



PROGRAMA DE QUALIFICAÇÃO ESPECIAL

EM BOAS PRÁTICAS DE MANEJO E BIOSSEGURANÇA
PARA MICRO E PEQUENOS PRODUTORES DE CAMARÃO
DO MÉDIO E BAIXO JAGUARIBE, ESTADO DO CEARÁ

CURSO: ANÁLISES A FRESCO

O QUE SÃO? QUAL A METODOLOGIA? O QUÊ OBSERVAR E COMO INTERPRETAR? QUAL SUA IMPORTÂNCIA PARA A PREVENÇÃO E CONTROLE DE ENFERMIDADES NO CULTIVO DO *L. VANNAMEI*?

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



A B C C

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE CAMARÃO

**ANÁLISES A FRESCO: O QUE SÃO? QUAL A METODOLOGIA? O
QUE OBSERVAR E COMO INTERPRETAR? QUAL SUA
IMPORTÂNCIA PARA A PREVENÇÃO E CONTROLE DE
ENFERMIDADES NO CULTIVO DO L. VANNAMEI**

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE CAMARÃO – ABCC

CONVENIO MAPA Nº 827739/2016

SETEMBRO 2017

APRESENTAÇÃO

O desafio de reduzir o uso dos recursos naturais no processo de expansão da carcinicultura, mediante aumento da produtividade, minimizando adicionalmente os prejuízos ocasionados pelas enfermidades de importância econômica para o camarão cultivado, principalmente as infecciosas de origem viral e bacterianas, levaram países como China, Tailândia, Indonésia, Vietnã e Equador, a aperfeiçoarem procedimentos, métodos e práticas de cultivo, cuja sistemática aplicação, além de aumentar a produtividade, assegura a produção em convivência com as referidas adversidades.

Essa situação foi, em grande parte, o motivo que levou a Associação Brasileira de Criadores de Camarão (ABCC), com apoio financeiro do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a elaborar um Programa de Aperfeiçoamento e Capacitação, para os carcinicultores cearenses, envolvendo um abalizado conjunto de BPMs e Medidas de Biossegurança associado com o Sistema Intensivo de produção, cuja aplicação contribuirá efetivamente para a melhoria dos atuais níveis de produção comercial, assegurando a viabilidade da atividade frente ao surto da “mancha branca” e, naturalmente, a oferta de camarão para os mercados consumidores.

Em realidade, o conceito do Sistema Intensivo, que foi aprimorado e será disseminado na Carcinicultura cearense, refere-se à forma mais eficiente ou à que gera a melhor relação custo x benefício para garantir o desempenho produtivo, a expansão vertical e o desenvolvimento sustentável da atividade de carcinicultura, frente aos problemas associados com a presença da mancha branca.

Da mesma forma, a Biossegurança, que para efeitos do presente Programa, se junta às Boas Práticas de Manejo, é o termo aplicado na indústria animal para descrever os procedimentos e cuidados especiais, cientificamente comprovados, para a prevenção e controle das enfermidades virais, o que significa o uso de práticas que previnem e/ou convivem com as enfermidades que afetam o camarão cultivado.

Para assegurar o uso eficiente do Sistema Intensivo, combinados com as indispensáveis Medidas de BPM e Biossegurança, o **PROGRAMA DE QUALIFICAÇÃO ESPECIAL EM BOAS PRÁTICAS DE MANEJO E BIOSSEGURANÇA PARA MICRO E PEQUENOS PRODUTORES DE CAMARÃO DO MÉDIO E BAIXO JAGUARIBE, ESTADO DO CEARÁ** prevê a partir de Abril/2017, a realização de cursos específicos, que priorizarão os aspectos práticos da transferência de conhecimentos com a realização de análises de água e solo e análises presuntivas do camarão, bem como, todo o funcionamento e protocolo de um Sistema de Cultivo Intensivo de Camarão Marinho, como parte da capacitação, e que capacitará, principalmente os micro e pequenos produtores, nas práticas de manejo tecnológico e seguro da produção de camarão cultivado.

Para assegurar a disseminação das BPMs com Biossegurança e desenvolver a habilidade dos beneficiários para o seu uso eficaz, o presente Programa prevê a realização de 04 (Quatro) Cursos com ênfase nos principais e mais práticos aspectos de Biossegurança e das Boas Práticas de Manejo, como instrumentos de nivelamento e conscientização, prioritariamente, para micro e pequenos produtores de camarão do Estado do Ceará, bem como,

funcionários e técnicos de fazendas, bem como, pessoal qualificado que se proponha a transferir esses conhecimentos para outros produtores.

Os Cursos Propostos no contexto do presente Programa são:

- **Curso 1** – *“Berçários Intensivos, Raceways e Crescimento Compensatório - Aumentando o Número de Ciclos de Cultivo por Ano”*;
- **Curso 2** – *“Técnicas de Manejo e Qualidade da Água com Ênfase no seu Balanço Iônico”*;
- **Curso 3** – *“Probióticos: O que são? Para que servem? Quando e como utilizá-los? Qual seu papel na Dinâmica Físico-Química e Microbiológica de Viveiros de Cultivo de L. vannamei”*;
- **Curso 4** – *“Análises a Fresco: O que são? Qual a Metodologia? O que observar e como interpretar? Qual sua Importância para a Prevenção e Controle de Enfermidades no cultivo do L. vannamei”*.

A capacitação será levada a efeito nas principais regiões produtoras de camarão marinho do Ceará, com o objetivo prioritário de transmitir não apenas os conhecimentos e habilidades para o uso eficiente das BPMs associadas às medidas de Biossegurança, mas, também, para desenvolver a reflexão e conscientização dos produtores sobre sua importância, de tal maneira que, conscientemente, assumam o compromisso de adotá-las regularmente e disseminá-las para outros produtores, tendo presente, a segurança de seus próprios empreendimentos, bem como, da produção local, regional e nacional.

A capacitação prevista no presente Programa levou em consideração o parâmetro de 60 participantes por evento, de forma que a realização de 04 cursos contemplados pelo Convênio (ABCC/MAPA) cobrirá a participação de 240 atendentes, distribuídos em todo estado do Ceará, sendo concentrados em locais de maior densidade de fazendas de camarão e, de acordo com a dimensão de cada um dos segmentos da cadeia produtiva da carcinicultura.

Na certeza de que, em colaboração e perfeita harmonia com sua afiliada estadual (ACCC), contando com o importante apoio financeiro do MAPA, a ABCC estará dando uma grande contribuição para a promoção sustentável do desenvolvimento da Carcinicultura Cearense, pelo que vimos, conclamar o apoio de toda a cadeia produtiva dessa estratégica atividade, destacando que na atualidade, o cultivo de camarão, se constitui a ferramenta mais importante para a geração de emprego e renda no meio rural da Região Nordeste, com promoção da verdadeira inclusão social e, estabelecimento de uma nova ordem econômica nessa carente Região, tendo como base, majoritária, a participação do micro e pequeno produtor, que já representam 75% do total de carcinicultores do Brasil.

Atenciosamente,

Itamar de Paiva Rocha

Engº de Pesca, CREA 7226-D/PE

Presidente da ABCC

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	3
INTRODUÇÃO	8
1. Anamnese	12
2. Exame Clínico.....	13
2.1 Método de exame clínico	21
3. Microscopia Direta.....	22
3.1 Métodos de microscopia	24
4. Análise a Fresco	29
4.1 Desenvolvimento da técnica	37
4.1.1 Brânquias	38
4.1.2 Hepatopâncreas	41
4.1.3 Intestino	47
4.1.4 Músculo e Gônadas	50
4.1.5 Antenas	51
4.1.6 Urópodos.....	52

INTRODUÇÃO

A Análise a Fresco é a técnica empregada para monitorar o estado de saúde dos organismos durante a realização de diagnósticos presuntivos realizado no laboratório ou em campo. Consiste na dissecação do camarão em todos os estágios de desenvolvimento, objetivando observar as principais alterações e patógenos presentes nos órgãos e tecidos.

O diagnóstico presuntivo a fresco pode ser realizado a partir de amostras observadas ao microscópio óptico, em que se podem analisar as brânquias, apêndices orais, animais completos, como larvas e pós-larvas. Fragmentos de tecidos são muito úteis para demonstração de enfermidades.

Como prática rotineira, deve ser buscado o diagnóstico da doença que atinge o cultivo, realizado a partir de diversos parâmetros:

- Aparência física
- Resposta comportamental
- Variáveis de produção (conversão; produção/ha/ano)
- Características populacionais do estoque criado
- Qualidade dos parâmetros ambientais ao longo da criação

A taxa de sobrevivência, o peso corporal e a taxa de crescimentos são os índices mais sensíveis a alterações adversas na condição de saúde da população criada em cativeiro.

Uma estratégia importante, e que sempre deve ser utilizada para avaliar o estado de saúde dos animais, é a análise presuntiva,

protocolo aceito mundialmente, capaz de identificar modificações anatômicas dos camarões, as quais podem ser relacionadas a enfermidades.

Em seguida, exames confirmatórios e escolha do melhor fármaco através de antibiograma e da concentração mínima inibitória (MIC), sempre tendo o cuidado de ministrar produtos quando sua possível eficácia seja comprovada.

O cuidado é imprescindível, pois os antibióticos podem permanecer nos ambientes de criação, na água e nos vegetais por mais de duas semanas e ser encontrados em organismos que consumiram restos de alimentos com resíduos desses antibióticos.

O uso de antibióticos na criação animal, quando usado de forma inadequada, pode causar o surgimento de cepas resistentes, levando ao aumento na mortalidade.

A disseminação e a presença de resíduos de antibióticos no camarão e no ambiente, quando despejados na água, podem provocar a mortalidade de diversos organismos, mudando a composição e a diversidade das comunidades locais.

