

## RESUMO

As doenças são consideradas como o principal fator biológico capaz de limitar e desestimular a carcinicultura no mundo. As viroses são, invariavelmente, as que causam maior impacto e, por conseguinte, maiores prejuízos econômicos registrados no setor. O vírus da Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética – IHHNV acomete os camarões silvestres e cultivados nas fases jovens e sub-adulta, mas não causa danos à saúde humana. Para a espécie *Litopenaeus vannamei* é considerado de baixo impacto, levando a uma enfermidade crônica denominada “síndrome da deformidade e do nanismo” (RDS), que compromete a qualidade do produto com implicações econômicas para a indústria camaroneira. O presente estudo teve por objetivo realizar testes de desafio com a espécie nativa do camarão *Farfantepenaeus subtilis* para verificar o comportamento da mesma frente ao vírus da IHHN. Foram utilizados 200 camarões jovens saudáveis com peso corporal de  $2,56 \pm 0,44$ g (média  $\pm$  desvio padrão; n = 200) mantidos em tanques individuais de 5,5L, em condições monitoradas que reproduziram os parâmetros ambientais de cultivo. Os animais foram desafiados de duas maneiras: um grupo por ingestão de tecido contaminado *per os* e outro por injeção intramuscular do extrato contendo o vírus, cada qual com seu grupo controle. Os grupos controles tiveram tratamentos semelhantes, porém um grupo ingeriu músculo de camarão IHHNV negativo e outro recebeu extrato de músculo de camarão livre de IHHNV. Após três dias de exposição ao IHHNV, os animais foram alimentados com ração comercial duas vezes ao dia e observados quanto ao comportamento, mortalidade, muda e sintomas já conhecidos em espécies susceptíveis à doença. O experimento teve duração de 30 dias, quando foram colhidas aleatoriamente amostras de material biológico para contagem total de hemócitos, análise histológica e molecular. O estudo demonstrou que a espécie nativa *Farfantepenaeus subtilis* capturada no Estuário do Rio Pacoti no município de Eusébio, Estado do Ceará é susceptível à infecção pelo vírus da IHHN.

Palavras chave: vírus, IHHNV, *Farfantepenaeus subtilis*, desafio, susceptibilidade.

## ABSTRACT

Diseases are the main biological factor that can limit and discourage the shrimp culture worldwide. Virus infection is the main cause of impact and economic losses registered in this sector. The Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV) occurs in both wild and cultured shrimp, mainly in the juvenile and sub-adult phases, although it does not cause harm to human health. This pathogen is considered a low impact virus to *Litopenaeus vannamei*, causing a chronic disease called "Runt Deformity Syndrome" (RDS), which compromises the product quality and can have economic implications to shrimp industry. This study aimed at verifying response of the native species *Farfantepenaeus subtilis* in presence of the IHHN virus. The experiment utilized 200 healthy young shrimp weighing  $2.56 \pm 0.44$ g (mean  $\pm$  standard deviation), kept in single 5.5L tanks, under monitored conditions similar to those found in shrimp culture farms. The animals have been challenged in two ways: "per os" and by intramuscular injection, each one with its control group. After three days of exposition to the virus, the animals were fed with a commercial food two times a day, when were observed behavior, mortality, moulting and the signs for the characteristic symptoms in species susceptible to this disease. The experiment was conducted during 30 days. The shrimp were sample randomly for total hemocytes counting, histological and molecular analyses. This study showed that the native species *F. subtilis* caught in Pacoti River Estuary (Eusébio - Ceará - Brazil) is susceptible to IHHNV infection.

Keywords: IHHNV, virus, *Farfantepenaeus subtilis*, challenge, susceptible

## 1. INTRODUÇÃO

A carcinicultura mundial tem merecido especial destaque não somente por sua importância econômica, mas também pela manutenção dos estoques naturais ameaçados pela pesca indiscriminada e poluição dos ecossistemas aquáticos. Existem três pontos de sustentação desta atividade: produção de proteína de qualidade, geração de empregos e preservação ambiental. Sem o respeito a esse trinômio, não haverá atendimento aos interesses sociais e a sustentabilidade (Jory, 2004). No ano de 2005 foram produzidas 2.307.600 toneladas de camarão cultivado em todo o mundo (ABCC, 2006). As espécies mais cultivadas são: *Penaeus monodon* (tigre gigante), *Penaeus chinensis* (camarão branco do oriente) e *Litopenaeus vannamei* (camarão branco do ocidente). O Continente Asiático é responsável por 83,69% da produção mundial, sendo os principais produtores China e Tailândia e os maiores mercados consumidores os EUA, Europa e Japão. Nos países ocidentais, o cultivo de camarão marinho cresceu muito na última década. Nos últimos cinco anos houve uma explosão desta atividade no Brasil, que ocupa a décima posição na produção mundial e a segunda no hemisfério ocidental. (Rocha, 2005).

