

MICOBACTERIOSE EM CAMARÃO BRANCO DO PACÍFICO, *Litopenaeus vannamei*

Virgínia Fonseca PEDROSA¹; Wilson WASIELESKY Júnior², Marta da Costa KLOSTERHOFF³, Luis Alberto ROMANO⁴, Gabriele Rodrigues de LARA⁵

RESUMO

A infecção por *Mycobacterium spp.* tem sido constatada em diversos vertebrados, ocasionando doenças em humanos e animais. As espécies responsáveis pela ocorrência de micobacteriose em peixes, a saber, *Mycobacterium marinum*, *M. fortuitum* e *M. chelonae*, também são potencialmente infecciosas para os camarões peneídeos. A micobacteriose que afeta crustáceos corresponde a uma enfermidade sistêmica, granulomatosa, possuindo como agente etiológico bacilos Gram positivos ácido-álcool resistentes. Relata-se neste trabalho a ocorrência de micobacteriose em camarões da espécie *Litopenaeus vannamei*, sendo identificada a bactéria *M. marinum* nas amostras teciduais analisadas. Durante a manutenção de juvenis da espécie foram observadas lesões enegrecidas no sexto segmento abdominal de 20 espécimes. A partir das técnicas de Fite-Faraco e Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) foi identificado o patógeno, representando uma doença bacteriana com potencial zootécnico que ocorre em ambientes aquáticos, acarretando riscos de contaminação tóxica em pessoas envolvidas na manipulação de camarões.

Palavras-chave: *Mycobacterium marinum*; *Litopenaeus vannamei*; granuloma; zoonose; Fite-Faraco; hibridização in situ.

MYCOBACTERIOSIS WHITE SHRIMP PACIFIC *Litopenaeus vannamei*

ABSTRACT

The *Mycobacterium spp.* infection they have been documented in many vertebrates, causing known diseases in man and animals. The species responsible for the occurrence of mycobacteriosis in fish, *Mycobacterium marinum*, *M. fortuitum* and *M. chelonae*, are also potentially infectious for penaeid shrimp. The mycobacterial disease that affects shellfish corresponds to a systemic disease, granulomatous, having as an etiological agent Gram-positive bacilli resistant acid-alcohol. We report the occurrence of mycobacteriosis in shrimps of the species *Litopenaeus vannamei*, and identified the species *M. marinum* in tissue samples analyzed. During the maintenance of juvenile of the species, blackish lesions were observed in the sixth abdominal segment in 20 specimens. From techniques Fite-Faraco and hybridization in situ with fluorescence (FISH), has identified the pathogen in the analyzed tissue was observed, representing a bacterial disease of aquatic environments with zoonotic potential, causing risks of topical contamination on people involved in handling shrimp.

Key words: *Mycobacterium marinum*; *Litopenaeus vannamei*; granuloma; zoonosis; Fite-Faraco; hybridization in situ.

Nota Científica: Recebido em 29/09/2016; Aprovado em 10/05/2017

^{1,3,4}Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande, Laboratório de Imunologia e Patologia de Organismos Aquáticos, Rua do Hotel, nº2, Cassino, Rio Grande-RS, CEP: 96210-030. E-mail: vikavet@yahoo.com.br (autor correspondente)

^{2,5}Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande, Laboratório de Carcinocultura, Rua do Hotel, nº2, Cassino, Rio Grande-RS, CEP: 96210-030.

INTRODUÇÃO

O camarão branco do Pacífico, *Litopenaeus vannamei*, espécie nativa da costa do Pacífico ocidental da América Latina (LIAO e CHIEN, 2011), possui participação de 90% da produção global de camarões cultivados (NIRMAL e BENJAKUL, 2009).

No Brasil, as condições climáticas são favoráveis ao cultivo da espécie, com domínio das tecnologias de produção, que transformaram o País no principal produtor de camarões das Américas (POERSCH *et al.*, 2006).

Juntamente com o rápido crescimento da carcinicultura surgiram enfermidades causadas por diferentes agentes patogênicos, que provocaram enormes perdas econômicas nas últimas décadas (FAO, 2014).

A ocorrência de infecção por *Mycobacterium spp.* tem sido documentada em diversos vertebrados, ocasionando doenças infecciosas em humanos e outros animais. Dentre as espécies mais conhecidas estão *Mycobacterium tuberculosis* e *M. bovis*, que acarretam doenças economicamente importantes em bovinos, e *M. avium*, que, da mesma forma, afeta aves (BROCK *et al.*, 1986).