Equilíbrio ecológico, qualidade de vida e bem-estar animal são fatores prioritários na produção animal, por isso fornecer alimentos que não levem contaminantes ao ambiente, aos produtores e aos consumidores é urgente como detalhado na Instrução Normativa 46/2011 (MAPA, 2011).

Com base nas principais técnicas utilizadas na atualidade para determinar enfermidades em camarões, a seguir serão apresentados os passos básicos e métodos que servem como

ferramentas para realizar diagnósticos e detectar agentes etiológicos nesses crustáceos de grande importância comercial para a economia mundial.

Embora alguns desses procedimentos possam ser realizados pelos próprios produtores nos laboratórios de larvicultura ou nas fazendas, recomenda-se que sejam feitos por profissionais com conhecimentos em sanidade aquícola.

Devemos lembrar que o diagnóstico não consiste em um teste de laboratório como tal, e sim na interpretação que faz o especialista com base em seus conhecimentos e na informação coletada dos testes feitos em campo e no laboratório.

Passos para o Diagnóstico

- Anamnese (informação histórica do caso, dados relacionados com o evento)
- Exame clínico
- Microscopia
- Análise a fresco
- Bacteriologia (de tecidos de camarões ou de substratos relacionados como água, sedimento e outros organismos aquáticos)
- Histologia de espécimes fixados
- Testes baseados em anticorpos para a detecção de patógenos utilizando anticorpos policlonais ou monoclonais
- Métodos moleculares
- Parâmetros imunológicos (hemogramas e medição de perfis imunes)
- Microscopia eletrônica de varredura ou de transmissão
- Bioensaios com portadores suspeitos, utilizando hospedeiros altamente suscetíveis como indicadores da presença de patógenos

Esta apostila abordará os 4 primeiros temas da lista acima, até análise a fresco, assunto foco deste curso.

1. Anamnese

Na medida do possível, o técnico responsável de realizar o diagnóstico de uma enfermidade numa população de camarão, deve incluir uma visita à instalação afetada (maturação, larvicultura ou fazenda de engorda)

Durante a visita, o técnico deve reunir a informação histórica prévia à aparição do surto da enfermidade. Isso pode incluir mudanças nos parâmetros ambientais ou físico-químicos, trânsito não usual de pessoas ou equipamentos pelas instalações, presença de animais forasteiros ao sistema como cachorros, aves, roedores ou vacas, alterações no regime e tipo/qualidade do alimento ministrado, mudanças nos procedimentos ou tipos de fertilizantes, uso de produtos químicos ou biológicos no cultivo afetado, existência de surtos similares anteriormente na empresa ou em outras próximas além de toda a informação passada ou presente relacionada direta ou indiretamente com a população em questão.

Deve ser obtido um registro desta informação adquirida na empresa para estudos de correlação com os achados obtidos nos exames clínicos e nos testes de laboratório complementares que serão feitos após a visita ao campo.

2. Exame Clínico

Quando se trata de um surto de uma enfermidade, durante a visita às instalações devem ser avaliadas as unidades de produção (tanques e viveiros) que apresentam problemas.

Devem ser realizadas coletas de camarões *in situ* e feita uma revisão individual dos animais, de forma a se ter uma ideia aproximada da proporção do problema: quantidade da população afetada (em %), grau de severidade das infecções observadas nos organismos enfermos e que tipo de enfermidade pode estar causando o surto.

O exame clínico deve incluir uma análise manual e visual muito cuidados dos camarões que serão revisados, os quais não devem ser coletados ao acaso, e sim selecionados por apresentar alguma manifestação de enfermidade. Com base nos achados nessa avaliação clínica, é possível em alguns casos fazer um diagnóstico presuntivo, no qual se deve certificar com provas complementares em laboratório.

O número de animais que se deve coletar para realizar um estudo sobre a etiologia de enfermidades será em função da habilidade de se reconhecer camarões enfermos em exames gerais, a natureza do problema presente e pela experiência do profissional especialista. Quando se escolhe camarões que apresentam sinais clínicos, 5 a 10 indivíduos da população analisados individualmente já serão suficientes.

A captura de camarões para se realizar um exame que busca determinar a presença de enfermidades deve realizar-se

buscando o mínimo de estresse durante a manipulação dos animais.

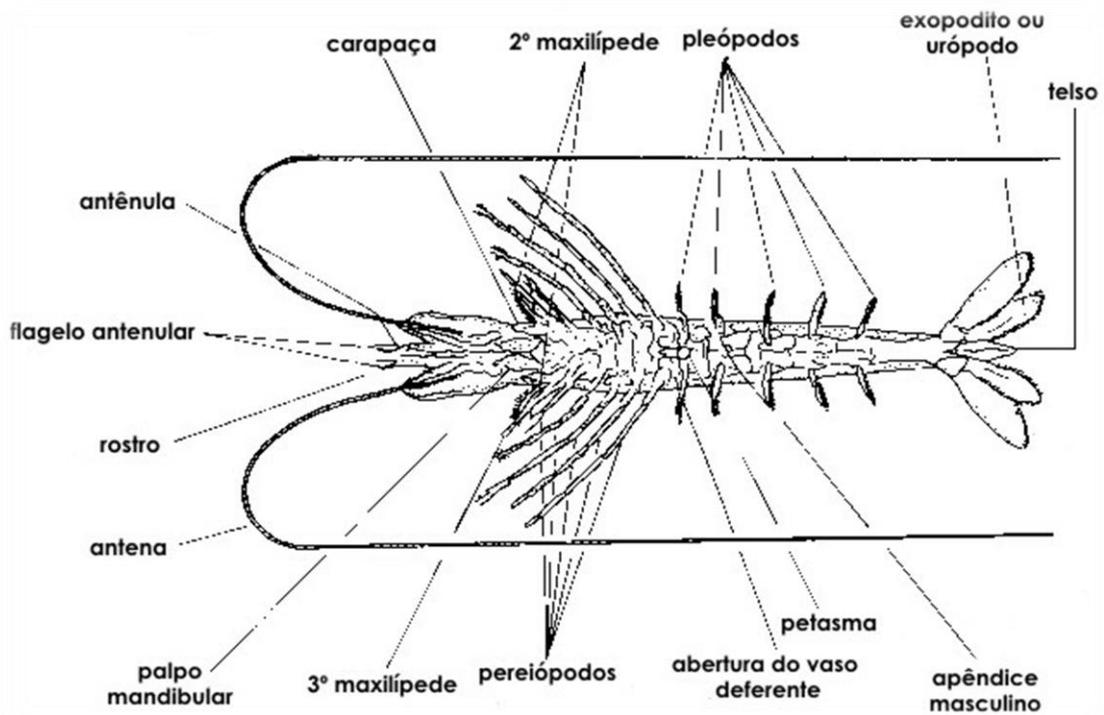
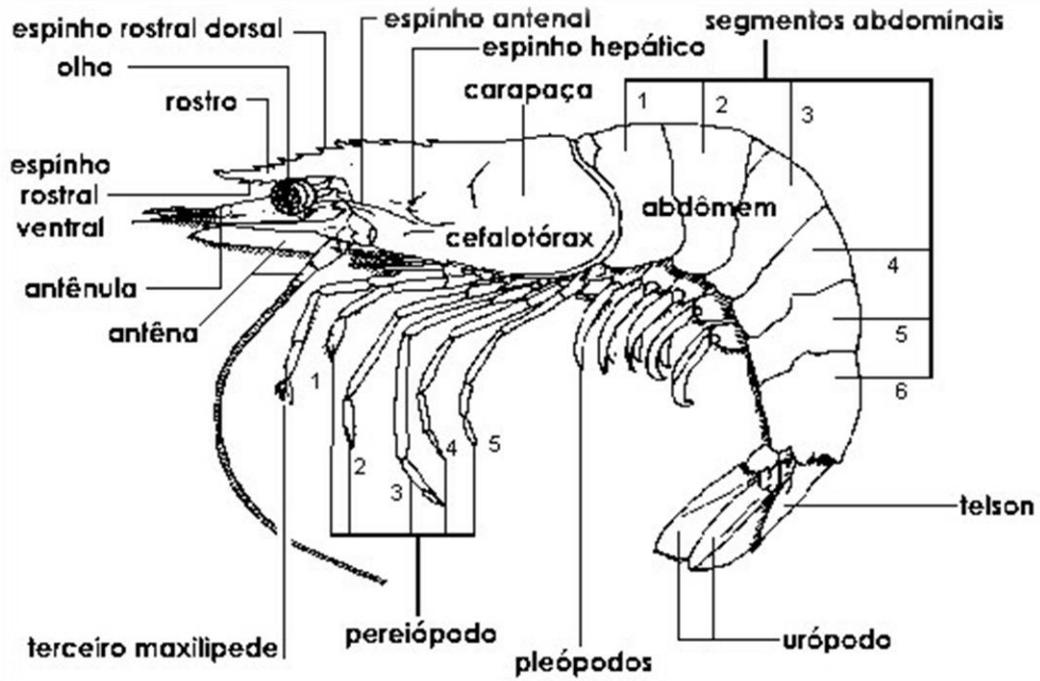
O exame clínico deve ser realizado em um lugar diferente ao da captura dos animais e os camarões devem ser transportados para outro local. Esse transporte deve ser feito em recipientes com água do mesmo tanque ou viveiro em que o camarão foi coletado. A água deve estar limpa (sem odor ou lodo nem restos de vegetação), com adequada aeração e tendo uma densidade baixa (para evitar o estresse dos animais). Caso os camarões permaneçam um período de tempo no recipiente antes de serem examinados, deve-se ter boa aeração e, dentro do possível, se deve baixar a temperatura a 15-27 °C mediante a adição de sacos com gelo (fechados).

