tornar o maior produtor mundial de camarão criado em cativeiro em menos de dez anos, com exportações superiores a um bilhão de dólares (MELO, 2004; MENDONÇA, 2003).

De acordo com Wainberg (2004), a expansão da carcinicultura brasileira apresenta um desordenamento no processo de expansão, seguido de colapso ambiental e sanitário. Na indústria de camarão de cultivo, o surgimento de enfermidades tem aumentado sensivelmente, prejudicando o desenvolvimento da aqüicultura e comércio em muitos países.

O uso de desinfetantes e drogas antimicrobianas limita a prevenção e cura de enfermidades aquáticas. O uso excessivo de antimicrobianos para o controle de

doenças infecciosas e promotores de crescimento em animais exercem uma pressão seletiva nos microrganismos, contribuindo para a sua resistência (KÜMMERER, 2004).

Bactérias do gênero *Vibrio* têm causado perdas significantes na carcinicultura mundial, especialmente na larvicultura e na engorda de camarões na fase juvenil (AGUIRRE-GUZMAN et al., 2004).

O controle das infecções é atualmente o principal fator limitante para o sucesso da carcinicultura. As altas densidades populacionais nos cultivos causam alastramento dos agentes infecciosos, gerando mortalidades. Práticas adequadas de manejo e a redução do estresse nos cultivos têm restringido a profilaxia e o controle de enfermidades em camarões. O estudo do sistema imune de crustáceos permite conhecer as bases da susceptibilidade e a resistência desses animais a microrganismos patogênicos e a parasitas, estabelecendo parâmetros de saúde e imunomarcadores para seleção genética de animais mais resistentes a infecções (BARRACCO, 2004).

O objetivo deste trabalho é testar a susceptibilidade antimicrobiana de cepas de *Vibrios* isoladas da hemolinfa do camarão *Litopenaeus vannamei*, em fazendas de cultivo de três municípios do Estado do Ceará.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Histórico do cultivo do *Litopenaeus vannamei*

No sudoeste asiático em meados do século XIV teve origem o cultivo do camarão marinho. Inicialmente, o cultivo de camarões se baseava nos recursos naturais, como por exemplo, a captura de pós-larvas silvestres, os viveiros semi-naturais, os alimentos naturais e o uso de grandes ecossistemas para recepção dos efluentes (CHAMBERLAIN, 2001).

A carcinicultura brasileira teve origem no início da década de 70 e somente a partir da década de 80 ganhou caráter empresarial, sendo a atividade praticada de forma semi-extensiva (5-10 camarões/m^2)(ROCHA; ROCHA, 2007).

O camarão-branco-do-pacífico (*Litopenaeus vannamei*) teve seus primeiros experimentos na década de 80, causando uma verdadeira revolução na carcinicultura mundial. No Brasil, especialmente no Nordeste, *Litopenaeus vannamei* adaptou-se ao clima, água e solo. Pós-larvas e reprodutores foram importados, sendo cultivado com bastante sucesso em países como Equador e Panamá (CARVALHO et al., 2005).

No início dos anos 90, com o domínio do ciclo reprodutivo do camarão *Litopenaeus vannamei* pelos laboratórios brasileiros, iniciou-se uma nova fase para a carcinicultura brasileira, com a distribuição comercial de pós-larvas, apresentando comprovada viabilidade comercial, índices de produtividade e rentabilidade superiores ao dos camarões nativos, tornando-se a única espécie cultivada em larga escala no Nordeste (ROCHA; MAIA, 1998; ROCHA; ROCHA, 2007).

A carcinicultura brasileira passou a crescer a taxas superiores a 60% ao ano, até 2003, quando a produção atingiu 90.190 t. (ROCHA; ROCHA, 2007). O Ceará foi em 2003, o maior exportador de camarão cultivado do Brasil, superando em produtividade o Rio Grande do Norte, pioneiro no Brasil em carcinicultura, respondendo por 31,3% da receita nacional, reflexo do elevado nível de produtividade (NETO et al., 2005).

Em 2004, vários problemas atingiram a carcinicultura brasileira tais como: a ação anti-dumping imposta pelos Estados Unidos, a forte desvalorização do dólar

americano, as viroses (IMNV no Nordeste e WSSV em Santa Catarina), as enchentes de 2004, prejudicando a produção e a produtividade das fazendas de cultivo, levando a diminuição da receita com as exportações. Apesar desses problemas, a carcinicultura brasileira conquistou novos mercados como Japão, Bélgica, África do Sul, Chile e Alemanha (ROCHA; ROCHA, 2007).

2.2. Características do camarão *Litopenaeus vannamei*

O camarão marinho é encontrado desde regiões de latitude subpolar até regiões subtropicais (MACHADO, 1988; LAVILLA-PITOGO et al., 1998). A espécie *Litopenaeus vannamei*, natural do Oceano Pacífico, foi muito bem adaptada ao Brasil e adquiriu um alto valor comercial (MARTINS, 2003). Está entre as cinco espécies de camarões mais cultivadas no mundo (NUNES, 2001) e tornou-se o fator revolucionário para a carcinicultura brasileira (BORGHETTI et al., 2003). É uma espécie exótica ao litoral brasileiro, com distribuição natural desde as águas do Oceano Pacífico na província de Sonora, México, até o sul de Tumbes, no Peru (NUNES, 2001).

Litopenaeus vannamei apresenta boa adaptação, principalmente às condições climáticas do Nordeste, rusticidade e rápido crescimento em todas as fases do cultivo e as pós-larvas aceitam facilmente rações peletizadas, tolerando uma variação de salinidade da água, de 0,5 até 65 Unidades Práticas de Salinidade (UPS = ‰) além de apresentar uma alta aceitação nos mercados internacionais (NUNES, 2002).

2.3. Adversidades no cultivo do camarão

Os agentes patogênicos podem se multiplicar sob estresse dos animais, cultivados em fazendas mal projetadas. O manejo adequado é importante para a saúde dos animais em decorrência da diminuição da probabilidade de transmissão de enfermidades, quer seja numa mesma fazenda ou para as fazendas

circundantes. É necessária a preparação adequada dos viveiros, utilizando larvas saudáveis, alimentação de acordo com as necessidades nutricionais específicas de cada organismo, e o uso de aeração e renovação da água obedecendo às necessidades do cultivo (SEIFFERT et al., 2006).

As bactérias têm sido relatadas como a principal causa de problemas associados à produção de juvenis (VANDSTEIN et al., 1993).

Baixas concentrações de oxigênio dissolvido, mudanças abruptas na salinidade, temperatura e pH extremos e presença de substâncias tóxicas são fatores ambientais relacionados ao desequilíbrio do ambiente de cultivo, podendo levar a um processo infeccioso. Outros fatores contribuem para o surgimento de enfermidades nos camarões tais como: a propagação de bactérias oportunistas (*Vibrio* spp., *Aeromonas* spp., etc.), a proliferação de protozoários (*Zoothamnium* spp. e Gregárias), a captação de água contaminada e a aquisição de pós-larvas com elevada carga viral (SOULAP, 1999).

A intensificação da densidade de produção, distúrbios ecológicos, alimentares e poluição têm contribuído para o desenvolvimento de doenças na carcinicultura (KAUTSKY et al., 2000). Como as bactérias são comuns na água do mar, elas se tornam patogênicas oportunistas, aproveitando-se das mudanças ecológicas da água utilizada na aqüicultura (SKJERMO; VADSTEIN, 1999).

. A microbiota intestinal de organismos aquáticos, ao contrário dos organismos terrestres, é constituída principalmente de bactérias Gram-negativas (VINE et al., 2006). Esta composição pode mudar bruscamente frente a mudanças ambientais e à escassez de algum nutriente (RINGO; GATESOUP, 1998).

Grande parte das bactérias patogênicas, como as do gênero *Vibrio*, são altamente adaptáveis a condições de baixa concentração de oxigênio dissolvido (MAEDA et al., 1997).

Os mecanismos de patogenicidade das bactérias do gênero *Vibrio* ainda não estão totalmente elucidados (GEORGE et al., 2005). Produtos extracelulares como proteases, lipases e hemolisinas são consideradas determinantes na virulência das cepas de víbrio (AUSTIN; ZHANG, 2006). Através de mecanismos protéicos mediadores específicos, as bactérias fixam-se na quitina, aderindo, colonizando e infectando o hospedeiro (MONTGOMERY; KIRSHMAN, 1993).

Baseando-se no nível de patogenicidade e risco para a indústria do camarão, as enfermidades na carcinicultura são classificadas em três categorias: C3 envolve

os patógenos que geram deformidades e alterações na aparência física dos camarões, mas causam um mínimo de impacto à produção. A categoria C2 afeta a produtividade dos cultivos, o crescimento e a sobrevivência dos camarões, envolvendo patógenos que ameaçam a produção. A categoria C1 envolve a maioria das doenças virais e bacterianas dos camarões marinhos, fazendo parte desta categoria os patógenos que causam mortalidade em massa em populações, prejudicando a sobrevivência da indústria em uma determinada área geográfica (LIGHTER, 1998; NUNES; MARTINS, 2002).

2.4. *Vibrio*

São as bactérias mais importantes na carcinicultura e estão presentes no trato digestivo dos camarões, os quais, quando submetidos a uma situação de estresse, podem adquirir vibrioses chamadas de infecção primária, ou agravar uma enfermidade, por exemplo, uma virose, passando a denominar-se de infecção secundária (MENDES et al., 2005).

O gênero *Vibrio* compreende 83 espécies (DSMZ, 2007), Gram-negativas, produzem oxidase, catalase, indol e fermentam glicose sem produção de gás, apresentam negatividade para arginina descarboxilase (AKINBOWALE et al., 2006). Medem entre 0,5 a 0,8 µm de diâmetro e 1,4 a 2,4 µm de comprimento. A maioria das espécies patogênicas é móvel, possuindo flagelo único e polar e reduzem nitrato com exceção da espécie *V. metschnikovii*. São halófitos restritos, necessitando de sódio, para o seu crescimento. Pertencem à família Vibrionaceae, não produzem H_2S, apresentam positividade nas provas de manitol e lisina-descarboxilase (THOMPSOM et al., 2004).

É um grupo de bactérias que apresenta crescimento em vida livre ou simbiose com outras espécies. Típicas de ambientes marinhos e estuarinos, onde a salinidade se apresenta entre 0,5‰ e 2,5‰. Necessitam de 2 a 3% de NaCl para o seu crescimento. A maioria das espécies é mesófila proliferando em períodos mais quentes. São facilmente isoladas de peixes e crustáceos, em decorrência do ambiente marinho ser seu nicho natural (NISHIGUSH; NAIR, 2003).

2.5. Vibrioses

As vibrioses atacam todos os estágios de vida do camarão (larval, pós-larval, juvenil e adulta). São consideradas como infecções secundárias e oportunistas que ocorrem quando há condições de estresse no sistema de cultivo como a diminuição de oxigênio, densidade de estocagem excessiva, lesões na cutícula dos camarões, alimentação inadequada e compostos nitrogenados excessivos no ambiente de cultivo (AGUIRRE-GUZMÁN et al., 2001).

O processo de infecção da vibriose pode ser cuticular, entérico (intestinal) e sistêmico (envolvendo vários órgãos). Quando localizada, apresenta lesões melanizadas na carapaça e ou abscesso pontuais no hepatopâncreas. O impacto da vibriose é variável, mas em alguns casos pode alcançar até 70% da população cultivada. Na vibriose crônica, camarões mortos ou moribundos podem ser canibalizados, contaminando rapidamente outros indivíduos na população (LIGHTNER, 1998; SAULNIER et al., 2000).

