



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

LARISSA DOS SANTOS NUNES

**MONITORAMENTO DE ESPÉCIES PERTENCENTES AO GÊNERO *VIBRIO*,
CAUSADORAS DA NECROSE HEPATOPANCREÁTICA AGUDA (AHPND), NO
ESTADO DO CEARÁ**

FORTALEZA

2021

LARISSA DOS SANTOS NUNES

Monografia apresentada ao curso de Engenharia de Pesca do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Engenheiro de Pesca.

Orientador: Profa. Dra. Francisca Gleire Rodrigues de Menezes

FORTALEZA

2021

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)

N926m Nunes, Larissa dos Santos.

Monitoramento de espécies pertencentes ao gênero *Vibrio*, causadoras da necrose hepatopancreática aguda (AHPND), no estado do Ceará / Larissa dos Santos Nunes. – 2021.
53 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2021.

Orientação: Profa. Dra. Francisca Gleire Rodrigues de Menezes.

1. Vibriose . 2. Síndrome da mortalidade precoce . 3. Carcinicultura. I. Título.

CDD 639.2

LARISSA DOS SANTOS NUNES

MONITORAMENTO DE ESPÉCIES PERTENCENTES AO GÊNERO *VIBRIO*
CAUSADORAS DA NECROSE HEPATOPANCREÁTICA AGUDA (AHPND), NO
ESTADO DO CEARÁ

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia de Pesca do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Engenheiro de Pesca.

Aprovada em: 12 /04 /2021.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Francisca Gleire Rodrigues de Menezes (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Fátima Cristiane Teles de Carvalho
Instituto de Ciências do Mar – Labomar

Profa. Dra. Janisi Sales Aragão
Instituto Federal do Ceará (IFCE)

A Deus.

Aos meus pais, Maria Zenir e Raimundo
Nonato, meus irmãos e amigos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, por tudo de bom que tenho, pelas pessoas que colocou em meu caminho e pelo conhecimento que me permitistes adquirir.

Aos meus pais, Maria Zenir e Raimundo Nonato, por todo amor, cuidado e apoio financeiro e emocional durante a graduação, sem vocês não teria sido possível concluir essa fase da minha vida.

Aos meus irmãos, Artur, Laynara, Ivna, Laylson e aos meus familiares.

A Profa. Dra. Francisca Gleire Rodrigues de Menezes pela excelente orientação, pela amizade, paciência e toda a atenção destinada a mim durante os três anos em que me orientou.

A Prof.a Dra. Oscarina Viana de Sousa, minha primeira orientadora na Microbiologia e Dra. Fátima Cristiane Teles, pela paciência de me ensinar, pelo convite para fazer parte do Laboratório de Microbiologia, pela amizade, competência e por todo carinho que recebi nesses anos.

As professoras participantes da banca examinadora, Dra. Fátima Cristiane Teles de Carvalho e Dra. Janisi Sales Aragão, pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Ao meu amigo de bancada, parceiro de pesquisa e minha dupla de laboratório, Márcio Ivis Coutinho, pela paciência, disponibilidade e companhia durante esse projeto.

Ao Dr. Rafael Rocha, pelo tempo concedido e auxílio nas técnicas de biologia molecular e ao Centro de Diagnóstico de Enfermidades de Organismos Aquáticos (CEDECAM) pelo espaço cedido para realização do experimento.

Ao Laboratório de Microbiologia Ambiental e de Pescados (LAMAP) e a todos seus membros, meu muito obrigada, pelas reflexões, críticas, sugestões, correções e principalmente pela disponibilidade para me ajudar nos procedimentos de bancada.

A Leonardo Queiroz, por todo carinho, cuidado, paciência e principalmente compreensão, ao me ouvir por horas falando sobre a rotina de laboratório. Por todo o incentivo à leitura e principalmente pelas vezes que me impulsionou a escrever este documento durante a quarentena. Por todo seu zelo, sou grata.

Aos meus amigos de laboratório Ana Vládila, Alexandra Sampaio, Raquel Cavalcante, Robério Freitas, Yasmin Girão, Ana Paula, Daniel Borges, Gabriel Bezerra, Jhones Vieira, Thereza Martins, João Pedro, Eduarda Torres, Janaína Silva, Sara Andrade e Igor Dantas.

Aos meus amigos de graduação Andressa Maia e Matheus Mota, pela parceria durante esses anos.

Ao departamento de Engenharia de Pesca e todos os seus funcionários.

Ao Instituto de Ciências do Mar (Labomar) da Universidade Federal do Ceará e seus funcionários.

A todos que estiveram de forma direta ou indireta comigo nessa caminhada, o meu muito obrigada!

“Tudo é vário, temporário, efêmero. Nunca
somos, sempre estamos!” (Chico Buarque)

RESUMO

Dentre as principais atividades agropecuárias desenvolvidas em mangues ou arredores podemos destacar a carcinicultura, considerada rentável economicamente e de produtividade superior a maioria das atividades agropecuárias até então desenvolvidas nesse tipo de ambiente. Em contrapartida, atrelado ao desenvolvimento da carcinicultura nessas regiões, houve também um aumento na incidência de enfermidades, principalmente de origem bacteriana, em especial as Vibrioses. Das principais patogenidades ligadas ao gênero *Vibrio* podemos destacar a Necrose Hepatopancreática Aguda (AHPND), anteriormente conhecida como Síndrome da Mortalidade Precoce (EMS), responsável pela redução da produção mundial de *Litopenaeus vannamei*. A fim de estabelecer um monitoramento acerca da presença e da diversidade de espécies do gênero capazes de causar a doença, analisou-se dois (2) estuários de grande importância para a atividade de carcinicultura no estado do Ceará, por meio de coletas de água e sedimento. A quantificação de *Vibrio* total do estuário do Rio Jaguaribe foi de $4,70 \times 10^3$ na primeira coleta e $7,95 \times 10^4$ durante a segunda coleta. Para o estuário do Rio Pirangi, os valores obtidos durante a primeira e a segunda coleta foram de $7,00 \times 10^3$ e $2,4 \times 10^4$, respectivamente. No total foram isoladas 82 amostras, das quais em 6 foram detectados genes que confirmam a presença do plasmídeo causador da AHPND, entretanto incapazes de codificar as toxinas pirA e pirB, envolvidas na patologia. Uma única amostra apresentou positividade para a detecção do *V. parahaemolyticus* causador de AHPND, caracterizando como caso suspeito. As demais amostras, de acordo com o protocolo de diagnóstico utilizado e sugerido pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), não podem ser caracterizadas como casos suspeitos ou confirmados havendo a necessidade de realização de outros testes para tal afirmação. Contudo, a presença de prováveis agentes patogênicos da AHPND é preocupante para os ambientes estudados, devido à proximidade com fazendas de carcinicultura.

Palavras-chave: Vibriose. Síndrome da Mortalidade Precoce. Carcinicultura.

ABSTRACT

Among the main agricultural activities developed in mangroves or surroundings, we can highlight shrimp farming, considered economically profitable and with higher productivity than most agricultural activities developed until then in this type of environment. On the other hand, linked to the development of shrimp farming in these regions, there was also an increase in the incidence of diseases, mainly of bacterial origin, especially *Vibrioses*. Among the main pathogenicities linked to the *Vibrio* genus, we can highlight the Acute Hepatopancreatic Necrosis (AHPND), formerly known as Early Mortality Syndrome (EMS), responsible for the reduction of worldwide production of *Litopenaeus vannamei*. In order to establish a monitoring about the presence and the diversity of species of the genus capable of causing the disease, two (2) estuaries of great importance for the shrimp farming activity in the state of Ceará were analyzed, through collections of water and sediment. The quantification of total balance of the Jaguaribe River estuary was 4.70×10^3 in the first collection and 7.95×10^4 during the second collection. For the Pirangi River estuary, the values obtained during the first and the second collection were 7.00×10^3 and 2.4×10^4 , respectively. In total, 82 samples were isolated, of which 6 were detected genes that confirm the presence of the plasmid causing AHPND, however unable to encode the *pirA* and *pirB* toxins involved in the pathology. A single sample was positive for the detection of *V. parahaemolyticus* that causes AHPND, characterizing it as a suspicious case. The other samples, according to the diagnostic protocol used and suggested by the World Organization for Animal Health (OIE), cannot be characterized as suspected or confirmed cases, with the need to perform other tests for this statement. However, the presence of probable pathogenic agents of AHPND is worrying for the studied environments, due to the proximity to shrimp farms.

Keywords: Vibriosis. Early Mortality Syndrome. Shrimp farming

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Produção de camarões cultivados no Brasil.....	20
Figura 2	– Localização dos pontos de coleta, nos estuários do Rio Jaguaribe e Rio Pirangi	29
Figura 3	– Processamento das amostras de sedimentos, dos estuários do Rio Jaguaribe e Rio Pirangi	31
Figura 4	– Processamento das amostras de água, dos estuários do Rio Jaguaribe e Rio Pirangi	31
Gráfico 1	– Percentual de colônias isoladas, com base no potencial de fermentação da sacarose	42
Quadro 1	– Bactérias do gênero <i>Vibrio</i> relacionadas como agentes etiológicos em eventos de doenças ocorridas em cultivo de camarão	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Volumes utilizados na PCR para verificação de produto da extração de DNA	34
Tabela 2 – Métodos e primers utilizados no protocolo sugerido pela OIE (2019), para detecção do plasmídeo (vPA1) causador da AHPND	35
Tabela 3 – Métodos e primers utilizados no protocolo sugerido pela OIE (2019), para detecção dos genes das toxinas	35
Tabela 4 – Métodos e primers utilizados no protocolo sugerido pela OIE (2019), para detecção de VpAHPND	36
Tabela 5 – Resultado das análises de parâmetros físico-químicos nos estuários dos Rios Jaguaribe e Pirangi (CE)	37
Tabela 6 – Quantificação de bactérias do gênero <i>Vibrio</i> pelo método de Contagem Padrão em Placa (CPP), nas amostras de água e sedimento nas coletas realizadas nos estuários dos Rios Jaguaribe e Pirangi, no Estado do Ceará	39
Tabela 7 – Quantificação de colônias sacarose positivas e sacarose negativas nas amostras de água	41
Tabela 8 – Quantificação de colônias sacarose positivas e sacarose negativas nas amostras de sedimento	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCC	Associação Brasileira de Criadores de Camarão
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
AHPND	Necrose Hepatopancreática Aguda
EMS	Síndrome da Morte Precoce
WSS	Síndrome da Mancha Branca
IHHN	Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética
TSV	Vírus da Síndrome de Taura
TS	Síndrome de Taura
YH	Síndrome da Cabeça Amarela
IMNV	Vírus da Mionecrose Infecciosa
NHP	Hepatopancreatite necrosante
RDS	Síndrome da Deformidade e do Nanismo
NaCl	Cloreto de Sódio
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
vPA1	Plasmídeo causador da AHPND
VpAHPND	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> causador de AHPND
PirA	Toxina causadora da AHPND
PirB	Toxina causadora da AHPND
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
ICAR	Central Institute of Brackishwater Aquaculture

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1	Aquicultura	17
2.2	Carcinicultura	19
2.3	Enfermidades na Carcinicultura	21
2.4	Vibrioses	23
2.6	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	26
2.5	Necrose Hepatopancreática Aguda - AHPND	26
3	MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1	Área de estudo	29
3.2	Coleta das amostras	30
3.3	Análise de fatores extrínsecos	30
3.4	Processamento das amostras	30
3.4.1	<i>Amostras de Sedimento</i>	30
3.4.2	<i>Amostras de Água</i>	31
3.5	Inoculação inicial das amostras	32
3.6	Quantificação e caracterização das colônias presuntivas	32
3.7	Isolamento de colônias em meio não seletivo	32
3.8	Lavagem das placas de Petri	32
3.9	Caracterização Morfotintorial	33
3.10	Extração de DNA total	33
3.11	Amplificação do DNA para confirmação do gênero <i>Vibrio</i>	33
3.12	Diagnóstico da Necrose Hepatopancreática Aguda (AHPND)	34
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	37
4.1	Análise de Fatores Extrínsecos	37
4.2	Quantificação e caracterização de colônias sacarose positiva e negativa	39
4.3	Amplificação do DNA para confirmação do gênero	42
4.4	Diagnóstico da Necrose Hepatopancreática Aguda (AHPND)	43
5	CONCLUSÃO	46
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
	REFERÊNCIAS	48

1 INTRODUÇÃO

A aquicultura, segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, 2018), é um dos setores que mais crescem, quando comparado a outras atividades importantes na produção alimentícia. A compreensão do comportamento dos organismos cultivados, aliado a incentivos econômicos permitiu o desenvolvimento do setor e a melhoria da tecnologia de produção envolvida (LIMA; MENDONÇA FILHO, 2009), tornando a atividade uma alternativa viável para aliviar a exploração sobre os estoques pesqueiros, ao mesmo tempo em que incrementa a oferta de pescados, atendendo as demandas do mercado consumidor (FAO, 2018).

O camarão se apresenta como um dos principais produtos exportados pelo Brasil, representando uma média de aproximadamente 9,45% das exportações de pescado entre 2006 e 2018 (RODRIGUES, 2019). No Brasil, a carcinicultura foi inicialmente implantada em áreas de apicuns dos manguezais, dando início ao desenvolvimento da atividade. Na década de 80 firmou-se como atividade lucrativa, ganhando espaço no agronegócio (NASCIMENTO, 2007). A atividade expandiu-se rapidamente e ganhou espaço na indústria de exportação de pescados, destacando-se por apresentar elevados índices econômicos quando comparadas a outras atividades aquícolas (QUEIROZ *et al.*, 2013).

A intensificação da carcinicultura e a transferência de organismos aquáticos entre países do mundo acarretaram no aumento da incidência de patógenos capazes de afetar a produtividade dos cultivos, prejudicando a sobrevivência e o crescimento dos animais (SAULNIER *et al.*, 2000). O adensamento de camarões em cativeiro, as elevadas densidades de estocagem, o aumento no aporte de rações, nutrientes e matéria orgânica, além do compartilhamento de água por diferentes fazendas somadas a redução da qualidade de água dos estuários predispõe os camarões à condições estressantes, tornando-os vulneráveis a agentes infecciosos (TANCREDO *et al.*, 2011).