Em humanos ocorre a espécie *M. marinum*, que causa lesões sob a forma de inflamação granulomatosa e nodular ou granulomas difusos na pele, tecido subcutâneo e tendões, sendo a doença também denominada “granuloma de natação”, “granuloma de tanques” e “doença de manipuladores e criadores de peixes” (CHRISTOPHER *et al.*, 2004; EKENNA, 2016), podendo ser confundida com esporotricose em humanos, pela semelhança entre as lesões (EKENNA, 2016), e ainda causar afecções mais severas em pacientes imunocomprometidos, como artrite séptica, bursite e osteomielite (KERN *et al.*, 1989; JERNIGAN e FARR, 2000). A infecção fica restrita à pele, uma vez que o crescimento ótimo da espécie *M. marinum* ocorre em temperaturas em torno de 37°C (SILCOX e DAVID, 1971), sendo revelada, no exame histopatológico da lesão de humanos infectados com o agente, uma reação granulomatosa crônica com inflamação aguda e crônica e presença de células gigantes multinucleadas (LEBLANC *et al.*, 2012).

As espécies responsáveis pela ocorrência da micobacteriose em peixes, como as já relatadas *Mycobacterium marinum*, *M. fortuitum* e *M. chelonae* (FRERICHS, 1993), também são potencialmente infecciosas para o camarão peneídeo. Em crustáceos

decápodes, a ocorrência de algumas destas bactérias já foi relatada (OVERSTREET, 1978; TANG *et al.*, 2014), incluindo a espécie *M. peregrinum* (MOHNEY *et al.*, 1998). No entanto, em alguns casos de micobacteriose não foi possível identificar a espécie responsável pelas lesões (LIGHTNER e REDMAN, 1986; KROL *et al.*, 1989; BROCK e LIGHTNER, 1990).

A enfermidade gera lesões tissulares proliferativas com intensa resposta tecidual, geralmente de característica granulomatosa, com presença de linfócitos, histiócitos, células epiteliais e, em alguns casos, células gigantes multinucleadas. A micobacteriose que afeta crustáceos corresponde a uma enfermidade sistêmica, granulomatosa, e tem como agente etiológico bacilos Gram positivos ácido-álcool resistentes com 1 a 12 cm de comprimento (MORALES-COVARRUBIAS, 2010).

Este trabalho objetiva o estudo da ocorrência de micobacteriose em camarões da espécie *Litopenaeus vannamei*, assim como a identificação da bactéria causadora da infecção de espécimes mantidos em cultivo experimental.

MATERIAL E MÉTODOS

Camarões de um cultivo experimental desenvolvido na Estação Marinha de Aquicultura da Universidade Federal do Rio Grande – RS foram mantidos em tanques com 150 litros de água, estando os valores de todos os parâmetros de qualidade adequados ao cultivo do camarão *Litopenaeus vannamei*. Os exemplares estudados foram eutanasiados com choque térmico, sendo, a seguir, realizada dissecação para coleta de amostras do sexto segmento abdominal, hepatopâncreas e brânquias, as quais foram então fixadas em solução de Davidson e processadas em equipamento automático (LEICA TP 1020).

As amostras teciduais emblocadas em paraplast foram cortadas em micrótomo na espessura de 5 cm, sendo as secções coradas por Hematoxilina e Eosina e pelo método de Fite-Faraco. Para a detecção de bactérias ácido-álcool resistentes pelo método de Fite-Faraco, as secções de tecido foram desparafinizadas em solução composta por xilol e óleo de amendoim por 15 minutos e, em seguida, lavadas em água corrente. Foi utilizada solução de ácido sulfúrico a 10% durante dois minutos para diferenciação, seguida de lavagem em água corrente e água destilada. Para a técnica de Fite-Faraco,

os tecidos são desidratados em xilol e, a seguir, montados sobre lâmina em Bálsamo do Canadá (FITE *et al.*, 1947).

O diagnóstico taxonômico da bactéria foi realizado por meio de hibridização in situ com fluorescência (FISH), utilizando o oligonucleotídeo AGG ACC ACG GGA TTC (5'-3'). A técnica de hibridização in situ com fluorescência (FISH), possui a vantagem de ser mais específica e sensível, permitindo a visualização de micro-organismos in situ sem realização de cultivo celular.

RESULTADOS

Os espécimes de *Litopenaeus vannamei*, estocados a uma densidade de 400 camarões.m⁻³ e com peso inicial médio de 1,03 g, apresentaram, após 30 dias, peso final médio de 2,25 g e sobrevivência de 67,08% (Tabela 1). Durante a manutenção dos animais

foram observadas lesões enegrecidas no sexto segmento abdominal de 20 exemplares (Figura 1), acompanhadas de baixo ganho de peso e alta mortalidade. As técnicas utilizadas permitiram evidenciar a presença do patógeno no tecido analisado.