Vibrio harveyi causa em larvas de camarões marinhos as doenças conhecidas como "síndrome das bolitas" e a "síndrome de protozooea" causadoras de grandes prejuízos na larvicultura de camarões. *Vibrio harveyi* é conhecido por ser o patógeno que mais doenças ocasionam em *Litopenaeus vannamei* e em *Penaeus monodon.* A presença de bactérias luminosas em tanques de cultivo de camarões marinhos está normalmente associada à bactéria *Vibrio harveyi.* Esta bactéria foi responsável pelo aparecimento da "síndrome de gaivota" no Equador que causou uma queda de 15% na produção (AUSTIN; AUSTIN, 1987; ROBERTSON et al., 1998).

De acordo com estudos feitos por Lavilla-Pitogo et al., (1998) infecções causadas por víbrios em sistemas de cultivo são mais devastadoras, devido à fragilidade das larvas. O decréscimo nos sistemas de cultivo nas Filipinas foi de 60% entre 1992 e 1994, associada a vibrios luminescentes. Diferentes espécies de víbrios são consideradas patogênicas oportunistas, ocasionando grandes perdas na produção de camarão, com mortalidades de até 100%, especialmente em pós-larvas e juvenis (AGUIRRE-GUZMÁN et al., 2004).

Quitinases, hemolisinas, proteases alcalinas, cisteína proteases, serina proteases e metaloproteases foram isoladas de sobrenadantes de cultura de *V.*

harveyi, V. alginolyticus e *V. anguillarum.* Diferentes produtos extracelulares (ECP) com efeitos tóxicos em camarão foram caracterizados de diferentes espécies de *Vibrio* isoladas de organismos marinhos e de meio ambiente. Produtos extracelulares de cultura de *V. penaeicida* incubados à 20°C, ocasionaram 100% de mortalidade quando injetados em camarões juvenis de *L. stylirostris* (AGUIRRE-GUZMÁN et al., 2004).

2.6. A resposta imune em crustáceos

O sistema imunológico dos invertebrados é formado por barreiras físicas (cutículas e epitélios) somadas a defesas celulares e defesas extracelulares mediadas por células (humoral) (PINHEIRO; ELLAR, 2006).

O sistema imune dos invertebrados é caracterizado pela carência de mecanismos adaptativos como anticorpos, razão pela qual é impossível a aplicação de vacinas. No entanto recentemente foi reportada evidência de memória adaptativa em crustáceos (KURTZ; FRANZ, 2003).

O sistema imunológico e a cutícula rígida dos crustáceos funcionam como uma barreira contra invasões e infecções de patógenos. Assim, como outros invertebrados, os crustáceos contam apenas com um *sistema imune intato* ou *natural*, diferentemente dos vertebrados, que possuem, além deste, um *sistema adaptativo ou adquirido* (BARRACCO, 2004).

A contagem total de hemócitos (THC) e a atividade fenoloxidase (PO) são utilizadas para avaliar a expressão da resposta imune em crustáceos, uma vez que mudanças nesses parâmetros podem estar relacionadas a infecções por patógenos e à condições adversas (SRITUNYALUCKSANA; SÖDERHÄLL, 2000).

Nos invertebrados a resposta imune se apresenta em duas fases: uma imediata não induzível associada a efetores celulares, e uma fase induzida humoral caracterizada pela participação das proteínas plasmáticas e fatores microbicidas circulantes que melhoram a eficiência da resposta imune (SÖDERHÄL; THÖRNQVIST, 1997).

Investigação da resposta inata do sistema imune em crustáceos tem mostrado novas perspectivas, no controle de doenças em aqüicultura,

principalmente com os peptídeos antimicrobianos para ser usados como agentes terapêuticos proporcionando resistência às infecções (BACHÈRE, 2003).

2.6.1. Hemograma

Hemócitos constituem na primeira linha de defesa interna contra invasores e são importantes nas reações imunes dos camarões, sendo responsáveis pela fagocitose, encapsulação, formação de nódulos e produção de moléculas tóxicas (VAN DE BRAACK et al., 2002).

Três tipos de hemócitos são descritos em crustáceos: Hemócitos hialinos (HH) com controle da fagocitose e coagulação, hemócitos semi-granulares ou com grânulos pequenos (HGP), vinculados aos processos de fagocitose e hemócitos granulares ou com grânulos grandes (HGG) que contém as enzimas que formam parte do sistema fenoloxidase (JOHANSSON et al., 2000; RODRIGUEZ; LE MOULLAC, 2000).

Acredita-se que os HH são de linhagens diferentes dos HGG e estão envolvidos com as reações de coagulação (SÖDERHÄLL; CERENIUS, 1992; GARGIONE; BARRACCO, 1998) e os HGG estão relacionados aos mecanismos de fagocitose, formação de nódulos e produção de moléculas tóxicas e microbicidas (DESTOUMIEUX et al., 2000). A infecção bacteriana faz com que os hemócitos migrem para as regiões da infecção, diminuindo o número de hemócitos na circulação. Com o controle da infecção, a quantidade de hemócitos na circulação é restabelecida, através da produção de novos hemócitos pelo tecido hematopoiético (VAN DE BRAACK et al., 2002).

Para o reconhecimento de padrões moleculares específicos da parede de microrganismos, os invertebrados são dotados de proteínas de reconhecimento padrão (PRPs- patern recognition proteins). Durante as infecções, as PRPs presentes nos hemócitos granulares ou no plasma, ligam-se aos microrganismos invasores, ativando os hemócitos e levando a sua degranulação com a liberação de moléculas imuno-efetoras (peptídeos antimicrobianos, enzimas fenoloxidase, lectinas) (RODRÍGUEZ; LE MOULLAC, 2000).

Quando o patógeno consegue ultrapassar a barreira física da cutícula e epitélios, a fagocitose é a mais comum das reações de defesa celular (SÖDERHÄLL; CERENIUS, 1992). A eliminação das partículas fagocitadas implica na intervenção de enzimas dentro do fagossoma e geração de radicais de oxigênio (BACHÈRE et al., 1995). Este processo consiste no reconhecimento, ingestão e degradação de partículas estranhas como bactérias, fungos e protozoários (VÁZQUEZ et al., 1996). Os microrganismos são interiorizados pelos hemócitos dentro de um vacúolo digestivo chamado de fagossoma, onde são liberadas enzimas degradativas e são gerados espécies reativas oxigênio (EROs) (SÖDERHÄLL; CERENIUS, 1992) em processo conhecido como choque respiratório e conduz a ativação da enzima de membrana NADPH oxidase, que catalisa a redução parcial do oxigênio em ânion superóxido (O_2^-) (MUÑOZ et al. , 2000). O ânion super óxido é o primeiro ERO gerado. Reações subseqüentes geram outros reativos de oxigênio como peróxido de hidrogênio, radicais hidroxila e oxigênio "*singlet*". (RODRÍGUEZ; LE MOULLAC, 2000).

As variações nos hemogramas de camarão são relatadas em muitas situações de estresse tais como infecções bacterianas (MARTIN et al., 1993), virais (VAN DE BRAACK et al., 2002), ciclo de mudas (LIU et al., 2004), salinidade (PERAZZOLLO et al., 2002), toxidez por enxofre (CHENG et al., 2007) e temperatura (WANG; CHEN, 2006).

2.6.2. Sistema fenoloxidase

A proPO é um zimogênio da enzima fenoloxidase e encontra-se nos crustáceos no interior dos hemócitos granulares, de onde são liberadas por uma exocitose regulada (SÖDERHÄLL; CERENIUS, 1998). Pela estimulação de componentes das paredes celulares microbianas como os lipopolissacarídeos da parede celular de bactérias Gram-negativas, a proPO é liberada e ativada em fenoloxidase. Esta enzima é a chave da síntese de melanina e está presente nos pontos de inflamação dos crustáceos(JOHANSSON; SÖDERHÄLL, 1989). A conversão da proPO inativa para enzima fenoloxidase (PO) é realizada por uma

serino-protease chamada de enzima ativadora de profenoloxidase (ppAE-Prophenoloxidase activating enzyme) (SRITUNYALUCKSANA; SÖDERHÄLL, 2000).

O sistema fenoloxidase promove a hidroxilação de fenóis e oxidação de fenóis a quinonas, os quais são responsáveis por destruir qualquer partícula estranha que invada a hemolinfa durante o processo de recuperação de feridas. As quinonas são subsequentemente polimerizadas em melanina por reações enzimáticas (BARRACCO, 2004).

Essa proPO pode também ser ativada por serino-proteases comerciais como a tripsina (PERAZZOLO et al., 2002).

As quinonas transformam-se por via não enzimática em vários outros compostos, que levam à formação da melanina. A melanina e os compostos intermediários da cascata de melanização são tóxicos a microrganismos (NAPPI; VASS, 1993).

Para evitar uma super ativação do sistema de ativação da proPO, existem inibidores de proteases para restringir a reação somente nos locais agredidos e/ou infectados evitando com isso, danificar outros tecidos do hospedeiro (BARRACCO, 2004).

A atividade da PO parece variar em relação a diversas condições de estresse, como a infecção por patógenos (HAUTON et al., 1997), hipoxia (LE MOULLAC et al., 1998), variação de temperatura (VARGAS-ALBORES et al., 1998), salinidade (PERAZZOLO et al., 2002) e amônia (LE MOULLAC; HAFFNER, 2000).

2.7. Antibióticos

De acordo com Trabulsi (2004), quimioterapia é o tratamento de doenças com substâncias químicas. Quando sintetizadas em laboratório são chamadas de quimioterápicos e quando são produzidas pelos seres vivos são chamadas de antibióticos. Esses quimioterápicos e antibióticos podem ter ação antibacteriana, antifúngica e antiviral, inibindo o crescimento ou provocando a morte do patógeno.

Para controlar os efeitos dos problemas bacteriológicos dos camarões, especialmente quando causados por víbrios, são utilizados antibióticos o que pode gerar cepas resistentes e com maior patogenicidade (VALLE et al., 2002).

A utilização profilática e terapêutica de antibióticos é utilizada para o controle de víbrios e outras bactérias patogênicas (GOMEZ-GIL et al., 2000), podendo estas bactérias, facilmente, desenvolver resistência aos antibióticos (SKJERMO; VANDESTEIN, 1999).

De acordo com Garcia-Ulloa (2003), o uso de antibióticos em alimentos de origem animal, é motivo de preocupação, já que a resistência a antibióticos da bactéria patogênica associada ao animal é aumentada e transmitida a humanos.

Embora o tratamento com antibióticos tenha uma resposta mais rápida às doenças bacterianas, pode ser contraproducente, devido ao fato de que os antibióticos podem causar um aumento da resistência dos patógenos. Novas cepas surgiram ao longo do tempo em resposta ao uso de antibióticos e muitos destes patógenos se tornaram mais resistentes, aumentando a mortalidade na carcinicultura (MACMILLAN, 2003).

Muitas das fazendas produtoras de camarão na Ásia e na América Latina, utilizam antibióticos em grande quantidade, incluindo fluoroquinonas, como a sarafloxacina, norfloxacina e outras. Estima-se em 1.000-2.000 toneladas métricas (tm)/ano. As fluoroquinonas não devem ser usadas na produção animal devido ser consideradas como a última linha de defesa para humanos com resistência a múltiplas bactérias (MACMILLAM, 2003).

