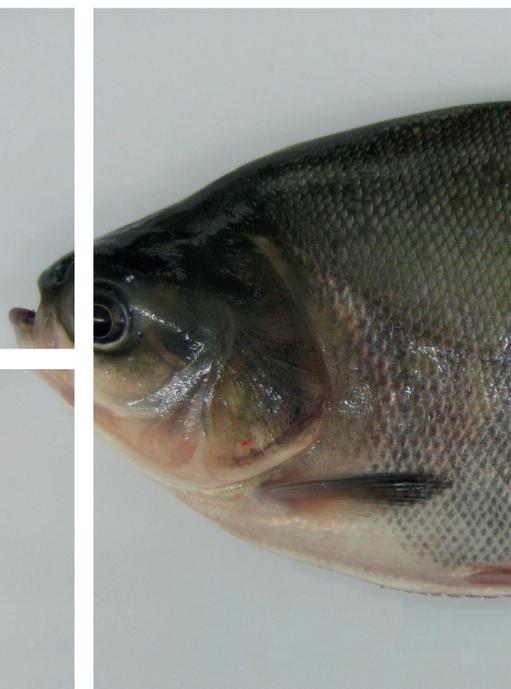


Identificação do Acantocéfalo *Neoechinorhynchus
buttnerae* em Plâncton de Viveiros de Produção
de Tambaqui (*Colossoma macropomum*)



OBJETIVOS DE
DESENVOLVIMENTO
SUSTENTÁVEL

2 FOME ZERO
E AGRICULTURA
SUSTENTÁVEL



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Amazônia Ocidental
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
33**

Identificação do Acantocéfalo *Neoechinorhynchus
buttnerae* em Plâncton de Viveiros de Produção
de Tambaqui (*Colossoma macropomum*)

*Magda Vieira Benavides
Sandro Loris Aquino Pereira
Edsandra Campos Chagas
Patricia Oliveira Maciel
Carlos José Hoff de Souza*

**Embrapa Amazônia Ocidental
Manaus, AM
2020**

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Amazônia Ocidental
Rodovia AM-010, Km 29,
Estrada Manaus/Itacoatiara
69010-970, Manaus, AM
Fone: (92) 3303-7800
Fax: (92) 3303-7820
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Unidade Responsável

Presidente
Everton Rabelo Cordeiro

Secretária-executiva
Gleise Maria Teles de Oliveira

Membros
*José Olenilson Costa Pinheiro, Maria Augusta
Abtibol Brito de Sousa e Maria Perpétua Beleza
Pereira*

Supervisão editorial e revisão de texto
Maria Perpétua Beleza Pereira

Normalização bibliográfica
*Maria Augusta Abtibol Brito de Sousa
(CRB 11/420)*

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Gleise Maria Teles de Oliveira

Foto da capa
Edsandra Campos Chagas

1ª edição
Publicação digital (2020)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Amazônia Ocidental

Identificação do acantocéfalo *Neoechinorhynchus buttnerae* em plâncton de vi-
veiros de produção de tambaqui (*Colossoma macropomum*) / Magda Vieira
Benavides... [et al.]. – Manaus : Embrapa Amazônia Ocidental, 2020.
18 p. : il. color. - (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Amazônia
Ocidental, ISSN 1517-2457; 33).

1. Tambaqui. 2. *Colossoma macropomum*. 3. Acantocéfalo. I. Benavides, Mag-
da Vieira. II. Pereira, Sandro Loris Aquino. III. Chagas, Edsandra Campos. IV. Ma-
ciel, Patricia Oliveira. V. Souza, Carlos José Hoff de. VI. Série.