Aliando intensas condições de cultivo à má gestão dos recursos, doenças bacterianas causadas principalmente por espécies do gênero *Vibrio*, são frequentemente associadas à mortalidade nos cultivos (SAULNIER *et al.*, 2000). Considerados microrganismos oportunistas, os *Vibrios*, fazem parte da microbiota natural do camarão peneídeo e causam doenças apenas em condições estressantes para o animal (AGUIRRE-GUZMÁN; VÁZQUEZ-JUÁREZ; ASCENCIO, 2001). Além disso, algumas bactérias pertencentes a este gênero são patogênicas para o ser humano (IZUMIYA *et al.*, 2011).

Dentre as espécies do gênero *Vibrio*, pode se destacar *Vibrio parahaemolyticus* como responsável pelo declínio da produção global de camarões. Sendo a espécie o agente causador da doença de Necrose Hepatopancreática Aguda (AHPND), inicialmente conhecida como Síndrome da Mortalidade Precoce (EMS) e portador dos genes da toxina pirA e pirB (WANG *et al.*, 2018). A doença causou graves danos à indústria, ocasionando perdas econômicas significativas para o setor em países como China (2009), Vietnã (2010), Malásia (2011), Tailândia (2012), México (2013) e Filipinas (2015) (RESTREPO *et al.*, 2018).

Acredita-se que as cepas patogênicas de *Vibrio parahemolyticus* contém genes homólogos capazes de codificar as toxinas pirA e pirB (VP_{AHPND}) e que os genes das toxinas estão localizados em um plasmídeo extracromossômico (pVA1) contido na bactéria (RESTREPO *et al.*, 2016). As toxinas são produzidas no estômago do camarão, capazes de causar a descamação do hepatopâncreas, desencadeando uma série de fatores que podem levar a morte (PHIWSAIYA *et al.*, 2017).

Outras espécies do gênero como *V. campbellii*, *V. owensii*, *V. punensis* e *V. harveyi* também foram observadas como causadoras da AHPND em camarões. Tudo indica que a transferência horizontal de genes entre as espécies do gênero ocorra devido a presença de genes de transferência no plasmídeo, capazes de mobilizar os genes de virulência AHPND para outra bactéria do gênero, transformando a bactéria receptora em uma cepa causadora da doença. Dessa forma, a presença de *Vibrios* não causadores da doença AHPND também trazem riscos a carcinicultura, visto que essas bactérias podem ser transformadas em patógenos por transferência, sendo a presença desses plasmídeos preocupantes para o ambiente de cultivo (MUTHUKRISHAN *et al.*, 2019)

Nesse contexto, o objetivo geral da pesquisa foi estabelecer um programa de monitoramento de bactérias do gênero *Vibrio* capazes de causar a doença da Necrose Hepatopancreática Aguda (AHPND) ou Síndrome da Mortalidade Precoce (EMS) em áreas de cultivo de camarão *Litopenaeus vannamei* no Estado do Ceará. Para isso, os seguintes objetivos específicos foram traçados:

- a) Quantificar a presença de bactérias pertencentes ao gênero *Vibrio* em amostra de água e sedimento de dois estuários no Estado do Ceará (Jaguaribe e Pirangi).
- b) Acompanhar a diversidade de bactérias do gênero *Vibrio* presentes nos dois estuários ligados a atividade de carcinicultura.
- c) Detectar a presença de genes ligados a doença da Necrose Hepatopancreática Aguda (AHPND) nas espécies isoladas por meio de técnicas de biologia molecular.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Aquicultura

A aquicultura consiste na produção, em cativeiro, de organismos no qual o ciclo de vida ou parte de seu desenvolvimento ocorre na água. Para caracterização dessa atividade destacam-se três pontos: o organismo a ser produzido deve ser aquático, independentemente se de ambiente marinho, dulcícola ou estuarino; deve existir um protocolo de cultivo adequado com as diretrizes para manejo e produção da espécie explorada; e a criação deve ter um proprietário, diferenciando-se assim da exploração pesqueira (VALENTI, 2002).

A atividade é marcada pela necessidade de intervenção humana durante o processo produtivo, controlando e/ou monitorando taxas de alimentação, reprodução e crescimento, elaborando medidas de proteção aos predadores e determinando as taxas de adensamento dos organismos, caracterizando-se assim como uma atividade planejada e controlada pela ação do homem (MORENO, 2019).

Pode ser dividida em: piscicultura (criação de peixes), carcinicultura (criação de crustáceos), ranicultura (criação de rãs), malacocultura (criação de moluscos, ostras e mexilhões), algicultura (cultivo de algas), quelonicultura (criação de tartarugas e tracajás) e criação de jacarés (SCHULTER; VIEIRA-FILHO, 2017).

Com o declive da produção pesqueira oriunda de captura, acredita-se que a aquicultura surgiu como opção viável para a produção de proteína de origem animal saudável e de boa qualidade, objetivando contribuir para o aumento da oferta de alimento mundial e destacando-se também como uma atividade geradora de emprego e renda (SIQUEIRA, 2018). Ressalta-se que mesmo a produção em pequena ou média escala tem sido vista como alternativa de renda para o produtor rural em diversas regiões do mundo, inclusive no Brasil (MELLO; OLIVEIRA; SEIXAS FILHO, 2017).

O crescimento da atividade ocorreu a partir de 1980, devido a introdução de novas técnicas de produção, o que resultou em um maior controle do ambiente aquático, com custos acessíveis e resultados promissores no quesito produtividade e qualidade (SIQUEIRA, 2018). Pode-se atrelar também como fator preponderante para o desenvolvimento da aquicultura, o incentivo financeiro e tecnológico, permitindo ganhar espaço na produção de pescados (MORENO, 2019).

Ao comparar o consumo mundial de pescado destinado a alimentação humana ao consumo de outras fontes de proteína animal, verifica-se que a média anual de consumo de

pescados teve um aumento de cerca de 3,1% entre 1961 a 2017, enquanto a média de consumo anual das demais fontes de proteína cresceram aproximadamente 2,1%. Em 2017, o consumo de pescados como fonte de proteína animal na dieta da população mundial foi de aproximadamente 17%, enquanto o consumo de outras proteínas foi de aproximadamente 7%. Dessa forma, o pescado se mantém como um dos produtos alimentícios mais comercializados no mundo (FAO, 2020).

De acordo com a FAO (2020), a produção mundial de pescado em 2018 foi de aproximadamente 179 milhões de toneladas, sendo destinadas ao consumo humano cerca de 156 milhões de toneladas, equivalendo a um consumo anual de 20,5 kg por habitante. A aquicultura contribuiu com aproximadamente 82,1 milhões de toneladas, equivalente a 46% de toda a produção mundial de pescado e 52% da produção destinada ao consumo humano.

Segundo a FAO (2020), a produção mundial aquícola atingiu o recorde de 114,5 milhões de toneladas em 2018, cujo a produção total consistiu em 82,1 milhões de toneladas de animais aquáticos, 32,4 milhões de toneladas de algas marinhas e 26.000 toneladas de conchas ornamentais e pérolas, perfazendo um valor de venda total de aproximadamente de 263,6 bilhões de dólares. Assim, a produção mundial de animais e plantas aquáticas cultivadas cresceram anualmente, em média aproximadamente 5,3% entre 2001 e 2018.

Em 2018, a principal espécie de peixe cultivado mundialmente foram as carpas (carpa herbívora, carpa prateada, carpa comum e carpa cabeçuda), que somadas representam 32,8% dos peixes produzidos, seguidos pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), representando 8,3% da produção mundial. No que se refere a produção de crustáceos, dentre as principais espécies cultivadas, destacou-se o camarão branco do Pacífico (*Litopenaeus vannamei*), responsável por 52,9% da produção mundial (FAO, 2020).

Em 2019 a aquicultura brasileira produziu aproximadamente 599,1 mil toneladas de pescados, cujo 88,4% da produção foi advinda da piscicultura, 9% da carcinicultura e o restante do cultivo de demais organismos aquáticos como ostras, vieiras e mexilhões (IBGE, 2019).

O desenvolvimento tecnológico da aquicultura proporcionou uma nova perspectiva para o setor. A contribuição da atividade no fornecimento mundial de pescado tem crescido anualmente, gerando cada vez mais impactos socioeconômicos (SIQUEIRA, 2018). Assim, Valenti (2002) ressalta a importância do uso consciente dos recursos naturais utilizados, atentando para a produção sustentável, como forma de manter a produção e lucratividade da produção nas gerações futuras. Afirmando que a aquicultura moderna deve envolver três

pilares: a produção lucrativa, a preservação do meio ambiente e o desenvolvimento social, como chave para a manutenção da atividade.

2.2 Carcinicultura

A carcinicultura, criação de crustáceos em cativeiro, é em sua maioria voltada para a produção de camarão marinho, sendo uma importante fonte de renda para países em desenvolvimento na Ásia e na América Latina. A Índia, por exemplo, desde 2017 é o quarto maior exportador de pescados, impulsionado por um forte aumento da produção de camarões cultivados (FAO, 2020).

O camarão cultivado segue sendo o principal abastecedor do setor de exportação de crustáceos. A maioria das exportações de camarões ocorre para os Estados Unidos, União Europeia e Japão. Acredita-se que a expansão da produção de camarões, influenciou diretamente na taxa de consumo per capita do produto (FAO, 2020).

O camarão branco do Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) destaca-se como a espécie mais utilizada na carcinicultura mundial, principalmente quando se trata de aquicultura continental, sendo cultivado em água doce ou em regiões áridas com água salina e alcalina. A contribuição da produção de *L. vannamei* em 2018 foi de aproximadamente 52,9% da produção total da carcinicultura (FAO, 2020).

Outras espécies de camarão como o camarão-tigre-gigante (*Penaeus monodon*) e o camarão gigante da Malásia (*Macrobrachium rosenbergii*) também são cultivadas mundialmente, representando 8% e 2,5%, respectivamente, da produção mundial de crustáceos (FAO, 2020).

No Brasil, a carcinicultura comercial teve início em 1970, tendo como base os modelos aquícolas de países como o Equador, Panamá e Estados Unidos (ROCHA, 2011). Inicialmente os cultivos de camarões marinhos eram implantados em salinas desativadas ou em apicuns dos manguezais. A partir da década de 80, firmou-se como atividade lucrativa do agronegócio, atraindo investidores e a fundação de laboratórios de pós-larvas (NASCIMENTO, 2007).

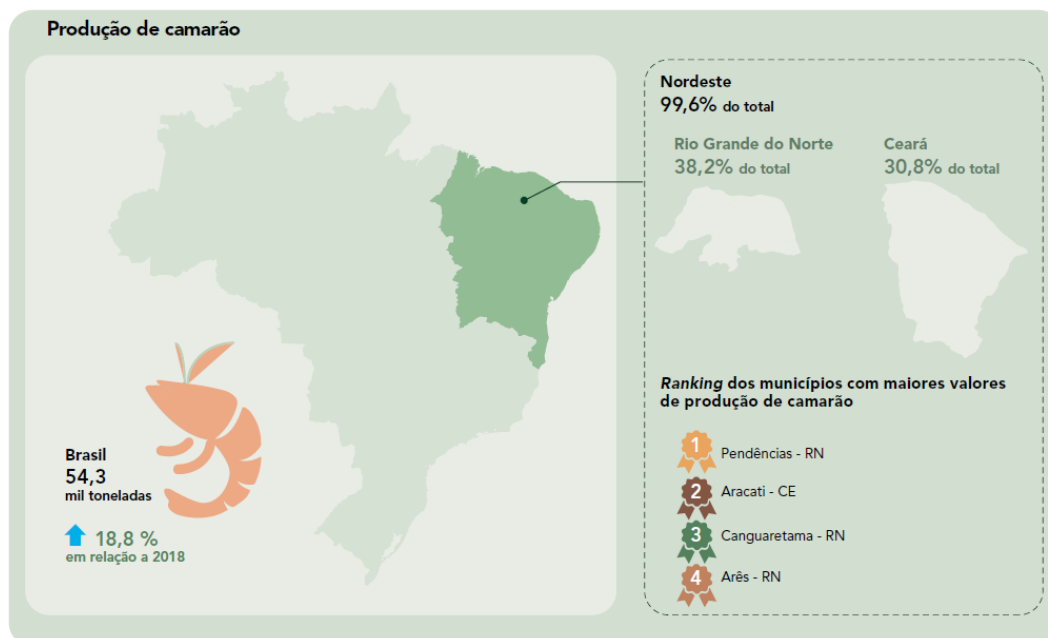
A carcinicultura brasileira consiste na produção de *L. vannamei*, por ser uma atividade com viabilidade técnica, econômica, social e ambiental (ROCHA, 2011). Em 2003, o Brasil ocupou a posição de líder mundial no quesito produtividade, ultrapassando o recorde de produção de 90.000 toneladas de camarões, onde 80% da produção destinou-se ao mercado internacional. Entretanto, no ano seguinte, com a ação *antidumping* imposta pelos Estados

Unidos e o surto da Mionecrose Infecciosa (IMN) as taxas de exportação e produção reduziram drasticamente (ABCC; MAPA, 2017).

A região Nordeste destaca-se como a principal produtora do país, correspondendo a 99,6% da produção nacional (figura 1). Os estados que se destacam como principais produtores são o Rio Grande do Norte e o Ceará, correspondendo a 38,2% e 30,8%, respectivamente, da produção total no ano de 2019 (IBGE, 2019). Em 2017, a produção de camarão havia sido afetada pelo Vírus da Síndrome Mancha Branca (WSSV), o que acarretou numa queda de 21,4% da produção quando comparada com 2016 (IBGE, 2017).

Entretanto, em 2019 o volume total de camarões produzidos pela carcinicultura nacional foi de 54,3 mil toneladas, ou seja, houve um crescimento de 18,8% quando comparado a 2018, com produção de 45,8 mil toneladas. O crescimento na produção está atrelado na recuperação da atividade após os efeitos do Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV) (IBGE, 2019).

Figura 1 – Produção de camarões cultivados no Brasil.



Fonte: Pesquisa da Pecuária Municipal 2019, IBGE.