O emprego de antimicrobianos proibidos pode prejudicar em curto prazo, o mercado mundial de camarão nos países produtores e consumidores, devido às exigências das autoridades sanitárias (FILOSE, 2003).

O uso de antimicrobianos na aqüicultura pode fortalecer a resistência de espécies patogênicas aos mais comuns antimicrobianos como a enrofloxacina, florfenicol e oxitetraciclina (TEO et al., 2002).

A oxitetraciclina é o antimicrobiano aprovado pelo Food and Drugs Administration (FDA), recomendado para doenças bacterianas em "catfish" (bagre americano, como é conhecido no Brasil) e salmão, sem nenhuma alusão ao uso em criações de camarão. A enrofloxacina é citada como droga ainda em licenciamento nos Estados Unidos, embora já tenha sido aprovado o seu uso no Canadá (PLUMB, 2005).

O risco de câncer pelo uso de antimicrobianos na produção de alimentos tem sido evidenciado em pesquisas com ratos, mostrando que quando a exposição é por toda a vida com dosagem de 1-5 µg /kg /dia, o risco aumenta em um para cada milhão de indivíduos. Em um estudo similar, a furazolidona aumentou o risco de câncer em um para cada milhão de indivíduo, quando a exposição por toda a vida foi de 100 ng/kg/dia (AMORNCHAI, 2002).

O cloranfenicol foi utilizado na Ásia nos produtos de camarão exportados para os Estados Unidos, os quais desde setembro de 2001, após a detecção de resíduos deste antimicrobiano, adotaram exame rigoroso para barrar tal prática (AMORNCHAI, 2002). Da mesma forma a comunidade européia recusa resíduos de cloranfenicol nos alimentos, sendo proibido o seu uso veterinário (HANEKAMP, 2003).

De acordo com a United States Food and Drug Administration (USFDA), antibióticos de uso humano e o cloranfenicol são colocados na lista de substâncias proibidas para uso em animais que serão de consumo alimentar. A lista de drogas proibidas inclui também o furazolidona e a nitrofurazolidona. O cloranfenicol está entre as substâncias ativas de farmacologia das quais não é permitido nenhum nível máximo residual no músculo do animal (AMORNCHAI, 2002).

2.7.1 Resistência no meio ambiente

Resíduos de antibióticos no camarão e no meio ambiente têm contribuído para a resistência bacteriana, já que a maior parte destas drogas é ligada ao sedimento e a diferentes partículas em viveiros ou tanques de cultivo, que mesmo em baixas concentrações implica no desenvolvimento de cepas bacterianas resistentes ao agente antimicrobiano (MONTOYA et al., 2003).

Os agentes antimicrobianos utilizados na aqüicultura para o tratamento de doenças nos organismos cultivados são descartados diretamente na água sem prévio tratamento, resultando em concentrações críticas no meio ambiente. No processo de purificação, muitos antibióticos não são totalmente eliminados, ou seja, são não biodegradáveis no meio aquático (AL-AHMAD, 1999).

2.7.2. Mecanismos de resistência bacteriana a antimicrobianos

Resistência bacteriana é um conjunto de mecanismos pelos quais microrganismos adquirem imunidade a um ou a mais antimicrobianos (CHIQUITO; MONTIANI, 1997) em virtude da seleção genética, induzindo a uma rápida propagação de genes com resistência a múltiplas drogas, atingido outras bactérias que não foram expostas ainda aos antimicrobianos (MORIARTY,1999).

O genoma bacteriano compreende os plasmídios, que são elementos genéticos de cadeias circulares de DNA extracromossomal capazes de replicação autônoma, tornando-se úteis à célula em algumas situações, e os cromossomos (STYER, 1992; CHAMBERS; SANDE, 1996), estando essas informações registradas tanto nos plasmídios (MANDELL; PETRI,1996) como nos cromossomos (STYER, 1992).

As bactérias Gram-negativas apresentam resistência a antibióticos hidrofóbicos que não conseguem atravessar sua membrana externa, diferente dos antibióticos hidrofílicos que são capazes de atravessar a membrana por meio dos canais formados pelas porinas (MANDELL; PETRI, 1996).

A resistência bacteriana pode ser natural ou adquirida. A resistência intrínseca ou natural é característica da espécie bacteriana e possui caráter hereditário, sendo transferida verticalmente para as células-filhas através dos genes cromossômicos, os quais conferem à célula, a ausência de receptores ou a presença de estruturas e/ou mecanismos que anulam a ação das drogas (MANDELL; PETRI, 1996; TAVARES, 2001; TRABULSI, 2004).

A resistência adquirida por uma célula bacteriana sensível é sempre devido a uma alteração genética de caráter bioquímico, sendo essas alterações originadas de mutações cromossômicas, ou pela aquisição de plasmídios de resistência ou por transposons (seqüências de DNA móveis que podem se autoreplicar em um determinado genoma). O antimicrobiano não induz a resistência, mas atua como um selecionador dos mais resistentes no meio de uma população bacteriana. A resistência cromossômica e a extracromossômica podem ser transferidas de uma bactéria para outra, por diversos mecanismos como a conjugação, a transdução ou transformação. A freqüência de transferência pode ser muito elevada ocorrendo entre a mesma espécie ou entre espécies diferentes (TRABULSI, 2004).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção das amostras

Para a realização deste trabalho foram utilizadas cepas isoladas da hemolinfa de camarão *Litopenaeus vannamei* oriundas de três fazendas de cultivo localizadas nas cidades de Acaraú, Granja e Aracati, municípios do Estado do Ceará (Figura 1). As estirpes foram obtidas em uma pesquisa anterior e atualmente fazem parte do acervo do Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado do Instituto de Ciências do Mar.

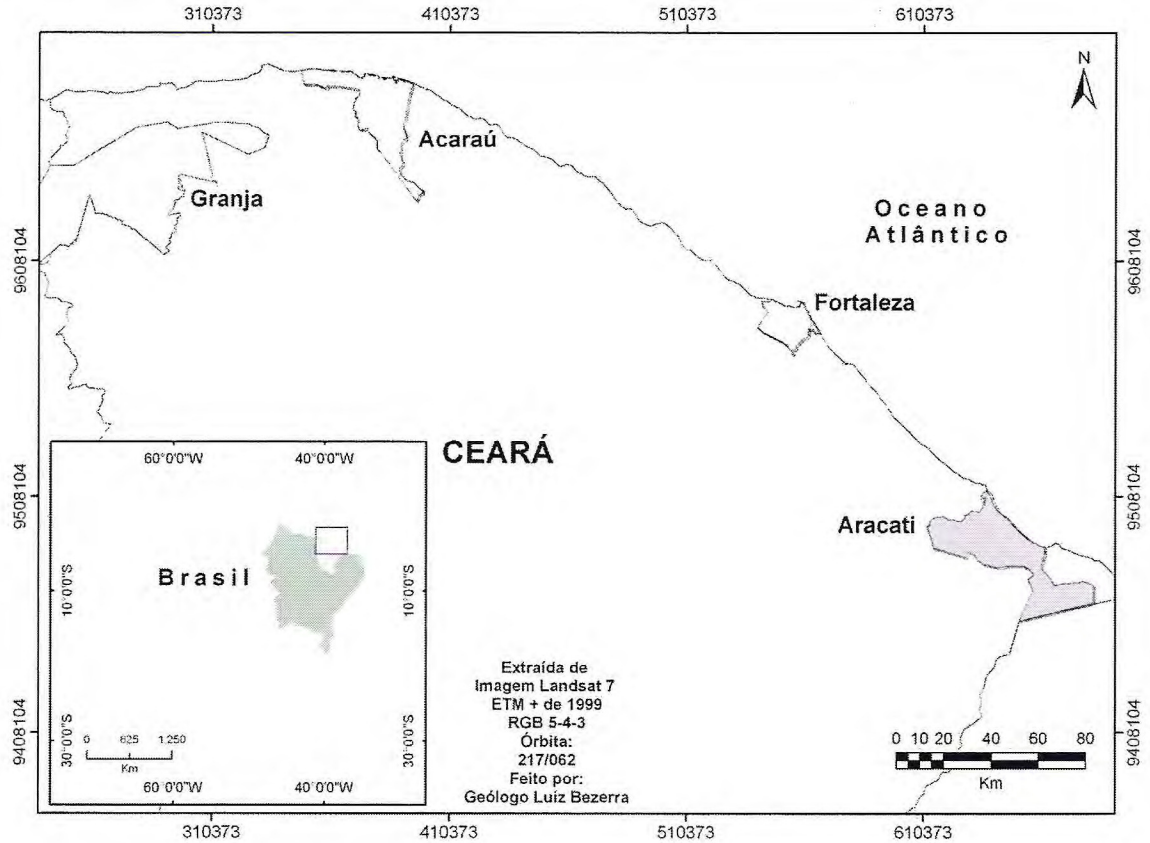


Figura 1 - Mapa das localidades das fazendas de carcinicultura em Granja, Acaraú e Aracati – Estado do Ceará, de onde procederam as amostras de camarão *Litopenaeus vannamei.*

3.2. Preparação das amostras

As cepas eram assim dispostas: cinco de *V. alginolyticus,* uma de *V. carchariae*, doze de *V. harveyi*, oito de *V. parahaemolyticus* e uma de *V. vulnificus.* Elas eram mantidas no laboratório de microbiologia ambiental e do pescado, em estufa B.O.D à temperatura de 23°C e foram renovadas em Caldo Tripticase Soja (TSB) 1% de NaCl e incubadas à temperatura de 35° C por um período de 24 horas. Os tubos que apresentaram crescimento em TSB contendo 1% de NaCl, foram inoculados em placas com ágar Tiossulfato Citrato Bile Sacarose (TCBS) e incubadas a 35°C/24h, para constatação da pureza das colônias. Após essa etapa, as colônias foram transferidas para tubos com Ágar Tripticase Soja 1% (TSA) que foram incubados a 35°C/24h. A partir de então, com as colônias puras, foram realizados os testes antimicrobianos (Figura 02).

3.3. Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos (Teste de Kirby- Bauer).

O antibiograma das cepas de *Vibrio* foi realizado pelo método de difusão em placa (BAUER et al., 1966), seguindo-se a metodologia proposta por Kirby– Bauer, segundo a orientação técnica ditada pelo National Committe for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2005)(Figura 02).

Os discos antimicrobianos estavam mantidos sob refrigeração à temperatura de 2 a 8 °C, e foram utilizados dentro do prazo de validade. Antes de serem testados, foram deixados à temperatura ambiente por aproximadamente duas horas.

Após o crescimento bacteriano em TSA contendo 1% de NaCl, uma alçada foi transferida e inoculada em tubos contendo 9mL de solução salina estéril na concentração de 1%, até obtenção do padrão de densidade óptica da escala de McFarland de 0,5, através de espectrofotômetro (Micronal B 542). Esta turvação representa uma concentração bacteriana de 5 x 10^5 unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL)(TRABULSI, 2004). Das soluções ajustadas foram retiradas inóculos com emprego de "swab" estéril semeados em placas de Ágar

Muller-Hinton com 1% de NaCl. Os discos impregnados de antibióticos foram aplicados na superfície da placa com o auxílio de uma pinça flambada e levemente pressionados no meio. Os antibióticos utilizados foram Ampicilina (AMP), Amicacina (AMI), Ciprofloxacin (CIP), Ácido Nalidixico (NAL), Florfenicol (FLF), Cloranfenicol (CLO), Nitrofurantoina (NIT), Sulfazotrim (SUT), Tetraciclina (TET) e Oxitetraciclina (OXI). Passados 15 minutos, as placas eram então invertidas e incubadas à temperatura de 35° C/ 24h. Após este tempo, com o auxílio de um paquímetro, procedeu-se a medição dos halos, cujos resultados foram comparados com os fornecidos pelo laboratório do fabricante dos discos (Quadro 1), e que classifica as cepas como sensíveis, intermediárias ou resistentes.