Na análise histopatológica utilizando coloração com Hematoxilina e Eosina, observou-se lesão com grande quantidade de pigmento de aspecto melânico, circundada por infiltrados inflamatórios hemocíticos na cutícula e no tecido muscular do sexto segmento abdominal (Figura 2A).

Microscopicamente, por meio da técnica de Fite-Faraco, foram visualizados nódulos granulomatosos com depósitos de melanina, circundados por hemócitos, e presença de bacilos ácido-álcool resistentes no centro da lesão (Figura 2B).

Por meio da técnica de hibridização in situ com fluorescência foi possível identificar *Mycobacterium marinum* como a espécie de micobactéria responsável pelas lesões (Figuras 2C e 2D).

Tabela 1. Resultados (média ± DP) dos parâmetros de crescimento de camarões *Litopenaeus vannamei* durante período experimental de 30 dias.

Parâmetro	Resultado
Peso inicial (g)	1,03 ± 0,55
Peso final (g)	2,25 ± 0,84
Sobrevivência (%)	67,08 ± 10,09
Taxa de conversão alimentar	3,32 ± 1,99
Biomassa inicial (g)	61,87 ± 33,17
Biomassa final (g)	103,13 ± 58,47
Produtividade final (kg.m ⁻³)	0,69 ± 0,39



Figura 1. Exemplar de camarão *Litopenaeus vannamei* com lesões enegrecidas no sexto segmento abdominal.

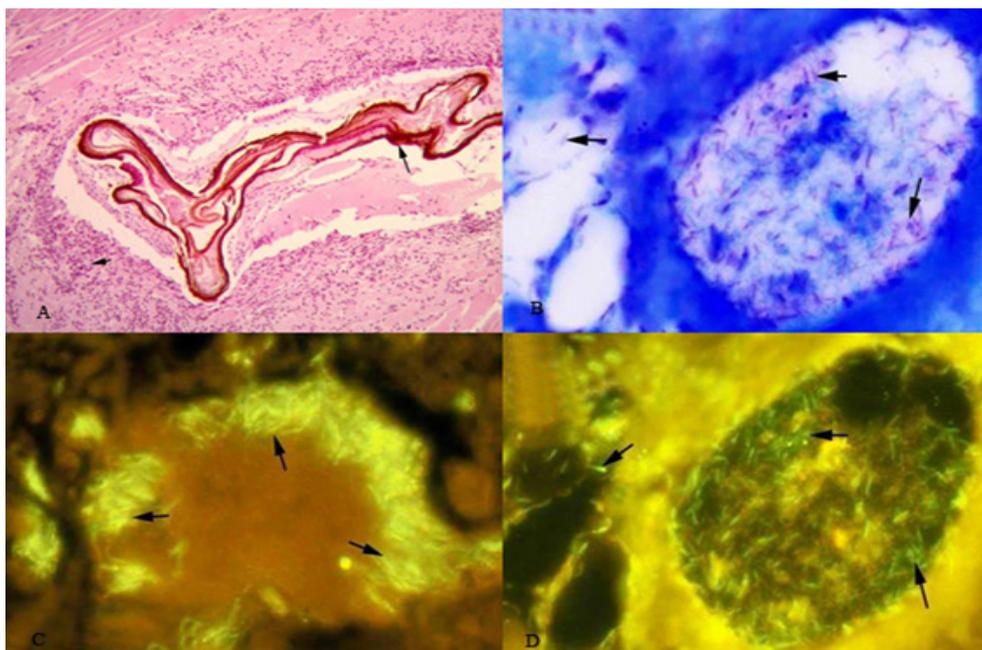


Figura 2. (A) Lesão no tecido muscular do sexto segmento abdominal do camarão *Litopenaeus vannamei* com abundante pigmento de aspecto melânico (seta longa), circundada por infiltrados inflamatórios hemocíticos (seta curta). HE, bar=10 μ m; (B) Nódulos no tecido muscular com presença de bacilos ácido-álcool resistentes no centro da lesão (setas). Fite-Faraco, bar=40 μ m; (C) e (D) Visualização de *Mycobacterium marinum* no tecido muscular, por meio da técnica de hibridização in situ com fluorescência, bar=40 μ m.