No Estado do Ceará, o município de Aracati destaca-se como principal produtor de camarão (IBGE, 2019). De acordo com o Censo da Carcinicultura do Litoral Sul do Estado do Ceará e Zonas Interioranas Adjacentes, realizado pela Associação Brasileira de Criadores de Camarão – ABCC em parceria com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (2017), municípios como Aquiraz, Horizonte, Cascavel, Beberibe, Parajuru, Fortim,

Aracati, Jaguaruana, Itaiçaba, Russas, Limoeiro do Norte, Morada Nova, Alto Santo, Jaguaribara, Jaguaribe e Icapuí, encontraram na carcinicultura uma importante fonte de emprego e renda.

Contudo, pode-se concluir que uma das principais adversidades encontradas no setor são as enfermidades que assolam a produção. Em 2003, o setor teve de enfrentar o IMNV (ABCC; MAPA, 2017). Alguns anos depois, com a chegada do vírus da Síndrome da Mancha Branca, novamente a produção nacional foi afetada (IBGE, 2017). Além dessas, outras patologias podem afetar o desenvolvimento do setor, então como forma de prevenção muitos produtores vêm adotando novas técnicas de manejo e medidas de biossegurança mais rígidas, a fim de evitar a disseminação de doenças no cultivo (ABCC; MAPA, 2017).

2.3 Enfermidades na Carcinicultura

As enfermidades acometem qualquer setor de produção animal. Com o desenvolvimento da carcinicultura marinha, a chegada de novas técnicas de diagnóstico e a expansão da atividade, é normal que novas epizootias virais sejam detectadas anualmente (NUNES; MARTINS; GESTEIRA, 2004). Coelho (2006) afirmou que as doenças são o principal fator biológico limitante para o desenvolvimento da carcinicultura mundial e que as viroses são as que causam maiores prejuízos econômicos ao setor.

Segundo OLIVEIRA-NETO (2006), as principais enfermidades virais detectadas na carcinicultura mundial são a Síndrome de Taura (TS), Síndrome da Cabeça Amarela (YH), Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética (IHHN) e a Síndrome da Mancha Branca (WSS).

A infecção pelo vírus da Síndrome de Taura (TSV) pode ocasionar uma mortalidade em massa de até 90% dos organismos cultivados, impactando a produtividade e consequentemente gerando perdas econômicas. A doença afeta diversas espécies de camarões peneídeos, inclusive *Litopenaeus vannamei*, o principal produto da carcinicultura marinha mundial (CUÉLLAR-ANJEL, 2013).

A manifestação dos sinais clínicos da síndrome de taura (TS) se iniciam por volta de 14-40 dias após a contaminação, podendo afetar pós-larvas, juvenis e indivíduos adultos (CUÉLLAR-ANJEL, 2013). Os camarões, na fase aguda da doença, apresentam a coloração avermelhada nos apêndices (urópodes, télson, pleópodes) devido a expansão dos cromatóforos, apresentando também letargia e anorexia (GUZMÁN-SÁENZ *et al.*, 2009). Na fase crônica da doença, os indivíduos apresentam lesões cuticulares melanizadas (SILVA, 1999).

Estima-se que os prejuízos causados pelo TSV foi de aproximadamente 1,3 bilhões de dólares. Além das perdas econômicas, outros prejuízos indiretos como restrições para exportação, aumento de custos na larvicultura e a queda nas vendas, dificultaram a recuperação do setor (CUÉLLAR-ANJEL, 2013).

A Síndrome da Cabeça Amarela (YH) foi descoberta em 1991, em cultivos de *Penaeus monodon* na Tailândia, trazendo graves prejuízos econômicos à carcinicultura mundial (LIGHTNER, 2005). Os camarões afetados apresentam o cefalotórax amarelado, além de descoloração do restante do corpo e reflexo hepatopancreático (LIGHTNER, 1999). O vírus é pertencente ao gênero *Okavirus* e da família Roniviridae, sendo o genótipo 1 do vírus o conhecido como causador da enfermidade (OIE, 2019).

A Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética (IHHN) também denominada de Síndrome da Deformidade e do Nanismo (RDS), apresenta-se de maneira crônica em cultivos de *L. vannamei*, ocasionando deformidades cutilares e baixas taxas de crescimento nos animais cultivados (OLIVEIRA-NETO, 2006). Os indivíduos infectados apresentam deformações principalmente no rosto e antenas (LIGHTNER, 1996).

O vírus WSS, causador da Síndrome da Mancha Branca, apresenta altas taxas de disseminação e mortalidade (OIE, 2003). Os animais contaminados geralmente apresentam-se moribundos e com manchas brancas circulares na carapaça, principalmente na região do cefalotórax (OLIVEIRA-NETO, 2006). No Brasil, o primeiro relato acerca da doença surgiu em Santa Catarina em 2005, no mesmo ano a enfermidade foi relatada no estado do Ceará (NUNES, 2005). Oliveira-Neto (2006) frisou que os vírus WSS e IHHN são listados como os importantes patógenos mais prevalentes e disseminados na carcinicultura mundial.

Nunes *et al.* (2004) relatou sobre o vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV), encontrado em fazendas de engorda de *L. vannamei* da Região Nordeste. Segundo o autor, a infecção por IMNV caracteriza-se pela necrose dos músculos do abdômen e do cefalotórax, dessa forma, o animal apresenta a cauda opaca ou áreas do corpo com aspecto leitoso ou apodrecido.

No Brasil, a produção da carcinicultura atingiu o recorde de 90.000 toneladas de camarão, entretanto em 2004 a produção caiu drasticamente devido a chegada da IMNV (ABCC; MAPA, 2017). Alguns anos depois, de acordo com dados do IBGE (2017), a produção brasileira novamente declinou cerca de 21,4% como consequência da chegada do WSSV.

Negreiros e Santos (2015) comentam acerca das doenças bacterianas em sistemas de carcinicultura, caracterizando-as como doenças secundárias ou oportunistas, visto que as

bactérias são componentes da microbiota natural do meio, manifestando-se quando condições ambientais desfavoráveis assolam o cultivo, prejudicando a saúde animal.

As doenças bacterianas são uma grave ameaça aos sistemas de larvicultura e engorda de camarão marinho, dentre as principais enfermidades bacterianas, destaca-se as vibrioses e a hepatopancreatite necrosante (NHP), ocasionada pela ocorrência de uma alfa-proteobactéria, ambas com índices de mortalidade superior a 90% (FEIJÓ, 2009).

Rebouças (2017) enfatizou que as vibrioses em sistemas de cultivo de *L. vannamei* se tornaram um problema econômico na carcinicultura mundial, necessitando de estudos acerca das medidas de controle e prevenção. A ocorrência de vibrioses no sistema de cultivo além de acarretar altas taxas de mortalidade e lesões nos organismos cultivados, contribui para a entrada de outras enfermidades nos animais (FEIJÓ, 2009).

De acordo com a Associação Brasileira de Criadores de Camarão - ABCC (2017), no Censo da Carcinicultura, constatou-se que o setor vem convivendo com as enfermidades em seus ambientes de cultivo. Cerca de 84,24% dos produtores do Ceará entrevistados teriam afirmado a presença de enfermidades virais, como a Síndrome da Mancha branca (WSS), Mionecrose Infecciosa (IMN), necrose hematopoiética (IHHN), e enfermidades bacterianas como a necrose hepatopancreática (NHP) e vibrioses, em suas fazendas.

Portanto, partindo do pressuposto de que as vibrioses são doenças secundárias e sabendo que grande parte das fazendas de cultivo de camarão do Estado do Ceará convivem com outras patogenicidades, favorecendo os surtos da enfermidade, é necessário que os produtores se atentem para os riscos que as bactérias do gênero trazem para o ambiente de cultivo. Vale ressaltar que além de patogênicas para os organismos cultivados, algumas espécies de *Vibrio* também apresentam mecanismos de virulência patogênicos ao ser humano.

2.4 Vibrioses

No ambiente de cultivo, os camarões ficam susceptíveis ao estresse causado pelas técnicas empregadas durante o manejo, tais como baixas concentrações de oxigênio dissolvido, altas densidades de estocagem, aumento da concentração de compostos nitrogenados, alimentação em excesso e má qualidade da água, o que pode acarretar uma maior sensibilidade a bactérias oportunistas, principalmente do gênero *Vibrio* (AGUIRRE-GUZMÁN; VÁZQUEZ-JUÁREZ; ASCENCIO, 2001).

As bactérias pertencentes a esse gênero habitam a matéria orgânica acumulada nos sedimentos e na coluna d'água dos viveiros, fazendo parte da microbiota natural do cultivo. Em

situações de desequilíbrio tornam-se patogênicas, debilitando os organismos cultivados e tornando-os mais propensos a outras enfermidades mais severas (ABCC, 2004). Dentre os principais problemas que essas bactérias podem acarretar aos organismos cultivados, destacam-se: altas taxas de mortalidade, animais com lesões e/ou necrose muscular, baixa taxa de crescimento dos indivíduos cultivados, degradação dos tecidos, inatividade e alterações nas metamorfoses larvais (VIEIRA, 2009; LINDOSO, 2017).

As espécies que constituem o gênero *Vibrio* são bactérias Gram-negativas, morfológicamente definidas como bastonetes curtos, não esporogênicas, anaeróbias facultativas e móveis, apresentando um flagelo polar (MADIGAN *et al*, 2010; REBOUÇAS, 2017). Algumas espécies são capazes de fermentar a sacarose. Assim, quando inoculados em Ágar Tiosulfato-citrato-bile-sacarose (TCBS), as colônias fermentadoras de sacarose apresentam-se na coloração amarela, enquanto as que não possuem a capacidade fermentadora apresentam-se na cor verde (ALVES, 2007).

A ocorrência de vibrioses em carniculturas tem ocasionado perdas econômicas relevantes para o setor, especialmente quando acomete as fazendas de larvicultura ou de juvenis (ALVES, 2007). Trata-se de uma enfermidade que afeta todos os estágios do ciclo de vida dos camarões (MENDES *et al.*, 2009)

Dentre as espécies que afetam os camarões peneídeos, destacam-se: *Vibrio parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. damsela*, *V. fluviales*, *V. carchariae* e *V. splendidus* (GUIMARÃES, 2008). Rebouças (2017) citou que os Víbrios causam mortalidade em larga escala nos cultivos de camarão e que as espécies mais preocupantes são: *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* e *V. nigripulchritudo* (Quadro 1).

Vieira (2009) comenta que a colonização de bactérias do gênero *Vibrio* no hepatopâncreas resulta em uma baixa taxa de conversão alimentar, prejudicando então o desenvolvimento e crescimento dos animais, o que implica em animais com crescimento lento e, conseqüentemente, com uma maior demanda de insumos e tempo para que os animais atinjam o tamanho desejado.

Para a identificação da doença, Negreiros e Santos (2015), descrevem como sinais clínicos a opacidade muscular, a presença de listras negras nas laterais do cefalotórax e uma coloração amareladas das brânquias. Alves (2007), descreve que a natação lenta, o acúmulo de animais as margens do viveiro, coloração avermelhada dos apêndices, flexão do terceiro segmento abdominal, melanização e anorexia também estão entre os sintomas, somado a turvação da hemolinfa e o tempo de coagulação alterado.

Quadro 1: Bactérias do gênero *Vibrio* relacionadas como agentes etiológicos em eventos de doenças ocorridas em cultivo de camarão.

Bactéria	Hospedeiro	Doença	Local de infecção	País	Referência
<i>V. harveyi</i>	<i>P. monodon</i>	Vibriose	Pós-larvas	-	KARUNASAGAR <i>et al.</i> , 1994
<i>Vibrio</i> spp	<i>P. monodon</i>	Doença do pé vermelho	Hepatopâncreas; órgão linfóide; hemolinfa	Filipinas	ALAPIDE-TENDÊNCIA e DUREZA, 1997
<i>Vibrio</i> sp. luminescente	<i>P. monodon</i>	Vibriose luminescente	Hepatopâncreas	Filipinas	LAVILLA-PITOGO, LEAÑO e PANER, 1998
<i>Vibrio</i> spp.	<i>P. stylirostris</i>	Síndrome 93	Hemolinfa	Nova Caledônia	COSTA <i>et al.</i> , 1998
<i>V. vulnificus</i>	<i>P. monodon</i>	-	Hemolinfa, tecido conjuntivo	-	ALDAY-SANZ, ROQUE e TURNBULL, 2002
<i>V. alginolyticus</i>	<i>L. vannamei</i>	Vibriose	Músculo	Taiwan	LIU <i>et al.</i> , 2004
<i>V. campbelli</i>	<i>L. vannamei</i>	-	Órgão linfóide; coração; hemolinfa; brânquias; hepatopâncreas	-	BURGENTS <i>et al.</i> , 2005
<i>V. penaeicida</i>	<i>L. stylirostris</i>	Síndrome 93	Hemolinfa	Nova Caledônia	GOARANT e MERIEN, 2006
<i>V. nigripulchritudo</i>	<i>L. stylirostris</i>	Síndrome do verão	Hemolinfa	Nova Caledônia	GOARANT <i>et al.</i> , 2006
<i>Vibrio</i> spp.	<i>P. monodon</i>	Necrose de cauda; doença intestinal branca; LSS; doença do pé vermelho	Hemolinfa	Índia	JAYASREE, JANAKIRAM e MADHAVI, 2006
<i>V. nigripulchritudo</i>	<i>P. japonicus</i>	Síndrome do verão	Coração, cérebro, brânquias, estômago, hepatopâncreas, órgão linfóide, glândula antenal, músculo	Japão	SAKAI <i>et al.</i> , 2007
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>L. vannamei</i>	-	Brânquias; hepatopâncreas	-	AGUIRRE-GUZMÁN <i>et al.</i> , 2010
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>L. vannamei</i>	AHPND/EMS*	Hemolinfa	Índia	KUMAR <i>et al.</i> , 2014
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>L. vannamei</i>	Vibriose	Camarão	Tailândia	YINGKAJORN <i>et al.</i> , 2014
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>F. indicus</i>	-	Brânquias, músculo, intestino; hemolinfa	-	VINOJ, VASEEHARAN e BRENNAN, 2014
<i>V. parahaemolyticus</i> e <i>V. rotiferianus</i>	<i>F. chinensis</i>	Vibriose	Hemolinfa	China	ZHANG <i>et al.</i> , 2014
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>L. vannamei</i>	AHPND/EMS*	Hemolinfa	México	SOTO-RODRIGUEZ <i>et al.</i> , 2015

Fonte: REBOUÇAS (2017) – * AHPND/EMS – Necrose aguda Hepatopancreática/Síndrome da Mortalidade Precoce.