Quadro1 - Padrão de interpretação do teste de difusão com medidas dos halos e resultados para sensibilidade, resistência, e comportamento intermediário das cepas testadas frente aos antimicrobianos escolhidos.

Antibióticos	Símbolo	Conc. Discos	Resistente	Intermediário	Sensível
Ác.nalidíxico	NAL	30 mcg	⊠ 13	14 a 18	⊙ 19
Amicacina	AMI	30 mcg	⊠ 14	15 a 16	⊙ 17
Ampicilina	AMP	10 mcg	⊠ 13	14 a 16	⊙ 17
Ciprofloxacin	CIP	5 mcg	⊠ 15	16 a 20	⊙ 21
Cloranfenicol	CLO	30 mcg	⊠ 12	13 a 17	⊙ 18
Florfenicol	FLO	30 mcg	⊠ 10	11 a 15	⊙ 16
Nitrofurantoína	NIT	300 mcg	⊠ 14	15 a 16	⊙ 17
Oxitetraciclina	OXI	30 mcg	⊠ 11	12 a 14	⊙ 15
Sulfazotrin	SUT	25 mcg	⊠ 10	11 a 15	⊙16
Tetraciclina	TET	30 mcg	⊠ 11	12 a 14	⊙ 15

Fonte: CECON (2003)

3.4. FLUXOGRAMA

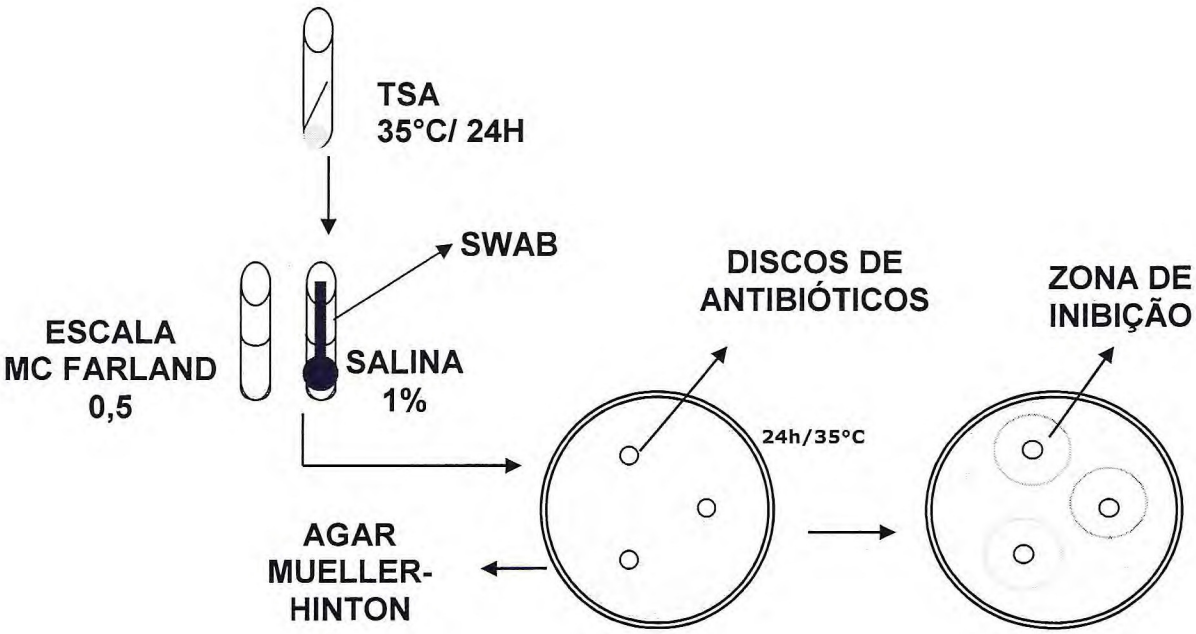


Figura 2 – Fluxograma do antibiograma

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da susceptibilidade aos antimicrobianos empregados estão dispostos na Tabela 1.

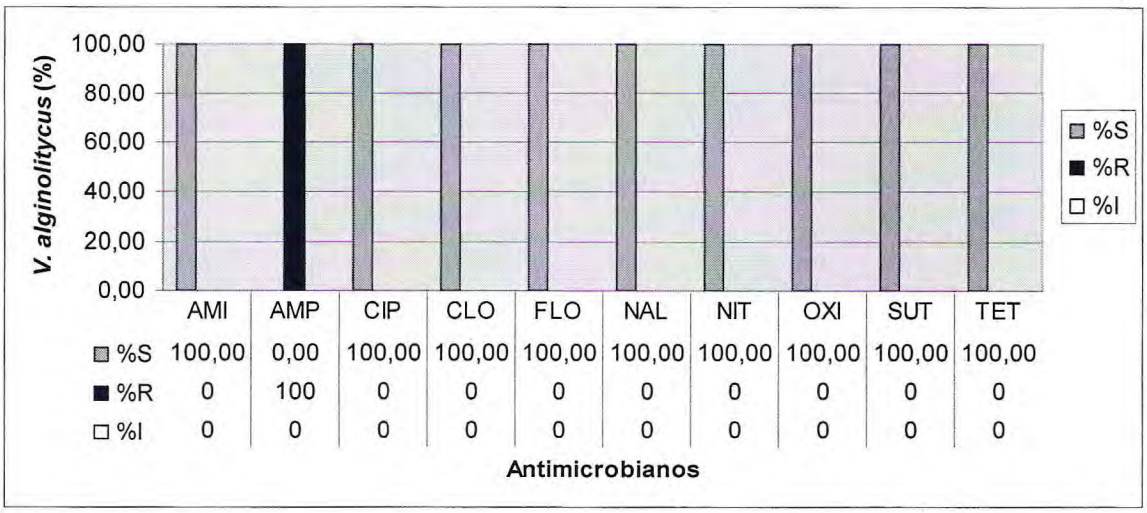
Tabela 1 – Perfil da susceptibilidade aos antimicrobianos das 27 cepas de *Vibrio* isoladas da hemolinfa do camarão *Litopenaeus vannamei* de fazendas de cultivo situadas em Aracati, Acaraú e Granja no Estado do Ceará.

Amostras	AMI	AMP	CIP	CLO	FLF	NAL	NIT	OXI	SUT	TET
1 V. alginolyticus	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
2 V. alginolyticus	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
3 V. harveyi	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
4 V. harveyi	I	R	S	S	S	S	S	S	S	S
5 V. harveyi	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
6 V. harveyi	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
7 V. parahaemolyticus	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
8 V. harveyi	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
9 V. alginolyticus	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
10 V. harveyi	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
11 V. alginolyticus	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
12 V. alginolyticus	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
13 V. harveyi	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
14 V. harveyi	I	R	S	S	S	S	S	R	S	R
15 V. parahaemolyticus	I	R	S	S	S	S	S	S	S	S
16 V. parahaemolyticus	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
17 V. parahaemolyticus	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
18 V. parahaemolyticus	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
19 V. parahaemolyticus	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
20 V. carchariae	I	R	S	S	S	S	S	S	S	S
21 V. parahaemolyticus	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
22 V. parahaemolyticus	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
23 V. harveyi	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R
24 V. vulnificus	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
25 V. harveyi	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
26 V. harveyi	I	R	S	S	S	S	S	S	S	S
27 V. harveyi	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S

R, resistente; I, intermediário; S, sensível;

AMI, Amicacina; AMP, Ampicilina; CIP, Ciprofloxacin; CLO, Cloranfenicol; FLF, Florfenicol; NAL, Ácido nalidíxico; NIT, Nitrofurantoína; OXI, Oxitetraciclina; SUT, Sulfazotrim; TET, Tetraciclina.

Todas as cepas de *V. alginolyticus* apresentaram resistência a AMP, mas, foram sensíveis aos outros antimicrobianos testados: AMI, CIP, CLO, FLO, NAL, NIT, OXI, SUT e TET (Figura 3).



	AMI	AMP	CIP	CLO	FLO	NAL	NIT	OXI	SUT	TET
%S	100,00	0,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
%R	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
%I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

R, resistente; I, intermediário; S, sensível

AMI, Amicacina; AMP, Ampicilina; CIP, Ciprofloxacin; CLO, Cloranfenicol; FLF, Florfenicol; NAL, Ácido nalidíxico; NIT, Nitrofurantoína; OXI, Oxitetraciclina; SUT, Sulfazotrim; TET, Tetraciclina.

Figura 03 – Percentual de susceptibilidade a antimicrobianos de cepas de *V. alginolyticus* (%) isoladas de hemolinfa de camarão *Litopenaeus vannamei* provenientes de três fazendas de cultivo situadas em Aracati, Acaraú e Granja no Estado do Ceará.

Zanetti et al. (2001), testando a susceptibilidade de 54 cepas de *Vibrio* spp., isoladas das águas costeiras do Nordeste da Sardenha, na Itália: 40 (quarenta) *V. alginolyticus*, 8 (oito) *V. parahaemolyticus* e 6 (seis) *V. vulnificus*, concluíram que mais de 80% dos víbrios isolados apresentaram resistência para ampicilina, resultados semelhantes aos apresentados no presente estudo.

A resistência mediada por plasmídio é bastante comum nesses grupos de drogas (PRESCOT, 2003). Plasmídios com genes de resistência são detectados na maioria dos grupos bacterianos e podem ser isolados de bactérias da microbiota normal de animais de produção saudáveis (SORUM; LABÈE-LUND, 2002).

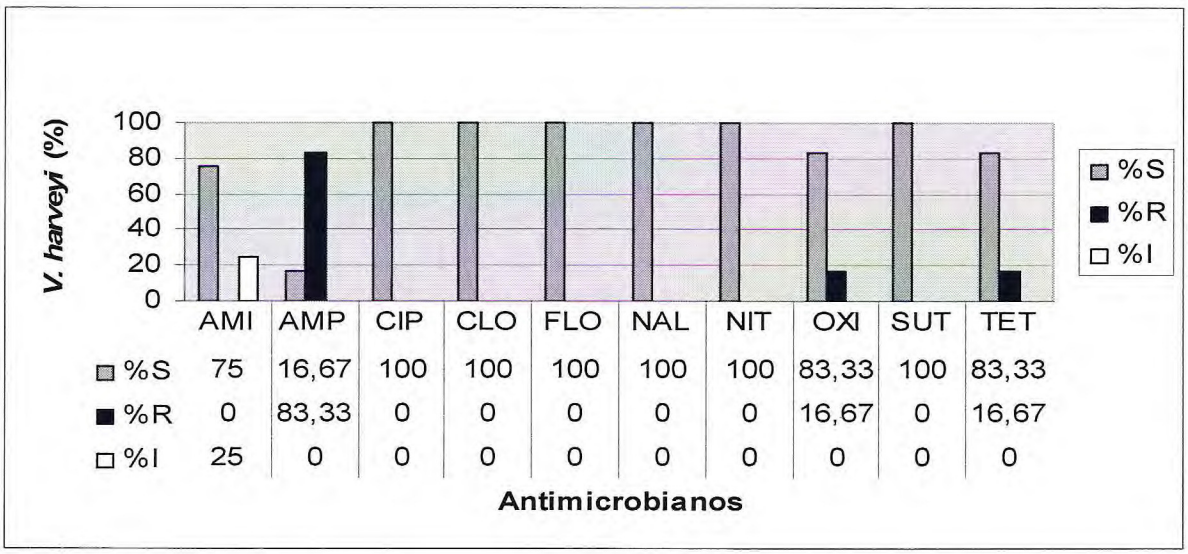
Vibrio carchariae foi resistente a AMP, intermediário a AMI e sensível aos outros antimicrobianos testados: CIP, CLO, FLO, NAL, NIT, OXI, SUT e a TET.