CDD 639.3

Sumário

Resumo	7
Abstract	9
Problema	10
Objetivo	12
Material e Métodos	12
Resultados e Discussão	13
Conclusão.....	16
Agradecimentos.....	17
Referências	17

Identificação do Acantocéfalo *Neoechinorhynchus buttnerae* em Plâncton de Viveiros de Produção de Tambaqui (*Colossoma macropomum*)¹

Magda Vieira Benavides²

Sandro Loris Aquino Pereira³

Edsandra Campos Chagas⁴

Patricia Oliveira Maciel⁵

Carlos José Hoff de Souza⁶

Resumo – O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é a segunda espécie de interesse produtivo no Brasil e a primeira em produção na região Norte do País. Com o aumento do cultivo veio também o aparecimento de surtos do acantocéfalo *Neoechinorhynchus buttnerae*, primeiramente observado no estado do Amazonas, e que vem crescendo em outros estados da região Norte. A acantocefalose é uma parasitose do trato gastrointestinal que retarda o crescimento dos peixes, podendo até levá-los à morte. Dados preliminares de levantamento parasitário do Projeto Aquasec-Rede de Pesquisa em Epidemiologia de Enfermidades Bacterianas e Parasitárias e Prospecção de Vírus em Tambaquis, nos Polos Produtivos de Rio Preto da Eva, AM, Baixo São Francisco, AL/SE, e de pacus na Grande Dourados, MS, e Fatores de Risco Associados, financiado pelo CNPq/MPA 2012-2014, evidenciaram o problema da alta infecção por acantocéfalos no cultivo de tambaqui em Rio Preto da Eva, principal município de alta produção piscícola no Amazonas. Em função dessa problemática, o projeto identificou a forma do parasito em

¹ Cadastro nº A8DB368 (SisGen)

² Zootecnista, Ph.D. em Wool Science, pesquisadora da Embrapa Pecuária Sul, Bagé, RS.

³ Engenheiro de pesca, doutor em Biologia de Água Doce e Pesca Interior, pesquisador da Embrapa Roraima, Boa Vista, RR.

⁴ Engenheira de pesca, doutora em Aquicultura, pesquisadora da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM.

⁵ Veterinária, mestra em Biologia de Água Doce e Pesca Interior, pesquisadora da Embrapa Pesca e Aquicultura, Palmas, TO.

⁶ Veterinário, Ph.D. em Biologia Reprodutiva, pesquisador da Embrapa Pecuária Sul, Bagé, RS.

hospedeiros intermediários presentes na água de viveiros de produção e de abastecimento, por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR – sigla em inglês), como forma de indicar quais viveiros estão positivos para o parasito e, assim, não precisar realizar a eutanásia dos peixes para essa mesma finalidade.

Termos para indexação: tambaqui, acantocéfalo, plâncton, PCR.

Identification of Acantocephala *Neoechinorhynchus buttnerae* in Plancton of Tambaqui (*Colossoma macropomum*) Fish Ponds

Abstract – Tambaqui (*Colossoma macropomum*) is the second tropical fish species of productive interest in Brazil and the first in commercial production in the Northern region of the country. With the increase of tambaqui productive farms, outbreaks of the acantocephalus *Neoechinorhynchus buttnerae*, which was first observed in the State of Amazonas and reports show it is now causing problems in other Brazilian Northern States. *Neoechinorhynchus buttnerae* is a parasite of the intestinal tract that stunts fish growth and can lead to death. Preliminary data in parasitic surveillance of an earlier research project (AQUASEC “Research network in bacterial, parasitic and viral diseases epidemiology in tambaqui fish, in Rio Preto da Eva (AM), Baixo São Francisco (AL/SE), and pacus in Grande Dourados (MS) productive regions, and associated risk factors”, CNPq/MPA 2012-2014 grant), highlighted the problem of high infection by acantocephala in tambaqui ponds at Rio Preto da Eva (Amazonas State main tambaqui productive region). The present work was carried out to identify acantocephala DNA in plancton intermediate hosts, by means of Polymerase Chain Reaction (PCR) as a way to spot which fish ponds are positive for this parasite, instead of conducting euthanasia in fish to single out positive parasite infected ponds, for sanitary control measures.

Index terms: tambaqui, acantocephala, plancton, PCR.

Problema

Colossoma macropomum (Cuvier 1818), conhecido vulgarmente como tambaqui (Figura 1), é um peixe da ordem Characiformes, pertencente à família Serrasalmidae, nativo dos rios Amazonas, Orinoco e seus afluentes. O tambaqui alcança porte máximo em torno de 100 cm de comprimento e peso superior a 40 kg. Em cultivo, essa espécie atinge a maturação sexual em até 3 anos (Goulding; Carvalho, 1982; Araújo-Lima; Goulding, 1998) e pode alcançar 2,62 kg de peso e produção de 18.530 kg/ha, em altas densidades, após 10 meses de engorda (Izel et al., 2013).