Em estudos de camarões presumidamente enfermos, deve-se selecionar animais moribundos, descoloridos, com comportamento anormal ou que apresentem outras formas anormalidades macroscópicas com as quais se suspeite de uma enfermidade. As principais observações que devem ser realizadas nos camarões enfermos durante uma avaliação clínica são as seguintes:

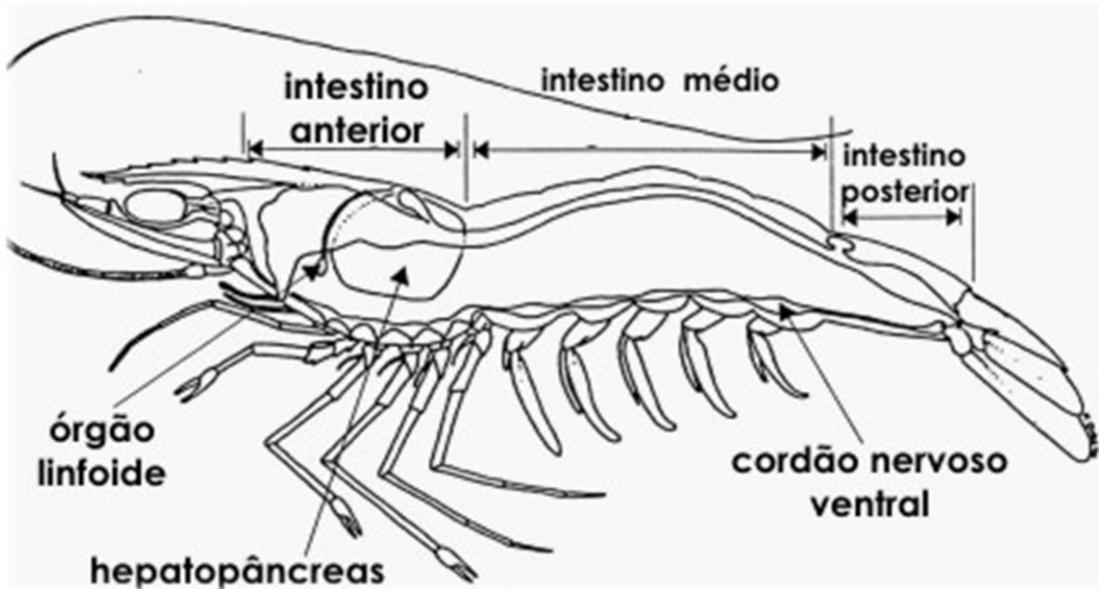
- Cor do animal
- Tamanho do corpo comparado com o resto da população (nanismo)
- Expansão de cromatóforos
- Deformidades no rosto, abdômen e apêndices
- Flexão do músculo abdominal
- Cor das brânquias (amarelas, marrom ou pretas)

- Cor dos apêndices (pereiópodos, pleópodos, e urópodos)
- Cor das antenas
- Edema (presença anormal de líquido) em apêndices ou em outras partes do corpo
- Transparência dos músculos do abdômen e do cefalotórax
- Repleção intestinal (porcentagem do intestino que se encontra cheio)
- Textura do exoesqueleto (duro ou mole)
- Tono do músculo abdominal (firme ou flácido)
- Presença de muco sobre a cutícula (escorregadio ou áspero ao toque)
- Manchas, lacerações, feridas, zonas escuras ou opacas, gravetos cravados
- Cor do esôfago e estômago (alaranjado sugere canibalismo ou mortalidade)

Morfologia Externa do Camarão



Morfologia Interna do Camarão



Representação esquemática do sistema digestório dos camarões
Peneídeos



Representação esquemática do estômago dos camarões
Peneídeos



Representação esquemática do intestino dos camarões Peneídeos



Representação esquemática do hepatopâncreas dos camarões
Peneídeos



Representação esquemática das brânquias dos camarões
Peneídeos



Representação esquemática do sistema circulatório dos camarões
Peneídeos



Quanto às manifestações de enfermidades em condições naturais nos tanques ou viveiros, as seguintes são observadas em camarões enfermos frequentemente:

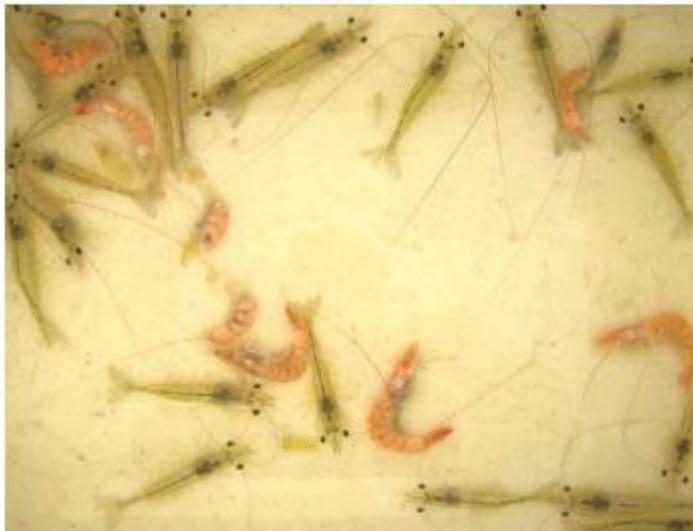
- Nado errático
- Letargia e debilidade
- Perda de reflexo no nado (permitem serem capturados sem exercer resistência)
- Vulnerabilidade a predadores (aves)
- Nado superficial
- Suscetibilidade à hipoxia
- Diminuição na alimentação

Quando se realizam amostras aleatórias intencionais para estimar a prevalência de alguma enfermidade em uma população, os camarões devem ser coletados ao acaso (não escolhidos). O tamanho a amostra para estudos de enfermidades em camarões será discutido mais adiante.

2.1 Método de exame clínico



Captura de camarões em um tanque de cultivo mediante o uso de tarrafa para serem submetidos á exames



Amostra de camarões saudáveis, enfermos e mortos observados num recipiente de fundo branco, depois de sua captura num viveiro de engorda. Observa-se a ocorrência de alguns camarões mortos sem apêndices devido à ocorrência de canibalismo.



Camarões *L. vannamei* sendo observados logo após terem sido coletados em um viveiro de engorda durante um procedimento de exame clínico. Neste caso, nos cinco camarões não se observa a ocorrência de manifestações clínicas de enfermidade.

3. Microscopia Direta

Esta técnica é baseada na observação, em microscópio, de tecidos ou partes de camarões afetados, com o objetivo de estabelecer na medida do possível, um diagnóstico presuntivo. As partes comumente mais analisadas em microscópio são: hepatopâncreas, brânquias, conteúdo intestinal, músculo esquelético e conteúdo gástrico.

Para uma avaliação sanitária com microscopia direta, deve-se examinar as amostras o mais rápido possível depois da

amostragem e da preparação da montagem em uma lâmina. Sempre que possível deve-se utilizar organismos vivos ou então usar mortos, porém frescos que foram mantidos no frio (refrigerados ou em gelo), ou espécimes fixados em formalina 10 % tamponada, quando não seja possível trabalhar com camarões vivos. Se existir um laboratório de campo adequado, deve-se usá-lo para processar e examinar as amostras o mais próximo possível do local onde foi feita a amostragem.

Uma aplicação importante do método de microscopia é o exame do conteúdo gástrico em camarões. Para tal, devem ser sacrificados ao menos 10 animais coletados ao acaso em uma população determinada (tanque ou viveiro de engorda). Extrai-se cuidadosamente o estômago logo após a realização da dissecação do animal utilizando tesouras e pinças pequenas.

Deve ser realizada uma incisão pela linha média com as tesouras e extraído o equivalente a uma gota de conteúdo gástrico. Em seguida posicionar esse material retirado em cima de uma lâmina e adicionar uma gota de solução salina. A seguir coloca-se outra lâmina por cima da amostra e faz-se pressão com a pinça cuidadosamente, com o objetivo de se separar o conteúdo gástrico.

Deve-se observar a amostra em microscópio utilizando lentes objetivas de 4 X e 10 X, registrando a proporção estimada de alimento artificial (pelets), microalgas, zooplâncton, sedimentos e outros componentes.

Em seguida faz-se uma estimativa média de porcentagem entre os 10 camarões para cada um dos itens observados, para se obter os valores para a população em questão. Este método permite se

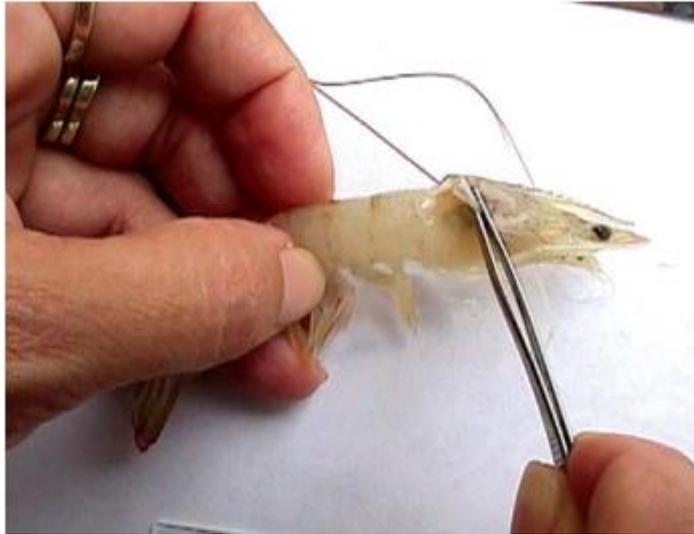
conhecer fatores que estejam afetando o crescimento, assim como realizar correções na dieta dos animais.