YII et al., (1997) isolaram do cultivo, V. *carchariae* proveniente de *Epinephelus coioides,* uma espécie de peixe da família Serranidae, depois da ocorrência de mortalidades, caracterizados pala inchação do intestino, ocorrido no

verão de 1993, em Taiwan. Uma cepa foi isolada, caracterizada e identificada como *V. carchariae* e foi sensível a CLO, a Doxicyclina - HCl, a NAL, a Ácido oxolínico, a OXI e a Sulfanamida, sendo resistente a Ampicilina e a Penicilina G, com perfil de comportamento semelhante aos apresentados neste estudo.

No Brasil, estudos revelaram a prevalência de *Vibrio parahaemolyticus, Vibrio carchariae, Vibrio alginolyticus* e *Vibrio vulnificus* no ambiente aquático, particularmente salino e também a partir de alimentos de origem marinha, ressaltando-se que a freqüência de isolamento desses patógenos costuma ser mais elevada nos meses de verão, tanto nas regiões de clima temperado como tropical, sugerindo uma característica de sazonalidade (PEREIRA et al., 2007).

Todas as cepas de *V. harveyi* foram sensíveis a CIP, CLO, NAL, NIT OXI, SUT e a TET. Dez cepas (83,3%) de *V. harveyi* apresentaram resistências a AMP e 2 cepas (16,7%) foram resistentes tanto a OXI como a TET. Foram intermediárias a AMI, três cepas (25%). Nove cepas (75%) de *V. harveyi* apresentaram sensibilidade para AMI, duas (16,7%) a AMP, dez (83,3%) a OXI e dez (83,3%) a TET (Figura 04).



R, resistente; I, intermediário; S, sensível

AMI, Amicacina; AMP, Ampicilina; CIP, Ciprofloxacin; CLO, Cloranfenicol; FLF, Florfenicol; NAL, Ácido nalidíxico; NIT, Nitrofurantoína; OXI, Oxitetraciclina; SUT, Sulfazotrim; TET, Tetraciclina.

Figura 04 – Percentual de susceptibilidade a antimicrobianos da cepa de *V. harveyi* (%) isolada de hemolinfa de camarão *Litopenaeus vannamei* proveniente de três fazendas de cultivo situadas em Aracati, Acaraú e Granja no Estado do Ceará.

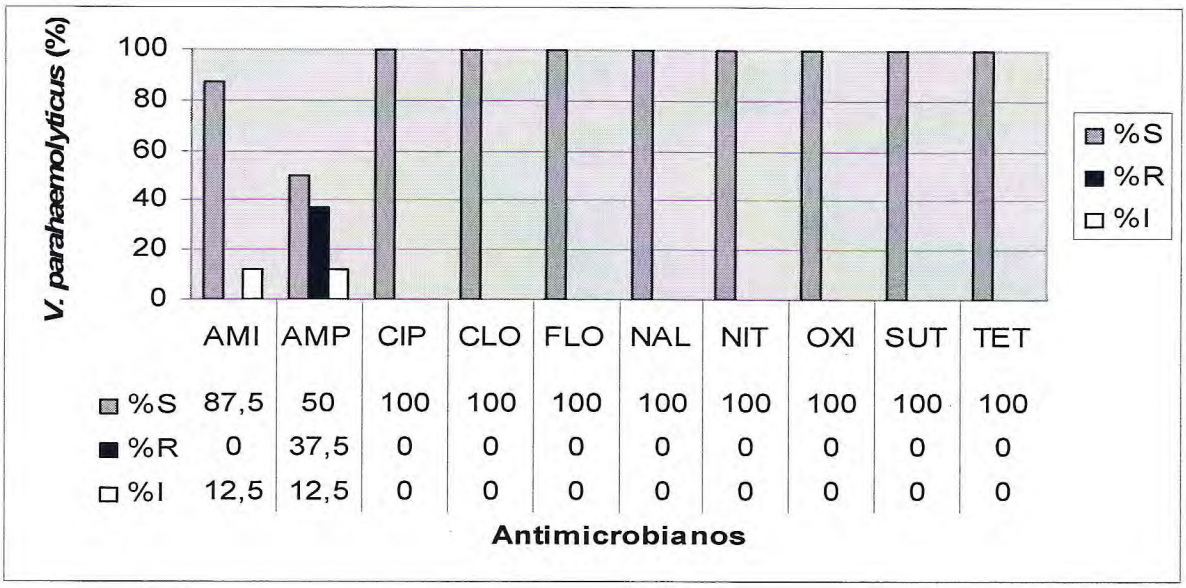
Um fato que chama atenção é o surgimento de uma cepa que apresentou múltipla resistência para AMP, OXI e TET. Segundo Trabulsi (2004), multiresistência é a resistência que uma bactéria apresenta a dois ou mais antibacterianos.

Ottaviani et al. (2001), testando a susceptibilidade de 71 cepas de víbrios de diferentes espécies, oriundas de frutos do mar, frente à 27 antimicrobianos, concluíram que mais da metade das cepas de *V. alginolyticus, V. harveyi, V. vulnificus* e *V. parahaemolyticus* foram resistentes a ampicilina, carbenicilina, cefalotina e penicilina. *V. harveyi, V. parahaemolyticus* e *V. alginolyticus* apresentaram múltipla resistência para diferentes combinações de antimicrobianos, confirmando os resultados obtidos no presente estudo.

Muñoz et al., (2000) relatam que o aumento da produção de espécies ativas de oxigênio (EAO) em *Litopenaeus vannamei* está associado a bactérias do gênero *Vibrio,* uma vez que, a espécie *V harveyi* não é capaz de estimular a produção de ânion superóxido pelos hemócitos de *L. vannamei*, explicando a sua patogenicidade a essa espécie de camarão.

Segundo Vivekanandhan et al. (2000) a múltipla resistência a antimicrobianos é alta em ambientes onde há o uso constante de drogas. O trato gastrintestinal do homem e animais é um local favorável a troca de genes de resistência entre bactéria da microbiota e até entre bactérias patogênicas (SMITH ; LEWIN, 1993).

Dentre as cepas analisadas neste estudo, as cepas de *V. parahaemolyticus* testadas, três (37,5%) foram resistentes a AMP, sete (87,5%) apresentaram sensibilidade a AMI e uma (12,5 %) apresentou perfil intermediário tanto para AMI como para AMP. Todas as cepas foram sensíveis a CIP, CLO, NAL, NIT, OXI, SUT e TET (Figura 05).



R, resistente; I, intermediário; S, sensível

AMI, Amicacina; AMP, Ampicilina; CIP, Ciprofloxacin; CLO, Cloranfenicol; FLF, Florfenicol; NAL, Ácido nalidíxico; NIT, Nitrofurantoína; OXI, Oxitetraciclina; SUT, Sulfazotrim; TET, Tetraciclina

Figura 05 – Percentual de susceptibilidade a antimicrobianos da cepa de *V. parahaemolyticus* (%) isolada de hemolinfa de camarão *Litopenaeus vannamei* proveniente de três fazendas de cultivo situadas em Aracati, Acaraú e Granja no Estado do Ceará.

Costa (2006) realizando pesquisa de víbrios em camarão de cultivo *Litopenaeus vannamei* nas fases de pós-larvas, juvenil e adulto em fazendas de carcinicultura de Camocim – Estado do Ceará concluiu que 75% das cepas de *V. parahaemolyticus* apresentaram resistências a ampicilina.

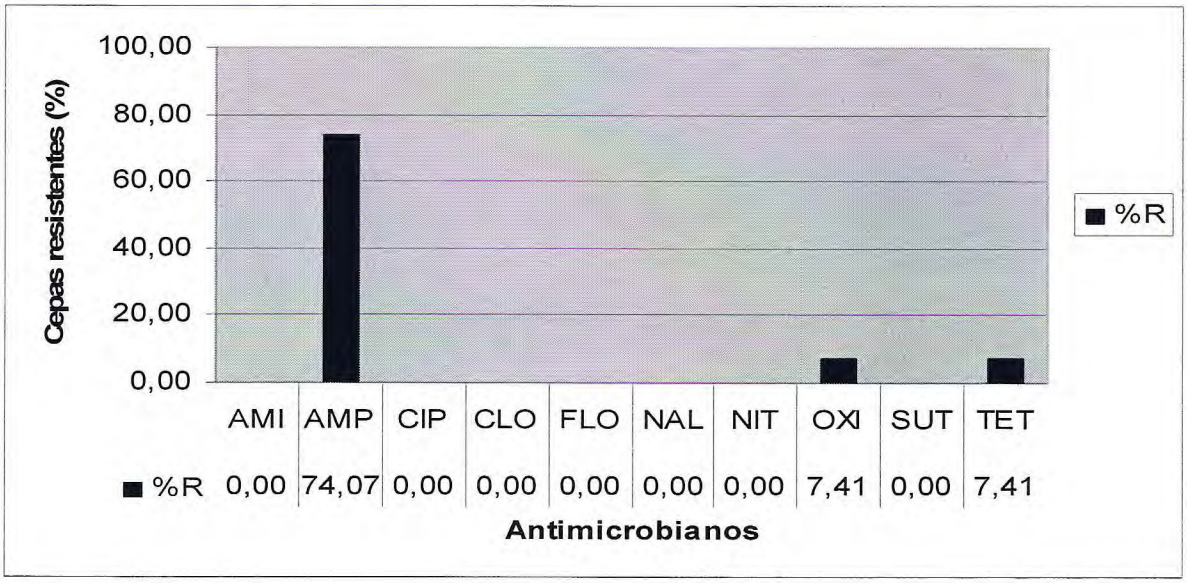
V. parahaemolyticus está associado a surtos de gastrenterites em vários paises do mundo, pois a ocorrência desses microrganismos na microbiota do camarão adulto é considerada como um possível risco á saúde pública. Heitmanng et al., (2005) detectaram no Chile, desde 1998, três surtos de gastrenterite causados por *V. parahaemolyticus*. Em 2005, um surto afetou mais de 10.000 pessoas, cujos sintomas foram dores abdominais, febre, vômito, náuseas e diarréia.

A cepa de *V. vulnificus* apresentou resistência a ampicilina e foi sensível para Amicacina, Ciprofloxacin, Cloranfenicol, Florfenicol, Ácido Nalidíxico, Nitrofurantoína, Oxitetraciclina, Sulfazotrim e Tetraciclina.