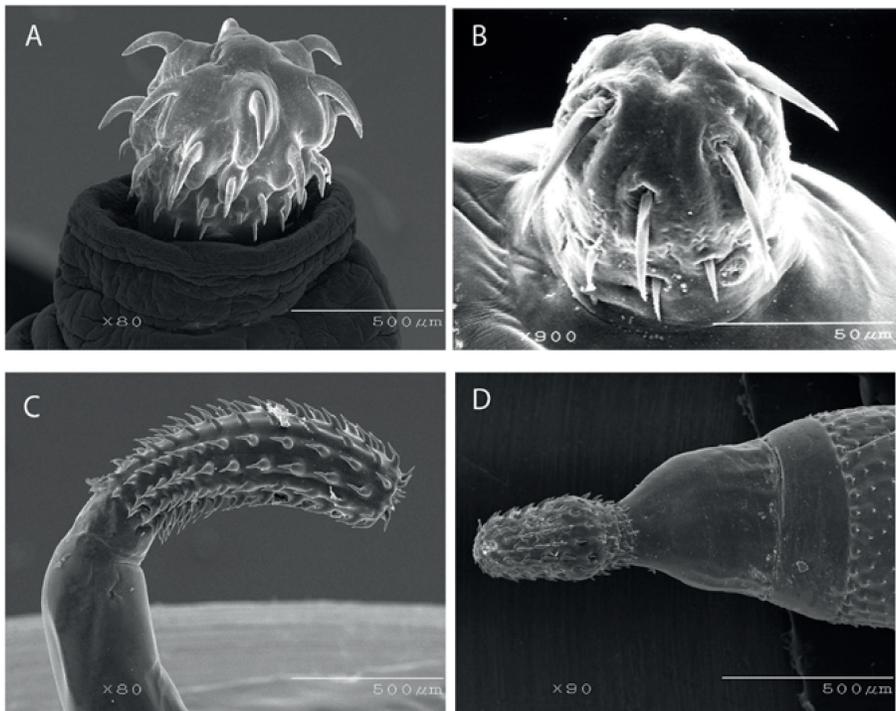


Figura 1. (A-D) Diversidade de detalhes da probóscide de espécies de acantocéfalos por microscopia eletrônica.

Fonte: García-Prieto et al. (2014).

A criação do tambaqui é realizada em praticamente todo o País, com exceção dos estados do Paraná, de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul (IBAMA, 2005; 2007). A expansão da criação dessa espécie é atribuída ao seu excelente potencial para produção intensiva. Contudo, um dos principais problemas relacionados à criação, na atualidade, é a ocorrência de doenças parasitárias, com destaque para o grupo dos acantocéfalos (Figura 1), que vêm preocupando os piscicultores em razão das altas infecções registradas no estado do Amazonas (Aquino-Pereira et al., 2014; Gomes et al., 2014).

Com 1.100 espécies, aproximadamente, os acantocéfalos são o menor grupo de parasitos, ocorrendo em peixes na natureza e de cultivo (Bush et al., 2001; Nickol, 2006). O ciclo de vida desse grupo é indireto, sendo necessário um artrópode como hospedeiro intermediário e um vertebrado como hospedeiro definitivo (Santos et al., 2013). Os acantocéfalos adultos parasitam o intestino delgado de seus hospedeiros peixes, nesse órgão também ocorre a reprodução (Santos et al., 2013).

Os ovos fertilizados são liberados nas fezes e ingeridos por crustáceos (anfípodos, copépodes, isópodes ou ostracodas) presentes no ambiente aquático (Nickol, 2006; Santos et al., 2013). A fase infectante para o hospedeiro intermediário é chamada de acantor. A larva só se desenvolve após predação do ovo (Thatcher, 2006). Depois de eclodida se desenvolve até cistacanto (Nickol, 2006; Santos et al., 2013), que é a forma infectante para o hospedeiro definitivo.