3.1 Métodos de microscopia

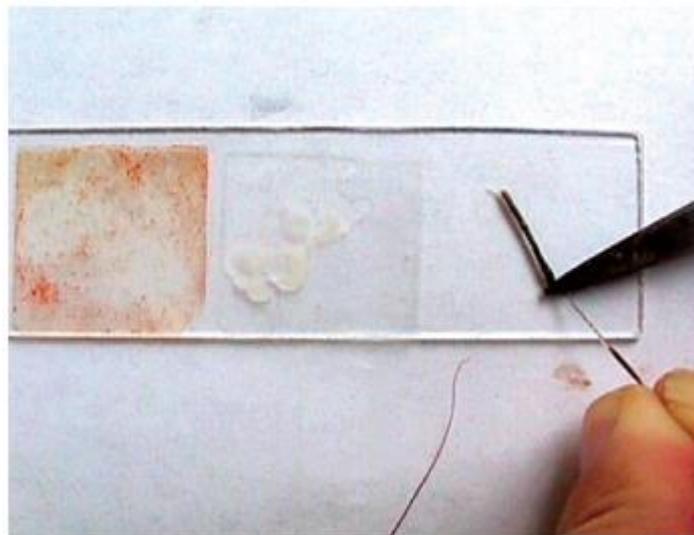
(Montagens a fresco)



Camarões *L. vannamei* durante exame clínico. Nota-se a presença de uma zona escura na parte média do cefalotórax e superior as brânquias. A opacidade generalizada do músculo abdominal pode ocorrer devido ao tempo que esses animais estiveram fora da água (estresse por hipoxia). Não se observa manifestações adicionais de enfermidades.



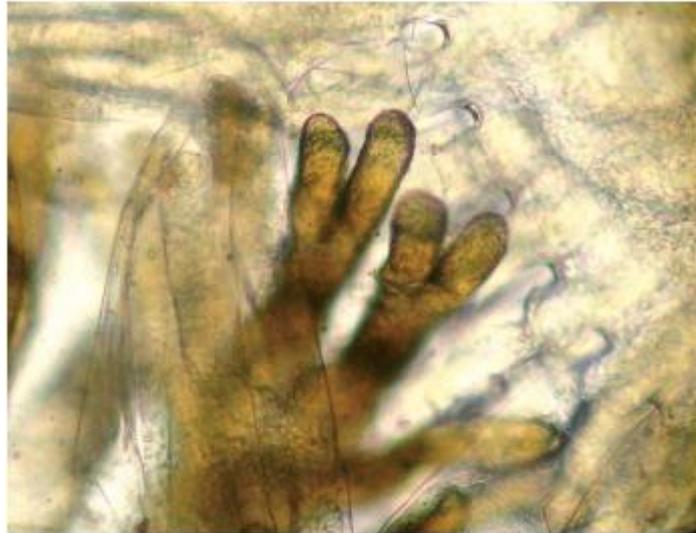
Camarão juvenil de *L. vannamei*, onde está se levantando a cutícula posterior do cefalotórax para se extrair amostras do hepatopâncreas, de brânquias e fezes do intestino médio, a partir das quais se vai preparar uma montagem a fresco.



Preparação de uma montagem a fresco de um camarão *L. vannamei* onde foi colocado na lâmina amostras de hepatopâncreas (esquerda) e brânquias (centro). As fezes estão sendo extraídas do intestino médio com o auxílio da ponta de uma tesoura.



Amostra de hepatopâncreas de um camarão juvenil de *L. vannamei* preparada mediante uma montagem a fresco. Se observa grande quantidade de vacúolos lipídicos (reservas de gordura) de coloração amarelada e cinza com tamanhos variados (todas normais). No centro há um processo de melanização (cor marrom) de um tubo do hepatopâncreas, o qual está rodeado por várias capas de hemócitos e apresenta um formato alargado sendo mais largo para a esquerda. Amplificação 100 X.

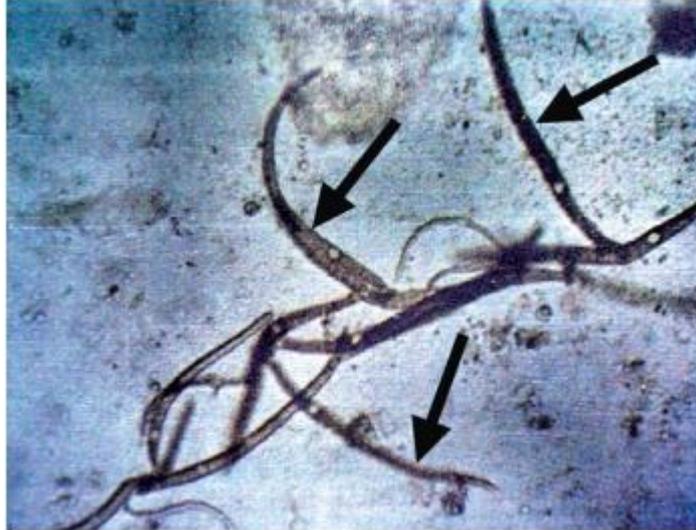


Amostra de brânquias de um juvenil de *L. vannamei* preparada mediante uma montagem a fresco. Observam-se duas lamelas branquiais bifurcadas em seu extremo (superior), as quais apresentam melanização de origem tóxica. Amplificação 100 X.



Montagem a fresco preparada a partir de uma amostra de fezes de um camarão juvenil de *L. vannamei*. Se observam dois trofozoitos de gregarina *Nematopsis* sp., um deles com o extremo posterior bifurcado. Estes protozoários estão formados por 3 células (acima) e por duas células (centro), respectivamente. Se pode diferenciar a

célula anterior (protomerito) e a célula posterior (deutomerito).
Amplificação 200X.



Montagem a fresco preparada a partir de fezes de uma pós larva, na qual se observam trofozoitos de gregarina *Paraophioidina* sp. (provavelmente *P. scolecoides*). Cada trofozoito está composto por uma única célula com o núcleo visível. Este parasita possui a particularidade de formar grupos nos quais vários organismos se aderem a um. Amplificação 100X.

4. Análise a Fresco

Introdução

O diagnóstico implica no entendimento da causa e, se possível, também no conhecimento dos fatores contribuintes que influenciam a aparição da uma determinada enfermidade.

Com a realização do diagnóstico, aumenta-se a probabilidade de um controle efetivo quando a causa exata do problema é determinada e relacionada com seus fatores contribuintes. Porém devemos aceitar que o conhecimento de sanidade e enfermidade varia em diferentes animais aquáticos, incluindo os camarões, além do fato de que nos laboratórios de larvicultura e nas fazendas de engorda sempre surgem novos tipos de enfermidades. Portanto, em uma situação particular, a precisão esperada e a qualidade de um diagnóstico podem ser diretamente afetadas pelo conhecimento disponível a respeito das enfermidades dos camarões, pelo treinamento e experiência da pessoa encarregada de realizar o diagnóstico, assim como pelas práticas de manejo adotadas no sistema de cultivo.

Um dos objetivos principais do diagnóstico de uma enfermidade é a determinação da causa (etiologia). A identificação dos agentes etiológicos da enfermidade se realiza (ou deveria se realizar) mediante a aplicação de métodos científicos de investigação. A observação da amostra de órgãos e tecidos dos camarões (para buscar bactérias, fungos, protozoários, metazoários e vírus) através de microscopia de luz e histopatologia (resposta do hospedeiro-

patologia), são métodos comumente empregados para estabelecer os agentes etiológicos, os quais levam a se determinar a causa das enfermidades nos camarões.

Os agentes patógenos se encontram no ambiente de forma natural e o meio aquático não é uma exceção. Muitos deles são oportunistas, enquanto os camarões se encontrarem sãos e as condições dos parâmetros de cultivo não alteradas, os patógenos não atacarão. Esse é um dado muito importante, pois a ocorrência de patógenos em uma fazenda ou laboratório não significa precisamente que os organismos se encontrem enfermos. A gravidade do problema dependerá:

- Do nível de incidência
- Do nível de prevalência
- Do tipo de patógeno
- De sua virulência
- De sua patogenicidade
- Da espécie cultivada
- Da genética da espécie (ciclo fechado ou espécie silvestre)
- Do nível de estresse dos camarões no momento de exposição ao patógeno

O estresse é determinado pela qualidade da água, tipo de alimentação, variação drástica nos parâmetros como oxigênio dissolvido, temperatura, salinidade, pH, etc., assim como pelas práticas de manejo. O cenário se complica com o transporte dos organismos vivos, que é realizado frequentemente entre os estados

e até entre países. Isso tem propiciado a introdução e propagação de agentes patogênicos exóticos em lugares onde eles não existiam. Em alguns casos esses agentes patogênicos se propagam nas populações de animais silvestres.

Análise a Fresco

A análise a fresco é a técnica que se utiliza para monitorar o estado de saúde dos organismos e realizar diagnósticos presuntivos em laboratório e campo. Consiste na dissecação do camarão em todos os seus estágios para se observar possíveis alterações ou patógenos presentes em seus órgãos e tecidos. A capacitação para este tipo de análise consiste em um curto treinamento básico que profissionais (biólogos, engenheiros de aquicultura e pesca, médicos veterinários e etc.) podem receber na fazenda ou laboratório.

Para se realizar o diagnóstico do estado de saúde de uma população se requiere a seleção e tomada adequada da amostra, a qual é eleita de acordo com o estado de saúde dos organismos ou a suspeita de alguma enfermidade. A intensidade da amostragem (número de amostras no tempo até a despesca) dependerá da necessidade da informação, do histórico da fazenda, da origem dos organismos e da densidade cultivo. Portanto, para uma boa seleção, deve-se ter em conta o seguinte:

Amostragem aleatória: somente quando se quer determinar o estado de saúde ou para buscar a prevalência de patógenos, se

escolhe os tanques e animais ao acaso, coletando os animais de pelo menos 4 áreas diferente do tanque.