Em termos de impactos econômicos, devido à preocupação com a disseminação de AHPND, causada por cepas de *V. parahaemolyticus*, diversos países suspenderam a importação de camarão vivo produzidos nos países afetados pela doença (FAO, 2013). Essa cepa de *Vibrio* coloniza o trato digestivo do animal, produzindo toxinas que acarretam a descamação celular do hepatopâncreas, levando à mortalidade (MUÑIZ, 2020).

Estudos conduzidos por Zhang *et al* (2014) analisaram camarões peneídeos doentes e saudáveis em fazendas de camarão do condado de Ganyu, província de Jiangsu, na China. Tais fazendas haviam apresentado um declínio na produção de camarão chinês cultivado em julho de 2010, ocasionada por uma mortalidade em massa superior a 30%, em um período de duas semanas. As amostras coletadas indicaram que os camarões estavam infectados por *Vibrios*, dentre eles *V. parahaemolyticus*.

2.5 *Vibrio parahaemolyticus*

Vibrio parahaemolyticus é a principal espécie do gênero associada à ocorrência de gastroenterite bacteriana, causada pela ingestão de frutos do mar crus ou mal cozidos, especialmente de ostras (YANG *et al.* 2010). O mecanismo de virulência dessa espécie em humanos está associado a genes que codificam para a produção de hemolisina termoestável direta (TDH) e seu homólogo hemolisina termoestável relacionada (TRH) (LIMA, 2017; REBOUÇAS, 2017; WEST, KLEIN e LOVELL, 2013).

Trata-se de uma bactéria naturalmente encontrada em ecossistemas marinhos e estuarinos. É moderadamente halofílica, capaz de crescer em ambientes com concentração de até 8% de NaCl, entretanto apresenta seu crescimento ótimo em meio com concentrações de 2 a 3% de NaCl (YANG *et al.* 2010).

As bactérias do gênero *Vibrio* geralmente constituem a microbiota natural dos camarões peneídeos, sendo *V. parahaemolyticus* uma das espécies descritas como um dos principais causadores de vibrioses em carciniculturas, causando altas taxas de mortalidade nos cultivos de todo o mundo (ZHANG *et al.*, 2014). Em 2013, na Índia, após uma mortalidade em massa nas fazendas de cultivo de *L. vannamei*, foi verificada a presença de *V. parahaemolyticus*, confirmando sua patogenicidade para essa espécie de camarão (KUMAR *et al.*, 2014).

Além da patogenicidade já confirmada para *L. vannamei*, algumas estirpes de *V. parahaemolyticus* são apontadas como agentes etiológicos da Necrose Hepatopancreática Aguda (AHPND), também conhecida como Síndrome da Mortalidade Precoce (EMS), responsável por grandes perdas na produção de camarão cultivado na China, Vietnã, Tailândia e Malásia (FAO, 2013).

2.6 Necrose Hepatopancreática Aguda (AHPND)

A enfermidade não viral mais importante para a carcinicultura mundial é a Necrose Hepatopancreática Aguda (AHPND), anteriormente conhecida como Síndrome da Mortalidade Precoce (EMS). Trata-se de uma enfermidade bacteriana, causada por estirpes de *V. parahaemolyticus*, caracterizada por uma mortalidade em massa nos primeiros 35 dias de cultivo (ICAR, 2016; BONDAD-REANTASO, 2016).

De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde Animal – OIE (2019), a doença foi oficialmente relatada na China (2010), Vietnã (2010), Malásia (2011), Tailândia

(2012), México (2013) e Filipinas (2014). A enfermidade foi responsável por grandes perdas na produção de camarão cultivado nesses países (FAO, 2013).

Segundo o Manual de Testes de Diagnóstico para Animais Aquáticos (2019) da OIE, a enfermidade é causada por uma cepa de *V. parahaemolyticus* (VpAHPND) que contém um plasmídeo extracromossômico (pVA1) de aproximadamente 70 kbp, com genes homólogos capazes de codificar as toxinas pirA e pirB.

Os genes das toxinas pirA e pirB, que ocasionam a AHPND, são semelhantes aos genes da toxina pirA e pirB de *Photobadus* spp, um gênero de bacilos Gram-negativo, bioluminescente, pertencente à família Enterobacteriaceae e que vive simbioticamente com *Heterorhabditis* spp., um parasita de larvas de insetos (BONDAD-REANTASO, 2016).

O Central Institute of Brackishwater Aquaculture – ICAR (2016) descreve como sinais clínicos da manifestação de AHPND a presença de camarões moribundos, geralmente com carapaças amolecidas e o intestino vazio, além de apresentar o hepatopâncreas esbranquiçado e significativamente reduzido. Isso ocorre porque as toxinas passam a serem produzidas no estômago do camarão, causando a descamação do hepatopâncreas e desencadeando uma série de fatores capazes de levar a morte (PHIWSAIYA *et al.*, 2017).

Inicialmente, as causas da AHPND eram desconhecidas, chegando a ser considerada uma doença idiopática. Acreditava-se que esta era ocasionada por um conjunto de fatores, como poluição, pesticidas, floração de algas, aplicação inadequada de probióticos ou má qualidade da ração ofertada, sendo o papel das bactérias considerado secundário, ou seja, acreditava-se que a colonização bacteriana era o último estágio da manifestação da doença e não a causa. Posteriormente, uma cepa virulenta de *V. parahaemolyticus* foi isolada em exemplares de *L. vannamei* doentes e apontada como agente etiológico da enfermidade (OIE, 2013).

Embora a AHPND afete principalmente a produção de *L. vannamei*, a enfermidade também foi relatada no cultivo de *Penaeus monodon* e *Penaeus chinensis*. Além disso, suspeita-se que apesar de ainda não ter sido notificada, a doença está presente em outros países da Ásia, América Latina e Caribe (BONDAD-REANTASO, 2016).

De acordo com a OIE (2019), embora haja relatos do isolamento de outras espécies de *Vibrios* em casos clínicos de AHPND, apenas o *Vibrio parahaemolyticus* (VpAHPND), demonstrou ser o causador da enfermidade. Entretanto, outras espécies do gênero como *V. campbellii*, *V. owensii*, *V. punensis* e *V. harveyi* também foram observadas como causadoras da AHPND em camarões (MUTHUKRISHAN *et al.*, 2019).

Chonsin *et al.* (2015) mencionam que fatores ambientais, como salinidade e nutrientes estimulam os mecanismos horizontais de transferência de genes entre bactérias, o que justificaria a transferência do plasmídeo (pAV1) entre diferentes espécies do gênero *Vibrio*.

Assim, a presença de Víbrios não causadores da doença AHPND traz riscos as fazendas de carcinicultura, sendo a transferência plasmidial preocupante para o ambiente de cultivo (MUTHUKRISHAN *et al.*, 2019). Principalmente porque a transferência de elementos genéticos nos viveiros pode acarretar o rápido surgimento de estirpes de *Vibrios*, principalmente *V. parahaemolyticus*, causador de AHPND (CHONSIN *et al.*, 2015).

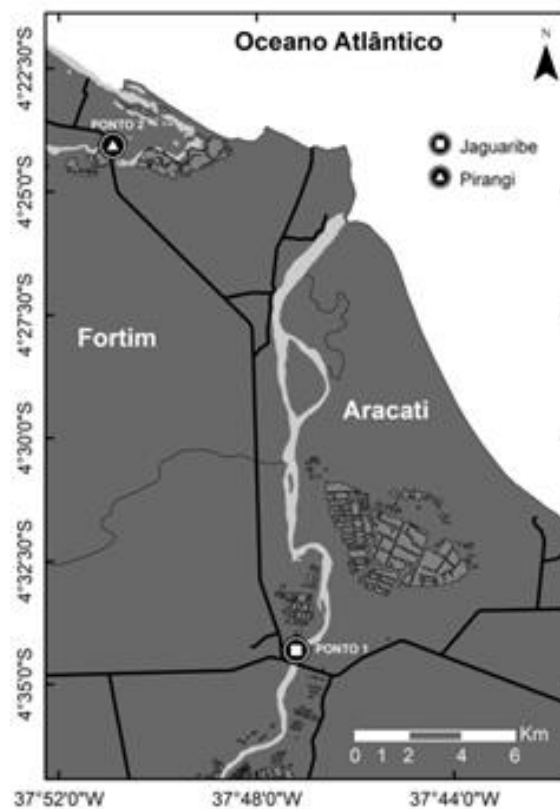
Reconhecendo os riscos que AHPND traz as fazendas de carcinicultura, desde 2011, muitas instituições e agências tem se esforçado na compreensão da enfermidade e na busca de tecnologias e boas práticas de manejo que ajudem a amenizar a ocorrência e o impacto da doença no setor (FAO, 2013).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Área de estudo

Foram realizadas duas (2) coletas, em dois estuários, localizados nos Rios Jaguaribe ($4^{\circ}34'18.6''\text{S } 37^{\circ}47'11.8''\text{W}$) e Pirangi ($4^{\circ}24'03.9''\text{S } 37^{\circ}50'54.4''\text{W}$), na região Leste do Estado do Ceará (figura 1) onde se concentram atividades de cultivo de *Litopenaeus vannamei* (IBGE, 2018). O estuário pertencente ao Rio Jaguaribe, no município de Aracati, foi considerado o ponto 1 de coleta, enquanto o estuário pertencente ao Rio Pirangi, no município de Fortim, foi considerado o ponto 2.

Figura 2: Localização dos pontos de coleta, nos estuários do Rio Jaguaribe (Ponto 1) e Rio Pirangi (Ponto 2).



Fonte: elaborado por COUTINHO (2019).

3.2 Coleta das amostras

As coletas ocorreram durante a estação de estio (agosto a dezembro) de 2019. A primeira foi realizada no mês de agosto e a segunda no mês de novembro, perfazendo um total de 8 amostras, sendo 4 amostras de água e 4 amostras de sedimento.

Para realização da coleta de sedimentos, foi utilizado um coletor de sedimentos tubular, acoplado de um tubo PVC, previamente higienizado. O sedimento coletado foi armazenado em sacos plásticos estéreis para posterior processamento.

A amostra de água foi obtida por filtração, numa profundidade de aproximadamente 50 cm, com o auxílio de uma garrafa âmbar de 1 litro, previamente esterilizada. No total foram filtrados cerca de 3 litros de água em gases estéreis. Em seguida, as gases utilizadas foram armazenadas em recipientes contendo 225 mL de água peptonada alcalina (APA) esterilizada, adicionada de 1% de cloreto de sódio (NaCl).

Ambas as amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas para transporte, sendo devidamente processadas no Laboratório de Microbiologia Ambiental e de Pescados (LAMAP), localizado no Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR), da Universidade Federal do Ceará (UFC).

3.3 Análise de fatores extrínsecos

A temperatura das amostras de água foi verificada no momento da coleta, com o auxílio de um termômetro bastão de mercúrio da marca Incoterm. Uma amostra de água foi coletada e levada ao laboratório, para verificação de outros parâmetros, como salinidade e pH.

Para verificação da salinidade utilizou-se um refratômetro da marca ATAGO S/MILL e para verificação de pH utilizou-se um phmetro de bancada da marca Hanna, modelo HI2210.

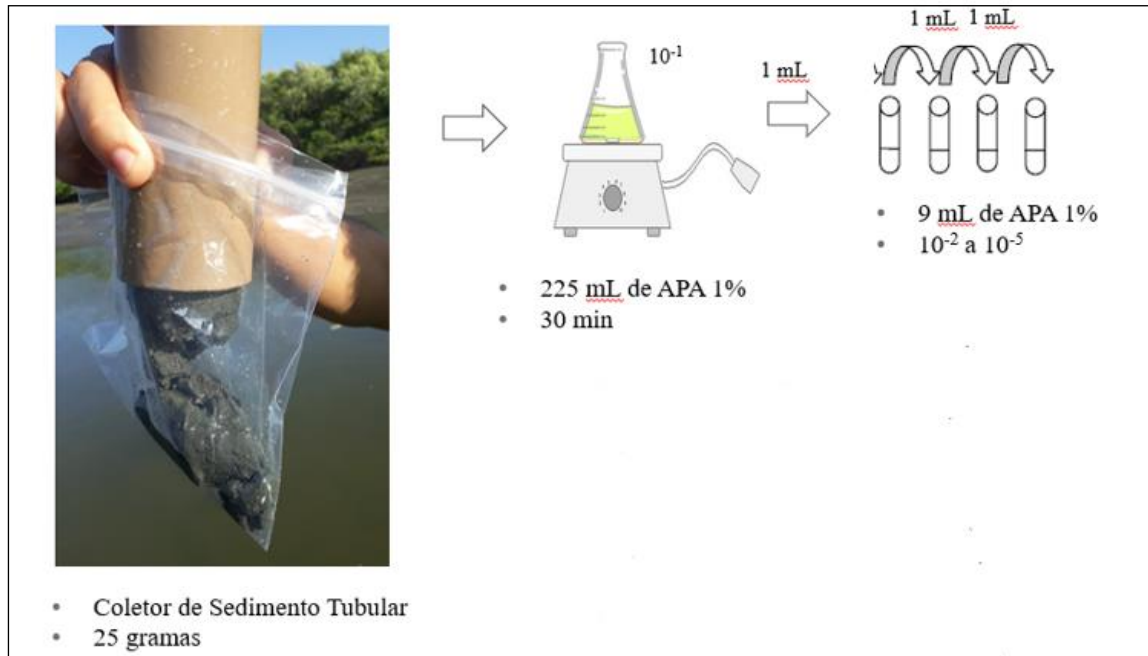
3.4 Processamento das amostras

3.4.1 Amostras de sedimento

Foram pesados 25 gramas de sedimentos, inoculadas em 225 mL de APA 1%, onde com o auxílio de um agitador magnético a amostra foi homogeneizada por aproximadamente 30 minutos. A amostra homogeneizada foi tida como a diluição 10^{-1} e por meio dela se deu

sequência as diluições seriadas, transferindo 1 mL da amostra homogeneizada para 9 mL de APA 1%. No total foram feitas sucessivas diluições decimais de 10^{-1} a 10^{-5} (figura 3).