É importante destacar que, para o controle de uma enfermidade, se deve atuar em duas frentes, uma delas é o tratamento da doença propriamente dito, a outra é a prevenção, tanto evitando a entrada quanto reduzindo ou eliminando as chances de reinfecção.

Há uma preocupação por parte do setor produtivo e de pesquisadores que surtos de doenças de organismos aquáticos estejam relacionados com a intensificação da aquicultura, portanto o conhecimento das doenças que podem se agravar nesse tipo de sistema, bem como o emprego de boas práticas de manejo sanitário, é fundamental. Ressalta-se, assim, a importância de estudos sobre o ciclo de vida do parasito com ênfase na identificação de seus hospedeiros intermediários e nas medidas de controle eficazes e seguras para o acantocéfalo *Neoechinorhynchus buttnerae* no cultivo de tambaquis.

Atualmente os métodos de diagnóstico para o acantocéfalo *N. buttnerae* consistem na avaliação dos peixes post mortem. Entretanto, a padronização de métodos que permitam a identificação precoce de peixes infectados e de viveiros infestados possibilitaria o tratamento dos hospedeiros e do ambiente e a redução das perdas econômicas por essa parasitose.

Objetivo

Identificar a presença de formas intermediárias do acantocéfalo *N. buttnerae* por meio de PCR no plâncton de viveiros de tambaquis (*C. macropomum*).

Material e Métodos

Pisciculturas comerciais (n=3) de tambaqui do município de Rio Preto da Eva, AM, foram amostradas (n= 1 viveiro por piscicultura e n=18 peixes por piscicultura) e a ocorrência de parasitos adultos foi registrada no trato gastrointestinal de peixes naturalmente parasitados por *N. buttnerae*. Os peixes foram eutanasiados, e, após necropsia, os parasitos foram coletados e armazenados a -80 °C.

Paralelamente foram amostrados plânctons dos viveiros de origem dos peixes e do local de abastecimento de água dos viveiros nas propriedades com peixes parasitados e não parasitados. De cada viveiro três amostras de plâncton foram retiradas e três do local de abastecimento dos viveiros.

Para a coleta de plâncton utilizou-se rede de plâncton (30 cm de diâmetro x 70 cm de comprimento, 68 µm de abertura de malha e copo de PVC de 150 mL) e realizaram-se arrastos horizontais subsuperficiais, paralelos às margens dos viveiros, com posterior filtragem desse volume de água com peneiras de metal de malha igual a 180 µm (Aquino-Pereira et al., 2016).

Amostras de DNA foram extraídas das amostras de plâncton, e PCRs com primers específicos para o acantocéfalo *N. buttnerae* foram desenhados para identificar a presença do parasito no plâncton de viveiros.

A extração de DNA do plâncton foi realizada com a metodologia descrita por Beltran et al. (2008), exceto que as amostras de plâncton foram sonicadas previamente ao protocolo de extração. Após teste de temperatura

de anelamento, as PCRs foram realizadas seguindo 1 ciclo de 95 °C por 2 minutos, 30 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 51,7 °C por 20 segundos, 72 °C por 30 segundos e 1 ciclo de 72 °C por 5 minutos para a extensão final. A sequência dos primers foi ACTTTGCGCTGCCGAATT (*primer sense*) e CTTGTCCCTCTAATAAGCATC (*primer antisense*), com fragmento amplificado de 754 pb (Figura 2). A localização dos primers foi priorizada em zonas de alta diversidade do RNA ribossomal 18S quando comparado com as demais espécies do gênero *Neoechinorhynchus* (*Neoechinorhynchus crassus* AF001842, *Neoechinorhynchus buttnerae* MK249749, *Neoechinorhynchus saginata* AY830150 e *Neoechinorhynchus pseudemydis* NPU41400), considerando que esse gene apresenta homologia superior a 93% entre as espécies desse gênero que foram analisadas por estarem com a sequência disponível no Genbank.

Resultados e Discussão

A presença de *N. buttnerae* nos hospedeiros intermediários, por meio da técnica de PCR no plâncton, e de parasitos no sistema gastrointestinal dos peixes coletados foi um fator para identificar falsos positivos nos viveiros comerciais.