A amostragem deve garantir no mínimo 95 % de confiança da ocorrência de uma infecção. Para a determinação da prevalência, a amostragem dependerá da prevalência estimada do patógeno e do nível de confiança eleito (Tabela 1). Os camarões selecionados devem ser colocados em recipientes com aeração de forma a garantir o mínimo de estresse possível e o transporte até o laboratório para posterior análise deve ser feito o mais rápido possível.

Amostragem não aleatória: amostragem que contém somente organismos enfermos. Este tipo de amostragem é realizada quando se tem a suspeita da presença no viveiro ou tanque, de alguma enfermidade ou síndrome. Devem ser selecionados no mínimo 10 organismos que apresentem sinais clínicos tais como:

- Descoloração
- Melanização
- Necrose na cutícula
- Anorexia (falta de apetite)
- Letargia (redução da atividade normal)
- Coloração avermelhada dos pleópodos e telson

Os organismos com essas características geralmente se encontram na comporta de drenagem dos tanques.

As amostras devem ser processadas imediatamente, de acordo com o procedimento ou procedimentos que foram eleitos para a

detecção do agente causal da enfermidade. Os organismos devem ser enviados vivos ao laboratório de diagnóstico.



Viveiro de cultivo de camarão onde se observa as quatro áreas diferentes para a coleta de organismos em uma amostragem ao acaso.



Viveiro de cultivo de camarão onde se observa a comporta de drenagem para a coleta de organismos numa amostragem não aleatória.

Tabela 1 – Seleção do tamanho da amostragem e cálculo de porcentagem de prevalência de um patógeno numa determinada população.

Tamanho População	Tamanho da amostra necessária para obter a porcentagem de prevalência *						
	2%	5%	10%	20%	30%	40%	50%
50	50	35	20	10	7	5	2
100	75	45	23	11	9	7	6
250	110	50	25	10	9	8	7
500	130	55	26	10	9	8	7
1000	140	55	27	10	9	9	8
1500	140	55	27	10	9	9	8
2000	145	60	27	10	9	9	8
4000	145	60	27	10	9	9	8
10000	145	60	27	10	9	9	8
> 10000	150	60	30	10	9	9	8

*Prevalência = número de indivíduos de uma espécie de hospedeiro infectada com uma espécie particular de parasito / número de hospedeiros examinados.

Para a realização da análise a fresco é requerido contar com um espaço limpo onde se tenha os seguintes materiais:

- Microscópio composto com objetivas de 4, 20, 40, 60, e 100 X
- Lâminas
- Lamínulas
- Bisturi
- Facas de dissecação
- Tesouras finas de dissecação
- Pinças de dissecação
- Tabua de dissecação
- Caixas de Petri
- Pipetas
- Luvas
- Água do mar estéril ou filtrada
- Resina
- Seringas descartáveis de várias medidas (1, 3 e 5 ml)
- Hematoxilina
- Eosina Y
- Solução de Davidson (AFA, Álcool-Formaldeído-Ácido acético)
- Solução de Davidson modificada (AFA, Álcool-Formaldeído-Ácido clorídrico)

- Etanol absoluto
- Etanol 70 %
- Xileno
- Recipiente para amostras
- Folha de relatório
- Manuais

4.1 Desenvolvimento da técnica

Os organismos são medidos e pesados para se obter o peso e tamanho médios.

- Analisa-se tanto a superfície do organismo para detectar deformações no rostro e no sexto segmento abdominal, como cutícula delgada (ou suave), epicomensais, descoloração, coloração avermelhada, melanização, ampolas e necroses de cutícula, pleópodos, pereiópodos e antenas.
- Seleciona-se uma pequena porção de cada tecido e órgão. Coloca-se individualmente a porção sobre a lâmina limpa (não misturar porções), adicionam-se gotas de água do mar estéril e em seguida coloca-se a lamínula. Deve-se ter cuidado para que na amostra não se forme bolhas que possam interferir, para isso deve ser realizada um leve pressão sobre a lamínula com a pinça de dissecação.

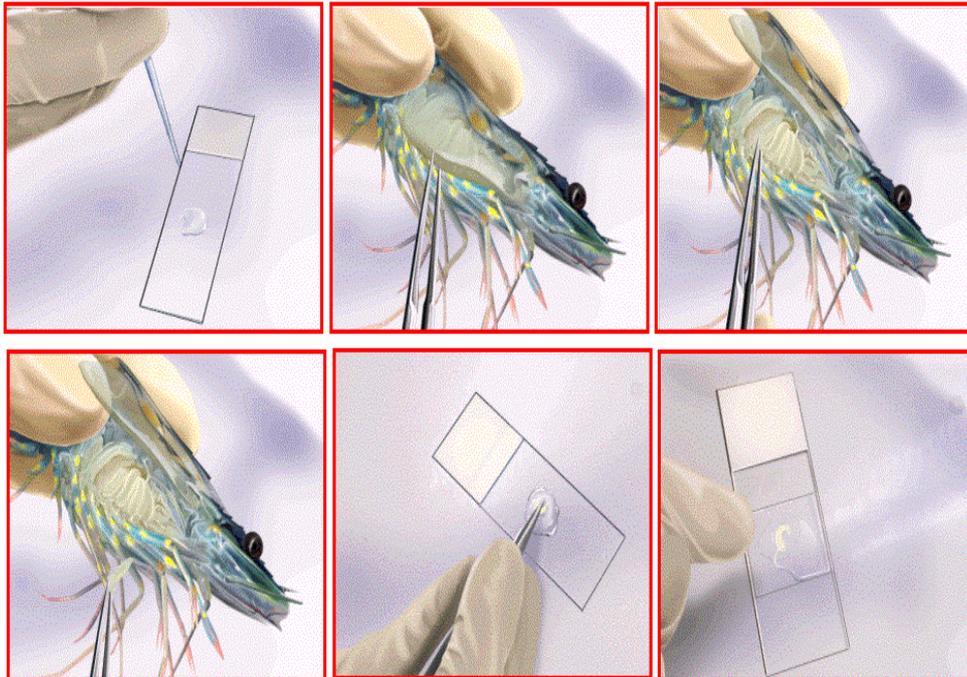


Lâminas e lamínulas.

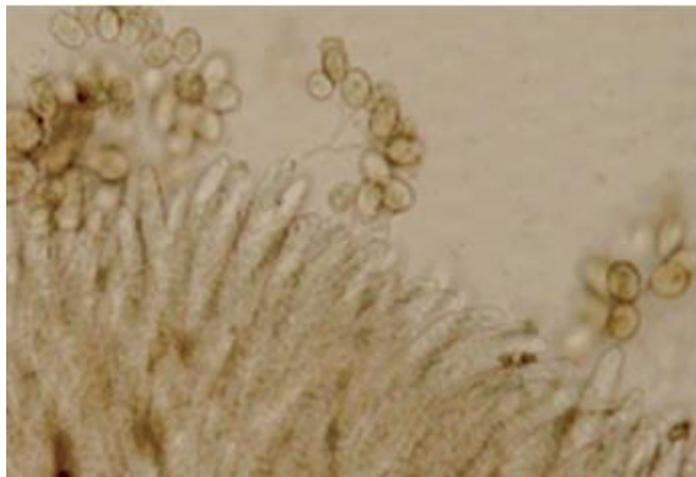
As amostras que se retiram do camarão são:

4.1.1 Brânquias

Com as tesouras finas se elimina o exoesqueleto que cobre as brânquias. Retira-se uma pequena porção e a coloca sobre a lâmina para buscar: mudanças na coloração dos filamentos branquiais (como melanização, necroses, áreas esbranquiçadas bem definidas), presença de protozoários (*Zoothamnium sp*, *Epistylis sp*, *Acineta*, *Asophris*, *Bodo sp*), bactérias filamentosas (*Leucothrix mucor e Flexibacter sp*), detritos do fundo do viveiro, restos de microalga, fungos, bactérias, melanizações e deformidades. Para detectar corpos de inclusão viral nas brânquias por marcas é necessário fixá-las em Solução de Davidson modificada (AFA, Álcool-Formaldeído-Ácido clorídrico) se forem ser processadas rapidamente. Se não for esse o caso, podem ser fixadas em Solução de Davidson (AFA, Álcool-Formaldeído-Ácido acético), utilizada para fixar organismos para histologia.