Figura 3: Processamento das amostras de sedimento, nos estuários do Rio Jaguaribe Rio Pirangi.

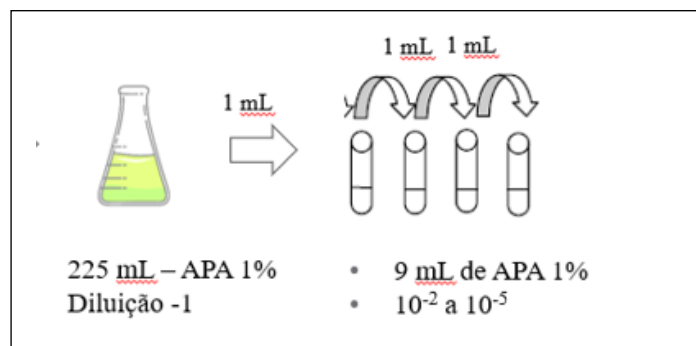


Fonte: O autor.

3.4.2 Amostras de água

A gaze armazenada em APA 1% foi considerada a diluição 10^{-1} . A partir dela foram realizadas as diluições seriadas, que consiste na inoculação de 1 mL da amostra obtida, em 9 mL de água peptonada alcalina (APA) 1%, com pH entre 7,5 a 8,5. No total foram realizadas diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-5} (figura 4).

Figura 4: Processamento das amostras de água, dos estuários do Rio Jaguaribe e Rio Pirangi.



Fonte: O autor.

3.5 Inoculação inicial das amostras

A partir das diluições seriadas preparadas anteriormente foram retiradas alíquotas de 200 µL de cada diluição, onde com o auxílio de uma alça de *Drigaslki* a amostra foi espalhada em placa de Petri com o meio Ágar Tiosulfato-citrato-bile-sacarose (TCBS), seletivo para o crescimento de bactérias do gênero *Vibrio*. Cada diluição foi inoculada em duplicata, por meio da técnica de *spread-plate*. As placas inoculadas foram incubadas por 24 horas em estufas bacteriológicas a 35°C (KAYSNER *et al.*, 2004).

3.6 Quantificação e caracterização de colônias presuntivas

Após o período de incubação, a contagem do número de colônias foi realizada, em seguida foram caracterizadas quanto a sua capacidade de fermentarem a sacarose, sendo identificadas e divididas em colônias sacarose positivas (com capacidade fermentadora) e sacarose negativas (sem capacidade fermentadora) (KAYSNER *et al.*, 2004).

A quantificação ocorreu através do método de Contagem Padrão em Placas (CPP), conforme as recomendações de Downes e Ito (2001).

3.7 Isolamento de colônias em meio não seletivo

Foram selecionadas colônias bacterianas que se enquadrassem nas possíveis características do gênero *Vibrio*, aquelas selecionadas foram inoculadas em meio não seletivo, Ágar Triptona de Soja (DIFCO) acrescido de 1% de cloreto de sódio (NaCl) e com pH em torno de 7,5 a 8,5. Os tubos inoculados foram incubados em estufa bacteriológica a 35°C, por um período de 24 horas para verificação de pureza das estirpes e posterior caracterização morfológica (KAYSNER *et al.*, 2004).

3.8 Lavagem das placas de Petri

Após o isolamento das colônias selecionadas, as placas de petri foram lavadas com APA 1% estéril, para que o material genético das colônias não isoladas fosse conservado. O procedimento de lavagem consistiu no espalhamento de APA 1% nas superfícies das placas de Petri, com o auxílio de uma alça de *Drigaslki*, e em seguida, transferiu-se uma alíquota de 2 mL do produto de lavagem para microtubos de centrifugação.

3.9 Caracterização Morfotintorial

Para caracterização da parede celular das colônias bacterianas selecionadas foi utilizado a técnica de Coloração de Gram, que tem como finalidade classificar as bactérias quanto ao seu tamanho e morfologia celular, sendo realizada seguindo o protocolo descrito por Levy (2004).

A partir da observação do esfregaço bacteriano corado foi possível separar as estirpes que se apresentassem como bastonetes Gram-negativos, característica do gênero *Vibrio*.

3.10 Extração de DNA total

Para a realização da extração de DNA, as estirpes puras foram inoculadas em caldo Luria Bertani (LB) acrescido de 1% de NaCl, em seguidas foram incubadas por um período de 48 horas em estufa bacteriológica a 35°C.

Após o crescimento das cepas inoculadas, transferiu-se uma alíquota de 1 mL para microtubos de centrifugação. Para a extração de DNA foi utilizado o kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega), o protocolo de extração foi fornecido pelo fabricante.

Os produtos da extração de DNA foram verificados pela técnica de eletroforese em gel de agarose 1%, cujo as corridas ocorreram com voltagem de 120V e duração de 40 min. O resultado da corrida foi documentado em sistema de fotodocumentação digital (Kodak EDAS900).

Todas as amostras de DNA extraídas foram mantidas a 4°C até a realização da reação em cadeia da polimerase (PCR), para confirmação do gênero *Vibrio*.

3.11 Amplificação do DNA para confirmação do gênero *Vibrio*

As amostras extraídas foram submetidas a Técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), a fim de confirmar se eram pertencentes ao gênero *Vibrio* ou não. Os reagentes e volumes utilizados estão listados na Tabela 1.

Tabela 1: Volumes utilizados na PCR para verificação de produto da extração de DNA.

Reagentes da Reação	PCR
	Volume
Tampão 10x	2,5 µL
dNTP's (2,5 mM)	0,4 µL
Iniciador F (10mM)	0,5 µL
Iniciador R (10mM)	0,5 µL
MgCl ₂ (50mM)	0,7 µL
Taq Polimerase (500U)	0,2 µL
Amostra	0,1 a 1 ng
Vol. da Reação	12,5 µL

Fonte: Elaborado pelo(a) autor(a).

Para a reação de PCR foi utilizada como controle a estirpe de referência: *Vibrio parahaemolyticus* IOC 18950, cedida pelo Instituto Oswaldo Cruz-RJ. Os primers utilizados continham as seguintes sequências de oligonucleotídeos: Vib-Forward (727): 5'-AGG CGG CCC CCT GGA CAG A-3' e Vib-Reverse (1423): 5'-ARA CTA CCY RCT TCT TTT GCA GC-3'.

As amplificações foram realizadas em termociclador Applied Biosystems (Modelo Veriti). Para a etapa de desnaturação inicial, as seguintes condições de termociclagem foram utilizadas: 94°C, por 2 minutos, seguida por 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos. A etapa final de extensão foi realizada a 72°C, por 8 minutos.

3.12 Diagnóstico da Necrose Hepatopanocrática Aguda (AHPND)

Seguiu-se o protocolo de PCR para detecção de bactérias causadoras de AHPND em culturas ou camarões infectados, sugerido pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), no Manual de Testes de Diagnóstico para Animais Aquáticos (2019).

O primeiro protocolo de PCR utilizado consistia em dois métodos, tendo como gene alvo o pVA1, envolvido na detecção do plasmídeo (Tabela 2).

Tabela 2: Métodos e primers utilizados no protocolo sugerido pela OIE (2019) para detecção do plasmídeo (vPA1) causador da AHPND.

Nome do Método	Primers	Gene Alvo	Tamanho esperado do Amplicon	Referencia	Condições de termociclagem
AP1	AP1F: 5'-CCT-TGG-GTG-TGC-TTA-GAG-GAT-G-3'	<i>pVAI</i>	700 bp	Flegel & Lo, 2014	94 °C / 5min 30 ciclos (94 °C/ 30 s., 60 °C/ 30 s., 72°C / 60 seg.) 72 °C /10 min.
	AP1R: 5'-GCA-AAC-TAT-CGC-GCA-GAA-CAC-C-3'				
AP2	AP2F: 5'-TCA-CCC-GAA-TGC-TCG-CTT-GTG-G-3'	<i>pVAI</i>	700 bp	Flegel & Lo, 2014	
	AP2R: 5'-CGT-CGC-TAC-TGT-CTA-GCT-GAA-G-3'				

Fonte: OIE (2019) - Manual de Testes de Diagnóstico para Animais Aquáticos.

Acerca da detecção dos genes das toxinas *pirA* e *pirB*, quatro métodos de PCR foram realizados, como mostra a tabela 3.

Tabela 3: Métodos e primers utilizados no protocolo sugerido pela OIE (2019) para detecção dos genes das toxinas.

Nome do Método	Primers	Gene Alvo	Tamanho esperado do Amplicon	Referencia	Condições de Termociclagem
AP3	AP3-F: 5'-ATG-AGT-AAC-AAT-ATA-AAA-CAT-GAA-AC-3'	<i>pirA^{vp}</i>	333 bp	Sirikharin <i>et al.</i> , 2014, 2015	94 °C/ 5min 30 ciclos (94 °C / 30 seg., 53 °C / 30 seg., 72 °C / 40 seg.); 72 °C / 5 min.
	AP3-R: 5'-GTG-GTA-ATA-GAT-TGT-ACA-GAA-3'				
TUMSAT-Vp3	TUMSAT-Vp3 F: 5'-GTG-TTG-CAT-AAT-TTT-GTG-CA-3'	<i>pirA^{vp}</i>	360 bp	Tinwongger <i>et al.</i> , 2014	
	TUMSAT-Vp 3 R: 5'-TTG-TAC-AGA-AAC-CAC-GAC-TA-3'				
VpPirA-284	VpPirA-284F: 5'-TGA-CTA-TTC-TCA-CGA-TTG-GAC-TG-3'	<i>pirA^{vp}</i>	284 bp	Han <i>et al.</i> , 2015a	
	VpPirA-284R: 5'-CAC-GAC-TAG-CGC-CAT-TGT-TA-3'				
VpPirB-392	VpPirB-392F: 5'-TGA-TGA-AGT-GAT-GGG-TGC-TC-3'	<i>pirA^{vp}</i>	392 bp	Han <i>et al.</i> , 2015a	
	VpPirB-392R: 5'-TGT-AAG-CGC-CGT-TTA-ACT-CA-3'				

Fonte: OIE (2019) - Manual de Testes de Diagnóstico para Animais Aquáticos.

O último protocolo de PCR utilizado tinha como objetivo a detecção do *V. parahaemolyticus* causador da AHPND (tabela 4). A técnica utilizada foi a de *nested* PCR (nPCR), que utiliza dois conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores em reações subsequentes.

Tabela 4: Métodos e primers utilizados no protocolo sugerido pela OIE (2019) para detecção de VpAHPND.

Nome do Método	Primers	Tamanho esperado do Amplicon	Referencia	Condições de Termociclagem
AP4 Etapa 1	AP4-F1: 5'-ATG-AGT-AAC-AAT-ATA-AAA-CAT-GAA-AC-3'	1269 bp	Dangtip <i>et al.</i> , 2015	94 °C/ 2min 30 ciclos (94 °C / 30 seg., 55 °C / 30 seg., 72 °C / 90 seg.); 72 °C / 2 min.
	AP4-R1: 5'-ACG-ATT-TCG-ACG-TTC-CCC-AA-3'			
AP4 Etapa 2	AP4-F2: 5'-TTG-AGA-ATA-CGG-GAC-GTG-GG-3'	230 bp	Dangtip <i>et al.</i> , 2015	94 °C/ 2min 25 ciclos (94 °C / 20 seg., 55 °C / 20 seg., 72 °C / 20 seg.).
	AP4-R2: 5'-GTT-AGT-CAT-GTG-AGC-ACC-TTC-3'			

Fonte: OIE (2019) - Manual de Testes de Diagnóstico para Animais Aquáticos.

Todos os produtos das reações de PCR realizadas foram verificados pela técnica de eletroforese em gel de agarose (1%), cujo a corrida ocorreu com voltagem de 100V por 1 hora. O resultado da corrida foi documentado em sistema de fotodocumentação digital (Kodak EDAS900). Para determinação do tamanho do amplicon foi aplicado no primeiro poço um marcador 1 kb (DNA Ladder).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Análise de fatores extrínsecos

Os resultados das análises das variáveis ambientais estão dispostos na tabela 5.

Os parâmetros ambientais analisados são fatores que afetam a diversidade dos gêneros bacterianos, exercendo uma seleção natural dos microrganismos presentes no ambiente estudado (LARSEN *et al.*, 2004).

Tabela 5: Resultado das análises de parâmetros físico-químicos nos estuários dos Rios Jaguaribe e Pirangi (CE).

Jaguaribe	Salinidade (ppt)	Temperatura (°C)	pH
1° Coleta	35	35	8,15
2° Coleta	46	28	8,83
Pirangi	Salinidade (ppt)	Temperatura (°C)	pH
1° Coleta	44	34	8,36
2° Coleta	54	31	7,93

Fonte: O autor

Na presente pesquisa as águas do estuário pertencentes ao Rio Jaguaribe (Ponto 1), apresentaram variações de temperatura entre 28 a 35 °C, o pH oscilou entre 8,15 a 8,83 e a salinidade entre 35 a 46 ppt. Já no estuário do Rio Pirangi (Ponto 2), a temperatura variou entre 31 a 34°C, enquanto o pH apresentou variações de 7,93 a 8,36 e a salinidade variações de 44 a 54 ppt, como mostra a tabela 5.

Eschrique (2007) ao analisar variáveis físico-químicas em um ponto do estuário do Rio Jaguaribe, na mesma região onde foram realizadas as amostragens, obteve variações de temperatura entre 29,5-29,7°C, pH entre 7,9-8,0 e salinidade com valores compreendidos entre 27,0- 29,5 ppt.

Ao mesmo tempo que, D'Assumpção *et al* (2007), avaliaram a qualidade de água do estuário do Rio Pirangi, com temperaturas entre 26,4 a 30°C e intervalo das faixas de pH compreendido entre 6,74-8,80. Entretanto, de acordo com os autores a salinidade média do estuário foi em torno de 21,3 durante o período de estio.