Os viveiros de produção mostraram peixes parasitados por *N. buttnerae*, sendo que a prevalência em duas das pisciculturas foi de 100%, enquanto uma das pisciculturas (a suposta como controle negativo) foi de um parasito adulto em um peixe (tanque 3; 5,55%; 1/18), quantidade suficiente para mostrar o diagnóstico positivo da propriedade.

Dos dois viveiros com 100% de peixes parasitados, as PCRs mostraram resultados positivos, sendo que, em um desses viveiros, a fonte de abastecimento de água também mostrou PCRs com resultados positivos, sugerindo que a água de abastecimento estava sendo fonte de contaminação dos peixes com o parasito.

No viveiro com 5,55% de peixes parasitados (viveiro 3), o resultado de PCR foi positivo no plâncton do viveiro de produção, mas não no local de abastecimento deste, sugerindo que a contaminação pode ter origem em alevinos parasitados oriundos de pisciculturas de reprodução ou de outra origem, como no povoamento do viveiro de engorda com peixes recriados em

viveiros contaminados pelo parasito. Outra fonte de contaminação pode ser a não desinfecção adequada do viveiro antes do início de um ciclo produtivo com histórico de peixes parasitados. A contaminação do plâncton por *N. buttnerae* no viveiro 3, via PCR, mostra que há potencial de aumento da prevalência nos peixes, uma vez que o parasito está presente nos hospedeiros intermediários que compõem o plâncton.

Tabela 1. Ocorrência do acantocéfalo *Neoechinorhynchus buttnerae* em tambaqui (*Colossoma macropomum*) após exame post mortem e em plâncton de viveiros e água de abastecimento, via PCR, de três pisciculturas amostradas em Rio Preto da Eva, AM.

Piscicultura		Plâncton			Nº total	Peixes		
		PCR am1	PCR am2	PCR am3		Parasitados	Ñ parasit.	Prevalência (%)
Nº 1	Viveiro	⊕⊕	O⊕	O⊕	18	18	0	100
	Abast.	nd	nd	nd	-		-	
Nº 2	Viveiro	O⊕	⊕O	nd	18	18	0	100
	Abast.	⊕	⊕	O	-		-	
Nº 3	Viveiro	O⊕	⊕⊕	⊕⊕	18	1	17	5,55
	Abast.	O	O	O	-		-	

⊕ – PCR positiva; O – PCR negativa; nd – não disponível

Replicatas de géis de agarose foram corridas quando detectaram-se amostras PCR negativas inicialmente. Descobriu-se que, posteriormente, essas amostras apareceram como PCR positiva em outro gel, mostrando ser a primeira análise um falso negativo (Figura 2). Salienta-se que a quantidade de plâncton, principalmente na água de abastecimento, em geral, é extremamente pequena, portanto a extração de DNA foi realizada com 500 µL de amostra inicial.

Outro problema encontrado na metodologia foi o uso de *SYBR green* como corante para os fragmentos de PCR. Esse produto distorce o tamanho dos fragmentos de DNA em razão de diferenças na concentração de DNA de cada uma das amostras (Figura 3).