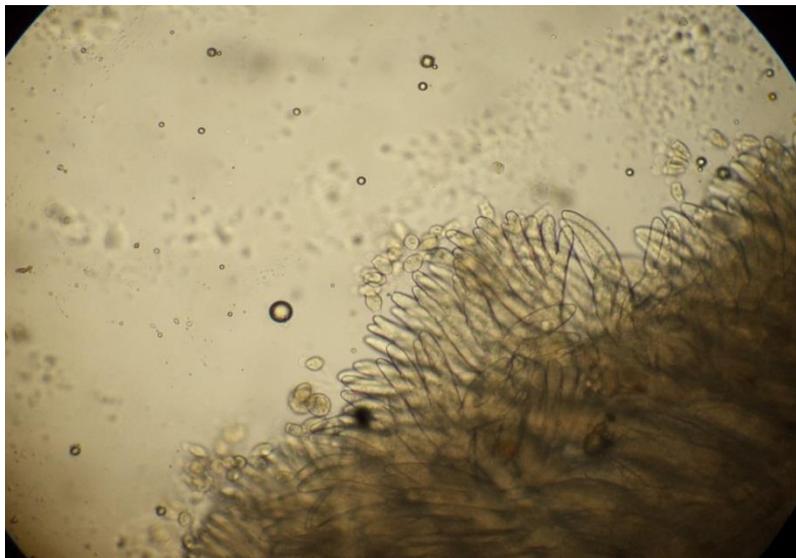
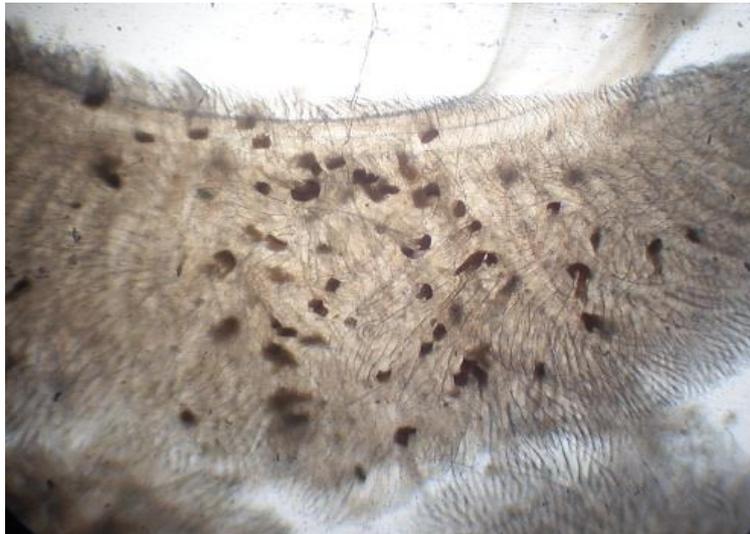
Preparação de lâmina para avaliação de brânquias





Amostra de brânquias onde se pode observar as formas bem definidas de *Zoothamnium sp.*





Avaliação de brânquias a luz de microscópio

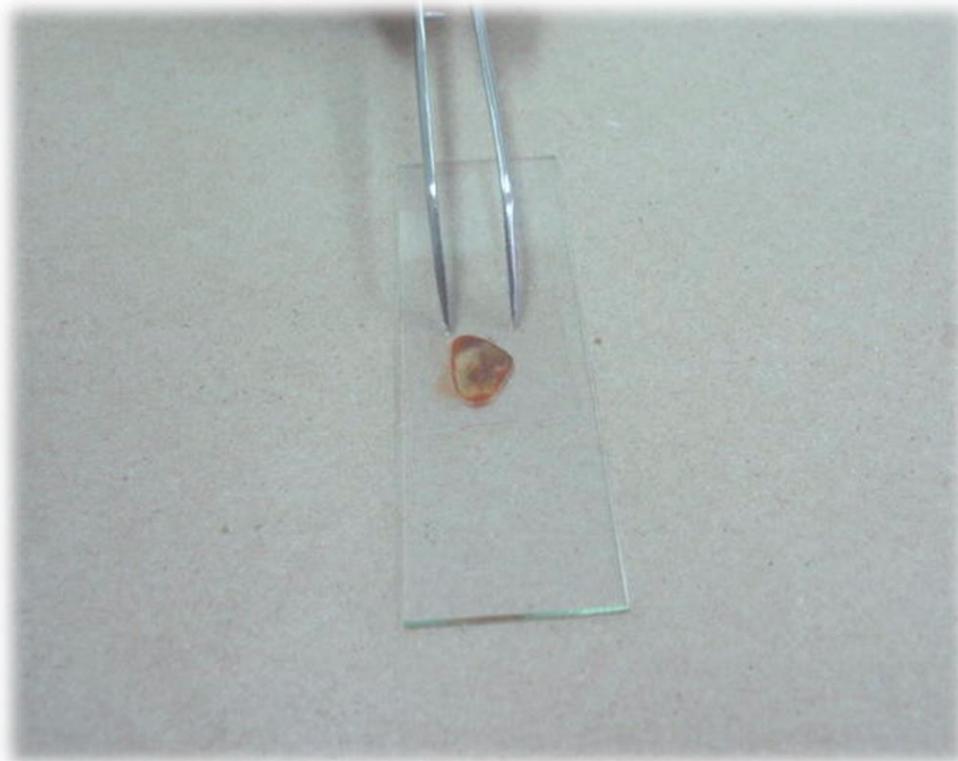
4.1.2 Hepatopâncreas

Deve se eliminar todo o exoesqueleto do cefalotórax para descobrir o hepatopâncreas e o estômago. Observa-se a coloração, o tamanho do hepatopâncreas para decidir se há atrofia (redução do tamanho) ou hipertrofia (aumento do tamanho) do órgão. Com

pinças, retira-se a membrana que cobre o hepatopâncreas e com um bisturi deve ser partido pela metade para observar a coloração do fluido, textura, melanização e necrose tubular. Toma-se uma pequena amostra e a coloca numa lâmina para buscar: *Baculovirus penaei*, *Monodon baculovirus*, gragarinas (trofozoitos e sigícias), bactérias, deformação tubular, nódulos hemocíticos, melanização e necroses nos túbulos.

Também deve ser observada a quantidade de lipídeos presentes, desprendimento de células do epitélio e dos túbulos do hepatopâncreas e acumulação dentro de vacúolos citoplasmáticos dos hepatócitos de uma substância de cor verde escuro (bolhas negras). Para a realização de um perfil histológico, é necessário fixar os órgãos e/ou tecidos do organismo selecionado no fixador adequado para o diagnóstico eleito.





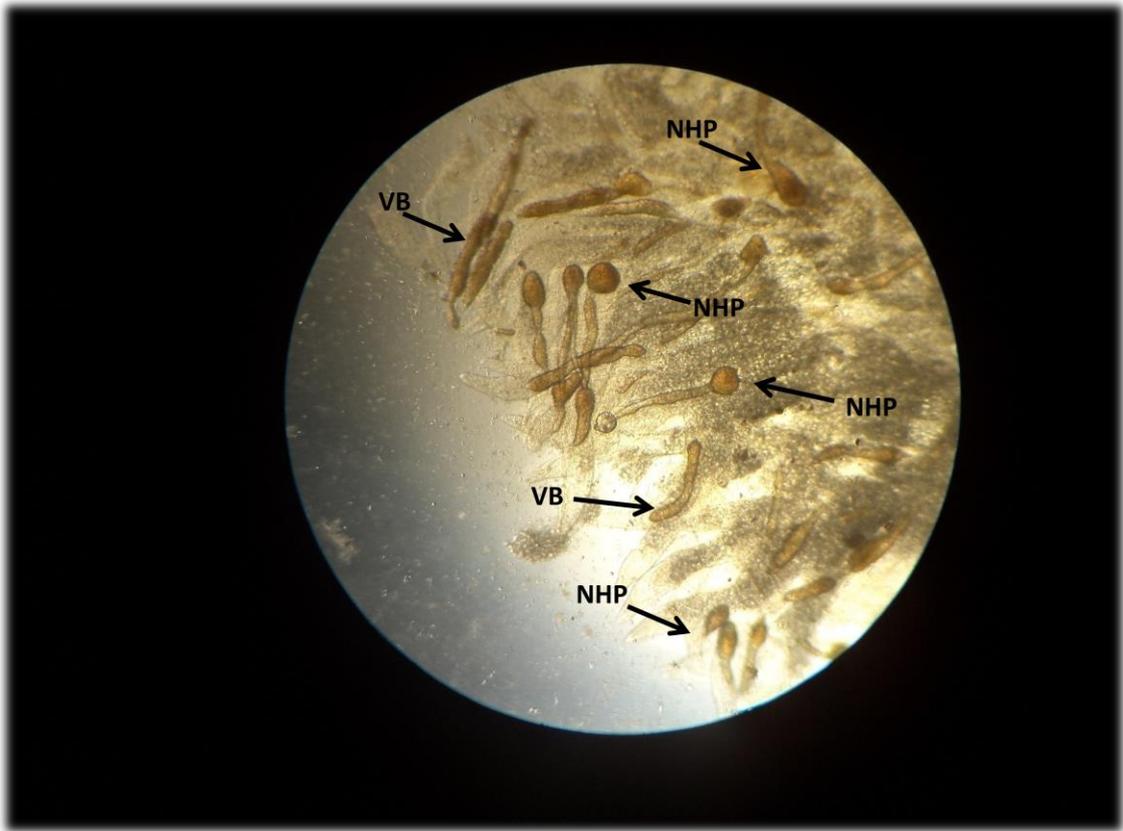
Preparação de lâmina para avaliação do hepatopâncreas



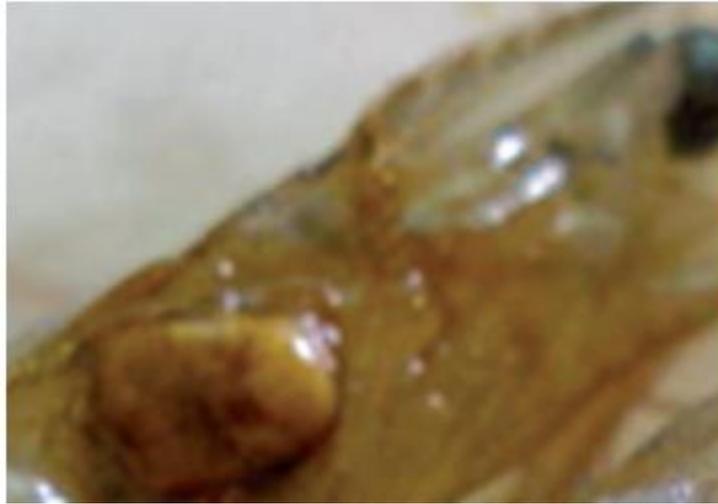
Hepatopâncreas com túbulos normais



Túbulos hepatopancreáticos apresentando necrose severa por vibriose



Túbulos hepatopancreáticos apresentando necrose severa por NHP e vibriose (VB)