Vale salientar que os rios analisados desagüam no Oceano Atlântico, entretanto o Rio Jaguaribe deságua entre os municípios de Aracati e Fortim (SOUSA; MELO; SILVA, 2013), onde predominam praias do tipo arenosas e falésias marinhas com formações litorâneas (PAULA; MORAIS; PINHEIRO, 2006), enquanto o Rio Pirangi deságua entre os municípios de Beberibe e Fortim. Dessa forma, esses estuários recebem água doce e são influenciados pelo regime de marés, justificando assim a diferença de salinidade entre as amostragens.

Os valores observados de salinidade e temperatura estão dentro dos padrões estabelecidos para o crescimento de grupos bacterianos comuns em regiões tropicais, contribuindo para o equilíbrio entre processos autotróficos e heterotróficos em ecossistemas estuarinos (APPLE; SMITH; BOYD, 2008).

A capacidade de adaptação as variações de salinidade e temperatura tendem a favorecer a ocorrência de *Víbrios* em águas estuarinas (MARTINELLI-FILHO, 2007). Sendo a distribuição do gênero diretamente afetada por essas variáveis (NORIEGA-OROZCO *et al.*, 2007). Porém, é importante ressaltar que o grupo bacteriano estudado é capaz de conseguir se desenvolver em temperaturas que apresentam variações entre 4 a 43°C, com ótimo de crescimento a 37°C (KIMES *et al.*, 2012).

Algumas bactérias como as pertencentes ao gênero *Vibrio*, podem sobreviver em ambientes com condições ambientais desfavoráveis por um determinado período de tempo, apresentando-se na forma de viável mas não cultivável (VNC), estado onde os microrganismos possuem baixa atividade metabólica (ADAMS; BATES; OLIVER, 2003).

Menezes *et al* (2017), verificaram que a diminuição da salinidade influenciou diretamente na quantidade de espécies de *Víbrios* isoladas. Variações desse parâmetro se correlacionam com a abundância desses microrganismos em estuários, afetando a diversidade de espécies do gênero (ROCHA, 2016; KOLM; ABSHER, 2008).

O pH também desempenha um papel restritivo ao desenvolvimento de vida aquática, sendo apontado como parâmetro físico-químico indicador de qualidade de água (ALEXANDRE, 2000). Para esta variável, nos dois pontos amostrados, foram observados valores ligeiramente alcalinos, comuns em ambientes de transição entre rios e mar (NASCIMENTO *et al.*, 2020).

Sabe-se que as estirpes de *V. parahaemolyticus* habitam ambientes onde a temperatura da água possui valores acima de 15°C, apresentam-se como uma espécie moderadamente halofílica e com faixa de pH ideal compreendida entre 7,8 a 8,6 (ROSA *et al.*, 2017). Dessa forma, com base nos parâmetros ambientais analisados durante as amostragens, é possível confirmar a ocorrência da espécie no ambiente estudado.

Recentemente foi demonstrado que parâmetros como temperatura e salinidade exercem influência sobre a virulência e expressão do gene PirA de VpAHPND. Resultados indicaram que temperaturas mais baixas podem reduzir a virulência, por meio da queda na taxa de crescimento bacteriano, afetando a produção da toxina, e que a salinidade influencia diretamente a transcrição do gene PirA (LOPÉZ-CERVANTES *et al.*, 2021).

De acordo com a OIE (2019), águas com salinidade abaixo de 20 ppt reduzem a incidência da doença, portanto surtos de AHPND tem mais probabilidades de ocorrerem em estações mais quentes e secas, onde a salinidade não sofre influência da pluviosidade.

No que se refere ao controle de temperatura, precisa-se levar em consideração dois pontos: a elevação de temperatura aumenta a concentração de Vibrios na água, que por ventura, também influencia na virulência de VpAHPND; e técnicas como estufamento de viveiros têm sido utilizadas nas mais diversas fazendas de camarão, como forma de elevar a temperatura e evitar a expressão de alguns vírus (BUCHELI; GARCIA, 2005).

4.2 Quantificação e caracterização de colônias sacarose positiva e negativa

Os resultados da contagem padrão em placa (CPP) durante as duas coletas demonstraram uma maior ocorrência dos vibriões nas amostras de água, quando comparada as de sedimento, sendo este comportamento verificado em ambos os estuários (Tabela 6).

Tabela 6: Quantificação de bactérias do gênero *Vibrio* pelo método de Contagem Padrão em Placa (CPP), nas amostras de água e sedimento nas coletas realizadas nos estuários dos Rios Jaguaribe e Pirangi, no Estado do Ceará.

Coletas	Locais de Coleta	Água (UFC/mL)	Sedimento (UFC/g)
1° Coleta	Rio Jaguaribe	4,75 x10 ³	< 50
2° Coleta	Rio Jaguaribe	7,95 x10 ⁴	2,65 x10 ³
1° Coleta	Rio Pirangi	7,00 x10 ³	1,53 x10 ³
2° Coleta	Rio Pirangi	2,43x10 ⁴	7,25 x10 ² est

Est: Estimada

Fonte: O autor

Rocha (2016), ao avaliar e quantificar a concentração de espécies de *Vibrios* em amostras de águas e sedimento em fazendas de carcinicultura, verificou que nas amostras coletadas no período de estio, a concentração desse gênero na água foi estatisticamente superior às concentrações do sedimento. Assim, é possível inferir que a concentração desse grupo bacteriano tende a ser maior na coluna d'água que em sedimentos, ao menos em períodos mais secos.

Vale ressaltar que as propriedades físico-químicas de solos e sedimentos exercem influência direta em processos metabólicos fundamentais para os microrganismos presentes, sendo a diversidade e a concentração da microbiota natural determinada pela disponibilidade de água, nutrientes, oxigênio e calor presente (MICHEREFF; ANDRADE; MENEZES, 2005).

Com relação a diversidade desses microrganismos, houve uma maior predominância de colônias sacarose positivas nas amostras de água oriundas dos dois estuários amostrados (tabela 7) e no sedimento (tabela 8). No quesito patogenicidade, sabe-se que existem espécies sacarose positivas e sacarose negativas capazes de desencadear doenças em camarões marinhos.

Pinto *et al.* (2011) destacam a necessidade de colônias presumivelmente positivas serem analisadas com testes bioquímicos para a confirmação da capacidade fermentadora, principalmente quando a intenção for detectar estirpes de *V. parahaemolyticus*. Os autores comentam sobre a possibilidade da mudança de cor (para amarelo) das colônias fermentadoras de sacarose, interferirem na interpretação dos resultados de colônias não fermentadoras, uma vez que essas colônias podem ser recobertas pela pigmentação de colônias vizinhas.

Dessa forma, os resultados obtidos quanto a capacidade fermentadora de sacarose caracteriza-se como presuntivos, havendo a necessidade de realização de testes bioquímicos para confirmação.

Tabela 7: Quantificação de colônias sacarose positivas e sacarose negativas nas amostras de água.

Coleta	Local de Coleta	Unidades Formadoras de Colônias (UFC)		
		Total	Sacarose +	Sacarose -
1° Coleta	Jaguaribe	4,75x10 ³	2,63x10 ³	2,13x10 ³
	Pirangi	7,00x10 ³	6,50x10 ³	5,00x10 ²
2° Coleta	Jaguaribe	7,95x10 ⁴	7,95x10 ⁴	-
	Pirangi	2,423x10 ⁴	2,33x10 ⁴	1,00x10 ³

(-): Não houve crescimento

Fonte: O autor

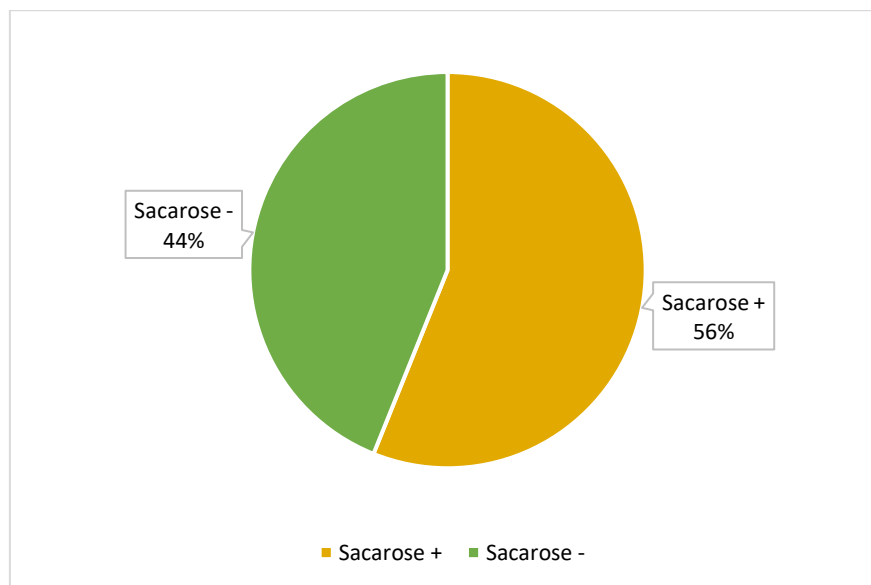
Tabela 8: Quantificação de colônias sacarose positivas e sacarose negativas nas amostras de sedimento.

Coleta	Local de Coleta	Unidades Formadoras de Colônias (UFC)		
		Total	Sacarose +	Sacarose -
1° Coleta	Jaguaribe	< 50	-	-
	Pirangi	1,53x10 ³	9,25x10 ²	6,00x10 ²
2° Coleta	Jaguaribe	2,65x10 ³	2,63x10 ³	2,5x10 ¹
	Pirangi	7,25x10 ²	5,50x10 ²	1,75x10 ²

Fonte: O autor

No que se refere a caracterização das colônias isoladas, dentre as 82 escolhidas, 46 apresentavam a capacidade de fermentar a sacarose, enquanto 36 cepas não possuíam atividade fermentadora (Gráfico 1).

Gráfico 1: Percentual de colônias isoladas, com base no potencial de fermentação da sacarose.



Fonte: O autor

Sabe-se que *V. parahaemolyticus* é sacarose negativo, entretanto para verificar se outras espécies do gênero são agentes causadores da AHPND, cepas sacaroses positivas também foram isoladas, principalmente porque já é conhecido o fato de que espécies pertencentes ao gênero *Vibrio*, possuem a capacidade de realizar a troca horizontal de material genético entre si, como resposta a fatores ambientais, tornando cepas não patogênicas em patógenos por transferência (DANG *et al.* 2008; MUTHUKRISHAN *et al.*, 2019).

4.3 Amplificação do DNA para confirmação do gênero *Vibrio*

Todas as amostras de DNA tiveram resultados positivos, confirmando serem pertencentes ao gênero em questão.

As técnicas de identificação genotípica tendem a ser mais rápidas e precisas, geralmente o diagnóstico via PCR leva em média um dia para obtenção de resultados, enquanto por meio de técnicas fenotípicas (testes bioquímicos) o tempo médio para os resultados é de quatro a sete dias (RASZL, 2016). Por essa razão, a confirmação do gênero se deu apenas por metodologias moleculares.

Entretanto, no que diz respeito a identificação a nível de espécies, de acordo com Thompson *et al* (2005), é dificultoso diferenciar geneticamente todas as espécies de *Vibrio*, devido à alta similaridade gênica. Embora a detecção do gênero por meio de PCR seja

considerada um método sensível e facilmente aplicado à amostras ambientais, elas são limitantes. Assim, as amostras analisadas foram identificadas somente a nível de gênero.

4.4 Diagnóstico da Necrose Hepatopanocrática Aguda (AHPND)

Nos testes referentes aos métodos AP1 e AP2, que visam a detecção do plasmídeo (pVA1), foram testadas 82 amostras, todas apresentaram resultados negativos para o AP1 e apenas 6 (5, 16, 17, 19, 20 e 25) positivaram para o método AP2 (quadro 2). Para os testes de PCR seguintes, nenhuma das amostras apresentaram positividade, exceto pela amostra 72 que positivou no passo dois do método AP4, utilizado para detecção do *V. parahaemolyticus* causador de AHPND.

Quadro 2: Resultado das amostras que apresentaram positividade para algum método de PCR testado.

AMOSTRAS	NOME DO MÉTODO						
	AP1	AP2	AP3	TUMSAT	VPIR A	VPIR B	AP4 STEP 2
5		+					
16		+					
17		+					
19		+					
20		+					
25		+					
72							+

Fonte: O autor.

Ressalta-se que praticamente todas as amostras que obtiveram resultados positivos, em pelo menos um método, são advindas das amostras de água do estuário pertencente ao Rio Jaguaribe, exceto pela amostra 72 pertencente ao estuário do Rio Pirangi.

O produto da lavagem das placas de petri com colônias de *Víbrio* que não foram isoladas, também foram submetidos aos testes de PCR, mas nenhuma das amostras se mostrou positiva aos métodos testados.

Os métodos AP1 e AP2, utilizados para detectar o plasmídeo causador de AHPND, foram propostos por Flegel e Lo (2014), que afirmam que embora tenham testado a especificidade do método, o número de amostras usadas foi relativamente pequeno, não garantindo que os métodos utilizados detectariam com sucesso todos os isolados bacterianos

causadores de AHPND, necessitando que países e pesquisadores interessados realizem mais testes e ajudem a validar os métodos de detecção.

Dessa forma, a especificidade do método pode ter interferido nos resultados. Além disso, as sequências de oligonucleotídeos utilizadas visavam partes diferentes do DNA, o que pode justificar a positividade das amostras para o AP2, enquanto as mesmas apresentavam resultados negativos para o AP1.

É pertinente também ressaltar que estudos posteriores indicaram que o método AP2 apresenta resultados superiores ao método AP1 na detecção de isolados positivos (DANGTIP *et al.*, 2015). Em contrapartida, Santos *et al.* (2019) comentam sobre a possibilidade do método AP2 gerar falsos positivos, em decorrência da mutação do plasmídeo não portador da toxina.