DISCUSSÃO

As micobacterioses que afetam humanos e outros mamíferos, como a tuberculose por *Mycobacterium tuberculosis*, já são bem caracterizadas quanto aos aspectos epidemiológico e clínico, com diagnóstico universalmente conhecido. No caso de animais poiquilotérmicos, as micobacterioses não são claramente conhecidas, com protocolos de diagnóstico diferindo dos aplicados quando se trata de espécies de *Mycobacterium* que causam a tuberculose, devido principalmente ao fato de o conteúdo de ácido micolítico ser inferior ao observado em micobactérias que acometem mamíferos e humanos (PROPHET *et al.*, 1992). Para verificação da ocorrência de bacilos ácido-álcool resistentes, a técnica clássica de Ziehl-Neelsen utiliza solventes orgânicos, gerando resultados falso-negativos em amostras do agente, em razão da menor quantidade de ácido micolítico, sendo, por isso, preconizada a técnica de Fite-Faraco, descrita em 1947, que consiste em desparafinar com uma solução de xilol e azeite mineral, evitando a perda de ácido micolítico, o que permite observar claramente as micobactérias que afetam peixes e invertebrados (FITE *et al.*, 1947).

De acordo com o manual de bacteriologia de Bergey, a espécie patogênica de *Mycobacterium* mais

comum em animais aquáticos é *M. marinum*, que substituiu as antigas denominações: *M. piscium*, *M. anabranche* e *M. salmoniphilum* (GARRITY *et al.*, 2005).

O método de hibridização in situ com fluorescência (FISH), com base em sondas de ácidos nucleicos de peptídeos, é rápido e de alta sensibilidade para diagnosticar e diferenciar espécies de micobactérias (HONGMANEE *et al.*, 2001), principalmente as zoonóticas de ocorrência na carcinicultura.

Na presente pesquisa, a lesão observada estava situada nos tecidos conectivo subcuticular e muscular, diferindo da lesão reportada por MOHNEY *et al.* (1998), que se localizava apenas no tecido conectivo subcuticular de *Penaeus vannamei* (*Litopenaeus vannamei*). MOHNEY *et al.* (1998) também reportaram o primeiro caso de ocorrência da espécie *Mycobacterium peregrinum* no camarão, sendo isolada apenas da carapaça do animal, com a lesão melanizada não atingindo o tecido muscular.

A presença de lesões melanizadas representa um problema na apresentação do camarão ao consumidor, pois interfere na aparência do produto, resultando em rejeição e perdas econômicas (LIGHTNER, 1996).

O relato da espécie bacteriana identificada não possui importância econômica apenas em cultivos do camarão *Litopenaeus vannamei*, visto que, em

ambientes aquáticos, causa doença bacteriana com potencial zoonótico, acarretando riscos de contaminação nas pessoas envolvidas na manipulação do camarão (HAENEN *et al.*, 2013).