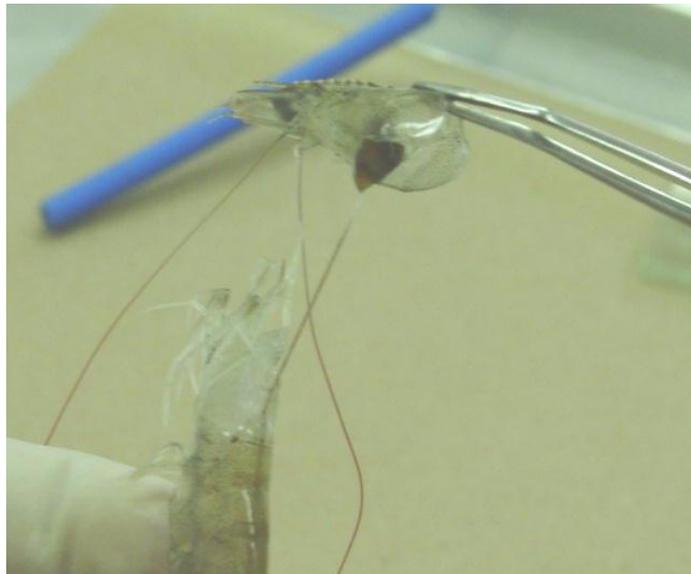
Camarão com hepatopâncreas exposto para a coleta de uma pequena porção para análise.

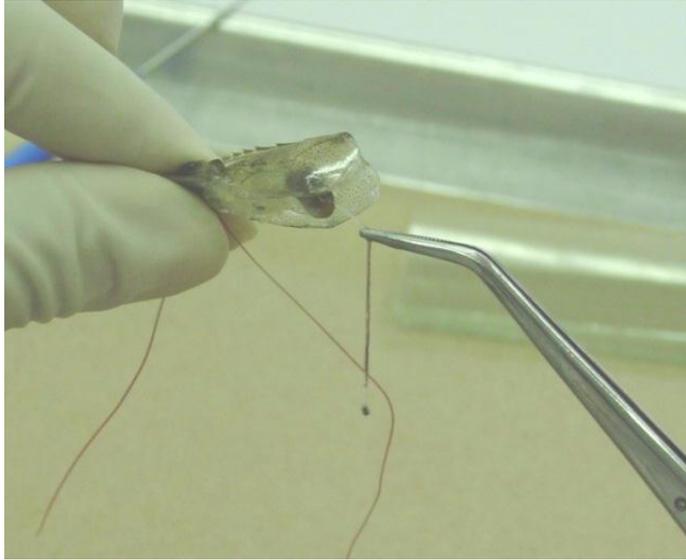


Amostra a fresco de hepatopâncreas com melanização e necrose das células e dos túbulos.

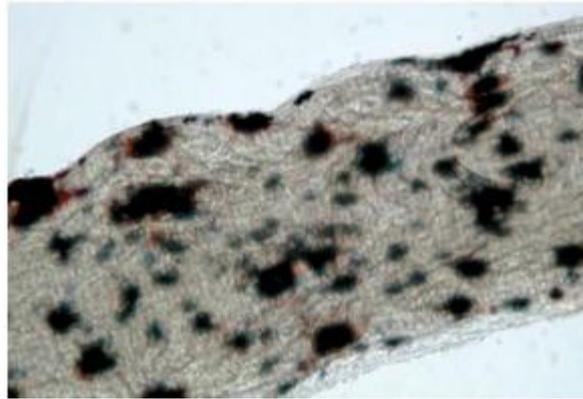
4.1.3 Intestino

O abdômen se separa do cefalotórax, do telson e dos urópodos para facilitar a extração do intestino. Pela parte posterior se localiza o intestino (que pode ou não conter material fecal). Com a ajuda de uma pinça fina, extrai-se com cuidado e coloca-se sobre a lâmina, estendendo-o. A seguir se aplica algumas gotas de água do mar e se pressiona ligeiramente ao colocar a lamínula. Ao observar a amostra no microscópio, deve-se buscar: gregarinas em seus diferentes estágios, distribuição e porcentagem de aderência no intestino, inflamação, nemátodos, corpos de oclusão de *Baculovirus penaei* e *Monodon baculovirus*.





Preparação de lâminas para avaliação do intestino



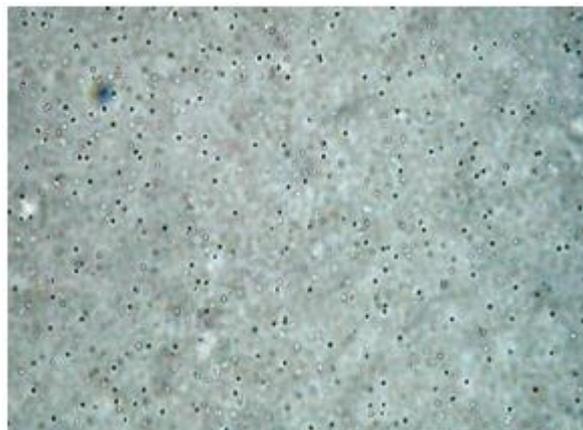
Amostra a fresco de um intestino de camarão.



Amostra a fresco de intestino médio onde se observa gregarinas de 2, 3, e 4 divisões aderidas ao epitélio e ao lúmen do intestino.

4.1.4 Músculo e Gônadas

Coleta-se uma pequena amostra de músculo e das gônadas (especialmente aquele tecido que mostre opacidade do tipo leitosa). Coloca-se em uma lâmina e se pressiona para facilitar a busca de microsporídeos. Se esses órgãos e tecidos forem parasitados deve-se observar massas de esporos de tamanho e forma uniformes.



Amostra a fresco de músculo onde se observam as cápsulas de
Ameson nelsoni

As mostras já preparada devem ser analisadas em microscópio, iniciando com a objetiva de menor aumento e finalizando com a de maior. Devido à sua rápida decomposição, a primeira amostra que deve ser analisada é a do hepatopâncreas. Depois se analisa a amostra de brânquias. Posterior às brânquias se analisa o intestino e por último a amostra dos músculos e gônadas. Na folha de relatório deve ser anotado tudo o que se observa com cada objetiva. Após isso deve ser calculada a porcentagem de prevalência e determinado o grau de severidade que apresentam os

organismos da amostra analisada. Finaliza-se com o diagnóstico e com o relatório final.

4.1.5 Antenas

Deve-se observar a coloração, rugosidade e se elas estão quebradiças.



Diferença entre uma antena vermelha, o que indica que o animal está estressado, e uma antena de coloração normal.

4.1.6 Urópodos

Deve-se observar edemas, coloração e lesões.



Diferença entre um urópodo de um camarão estressado
(avermelhado) e um camarão saudável.

Tabela 2 – Formato de relatório para a análise a fresco.

Nº _____ Data _____			
Procedência _____			
Espécie _____			
Tanque Nº _____ Tamanho da amostra _____			
Nº de mortos _____ Nº de examinados _____			
Estágio de vida _____ Peso padrão _____ Tamanho padrão _____			
CARACTERÍSTICAS EXTERNAS	OBSERVAÇÕES	CARACTERÍSTICAS INTERNAS	OBSERVAÇÕES
Atividade dos camarões		HEPATOPÂNCREAS	
Conteúdo do intestino		Atrofia	
Presença de fezes em forma de cadeia o descontinua		Coloração	
Presença de epibiontes, bactérias e fungos no camarão		Presença dos vírus: BP y MBV	
Deformidades no rosto, antenas, abdômen, telson, urópodos e pleópodos		Deformação dos túbulos	
Apêndices danificados		Coloração do fluido	
Melanização (coloração café claro)		Presença de gregarinas em todos os estágios	
Coloração anormal		Túbulos melanizados	
Características da cutícula		Presença de massa de bactérias e quantidade de lipídeos	
BRÂNQUIAS		INTESTINO	
Coloração		Presença de gregarinas em todos os estágios	
Presença de epibiontes		Massas melanizadas de hemócitos	
Nódulos de bactérias nas lamelas branquiais		Corpos de oclusão de BP	
Micoses (hifas, conídios)		MÚSCULO	
Corpos de inclusão de WSSV		Textura	
Matéria orgânica		Coloração	
Presença de melanização e necrose		Microsporídios	

Tabela 3 – Guia geral para a determinação de um valor numérico qualitativo do grau de severidade da infecção, infestação e síndrome.

GRAU DE SEVERIDADE	SINAIS CLÍNICOS
0	Não apresenta sinais de infecção por agente patológico, parasita ou epicomensal. Não apresenta lesões características de síndrome.
1	Presença muito baixa de patógeno, parasita ou epicomensal. Naqueles que se tem um número padrão permitido, este se encontra justo acima do limite normal. Se observa poucas lesões características de síndrome.
2	Se observa a presença baixa e moderada de patógeno, parasita ou epicomensal. Se observa lesões ligeiras ou moderadas características de síndrome. Incremento na mortalidade se não há aplicação de tratamento (quando houver)
3	Se observa a presença moderada de patógeno, parasita ou epicomensal. Se observa lesões moderadas ou severas características de síndrome. Potencialmente letal se não há aplicação de tratamento (quando houver)
4	Se observa grande quantidade de patógeno, parasita ou epicomensal. Se observam severas lesões características de síndrome. Muito letal com altas mortalidades.

Tabela 4 – Guia para determinar um valor numérico qualitativo do grau de severidade da deformação tubular no hepatopâncreas com análises a fresco.