Nascimento et al. (2001) pesquisando susceptibilidade a antimicrobianos de cepas de *V. vulnificus*, isoladas de camarão, comercializado na feira do Mucuripe, Fortaleza-CE, encontraram cepas sensíveis a Nitrofurantoína, a Ciprofloxacin, a Gentamicina e a Cloranfenicol. Semelhantemente aos nossos resultados, foram detectadas cepas resistentes a Ampicilina e também a Clindamicina, e a Penicilina.

Medidas preventivas e corretivas baseadas nas Boas Práticas de Manufatura (BPM) são necessárias para a redução destes microrganismos nos alimentos, evitando a multiplicação destes patógenos e aumentando a vida útil do produto. Os vibrios estão associados a elevados índices de mortalidade, por septicemia, devido à penetração cutânea em manipuladores, representando um risco para a saúde pública. As BPM são importantes na prevenção de doenças transmitidas por alimentos (DTA´s), a contaminação cruzada e recontaminação dos alimentos preparados (PEREIRA et al., 2007).

Das 27 cepas testadas, vinte (74,07 %) foram resistentes a AMP e duas (7,41%) a OXI e a TET. Observou-se resistência múltipla a AMP, a OXI e a TET para uma cepa de *Vibrio harveyi* (Figura 06).



R, resistente; I, intermediário; S, sensível

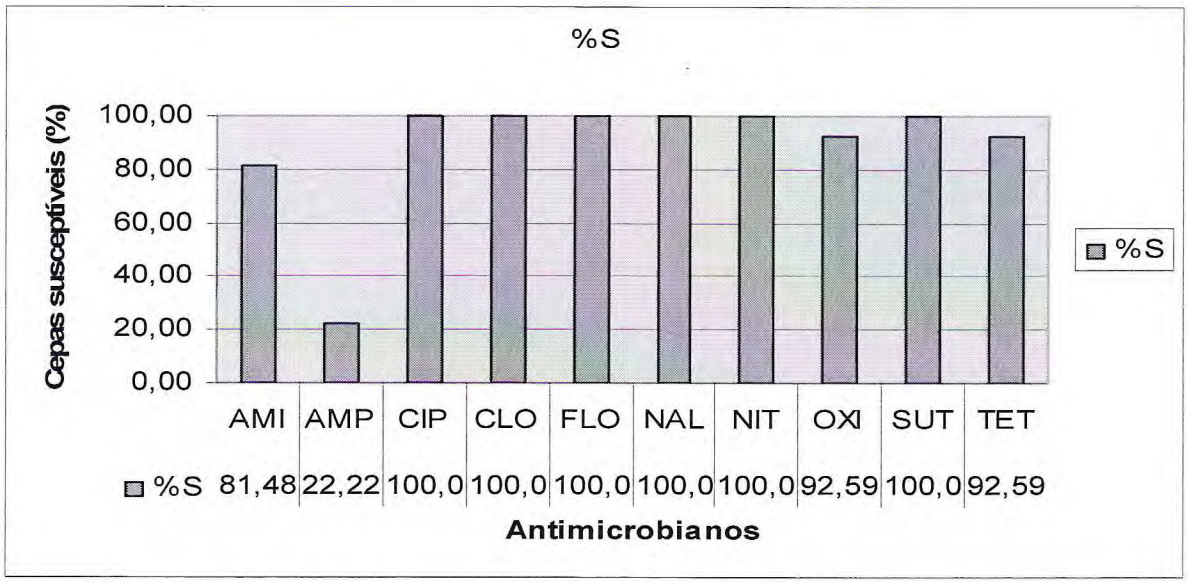
AMI, Amicacina; AMP, Ampicilina; CIP, Ciprofloxacin; CLO, Cloranfenicol; FLF, Florfenicol; NAL, Ácido nalidíxico; NIT, Nitrofurantoína; OXI, Oxitetraciclina; SUT, Sulfazotrim; TET, Tetraciclina.

Figura 06 — Percentual de resistência a 10 antimicrobianos de 27 cepas de *Vibrio* (%) isoladas de hemolinfa de camarão *Litopenaeus vannamei* proveniente de três fazendas de cultivo situadas em Aracati, Acaraú e Granja no Estado do Ceará.

Tjahjadi et al. (1994) demonstraram que *Vibrio* spp. isolados de cultivos de camarão na Indonésia demonstraram múltipla resistência a Ampicilina, a Tetraciclina, a Amoxilina e a Estreptomicina.

A Tetraciclina é uma droga de amplo espectro de atividade e os três mecanismos de resistência a este antimicrobiano são mediados por plasmídios (TENDÊNCIA; DELAPEÑA, 2001), A Normativa 42/1999 do Ministério da Agricultura e do Abastecimento – Secretaria de Defesa Agropecuária recomenda em camarões, como medida profilática contra o agente da necrose hepatopancreática, bem como nas doenças determinadas por bactérias piscicrófilas nas septicemia hemorrágica por *Pseudomonas, Edwarsiella* e *Aeromonas.* Esse uso em carciniculturas pode favorecer ao aparecimento de estirpes resistentes (BRASIL, 1999).

Apresentaram sensibilidade a Amicacina, vinte e duas (81,48%) cepas, a Ampicilina, seis (22,22%), a Oxitetraciclina, dez (92,59%) e a Tetraciclina, dez (92,59%) cepas (Figura 07).



R, resistente; I, intermediário; S, sensível

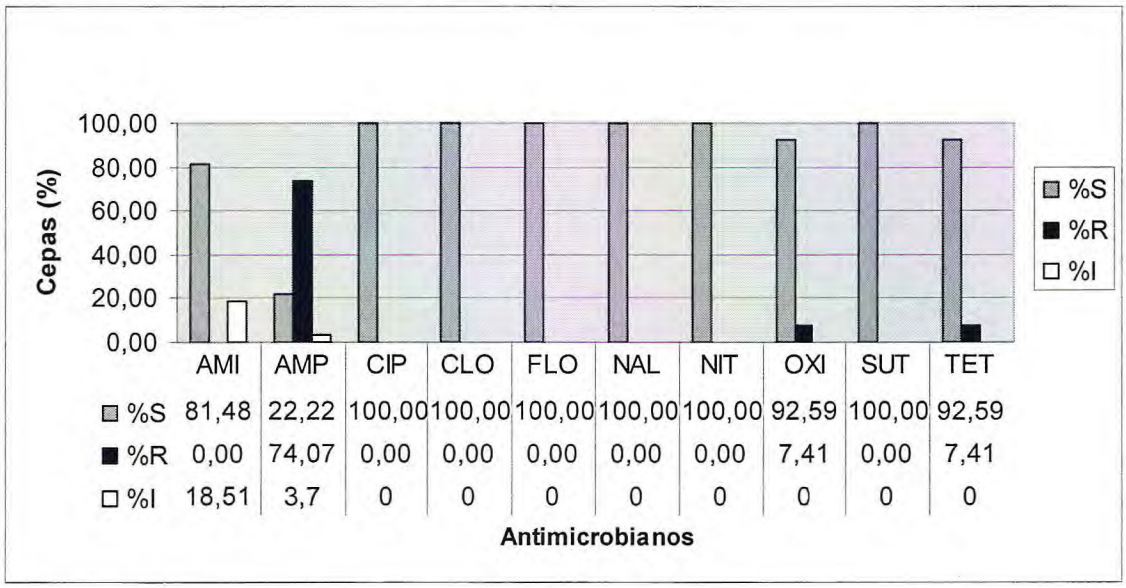
AMI, Amicacina; AMP, Ampicilina; CIP, Ciprofloxacin; CLO, Cloranfenicol; FLF, Florfenicol; NAL, Ácido nalidíxico; NIT, Nitrofurantoína; OXI, Oxitetraciclina; SUT, Sulfazotrim; TET, Tetraciclina.

Figura 07 - Percentual de sensibilidade das 27 cepas de Vibrio isoladas da hemolinfa de camarão *Litopenaeus vannamei* proveniente de três fazendas de cultivo situadas em Aracati, Acaraú e Granja no Estado do Ceará a 10 antimicrobianos testados.

Mendes et al. (2004), testando a susceptibilidade de víbrios isolados da larvicultura de camarão marinho *Litopenaeus vannamei* à enrofloxacina e a Oxitetraciclina observaram que esta foi menos eficaz nas maiores concentrações avaliadas, enquanto todos os microrganismos mostraram sensibilidade para todas as concentrações testadas de enrofloxacina.

Conhecer a sensibilidade "in vitro" destes microrganismos é de fundamental importância para a carcinicultura, pois a grande maioria destes patógenos apresenta variação de sensibilidade constante às drogas, tornando tarefa difícil a indicação de drogas específicas para conter a disseminação desses patógenos no ambiente de cultivo.

Vinte e cinco cepas (92,59%) apresentaram sensibilidade para Oxitetraciclina e Tetraciclina e vinte e duas (81,48%) para Amicacina. Vinte cepas (74,07%) apresentaram resistência para Ampicilina e duas (7,41%) foram resistentes tanto para Oxitetraciclina como Tetraciclina. Cinco cepas (18,51%) apresentaram comportamento intermediário frente a Amicacina e uma (3,7%) a Ampicilina. Uma cepa de V. harveyi apresentou múltipla resistência aos antimicrobianos Ampicilina, Oxitetraciclina e Tetraciclina (Figura 08).



AMI, Amicacina; AMP, Ampicilina; CIP, Ciprofloxacin; CLO, Cloranfenicol; FLF, Florfenicol; NAL, Ácido nalidíxico; NIT, Nitrofurantoína; OXI, Oxitetraciclina; SUT, Sulfazotrim; TET, Tetraciclina.

Figura 08 – Percentual das 27 cepas de *Vibrio ssp.* isoladas de camarão *Litopenaeus vannamei* proveniente de três fazendas de cultivo situadas em Aracati, Acaraú e Granja no Estado do Ceará, com perfis sensíveis, resistentes e intermediária quando testados com 10 antimicrobianos.

Akinbowale et al. (2006), testando 62 cepas de *Vibrio* spp. isoladas de fazendas de aqüicultura, na Austrália, relataram que 74% dos víbrios foram resistentes a pelo menos um antibiótico testado. Dos isolados, 40% foram resistentes a Ampicilina, um pouco abaixo do obtido neste estudo, 5% foram resistentes para Tetraciclina e 6,5% foram resistentes a Oxitetraciclina, dados que se aproximam aos percentuais obtidos neste trabalho

Ottaviani et al. (2001), testando a susceptibilidade de 71 cepas de víbrios de diferentes espécies oriundos de frutos do mar frente à 27 antimicrobianos, uniformemente sensíveis a Cloranfenicol, a Imipenem e a Meropenem. Todas as cepas foram altamente sensíveis a Ácido Nalidíxico, a Ácido Oxolínico, a Cefotaxina, a Doxicyclina, a Flumequina e a Trimetropim-Sulfametoxazole. Todos os isolados, exceto 58% das cepas de *V. alginolyticus,* foram sensíveis a Tetraciclina. Todos os isolados de *V. parahaemolyticus* foram sensíveis a Neomicina e a Oxitetraciclina. Mais de 80% dos isolados apresentaram sensibilidade ao Ácido Nalidíxico e a Ciprofloxacin, sem significante variação entre espécies diferentes.

Além do rígido controle da qualidade de água utilizada nos cultivos e das análises periódicas do camarão, deve-se obter a curva da dinâmica populacional, através do acompanhamento da carga bacteriana da água, com a finalidade de monitorar com eficiência a microbiota de cada viveiro (MENDES et al., 2005).

5. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

As cepas das diferentes espécies de *Vibrio* apresentaram um alto grau de resistência a ampicilina (74,07%) e uma pequena resistência a Oxitetraciclina (7,41%) e a Tetraciclina (7,41).

Todas as cepas apresentaram sensibilidade a Ciprofloxacin, a Cloranfenicol, a Florfenicol, a Ácido Nalidíxico, a Nitrofurantoína e a Sulfazotrim.

O alto grau de resistência frente a Ampicilina levanta a suspeita de sua presença no ambiente aquático em decorrência de seu uso inadequado.

Recomenda-se a realização de testes de perfil de resistência a antimicrobianos para a adequada e correta administração da antibioticoterapia, evitando-se assim abusos no uso das drogas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIRRE-GÚZMAN, G.; RUÍZ, H.M.; ASCENCIO, F. A review of extracellular virulence product of *Vibrio* species important in diseases of cultivated shrimp. **Aquaculture Research**, v. 35, n.15, p. 1395 - 1404, 2004.

AGUIRRE-GUZMÁN, G.; VÁSQUEZ-JUÁREZ, 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, p. 215-219, 2001.

AKINBOWALE, O.L.; PENG, H.; BARTON, M.D. Antimicrobial resistence in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, p. 1103 - 1113, 2006.

AL-AHMAD, A,; DASCHNER, F.D.; KUMMERER, K. Biodegradability of cefotiam, ciprofloxacin, meropenem, penicillin G. an sulfamethoxazole and inhibition of waste bater bacteria. **Archives of Environmental Contamination and toxicology,** v. 37, p. 158 - 163, 1999.

AMORNCHAI, S. Cloramphenicol in Aquaculture. **Aquatic Animal Reserch,** Institute Bangkok, 10900. Thailand. v. 2, n. 1, 2002.

AUSTIN, B.; AUSTIN, D.A. **Bacterial fish pathogens disease in farmed and wild fish,** John Wiley & Soul, West Sussex, 1987, 364p.

AUSTIN, B.; ZHANG, X.H. *Vibrio harveyi:* A significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. **Letters in applied microbiology**, v. 43, p. 119 - 124, 2006.

BACHÈRE, E.; MIALHE, E.; NOËL, D.; BOULO, V.; MORVAN, A.; RODRIGUEZ, J. Knowledge and research prospects in marine mollusc and crustacean immunology. **Aquaculture**, v. 132, p. 17 - 32, 1995.

BACHÈRE, E. Anti-infectious immune effectors in marine invertebrates. Potential tools for disease control in larviculture. **Aquaculture**, v. 227, p. 427 - 438, 2003.

BARRACCO, M.A. Mecanismo de resistência a doenças em crustáceos, in: RANZANI-PAIVA, M.J.T., TAKEMOTO, R.M., LIZAMA, M. DE LOS A.P. (Eds.) **Sanidade de organismos aquáticos**, Editora Varela, p. 49 - 72, 2004.

BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **American Journal Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, p. 493 - 496, 1966.

BRASIL. Instrução Normativa n° 42, de 20 de dezembro de 1999. Altera no âmbito federal o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal – PNCR e os de Controle de Resíduos em Carne – PCRC, Mel – PCRL, Leite – PCRL e Pescado – PCRP. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF 22 dez. 1999, seção 1, p. 213 – 227. Disponível em <

www.agricultura.gov.br/sda/dispoa/in_42_1999.htm >. Acesso em 18 de outubro de 2007.

BRASIL. **Plataforma Tecnológica do Camarão Marinho Cultivado**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Pesca e Aqüicultura. Brasília: MAPAS/SARC/DPA/DPA, CNPQ, ABCC , 2001, 276 p.

BOLETIM DO COMÉRCIO EXTERIOR. Disponível em < www.ipece.ce.gov.br/ estudos_macro/exterior/jan_set_07.pdf >. Acesso em 25 setembro de 2007.

BORGHETTI, J.R.; OSTRENSKY, A.; BOSCARDIN N. R. **Aquicultura: uma visão geral sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no mundo**. Curitiba: GIA, 2003, 129 p.

NETO, F.L.P.; NASCIMENTO, F.O.T.; CARVALHO, J.M.M.; FEITOSA, R.A. **Perspectivas para o desenvolvimento da carcinicultura no Nordeste brasileiro**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, v. 2, 2005, 131 p.

CECON - Centro de Controle e Produtos para Diagnóstico Ltda. **Instruções de uso para discos de sensibilidade bacteriana para antibiograma completo**. São Paulo, 4 p., 2003.

CHAMBERLAIN, G. Cultivo sostenible de camarón: Mitos y realidades. **Infopesca International**. n. 13, p. 31 - 36, 2001.

CHAMBERS, H. F.; SANDE, M. A. Antimicrobial agents: general considerations In: HARDMAN, J.G. & LIMBRID, L.E.: Goodman and Gilman's, **The Pharmacological Basis of Therapeutics,** 9ª ed., International Edition, New York, NY., 1996, 1055 p.

CHENG, S.Y.; HSU, S.W.; CHEN,J.C. Effect of sulfide on the immune response and susceptibility to *Vibrio alginolyticus* in the kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 22, p. 16 - 26, 2007.

CHIQUITO, M. & MONTIANI F. F. **Resistência bacteriana a antibióticos, in: Antibioticoterapia em pequenos animais.** Ed. Ícone, São Paulo, 1997, 214 p.

COSTA, R.A. **Pesquisa de *Vibrio* no cultivo do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* no Estado do Ceará**. Dissertação de mestrado, Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

DESTOUMIEUX, D.; MUÑOZ, M.; COSSEAU, C.; RODRIGUEZ, J.; BULET, P.; COMPS, M.; BACHÉRE, E. Penaeidins. Antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. **Journal of Cell Science**, v. 113, p. 461 – 469, 2000.

DSMZ. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. Disponível em: http://www.dsmz.de/bactnom/bactname.htm. Acesso em 21 de setembro de 2007.

FAO/NACA/UNEP/WB/WWF. **International Principles for Responsible Shrimp Farming.** Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific (NACA). Bangkok, Thailand. 2006, 20 p.

FILOSE, J. Mercado Mundial de Camarón. Estado actual y predicciones. **Panorama Aquícola**, v. 8, n. 5, p. 34 - 37, 2003.

GARCIA-ULLOA, M. Aditivos nutricionales: probióticos. **Panorama aquícola**, v. 8, n. 5, p. 38, 2003.

GARGIONI, R.; BARRACCO, M.A. Hemocytes of the palaemonids Macrobrachium rosenbergiiand M. acanthurus, and of the Penaeid Penaeus paulensis. **Journal of Morphology,** v. 236, p. 209 - 221,1998.

GEORGE, M.R.; JOHN, K.R.; YIAPPAN,T.; JEYASEELAN, M.J.P. Genetic heterogeneity among *Vibrio alginolyticus* isolated from shrimp farm by PCR fingerprinting. **Letters in applied microbiology**, v. 40, p. 369 - 372, 2005.

GOMEZ-GIL, B.; ROQUE, A E TURNBULL, J.F. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. **Aquaculture**, v. 191, p. 259 - 270, 2000.

HANEKAMP, J.C. Cloranfenicol revisado. Tolerância zero, mas problemática e "sempre em movimento". **Revista da ABCC**, Natal, n. 4, p. 37 - 43, 2003.

HAUTON, C.; WILLIAMS, J.A.; HAWKINS L.E. The effects of a live in vivo pathogenic infection on aspects of the immunocompetence of the common shorecrab,*Carcinusmaenas* (L.). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 211, p. 115 - 128, 1997.

HEITMANNG., I; JOFRÉ M., L.; HORMÁZABAL O., J. C.; OLEA N., A.; VALLEBUONA S.,C.&VALDÉS H., C. Revisión y recomendaciones para el manejo de diarrea por *Vibrio parahaemolyticus*. Review and guidelines for treatment of diarrhea caused by *Vibrio parahaemolyticus.* **Revista chilena de infectología**, v. 22, n. 2, p. 131 - 140, 2005.

KAUTSKY, P.; RONBACK, M; TEDENGREN E TROELL, M. Ecosystem perspectives on management of disease of shrimp pond farming. **Aquaculture**, v. 191, p. 145 - 161, 2000.

KÜMMERER, K. Resistance in the environment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy,** v. 54, p. 311 – 320, 2004.

KURTZ, J.; FRANZ, K. Evidence for memory in invertebrate immunity. **Nature,** v. 425, p. 37 - 38, 2003.

JOHANSSON, M. W.; SÖDERHÄLL, K. Cellular immunity in crustaceans and the proPO system. **Parasitology Today**, v. 5, p. 171 - 176, 1989.

JOHANSSON, M.W.; KEYSER, P.; SRITUNYALUCKSANA, K.; SÖDERHÄLL, K. Crustaceans haemocytes and haematopoieses. **Aquaculture**, v. 191, p. 45 - 52, 2000.

LAVILLA-PITOGO, C. R.; LEAÑO, E. M.; PANER, M. G. Mortalities of pond-cultured juvenile shrimp, *Penaeus monodon*, associated with dominance of luminescent Vibrios in the rearing environment. **Aquaculture**, v. 164, p. 337 - 349, 1998.

LE MOULLAC, G.; HAFFNER, P. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. **Aquaculture,** v. 191, p. 121 - 131, 2000.

LE MOULLAC, G.; SOYEZ, C.; SAULNIER, D.; ANSQUER, D.; AVARRE J.C.; LEVY, P. Effect of hypoxic stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 8, p. 621 - 629, 1998.

LIGHTER, D.V.; REDMAN, R.M; Shrimp diseases and current diagnostic methods. **Aquaculture**, v. 164, p. 201 - 220, 1998.

LIU, C.H.; CHEN, J.C.; YEH, S.T. Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 16, p. 321 - 334, 2004.

MACHADO, Z. L. **Camarão marinho: captura – cultivo – conservação – comercialização.** Recife: SUDENE / PRN, 1988, 249 p.

MACMILLAN, J.R. **Resposta: os perigos do uso de antibióticos na aquaculture**. 2003. Disponivel em www.aqualider.com.br/article.php?recid=88&hl=macmillan - Acesso em 15 de setembro de 2007.

MAEDA, M.; NOGAMI, K.; KANEMATSU, M.; HIRAYAMA, K. The concept of biological control methods in aquaculture. **Hydrobiologia**, v. 358, p. 285 - 290, 1997.

MANDELL, G. I.; PETRI J.; W. A. Antimicrobial agents: general considetarions. In: HARDMAN, J.G. and LIMBIRD, L. E.: Goodman and Gilman's. **The pharmacological basis of therapeutics**, 9ª ed.; International Edition, New York, NY. 1996, 1223 p.

MARTIN, G.G.; POOLE, D.; HOSE, J.E.; ARIAS, M.; REYNOLDS, L.; MCKRELL, N.; WHANG,A. Clearance of bacteria injected into the hemolymph of the penaeid shrimp sicyonia ingentis. **Journal of invertebrates pathology**, v. 62, p. 3008 - 315, 1993.

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.** Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais. Universidade Federal de São Carlos. São Paulo, 2003, 117 p.

MELO, S. Reaberto mercado americano para o camarão brasileiro. **Panorama da Aqüicultura**. v. 14, n. 86, p. 51 - 52, 2004.