REFERÊNCIAS

- BROCK, J.A.; NAKAGAWA, L.K.; SHIMOJO, R.J. 1986 Infection of a cultured freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* de Man (Crustacea: Decapoda), by *Mycobacterium* spp., Runyon Group II. *Journal of Fish Diseases*, 9, i. 4, p. 319-324.
- BROCK, J.A.; LIGHTNER, D.V. 1990 Diseases of Crustacea: diseases caused by microorganisms in O. Kinne, editor. *Diseases of marine animals*, 3, p. 245-349. Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, Germany.
- CHRISTOPHER, T.; CASSETTY, M.D.; MIGUEL SANCHEZ, M.D. 2004 *Mycobacterium marinum* infection. *Dermatology Online Journal*, 10(3), 21.
- EKENNA, O. 2016 *Cases in Clinical Infectious Disease Practice*, Editora John Wiley & Sons. ISBN 1119044162, 9781119044161, 272p.
- FAO. 2014 *The State of World Fisheries and Aquaculture. Food and Agriculture 18 Organization of The United Nations, Fisheries and Aquaculture 19 Department*. Roma, 243p.
- FITE, G.L.; CAMBRE, F.J.; TURNER, M.H. 1947 Procedures for demonstrating lepra bacilli in paraffin sections. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 43(6):624-625.
- FRERICHS, G.N. 1993 *Mycobacteriosis: nocardiosis*. In V. Inglis, R. J. Roberts, and N. R. Bromage, editors. Bacterial diseases of fish. Blackwell Scientific Publication, Oxford, UK. P.219-233.
- GARRITY, G.M.; BRENNER, DON J.; KRIEG, N.R.; Staley, J.R. 2005 *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Springer - Verlag.
- HAENEN, O.L.M.; EVANS, J.J.; BERTHE, F. 2013 Bacterial infections from aquatic species: potential for and prevention of contact zoonoses. *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties.*, 32(2), 497-507.
- HONGMANEE, P.; STENDER, H; RASMUSSEN, O.F. 2001 Evaluation of a Fluorescence In Situ Hybridization Assay for Differentiation between Tuberculous and Nontuberculous Mycobacterium Species in Smears of Lowenstein-Jensen and Mycobacteria Growth Indicator Tube Cultures Using Peptide Nucleic Acid Probes. *Journal of Clinical Microbiology*, Mar., p. 1032-1035.
- JERNIGAN, J.A.; FARR, B.M. 2000 Incubation period and sources of exposure for cutaneous *Mycobacterium marinum* infection: case report and review of the literature. *Clinical Infectious Diseases*, 31(August), 439-443.
- KERN, W.; VANEK, E.; JUNGBLUTH, H. 1989 Fish breeder granuloma: infection caused by *Mycobacterium marinum* and other atypical mycobacteria in the human. In Analysis of 8 cases and review of the literature [in German]. *Medizinische Kliniken (Munich)*, 84(12), 578-583.
- KROL, R.M.; HAWKINS, W.E.; VOGELBEIN, W.K.; OVERSTREET, R.M. 1989 Histopathology and ultrastructure of the hemocytic response to an acid-fast bacterial infection in cultured *Penaeus vannamei*. *Journal of Aquatic Animal Health* 1(1):37-42.
- LEBLANC J.D.; WEBSTER G.J.; TYRRELL I CHIU. 2012 *Mycobacterium marinum* infection from sea monkeys. *Can J Infect Dis Med Microbiol*, 23(4): 106-108.
- LIAO, C.; CHIEN, Y.-H. 2011 *The Pacific white shrimp, Litopenaeus vannamei*, in Asia: The world's most widely cultured alien crustacean. In *The Wrong Place- Alien Marine Crustaceans: Distribution, Biology and Impacts*; Galil, B.S., Clark, P.F., Carlton, J.T., Eds.; Invading Nature-Springer Series in Invasion Ecology: Dordrecht, The Netherlands; Volume 6, p. 489-519.
- LIGHTNER, D.V.; REDMAN, R.M. 1986 A probable *Mycobacterium* sp. infection of the marine shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). *Journal of Fish Diseases* 9(4):357-359.
- LIGHTNER, D.V. 1996 *A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA. 304p.
- MOHNEY, L.L.; POULOS, B.T.; BROOKER, J.H.; CAGE, G.D.; LIGHTNER, D.V. 1998 Isolation and Identification of *Mycobacterium peregrinum* from the

Pacific White Shrimp *Penaeus vannamei*. *Journal of Aquatic Animal Health*, 10(1):83–88.

MORALES-COVARRUBIAS, M.S. 2010 *Enfermedades del camarón. Detección mediante análisis en fresco e histopatología*. Editorial Trillas, SA de CV., Av. Río Churubusco 385, Col. Pedro María Anaya, México, D.F. Segunda edición. ISBN:907-607*17-0436-8. Pp. 1-130.

NIRMAL N.P.; BENJAKUL S. 2009 Melanosis and quality changes of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) treated with catechin during iced storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(9):3578-3586.

OVERSTREET, R.M. 1978 Marine maladies? Worms, germs, and other symbionts from the northern Gulf of Mexico. *Mississippi-Alabama Sea Grant Consortium, MASGP-78-921:28–40*.

POERSCH L.; CAVALLI R.O.; WASIELESKY JÚNIOR W.; CASTELLO J.P.; PEIXOTO, S.R.M. 2006 Perspectivas para o desenvolvimento dos cultivos de camarões marinhos no estuário da Lagoa dos Patos, RS. *Ciência Rural*, 36(4):1337-1343.

PROPHET, E.B.; BOB, M.; JACQUELYN, A. 1992 *Laboratory Methods in Histotechnology*. Edited by Armed Forces Institute of Pathology. Washington, D.C.

SILCOX VA; DAVID HL. 1971 Differential identification of *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium marinum*. *Journal of Applied Microbiology*, 21(2):327–34.

TANG, Y.; TAO, P.; TAN, J.; MU, H.; PENG, L.; YANG, D.; TONG, S.; CHEN, L. 2014 Identification of bacterial community composition in freshwater aquaculture system farming of *Litopenaeus vannamei* reveals distinct temperature-driven patterns. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(8), 13663-13680.