GRAU DE SEVERIDADE	SINAIS CLÍNICOS
0	Não apresenta sinais de deformação tubular (0). Não apresenta lesões caracterísrticas de síndrome.
1	Presença muito baixa de deformação tubular (1-5/campo/organismo). Observa-se pouco desprendimento celular.
2	Observa-se a presença moderada de deformação tubular (6-10/campo/organismo). Presença de hemócitos e formação de nódulos hemocíticos. Risco de mortalidade se não há a aplicação de tratamento.
3	Observa-se alta presença de deformação tubular (11-20/campo/organismo). Presença de lesões moderadas e severas, como melanização, desprendimento celular, atrofia tubular e formação de nódulos hemocíticos. Potencialmente letal se não há tratamento.
4	Observa-se grande quantidade de túbulos disformes (mais de 20/campo/organismo). Presença de severas lesões como melanização, necrose, atrofia tubular, túbulos vazios, formação de nódulos hemolíticos e presença de granulomas. Muito letal com altas mortalidades.

Tabela 5 – Guia para determinar um valor numérico qualitativo do grau de severidade da infestação por gregarinas utilizando análises a fresco.

GRAU DE SEVERIDADE	SINAIS CLÍNICOS
0	Não apresenta sinais de infecção pelo parasita (0). Não apresenta lesões causadas pelo parasitismo.
1	Presença muito baixa do parasita (1-15/intestino/organismo). Observam-se poucas lesões causadas pelo parasitismo como infiltração hemocítica.
2	Se observa a presença moderada do parasita (16-50/intestino/organismo). Se observa um incremento na lesões causados pelo parasitismo como infiltração hemocítica e formação de nódulos hemocíticos. Incremento na mortalidade se não há aplicação de tratamento.
3	Se observa alta presença do parasita (51-100/intestino/organismo). Se observam lesões moderadas a severas causadas pelo parasitismo como infiltração hemocítica, áreas multifocais mecanizadas e formação de nódulos hemocíticos. Potencialmente letal se não há aplicação de tratamento.
4	Se observa grande quantidade do parasita (mais de 100/intestino/organismo). Se observam severas lesões causadas pelo parasitismo como infiltração hemocítica, melanização multifocal e necrose. Muito letal com alta mortalidade.

Tabela 6 – Guia para determinar um valor numérico qualitativo do grau de severidade da infestação por epicomensais em lamelas branquiais.

GRAU DE SEVERIDADE	SINAIS CLÍNICOS
0	Não apresenta sinais de infecção pelo protozoário (0). Não apresenta lesões causadas pelo epicomensal.
1	Presença muito baixa do parasita (1-5/lamela/organismo). Observam-se poucas lesões causadas pelos epicomensais como infiltração hemocítica.
2	Se observa a presença moderada de protozoários (6-10/lamela/organismo). Se observa um incremento na lesões causados pelos epicomensais como infiltração hemocítica e formação de nódulos hemocíticos. Incremento na mortalidade se não há aplicação de tratamento.
3	Se observa alta presença de protozoários (10-20/lamelas/organismo). Se observam lesões moderadas a severas causadas pelos epicomensais como infiltração hemocítica, áreas multifocais mecanizadas e formação de nódulos hemocíticos. Potencialmente letal se não há aplicação de tratamento.
4	Se observa grande quantidade do protozoário (mais de 20/lamela/organismo). Se observam severas lesões causadas pelos epicomensais como infiltração hemocítica, melanização multifocal e necrose. Muito letal com alta mortalidade.



Amostras de camarão para a realização de análises a fresco.

O FUTURO DA CARCINICULTURA

Um novo paradigma está surgindo no cenário da carcinicultura mundial. Lugares onde outrora era inimaginável cultivar camarão, como na Letônia, país báltico onde as temperaturas chegam a 30 graus negativos, hoje surpreendem com cultivos sustentáveis de alta produtividade.

"Indoor Shrimp Production System - ISPS" é a nomenclatura que vem sendo utilizada para classificar este novo sistema de cultivo. Em português significa algo como "Cultivo de Camarão em Ambientes Fechados". Para facilitar a incorporação do conceito aqui no Brasil, será adotado o termo "Carcinicultura Indoor - CI".

A ideia de que é inescusável dispor de grandes áreas e altas temperaturas para praticar a carcinicultura pode se tornar coisa do passado. Em 2015 já observamos a ocorrência, em diversos (e adversos) locais do mundo, de cultivos super intensivos em ambientes fechados, desde países mais ricos como o Japão, Espanha e Estados Unidos até nações menos favorecidas como África do Sul, México e Mongólia.

No Brasil esses cultivos vêm surgindo discretamente. Ainda existem desafios a serem superados para que esta prática se torne habitual por aqui. O descaso do governo com a real potência da aquicultura nacional, a carência de investimentos eficientes em ciência e tecnologia e a resistência por parte dos produtores em adotar métodos inovativos são algumas das barreiras para o processo de intensificação sustentável dos sistemas de carcinicultura no país.

A ciência por trás do atual sucesso da Carcinicultura Indoor se dá principalmente devido aos avanços em três linhas de pesquisa: Sistema de Recirculação de Água, Sistema de Cultivo Mixotrófico e Cultivo Livre de Patógenos Específicos. A conjunção prática desses novos saberes culmina em uma nova forma de pensar a carcinicultura.

O aprimoramento das técnicas de recirculação contribui para a diminuição significativa do volume de água necessário para abastecer e manter o cultivo, além de promover a recirculação dos nutrientes. O cultivo mixotrófico aumenta a disponibilidade de alimento natural, reduzindo as taxas de conversão alimentar e aumentando a estabilidade do sistema. Um cultivo livre de patógenos

específicos promove a redução do risco de enfermidades, o que incrementa os níveis de sobrevivência.

A Carcinicultura Indoor maximiza a produção num contexto limitado de terra e água; possibilita o completo controle das variáveis físicas, químicas e biológicas do ambiente de cultivo; independe das condições climáticas naturais da região; possui relativa facilidade na obtenção de licenças ambientais, pois o impacto ambiental é baixo ou nulo; oportuniza o cultivo integrado com salicornia (planta tolerante à água salgada, considerada o sal do futuro); viabiliza o cultivo em regiões afastadas da costa, podendo ser implantado próximo a grandes mercados consumidores. Em suma, a principal vantagem é o fato de não ser necessário muita água nem grandes áreas para produzir em uma escala comercial considerável. As maiores dificuldades desse sistema são a necessidade de trabalhadores capacitados e treinados para administrar este tipo de cultivo e o custo relativamente alto de implantação.

Atualmente cerca de 90% do camarão consumido no Japão é importado. Especialistas apontam que, num futuro próximo, todo o camarão consumido no país poderá ser advindo da CI. Devemos começar também a repensar a

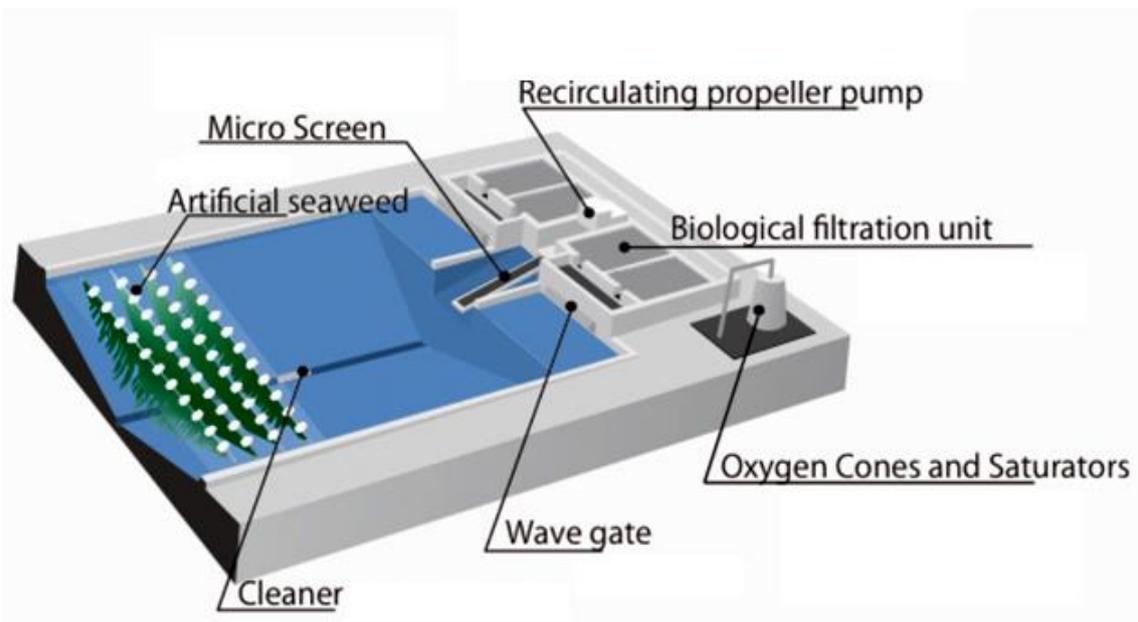
carcinicultura no nosso país. A Carcinicultura Indoor representa uma ameaça ao cultivo convencional? Ambos existirão em consonância? Ainda não temos essas respostas, no entanto podemos presumir que haverá uma reestruturação da indústria e do mercado do camarão no Brasil e no mundo decorrente da (r)evolução tecnológica desse setor. Um novo paradigma está surgindo no cenário da carcinicultura mundial e ainda nem todos o perceberam.



Fazenda de cultivo intensivo indoor em Las Vegas, Estados Unidos.



Esquema feito em Sketchup de um cultivo indoor intensivo de camarão.



Esquema de um modelo de cultivo indoor de camarão.

WWW.ABCCAM.COM.BR