MENDES, E.S.; ALVES, C.A.B.; BEZERRA, S.S.; MENDES, P.P.; SANTOS, F.L. Sensibilidade in vitro a enrofloxacina e oxitetraciclina de Vibrios isolados na larvicultura de camarão marinho *Litopenaeus vannamei*. **Cienc. vet. trop.,** Recife, v. 7, n. 2 e 3, p. 90 - 97, 2004.

MENDES, S.E.; MENDES, P.P.; GOÉS, L.M.N.B.; BEZERRA, S.S.; VIEIRA, K.P.B.A. Os víbrios na carcinicultura. **Panorama da Aqüicultura**, v. 15, p. 26 - 29, 2005.

MENDOÇA, R. Camarão campeão. **Revista Epóca**, Editora Globo, n. 291, p. 108 - 109, 2003.

MONTGOMERY, M.T.; KIRCHMAN, D.L. Role of chitinbinding proteins in the specific attachment of the marine bacterium *Vibrio harveyi* to chitin. **Appliied Environmental Microbiology**, v. 59, p. 373 - 379, 1993.

MONTOYA, N.; UYAGUARI, M.; SOTOMAYOR, M. Acumulación de antibióticos y su efecto ante la comunidad bacteriana presente en sedimentos de piscinas camaroneras. **Panorama Aquícola,** v. 8, n. 3, p. 70 - 73, 2003.

MORIARTY, D. J. W. **Disease Control in Shrimp Aquiculture with Probiotic Bacteria. Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology**, Halifax, Canada, 1999.

MUNÕZ, M.; CEDENO, R.; RODRIGUEZ, J.; VAN DE KNAAP, W.P.W.; MIALHE, E.; BACHÈRE, E. Measurement of reactive oxigen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, Penaeus vannamei. **Aquaculture**, v. 191, p. 89 - 107, 2000.

NAPPI, A.J.; VASS, E. Melanogenesis and the generation of cytotoxic molecules during insect cellular immune-reactions. **Pigment Cell Research**, v. 6, p. 117 - 126, 1993.

NASCIMENTO, S.M.M; VIEIRA, R.H.S.F; THEOPHILO, G.N.D; RODRIGUES, D.P.; VIEIRA, G.F. *Vibrio vulnificus* as a health hazard for shrimp consumers. **Rev. Inst. Méd. Trop. S. Paulo**, v. 43, p. 263 - 266, 2001.

NCCLS. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORIAL STANDARDS. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement**, v. 25, n. 1, M100-S14, 2005.

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.

NUNES, A. J. P. O cultivo de camarão *Litopenaeus vannamei* em Águas Oligohalinas. **Panorama da Aqüicultura.** Rio de Janeiro, v. 11, n. 66, p. 17 - 23, 2001.

NUNES, A. J. P.; MARTINS, P.C. Avaliando o estado de saúde de camarões marinhos na engorda. **Panorama da Aqüicultura,** Rio de Janeiro, v. 12, n. 72, p. 23 - 33, 2002.

OTTAVIANI, D.; BACCHIOCCHI,I.; MASINI, L.; LEONI, F.; CARRATURO, A.; GIAMMARIOLI, M.; SBARAGLIA, G. Antimicrobial susceptibility of potentially pathogenic halophilic vibrios isolated from seafood. **Internacional Journal of Antimicrobial Agents**, v. 18, p. 135 - 140, 2001.

PERAZZOLO, L.M.; GARGIONI, R.; OGLIARI, P.; BARRACCO, M.A. Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress. **Aquaculture,** v. 214, p. 19 - 33, 2002.

PEREIRA, C.S.; VIANA, C.M.; RODRIGUES, D.P. Vibrios patogênicos em ostras (*Cassostrea rhizophorae*), servidas em restaurantes no Rio de Janeiro. Um alerta para a saúde pública. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 3, 2007.

PINHEIRO, V.B.; ELLAR, D.J.; How to kill a mocking bug? **Cellular Microbiology**, v. 8, p. 545 - 557, 2006.

PLUMB, J.A. **Aquaculture in the United States approach to infectious diseases and use of antibiotics.** Disponível em < www.fda.gov/ cvm/documents/ s2_plumb.doc >. Acesso em 23 de outubro de 2007.

PRESCOT, J. F. Quimioterapia antimicrobiana. In: HIRSH,D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 27 - 46. 2003.

RINGO, E; GATESOUP, F.O.J. Lactic acid bacteria fish: a review. **Aquaculture**, v. 160, p. 177 - 203, 1998.

ROBERTSON, P.A.W.; CALDERON, J.; CARRERA, L.; STARK, J.R.; ZHERDMANT, M. AUSTIN, B. Experimental *Vibrio harveyi* infections in *penaeus vannamei* larvae. **Diseases of Aquatics Organisms**, v. 32, p. 151 - 155, 1998.

ROCHA, I.P.; MAIA, E.P. Desenvolvimento Tecnológico e Perspectivas de Crescimento da Carcinicultura Marinha Brasileira. In: Aqüicultura Brasil 98, **Anais**, v. 1, Recife, p. 213, 1998.

ROCHA, I.P.; ROCHA, B.M. Carcinicultura: produção, demanda e processo tecnológico com responsabilidade ambiental e compromisso social. **Revista da ABCC**, Natal, n. 1, p. 16 - 22, 2007.

RODRIGUEZ, J.; LE MOULLAC, G. State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. **Aquaculture,** v. 108, p. 1043 - 1050, 2000.

SAULNIER, D.; HAFFNER, P.; GOARANT, C.; LEVY, P.; ANSQUER, D. Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. **Aquaculture,** v. 191, p. 133 - 144, 2000.

SEIFFERT, W.Q.; BELTRAME, E; ANDREATTA, E.R.; MAGGIONE, D.S.; Enfermidades: uma oportunidade para repensar o cultivo de camarões marinhos. **Panorama da Aqüicultura,** Rio de Janeiro, v. 16 , n. 97 , p. 32 - 38, 2006.

SÖDERHÄLL, K.; CERENIUS, L. Crustacean immunity. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 2, p. 3 - 23, 1992.

SÖDERHÄLL, K.; THÖRNQVIST, P. O. Crustacean immunity – A short review. In: Gudding, R.; Lillehaug, A.; Midtlyng, P. J.; Brown, F. **Fish Vaccinology,** v. 90, p. 45 - 51, 1997.

SÖDERHÄLL, K.; CERENIUS, L. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 10, p. 23 - 28, 1998.

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

SMITH, J. T.; LEWIN, C. S. Mechanisms of antimicrobial resistance and implications for epidemiology. **Veterinary Microbiology**, v. 35, p. 233 - 242, 1993.

SORUM, H.; LABÉE-LUND, T. M. Antibiotic resistance infood-related bacteria: a result of interfering with the globalweb of bacterial genetics. **International Journal Food Microbiology**, Amsterdam, v. 78, p. 43 - 56, 2002.

SOULAP, E. **Nuevas alternativas de cultivos acuícolas**. 1 ed. Guaiaquiu. Ecuador ed. Ener Soulap, 1999, 442 p.

SRITUNYALUCKSANA, K.; SÖDERHÄLL, K. The proPO and clotting system in crustaceans. **Aquaculture**, v. 191, p. 53 - 69, 2000.

STYER, L. **Bioquímica**. Terceira edição, Guanabara, Rio de Janeiro, 1992, 881 p.

TAVARES, W.; **Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antifecciosos.** 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2001, 816 p.

TENDENCIA, E. A.; DELA PEÑA, L. D. Antibiotic resistance of bacteria from shrimp ponds. **Aquaculture**, v. 195, p. 193 - 204, 2001.

TEO, J.W.P; TAN, T.M.C. and POH, C.L. Genetic Determination of Tetracycline Resistance in *Vibrio* Antimicrobial. **Agents Chemother.**, v. 4, n. 46, p. 1038 - 1045, 2002.

THÖRNQVIST, P.O.; SÖDERHÄLL, K. Crustacean Immune Reactions, a Short Review. In: **Diseases in Asian Aquaculture III**, (ed. Flegel, T.W.; MacRae, I.H.), Manila: Fish Heath Section, Asian Fisheries Society, p. 203 – 218, 1997.

THOMPSON, R. J.; RANDA, M.A.; MARCELINO, L. A.; TOMITA-MITCHELL, A.; LIM, E. & POLZ, M. F. Diversity and dynamics of a North Atlantic coastal *Vibrio* community. ***Appl. Environ. Microbiol.***, v. 70, n. 7, p. 4103 - 4110, 2004

TJAHJADI, M.R.; ANGKA, S.L.; SUWANTO, A. Isolation and evaluation of marine bactéria for biocontrol of luminous bacterial disease in tiger shrimp larvae (*Penaeus monodon).* **Asia Pac. J.Mol. Biol. Biotechnol**, v. 2, p. 347 - 352, 1994.

TRABULSI, R. L., ALTERTHUM, F.; **Microbiologia.** 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2004, 718 p.

VADSTEIN, O. A strategy to obtain microbial control during larval development of marine fish. In: REINERTSEN, H. et al. (Eds) **Fish farming technology**. Balkema Publishers, p. 69 - 75, 1993.

VALLE, J. C.; TORRES, A.; SAN MIGUEL, L. Y HARO, G. Efecto Timsen sobre la carga de *vibrios spp* en el cultivo de camarón. **Panorama Aquícola,** v. 8 n. 1, p. 52 – 53, 2002.

VAN DE BRAAK, C.B.T.; BOTTERBLOM, M.H.A.; LIU W.; VAN DER KNAAP, W.P.W.; ROMBOUT, J.H.W.M. The role of the haematopoietic tissue in haemocyte production and maturation in the black tiger shrimp *(Penaeus monodon*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 12, p. 253 - 272, 2002.

VARGAS - ALBORES, F.; HINOJOSA - BALTAZAR, P.; PORTILLO - CLARK, G.; MAGALLÓN - BARAJAS, F. Infuence of temperature and salinityon the yellow leg shrimp, *Penaeus californiensis* Holmes, prophenoloxidase system. **Aquaculture Research**,v. 29, p. 549 - 553, 1998.

VAZQUEZ, L.; JARAMILLO, L.; LASCURAIN, R.; COOPER, E.L.; ROSAS, P.; ZENTENO, E. Bacterial agglutination by the sialic acid specific serum lectin from *Macrobrachium rosenbergii.* **Comparative biochemistry and Physiology**, v. 113, p. 355 - 359, 1996.

VIVEKANANDHAN, G.; SAVITHAMANI; HATHA, A.A. M. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from marketed fish and prawn of South India. **International Journal Food Microbiology**, v. 76, p. 165 - 168, 2002.

WAINBERG, A. A. Camarão orgânico braisileiro. **Panorama Aquícola**, v. 14, n. 86, p. 13 - 19, 2004.

WANG, F.I.; CHEN, J.C. The immune response of tiger shrimp *Penaeus monodon* and its susceptibility to *Photobacterium damselae* subsp. damselae under temperature stress. **Aquaculture**, v. 258, p. 34 - 41, 2006.

YII, K.C.; YANG, T.I.; LEE, K.K. Isolation and Characterization of *Vibrio carchariae*, a Causative Agent of Gastroenteritis in the Groupers, *Epinephelus coioides.* **Current Microbiology**, v. 35, n. 2, p. 109 - 115, 1997.

ZANETTI, S.; SPANU, T.; DERIU, A.; ROMANO, L; SEEHI, L.A.; FADDA, G. *In vitro* susceptibility of vibrio spp. isolated from the environment. Internacional. **Journal of Antimicrobial Agents**, v. 17, p. 407 - 409, 2001.