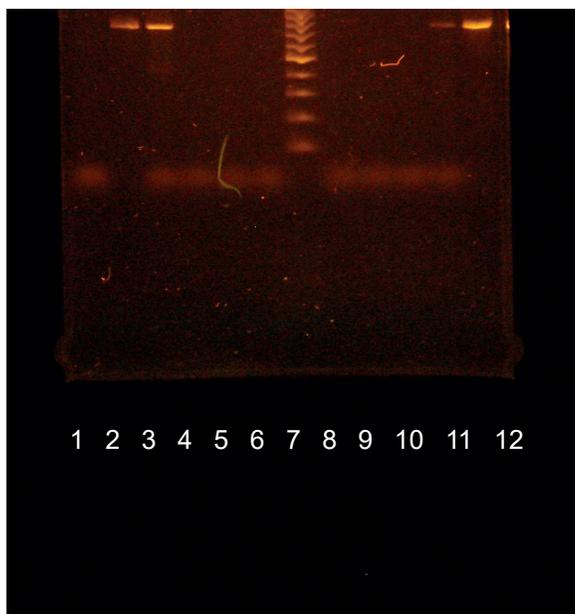


Figura 2. Primeira rodada de gel de agarose a 1,5% mostrando fragmentos de PCR em torno de 754 pares de base. Controle água (faixa 1), controle parasito (faixa 2), viveiro 2 amostra 1 (faixa 6), marcador 100 bp (faixa 7), viveiro 2 amostra 2 (faixa 8), viveiro 3 amostra 1 (faixa 9), viveiro 3 amostra 2 (faixa 10), viveiro 3 amostra 3 (faixa 11), controle parasito (faixa 12).

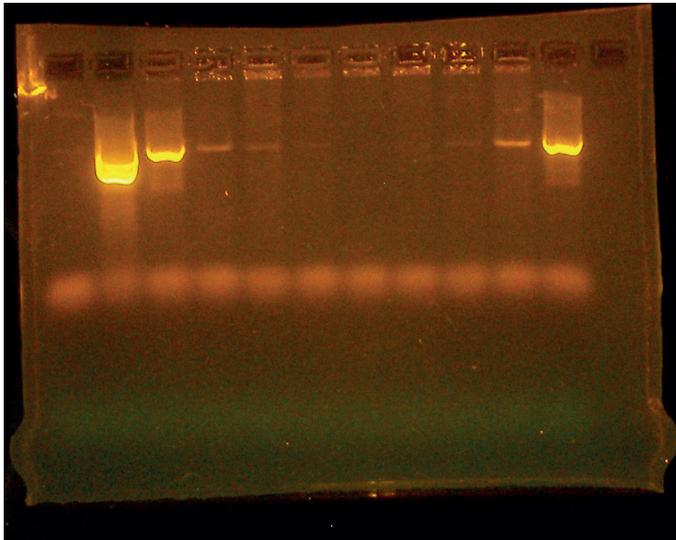


Figura 3. Segunda rodada de gel de agarose a 1,5% mostrando fragmentos de PCR em torno de 754 pares de base. Controle água (faixa 1), controle parasito (faixa 2), viveiro1 amostra 1 (faixa 3), viveiro 1 amostra 2 (faixa 4), viveiro 1 amostra 3 (faixa 5), viveiro 2 amostra 1 (faixa 6), viveiro 2 amostra 2 (faixa 7), viveiro 3 amostra 1 (faixa 8), viveiro 3 amostra 2 (faixa 9), viveiro 3 amostra 3 (faixa 10), controle parasito (faixa 11).

Os resultados demonstram que é possível identificar viveiros infectados por *N. buttnerae*. A avaliação de plâncton de viveiros de piscicultura por meio de PCR apresenta-se como uma forma não invasiva de detecção do patógeno no ambiente. A alta associação do ambiente com tambaquis parasitados indica que o teste de PCR no plâncton dos viveiros pode auxiliar no diagnóstico precoce dessa parasitose, sugerindo o tratamento dos peixes e do ambiente no caso de PCR positiva para o plâncton.

Conclusão

Apesar da ocorrência de falsos negativos para PCR, observou-se que, replicando o número de géis de agarose, é possível classificar os viveiros como positivo ou negativo para o acantocéfalo *N. buttnerae*, e esse resultado

foi comprovado pela presença de parasitos no trato gastrointestinal dos peixes amostrados.

Agradecimentos

Os autores agradecem o financiamento da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) ao projeto de pesquisa 02.13.09.003.00.03 e o valioso auxílio da Sra. Tania Maria Bueno, com as análises laboratoriais.