Para Flegel e Lo (2014), a sequência genética dos plasmídeos relacionados a AHPND podem variar ou esses elementos genéticos móveis podem não serem portadores dos genes da toxina envolvida, assim, o método adequado para o diagnóstico da doença deve consistir na amplificação da sequência de codificação da toxina produzida. Portanto, partindo disso e sabendo que a infecção por AHPND consiste na colonização do estômago do camarão por células bacterianas produtoras de toxinas solúveis que causam a descamação celular do hepatopâncreas, testou-se o método AP3.

Nenhuma das amostras analisadas foram positivas para o método AP3, desenvolvido por Sirikharin *et al.* (2015), que visa a detecção da toxina. O que pode corroborar com a teoria de que os plasmídeos envolvidos não necessariamente são portadores da toxina, visto que o método AP3 apresenta 100% de especificidade e sensibilidade.

Os outros métodos listados na tabela 3, utilizados para detecção das toxinas, também foram testados e as amostras apresentaram resultados negativos, assim pode-se inferir que as estirpes de *Vibrio* analisadas não produzem a toxina, embora possam carregar o plasmídeo causador.

Vale ressaltar que a detecção dos plasmídeos torna-se preocupante, devido ao fato de existir a possibilidade da sua transferência, principalmente para espécies com alto grau de similaridade gênica, visto que as mesmas apresentam diversas formas de troca de material genético, havendo a possibilidade de conversão de uma cepa não patogênica em patogênica, aumentando os riscos de disseminação da doença (RESTREPO *et al.*, 2018).

A amostra 72 demonstrou resultados positivos apenas no método AP4, que tem como objetivo a detecção do VpAHPND. Essa metodologia é considerada mais sensível e mais específica que a do método AP3, sendo incapaz de detectar amplicons para bactérias não causadoras de AHPND.

Entretanto, para a afirmação de que as amostras isoladas são de cepas causadoras de AHPND, haveria a necessidade de que todas as amostras tivessem sido positivas em todas as reações de PCR envolvidas, o que não foi o caso.

De acordo com o Manual de Testes de Diagnóstico para Animais Aquáticos (2019) da OIE, o protocolo ideal para a confirmação da identificação de VpAHPND são as análises por PCR, seguida de um bioensaio, a fim de confirmar a patogenicidade do agente causador.

Ressalta-se também que por critérios técnicos, definição de caso suspeito deve atender a pelo menos um dos seguintes pré-requisitos: mortalidade e sinais clínicos consistentes; histopatologia compatível; e detecção dos genes da toxina por PCR convencional ou PCR em tempo real. Enquanto que para casos confirmados deve-se atender a pelo menos dois dos seguintes critérios: histopatologia compatível; detecção do gene da toxina Pir no plasmídeo pVA1 em *V. parahaemolyticus*; e resultados positivos em bioensaios (OIE, 2019).

Portanto, pode-se interpretar que os resultados obtidos na presente pesquisa não configuram caso positivo de AHPND, principalmente porque em nenhum dos testes a presença do gene das toxinas foi evidenciada, apenas a presença do plasmídeo. Entretanto, a amostra 72 configura-se como caso suspeito, visto que atende a pelo menos um dos pré-requisitos estabelecidos pela OIE, tendo demonstrado resultado positivo para a presença de VpAHPND em reações de PCR convencional.

Embora os resultados detectem a presença de plasmídeo pVA1 (gene alvo dos métodos AP1 e AP2), os mesmos já foram identificados em outras espécies de *Vibrio*, mas não necessariamente acompanhado de genes pirABvp (relacionado a codificação da toxina) (DONG *et al.*, 2017).

Contudo, não se deve descartar a possibilidade de que essas espécies podem ser potencialmente patogênicas. Phiwsaiya *et al.* (2017) caracterizaram uma estirpe de *V. parahaemolyticus* causador de AHPND, portador de um plasmídeo pVA1 mutante com a inserção de uma sequência de transposon em seu gene PirAvp. Nesse caso, o plasmídeo em questão apresentou virulência para o camarão cultivado, causando mortalidade, apesar da incapacidade de produzir toxinas, além de não ocasionar lesões nos organismos infectados. Assim, episódios de mortalidade em massa podem não ter sido previamente relacionados a AHPND, devido à ausência de sinais clínicos.

A falta de um protocolo de diagnóstico rápido e específico dificultam que medidas de controle e rastreabilidade da enfermidade sejam tomadas (FLEGEL; LO, 2014). A compreensão acerca dos mecanismos genéticos envolvidos na enfermidade ainda é confusa, sendo necessária a combinação de diferentes métodos de análises.

5 CONCLUSÃO

Os parâmetros ambientais analisados estavam dentro dos limites estabelecidos para o ambiente estudado.

A quantificação de bactérias pertencentes ao gênero *Vibrio* demonstraram que as mesmas foram mais abundantes nas amostras de água que sedimento, principalmente durante a segunda coleta.

A cerca da diversidade de espécies, a identificação não foi possível devido as metodologias adotadas, sendo confirmadas somente o pertencimento ao gênero de estudo. Entretanto, como base na capacidade fermentadora de sacarose, foi possível presumir que em ambos os estuários, a presença de estirpes sacarose positiva foi maior, tanto nas amostras de água, como também nas de sedimento.

Em 6 estirpes analisadas foram detectados genes relacionados ao plasmídeo PvA1. Entretanto, com base nos pré-requisitos estabelecidos pela OIE (2019), as amostras não podem ser enquadradas como casos confirmados, vistos que não atendem aos critérios propostos para tal. Exceto pela amostra 72, proveniente das amostras de água do estuário do Rio Pirangi, que se configura como caso suspeito.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante do que foi exposto, é importante ressaltar que estirpes do gênero *Vibrio*, podem apresentar mais de um plasmídeo extracromossômico, aumentando assim a preocupação com a possibilidade de troca gênica. Dessa forma, o fato de estirpes provenientes de amostras ambientais encontradas no presente estudo, carregarem o plasmídeo PvA1, torna-se um risco aos ambientes de carcinicultura no Ceará. Os resultados negativos para a expressão da toxina não indicam falta de patogenicidade, visto que plasmídeos mutados (que não apresentam o gene da toxina) também são capazes de acarretar mortalidade em massa. Assim, o ideal para as amostras testadas no presente estudo é que sejam submetidas a bioensaios, a fim de verificar a ocorrências de lesões hepatopancreáticas e taxas de mortalidade, para então tentar estabelecer medidas que possam conter ou remediar algum eventual surto de AHPND.

REFERÊNCIAS

- ABCC. **Recomendações de Boas Práticas de Manejo na Prevenção de Enfermidades**. 2004. Elaborado por Clelio Fonseca e Itamar de Paiva Rocha. Disponível em: https://abccam.com.br/wp-content/uploads/2011/02/Cartilha_IMNV.pdf. Acesso em: 13 mar. 2021.
- ABCC; MAPA. **Censo da Carcinicultura do Litoral Sul do Estado do Ceará e Zonas Interioranas Adjacentes**. 2017. Disponível em <https://abccam.com.br/wp-content/uploads/2017/12/CENSO-DA-CARCINICULTURA-LITORAL-SUL.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2021.
- ADAMS, B. L.; BATES, T. C.; OLIVER, J. D. Survival of *Helicobacter pylori* in a Natural Freshwater Environment. **Microbiologia Aplicada e Ambiental**, [S.L.], v. 69, n. 12, p. 7462-7466, dez. 2003. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.69.12.7462-7466.2003>.
- AGUIRRE-GUZMÁN, G.; VÁZQUEZ-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, n. 4, p. 215-219, nov. 2001.
- ALEXANDRE, N. Z. **Análise Integrada da qualidade das águas da bacia do Rio Araranguá (SC)**. 2000. 296 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Geografia, Departamento de Geociências, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000.
- ALVES, C. A. B. **Fatores Interferentes na ocorrência das Vibrioses em camarão marinho cultivado (*Litopenaeus vannamei*, Boone 1931) no litoral norte de Pernambuco**. 2007. 43 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2007.
- ARMELIM, J. M. **Ocorrência de antibióticos em fazendas de cultivo de camarão (*Litopenaeus vannamei*) no estado do Rio Grande do Norte - Brasil**. 2019. 105 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Ciências, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2019.
- APPLE, J. K.; SMITH, E. M.; BOYD, T. J. Temperature, Salinity, Nutrients, and the Covariation of Bacterial Production and Chlorophyll-a in Estuarine Ecosystems. **Journal of Coastal Research**, West Palm Beach, v. 55, p. 59-75. Jan 2008.
- BONDAD-REANTASO, M. G. Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of penaeid shrimps: global perspective. *In Addressing acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) and other transboundary diseases for improved aquatic animal health in Southeast Asia*. Southeast Asian Fisheries Development Center/Aquaculture Department, Iloilo, Philippines. 2016, p. 15-23.
- BUCHELI, P.; GARCIA, F. O Vírus da Síndrome da Mancha Branca. **Panorama da Aquicultura**, [s. l], v. 87, 2005.
- CHONSIN, K. *et al.* Genetic diversity of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from farmed Pacific white shrimp and ambient pond water affected by acute hepatopancreatic necrosis

disease outbreak in Thailand. **Fems Microbiology Letters**, [S.L.], v. 363, n. 2, p. 1-8, 21 nov. 2015. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/femsle/fnv222>.

COELHO, M. das G. L. **Susceptibilidade do camarão-rosa *Farfantepenaeus subtilis* (Perez-Farfante, 1967) ao vírus da infecção hipodermal e necrose hematopoiética (IHHNV)**. 2006. 38f Dissertação (mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) - Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

CUÉLLAR-ANJEL, J. **Síndrome de Taura**. 2013. Factsheets Elaborado por The Center For Food Security & Public. Disponível em: <https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/taura-syndrome-es.pdf>. Acesso em: 13 mar. 2021.

D'ASSUMPÇÃO, A. L. G. **Qualidade da água no estuário do rio Pirangi - CE**. Anais do XVII Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos, São Paulo, XVII Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos, São Paulo, SP - 2007.

DANG, H. *et al.* Dominant chloramphenicol-resistant bacteria and resistance genes in coastal marine waters of Jiaozhou Bay, China. **World Journal Of Microbiology And Biotechnology**, [S.L.] v. 24, n. 2, p. 209-217, 24 jun. 2007. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-007-9458-8>.

DANGTIP, S. *et al.* AP4 method for two-tube nested PCR detection of AHPND isolates of *Vibrio parahaemolyticus*. **Aquaculture Reports**, v. 2, p. 158-162, 2015.

DONG, X. *et al.* An isolate of *Vibrio campbellii* carrying the pirVP gene causes acute hepatopancreatic necrosis disease. **Emerging Microbes & Infections**, [s.l.], v. 6, n. 1, p. 1-3, jan. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1038/emi.2016.131>.

DOWNES, M. P. & ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. APHA 4th. edition. 676 p., Washington, DC, 2001.

ESCHRIQUE, S. A. **Hidrogeoquímica do fósforo no estuário do Jaguaribe (CE)**. 2007. 100 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

FAO. **Technical Workshop on Early Mortality Syndrome (EMS) or Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPNS) of Cultured Shrimp**. Hanoi, Vietnã, 25-27 Junho, 2013.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2018. **Meeting the sustainable development goals**. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO, 2018

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture. 2020. **Sustainability in action**. Rome. Disponível em: www.fao.org/documents/card/en/c/ca9229en/ Acesso em: 15 jan. 2021

FEIJÓ, R. G. **Prospecção de genes relacionados à ocorrência de enfermidades no camarão *Litopenaeus Vannamei* (Boone, 1931) sob condições de cultivo**. 2009. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) - Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

FLEGEL, T. W.; LO, C. F. Free release of primers for specific detection of bacterial isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). **Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific**, Thailand, 2014.

GUIMARÃES, R. L. **Patógenos das Famílias Vibrionaceae, Aeromonadaceae e Enterobacteriaceae isolados de camarão (*Penaeus* spp.) de vida livre no Rio de Janeiro e de criatórios (*Litopenaeus vannamei*) oriundos do Rio Grande do Norte**. 2008. 67 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Veterinária, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2008.

GUZMÁN-SÁENZ, F. M. *et al.* Vírus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHNV) y vírus del síndrome de Taura (TSV) em camarón silvestre (*Farfantepenaeus aztecus* Ives, 1981 y *Litopenaeus setiferus* Linnaeus, 1767) de La Laguna Madre, Golfo de México. **Revista de Biología Marinha y Oceanografía**. 44, 663-672. 2009.

IBGE. **Produção da Pecuária Municipal 2017 PPM**. Rio de Janeiro, v45, p. 1-8, 2017. Disponível em: https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2017_v45_br_informativo.pdf. Acesso em: 15 jan. 2021

IBGE. **Produção da Pecuária Municipal 2018 PPM**. Rio de Janeiro, v46, p. 1-8, 2018. Disponível em: https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2017_v45_br_informativo.pdf. Acesso em: 15 jan. 2021

IBGE. **Produção da Pecuária Municipal 2019 PPM**. Rio de Janeiro, v47, p. 1-8, 2019. Disponível em: https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2019_v47_br_informativo.pdf. Acesso em: 15 jan. 2021

ICAR. **Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease / Early Mortality Syndrome (AHPND/EMS)**. CIBA - Extension Series No. 50, Chennai. 2016.

IZUMIYA, H. *et al.* Multiplex PCR assay for identification of three major pathogenic *Vibrio* spp., *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Vibrio vulnificus*. **Molecular And Cellular Probes**, v. 25, n. 4, p.174-176, ago. 2011.

KAYSNER, C.A *et al.* Bacteriological Analytical Manual (BAM): *Vibrio*. 2004. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm070830.htm>. Acesso em: 13 mar. 2021

KIMES, N. E. *et al.* Temperature regulation of virulence factors in the pathogen *Vibrio coralliilyticus*. **The Isme Journal**, New York, v. 6, n. 4, p. 835-846, 8 dez. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2011.154>. Apr 2012.

KOLM, H. E.; ABSHER, T. M. Bacterial density and coliform organisms in waters and oysters of Paranaguá estuarine complex, Paraná, Brazil. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 34, n. 1, p. 49-59. 2008.

KUMAR, B. K., *et al.* Diversity of *Vibrio parahaemolyticus* associated with disease outbreak among cultured *Litopenaeus vannamei* (Pacific white shrimp) in India. **Aquaculture**, [S.L.], v. 433, p. 247-251, set. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.06.016>.