Referências

- AQUINO-PEREIRA, S. L.; CHAGAS, E. C.; BOIJINK, C.; MAJOLO, C.; BRANDÃO, F. R.; FUJIMOTO, R. Y. Levantamento parasitário de tambaqui (*Colossoma macropomum*) criado em pisciculturas do município de Rio Preto da Eva (AM) no período das chuvas. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE PATOLOGISTAS DE ORGANISMOS AQUÁTICOS, 13., 2014, Aracaju. **Anais....** Aracaju: ABRAPOA, 2014. p. 244.
- AQUINO-PEREIRA, S. L. A.; CHAGAS, E. C.; MACIEL, P. O.; BENAVIDES, M. V.; MAJOLO, C.; BOIJINK, C. de L.; TAVARES-DIAS, M.; ISHIKAWA, M. M.; FUJIMOTO, R. Y.; BRANDÃO, F. R.; SOUSA, K. L. de; MORAIS, M. da S.; MARTINS, V. F. da S. **Agentes patogênicos de tambaquis cultivados, com destaque para registros em Rio Preto da Eva, AM**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2016. 80 p. (Embrapa Amazônia Ocidental. Documentos, 127).
- ARAÚJO-LIMA, C. A.; GOULDING, M. **Os frutos do tambaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia**. Brasília, DF: Sociedade Civil Mamirauá: CNPq, 1998. 186 p.
- BELTRAN, S.; GALINIER, R.; ALLIENNE, J. F.; BOISSIER, J. Cheap, rapid and efficient DNA extraction method to perform multilocus microsatellite genotyping on all *Schistosoma mansoni* stages. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 501-503, 2008.
- BUSH, A. O.; FERNÁNDEZ, J. C.; ESCH, G. W.; SEED, R. Acanthocephala: the thorny-headed worms. In: BUSH, A. O.; FERNÁNDEZ, J. C.; ESCH, G. W.; SEED, R. (Ed.). **Parasitism: the diversity and ecology of animal parasites**. Cambridge: Cambridge University Press, 2001. p. 197-214.
- GARCIA-PRIETO, L.; GARCIA-VARELA, M.; MENDOZA-GARFIAS, B. Biodiversidad de Acanthocephala en México. **Revista Mexicana de Biodiversidad**, v. 85, p. S177-S182, 2014. Suppl.
- GOMES, A. L. S.; RIPPY, A.; AMORIM NETO, B. J. C. A.; MACHADO, M. R. F.; BERNARDINO, G. Enfermidades em piscicultura intensiva no estado do Amazonas: condições predisponentes e formas de controle. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE PATOLOGISTAS DE ORGANISMOS AQUÁTICOS, 13., 2014, Aracaju. **Anais....** Aracaju: ABRAPOA, 2014. p. 045.
- GOULDING, M.; CARVALHO, M. L. Life history and management of the tambaqui (*Colossoma macropomum*, characidae): an important Amazonian food fish. **Revista Brasileira de Zoologia**, n. 1, p. 107-133, 1982.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS
RENOVÁVEIS – IBAMA. **Estatística da pesca 2006 Brasil**: grandes regiões e unidades da
federação. Brasília, DF, 2007. 174 p.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS
RENOVÁVEIS – IBAMA. **Produção brasileira da Aqüicultura Continental, por Estado e
espécie, para o ano de 2005**: estatística da aqüicultura e pesca no Brasil – ano 2005. Brasília,
DF: SEAP, 2005. 101 p.

IZEL, A. C. U.; CRESCÊNCIO, R.; O’SULLIVAN, F. F. L. A.; CHAGAS, E. C.; BOIJINK, C. L.;
SILVA, J. I. **Produção intensiva de tambaqui em tanques escavados com aeração**. Manaus:
Embrapa Amazônia Ocidental, 2013. 4 p. (Embrapa Amazônia Ocidental. Circular técnica, 39).

NICKOL, B. B. Phylum Acanthocephala. In: WOO, P. T. K. (Ed.). **Fish diseases and disorders**.
v. 1: Protozoan and metazoan infections. Canadá: University of Guelph, 2006. p. 444-465.

SANTOS, C. P.; MACHADO, P. M.; SANTOS, E. G. N. Acanthocephala. In: PAVANELLI, G. C.;
TAKEMOTO, R. M.; EIRAS, J. C. (Org.). **Parasitologia de peixes de água doce do Brasil**.
Maringá: Eduem, 2013. p. 353-370.

THATCHER, V. E. **Amazon fish parasites**. 2. ed. Sofia: Pensoft Publishers, 2006.



Amazônia Ocidental