LARSEN, M. H. *et al.* Influences of temperature, salinity and starvation on the motility and chemotactic response of *Vibrio anguillarum*. **Microbiology**, [S.L.], v. 150, n. 5, p. 1283-1290, 1 maio 2004. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.26379-0>.

LEVY, C.E. **Manual de Microbiologia Clínica para controle de infecções em serviços de saúde**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, DF, 2004.

LIGHTNER D.V. The penaeid shrimp viruses IHNV and TSV: epizootiology, production impacts and role of international trade in their distribution in the Americas. **Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.**, v.15, p. 579-601, 1996.

LIGHTNER, D.V. The penaeid shrimp viruses TSV, IHNV, WSSV, and YHV: current status in the Americas, available diagnostic methods and management strategies. **J. App. Aquaculture**, v. 9, pp. 27-52, 1999.

LIGHTNER, D.V. Biosecurity in Shrimp Farming: Pathogen Exclusion through use of SPF Stock and routine Surveillance. **Journal of The World Aquaculture Society**, v. 36, p. 229-242, 2005.

LIMA, A. de S. **Vibrio em Camarão e na água de tres fazendas de carcinicultura no Ceará**. 2007. 120 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Marinhas Tropicais, Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

LIMA, J. S. G.; MENDONÇA FILHO, M. Sustentabilidade socioambiental na aquicultura. **Cienc. Cult.**, São Paulo, v. 61, n. 4, p. 4-5, 2009. Disponível em: <http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252009000400002&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 15 Jan. 2021.

LINDOSO, A. L. P. **Eficácia do probiótico comercial no cultivo do camarão-branco-dopacífico (*Litopenaeus vannamei*) em sistema intensivo**. 2017. 64 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

LÓPEZ-CERVANTES, G. *et al.* Temperature and salinity modulate virulence and PirA gene expression of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of AHPND. **Aquaculture International**, [S.L.], v. 29, n. 2, p. 743-756, 26 fev. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10499-021-00654-0>.

MADIGAN, M. T. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MARTINELLI FILHO, J. E. **A associação entre o zooplâncton e o *Vibrio cholerae* no complexo estuarino de Santos - Bertioga e Plataforma adjacente**. 2007. 151 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Oceanografia Biológica, Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

MELLO, S. C. R. P.; OLIVEIRA, E. C. P.; SEIXAS FILHO, J. T. ASPECTOS DA AQUICULTURA E SUA IMPORTÂNCIA NA PRODUÇÃO DE ALIMENTOS DE ALTO VALOR BIOLÓGICO. **Semioses**, [S.L.], v. 11, n. 2, p. 28-34, 27 out. 2017. Sociedade Unificada de Ensino Augusto Motta -UNISUAM. <http://dx.doi.org/10.15202/1981996x.2017v11n2p28>.

MENDES, E. S.; *et al.* *Vibrio* spp. Isolados de camarão e água de cultivo de fazenda marinha em Pernambuco. **Ciência Animal Brasileira**. São Paulo, v. 10, n. 4, p. 1191-1199, 2009.

MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G.T.; MENEZES, M. Propriedades Físicas e Químicas dos Solos. *In: Ecologia e Manejo de Patógenos Radiculares em Solos Tropicais*. Recife: Ufrpe, Imprensa Universitária, 2005. p. 41.

MORENO, L. T. A atividade artesanal pesqueira versus a aquicultura empresarial: as disputas que envolvem a pesca brasileira. **Revista Campo Território**, [S.L.], p. 178-207, 30 abr. 2019. EDUFU - Editora da Universidade Federal de Uberlândia. <http://dx.doi.org/10.14393/rct143208>.

MUÑIZ, M. M. **Biosíntesis de nanopartículas con extractos de macroalgas, caracterización y evaluación contra *Vibrio parahaemolyticus* causante de la enfermedad de necrosis hepatopancreática aguda (AHPND/ EMS) en camarón blanco *Litopenaeus vannamei***. 2020. 156 f. Tese (Doutorado) - Curso de Doutor em Ciências com Especialização em Nutrição e Tecnologia de Alimentos Para Organismos Aquáticos., Ciências Biológicas, Universidade Autónoma de Nueva Leon, San Nicolas de Los Garza, 2020.

MUTHUKRISHNAN, S. *et al.* Horizontal gene transfer of the pirAB genes responsible for Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) turns a non-*Vibrio* strain into an AHPND-positive pathogen. **Biorxiv**, Selangor, 20 dez. 2019.

NASCIMENTO, I. A. Manguezal e carcinicultura: o conflito da ecocompatibilidade. **Revista Diálogos & Ciência**, v. 5, n. 10, 2007.

NASCIMENTO, R. C. M. do; *et al.* Qualidade da água de três estuários tropicais expostos a diferentes níveis de urbanização. **Revista de Gestão Costeira Integrada**, [S.L.], v. 20, n. 3, p. 169-178, 1 set. 2020. Associação Portuguesa dos Recursos Hídricos (APRH). <http://dx.doi.org/10.5894/rgci-n284>.

NEGREIROS, L. M. S.; SANTOS, D. B. Doenças microbianas na carcinicultura brasileira: uma revisão. **Carpe Diem: Revista Cultural e Científica do UNIFACEX**, 13(1), 107-124. 2015

NORIEGA-OROZCO, L. *et al.* Pathogenic and non pathogenic *Vibrio* species in aquaculture shrimp ponds. **Revista Latino americana de Microbiologia**, v. 49, n. 3-4, p. 60-67, 2007.

NUNES, A. J. P.; MARTINS, P. C.C.; GESTEIRA, T. C. V. Carcinicultura ameaçada: produtores sofrem com as mortalidades frequentes do Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV). **Panorama da Aquicultura**, vol.14 (83) (2004), p. 37-51.

NUNES, A. J. P. Um ano de mudanças, perdas e ganhos. **Panorama da Aquicultura**, v.15, n. 92, p. 26-33, 2005.

OIE. Chapter 2.2.1 - Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease. In: Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. Paris: OIE, 2019. p. 1–12. 2019.

OIE. Chapter 2.2.8 – Infection With White Spot Syndrome Virus. In: Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. Paris: OIE, 2019.

OIE. Chapter 2.2.9 – Infection With Yellow Head Virus Genotype 1. In: Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. Paris: OIE, 2019. p. 1–14. 2019.

OLIVEIRA NETO, J. M. de. **Investigação da ocorrência dos vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) e da infecção hipodermal e necrose hematopoiética (IHHNV) em camarões coletados em área sob influência de efluentes da carcinicultura.** 2006. 63 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar, Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, Fortaleza, 2006.

PAULA, D.P.; MORAIS, J.O.; PINHEIRO, L.S. **Análise geoambiental do estuário do rio Jaguaribe-CE: tensores naturais e antrópicos.** Anais do 6º Simpósio Nacional de Geomorfologia, VI:1-11, Goiânia, GO, Brasil. (2006) Disponível on line em: <http://www.seb-ecologia.org.br/anais/3.pd> Acesso em: 13 mar. 2021

PHIWSAIYA, K. *et al.* A Natural *Vibrio parahaemolyticus* PirvA-B Mutant Kills Shrimp but Produces neither Pir Vp Toxins nor Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease Lesions. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 83, n. 16, 2 jun. 2017.

PINTO, A. di, *et al.* Comparison between thiosulphate-citrate-bile salt sucrose (TCBS) agar and CHROMagar Vibrio for isolating *Vibrio parahaemolyticus*. **Food Control**, [S.L.], v. 22, n. 1, p. 124-127, jan. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.06.013>.

QUEIROZ, L. *et al.* Shrimp aquaculture in the federal state of Ceará, 1970–2012: Trends after mangrove forest privatization in Brazil. **Ocean & Coastal Management**, v. 73, p.54-62, mar. 2013.

RASZL, S. M. ***Vibrio vulnificus* em ostras (*Crassostreas gigas*) em Santa Catarina: Caracterização genotípica e comparação da eficácia de métodos microbiológicos de detecção.** 2016. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

REBOUÇAS, R. H. **Colonização de tecidos e líquido corpóreo do camarão *Litopenaeus vannamei* por *Vibrio parahaemolyticus* autóctone do ambiente de cultivo.** 2017. 72 f. Tese (Doutorado em Ciências Marinhas Tropicais) - Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

RESTREPO, L. *et al.* Draft genome sequence of pathogenic bacteria *Vibrio parahaemolyticus* strain Ba94C2, associated with acute hepatopancreatic necrosis disease isolate from South America. **Genomics Data**, v. 9, p.143-144, set. 2016.

RESTREPO, L. *et al.* PirVP genes causing AHPND identified in a new *Vibrio* species (*Vibrio punensis*) within the commensal Orientalis clade. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 30 ago. 2018. Springer Science and Business Media LLC.

ROCHA, I. de P., Carcinicultura Brasileira: Processos Tecnológicos, Impactos Sócio-Econômicos, Sustentabilidade Ambiental, Entraves e Oportunidades. **Revista da Associação de Criadores de Camarão em Cativeiro (ABCC)**, 2011. Disponível em: <https://abccam.com.br/2011/03/carcinicultura-brasileira/>. Acesso em: 15 jan. 2021

ROCHA, R. dos S. **Caracterização polifásica da comunidade bacteriana Heterotrófica de ambientes de carcinicultura frente às tetraciclinas.** 2016. 107 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós Graduação em Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

RODRIGUES, G. M. **Panorama do comércio internacional brasileiro de pescados no período entre 2006 e 2018.** 2019. 39 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia de Pesca, Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/50352>. Acesso em: 15 jan. 2021

ROSA, J. V., *et al.* Formação de biofilme após o estresse subletal por *Vibrio parahaemolyticus* isolados de camarão rosa (*Farfantepenaeus paulensis*). **Ciência Animal Brasileira**, [S.L.], v. 18, p. 1-8, 23 out. 2017. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1089-6891v18e-44246>.

SANTOS, H. M. *et al.* Diagnosis and potential treatments for acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND): a review. **Aquaculture International**, [s.l.], v. 28, n. 1, p. 169-185, 10 ago. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10499-019-00451-w>.

SAULNIER, D. *et al.* Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. **Aquaculture**, v. 191, n. 1-3, p.133-144, nov. 2000.

SCHULTER, E. P.; VIEIRA-FILHO, J. E. R. **EVOLUÇÃO DA PISCICULTURA NO BRASIL: DIAGNÓSTICO E DESENVOLVIMENTO DA CADEIA PRODUTIVA DE TILÁPIA.** 2017. Texto para discussão / Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada.- Brasília : Rio de Janeiro : Ipea , 1990. Disponível em: http://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/8043/1/td_2328.pdf. Acesso em: 15 jan. 2021.

SILVA, L. G. **Virus del síndrome de Taura (STV), y virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV), agentes causantes de Epizootias en la camaronicultura mexicana (1996-1999).** 1999. 151 f. Tese (Doutorado) - Doutorado em Ciências Com Especialidade em Microbiologia, Universidade Autónoma de Nuevo León, San Nicolas de Los Garza, 1999.

SIQUEIRA, T. V. Aquicultura: a nova fronteira para produção de alimentos de forma sustentável. **Revista BNDES**, Rio de Janeiro, v. 8, n. 49, p. 119-170, jun. 2018. Disponível em: https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/bitstream/1408/16085/1/PRArt_Aquicultura%20a%20nova%20fronteira_compl.pdf. Acesso em: 15 jan. 2021.

SIRIKHARIN, R. *et al.* Characterization and PCR Detection Of Binary, Pir-Like Toxins from *Vibrio parahaemolyticus* Isolates that Cause Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) in Shrimp. **Plos One**, [s.l.], v. 10, n. 5, p. 1-16, 27 maio 2015. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0126987>.

SOUSA, A. B. de; MELO, R. A. de; SILVA, D. F. Avaliação climática e dos recursos hídricos da bacia hidrográfica do Rio Jaguaribe (CE). **Revista Brasileira de Geografia Física**, Pernambuco, v. 6, n. 5, p. 1115-1140, 30 jul. 2013.

TANCREDO, K. R. **Impactos Ambientais da Carcinicultura Brasileira**. 3rd International Workshop | Advances in Cleaner Production, São Paulo, 2011.

THOMPSON, F. L. *et al.* Phylogeny and Molecular Identification of Vibrios on the Basis of Multilocus Sequence Analysis. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 71, n. 9, p. 5107-5115, set. 2005. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.71.9.5107-5115.2005>.

VALENTI, W. C. 2002. **Aquicultura sustentável**. In: Congresso de Zootecnia, 12o, Vila Real, Portugal, 2002, Vila Real: Associação Portuguesa dos Engenheiros Zootécnicos. Anais...p.111-118.

VIEIRA, R. H. S. F. *et al.* VIBRIOSES EM CAMARÃO CULTIVADO: vibrioses on farmed shrimps. **Arquivos de Ciências do Mar**, Fortaleza, v. 42, n. 1, p. 112-120, 01 jul. 2009. Disponível em: <http://www.periodicos.ufc.br/arquivosdecienciadomar/article/view/6051>. Acesso em: 13 mar. 2021.

WANG, H. *et al.* *Pseudoalteromonas* probiotics as potential biocontrol agents improve the survival of *Penaeus vannamei* challenged with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND)-causing *Vibrio parahaemolyticus*. **Aquaculture**, v. 494, p. 30-36, set. 2018.

WEST, C. K. G.; KLEIN, S. L.; LOVELL, C. R. High Frequency of Virulence Factor Genestdh, trh, and tlh in *Vibrio parahaemolyticus* Strains Isolated from a Pristine Estuary. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 79, n. 7, p. 2247-2252, 25 jan. 2013. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.03792-12>.

YANG, L. *et al.*, The low-salt stimulon in *Vibrio parahaemolyticus*. **International Journal Of Food Microbiology**, [S.L.], v. 137, n. 1, p. 49-54, 31 jan. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.006>.

ZHANG, X. J. *et al.* Isolation and Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio rotiferianus* Associated with Mass Mortality of Chinese Shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). **Journal Of Shellfish Research**, [S.L.], v. 33, n. 1, p. 61-68, abr. 2014. National Shellfisheries Association. <http://dx.doi.org/10.2983/035.033.0108>.