A Região Nordeste é a principal produtora de camarão marinho cultivado no Brasil, com 93,1% da produção nacional, sendo o Estado do Rio Grande do Norte o líder de produção, seguido pelo Ceará. Nos anos de 2004 e 2005 houve uma queda de produção e produtividade na carcinicultura brasileira ocasionadas por diversos fatores dentre estes, as enfermidades virais com destaque para a Mionecrose Infecciosa Viral (IMNV) (Rodrigues, 2005).

A espécie exótica *L. vannamei* importada do Pacífico tem sido a eleita para cultivo pelos países do mundo ocidental (Barbiere & Ostrenski, 2002). Nos últimos anos vem crescendo o seu cultivo no Oriente, principalmente na Tailândia, tendo se tornado a espécie mais cultivada mundialmente, desde 2004 (ABCC, 2006). O cultivo deste crustáceo decápode foi introduzido no Brasil nos anos 80, mas somente no início dos anos 90, com validações tecnológicas, demonstrou supremacia sobre as espécies nativas, por apresentar uniforme taxa de crescimento, fácil adaptabilidade às diferentes condições de meio ambiente, altas taxas de sobrevivência, fácil reprodução em laboratório e ter boa aceitação pelo mercado internacional. Contudo, essa espécie é bastante vulnerável a enfermidades virais e bacterianas (DPA, 2001).

Quando espécies exóticas são introduzidas no ambiente natural podem causar impactos ambientais gerados pela competição e predação das espécies nativas, podendo levá-las à

extinção (Primack & Rodrigues, 2001). Outro fator impactante, especialmente na criação de camarão em cativeiro é a possibilidade de transmissão de doenças para os estoques naturais das áreas de em torno das fazendas. Dada a fragilidade da sustentação de cultivos baseados em uma única espécie, devido ao risco de queda da produção por sua susceptibilidade ao ataque de doenças, perda da variabilidade pela frequência de consangüinidade, bem como alteração na biodiversidade natural, por se tratar de uma espécie exótica, considera-se o cultivo de camarões nativos um fator de alta prioridade para o país (Borghetti *et al.*, 2003).

De acordo com Maia & Nunes (2003), a capacidade de adaptação da espécie nativa *Farfantepenaeus subtilis* ao sistema de engorda intensiva é positiva, indicando a possibilidade concreta da sua cultura em densidades de estocagem semelhantes às praticadas para o *L. vannamei*.

A domesticação de espécies silvestres e o êxito de sua exploração nos cultivos com fins comerciais não podem prescindir do conhecimento de sua biologia, quanto aos aspectos reprodutivos, nutricionais e de saúde. Os conhecimentos desses aspectos podem contribuir para geração de tecnologias, e conseqüentemente assegurar o sucesso do empreendimento, no entanto poucos estudos têm sido realizados em espécies nativas (Brock & Main, 1994).

Algumas vantagens para estimular o cultivo do *F. subtilis* são: encontrar-se distribuída por toda costa do Nordeste Brasileiro, possuir tégum fechado, o que facilita a reprodução em cativeiro, disponibilidade de fêmeas maduras e pós-larvas em ambiente natural e preço alto no mercado. Esta espécie já foi cultivada no Brasil nos anos 80, porém a inexistência de ração balanceada e de pacotes tecnológicos de cultivo foram os principais entraves que inviabilizaram o cultivo comercial desta espécie (Nunes, 1995).

A presente pesquisa teve como objetivo avaliar a susceptibilidade da espécie nativa *F. subtilis* ao vírus da Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética (IHNV) que freqüentemente acomete a espécie exótica cultivada *L. vannamei*. Segundo Lightner (1996a) e Tang & Lightner (2002), não se sabe se as espécies de camarões selvagens do Golfo do México, do Caribe e da costa do Atlântico são susceptíveis à infecção por esse vírus. Os resultados obtidos poderão servir de subsídio para o cultivo de *F. subtilis*, como alternativa de ampliação do número de espécies cultivadas e conseqüentemente, contribuir para a sustentabilidade do setor produtivo.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. A espécie nativa *Farfantepenaeus subtilis* (Perez-Farfante, 1967)

As espécies de camarão de maior importância econômica que habitam a costa brasileira são da família Penaeidae, pertencendo a dois gêneros: *Farfantepenaeus* e *Litopenaeus* (Perez-Farfante, 1997).

O camarão rosa *Farfantepenaeus subtilis* foi descrito originalmente por Perez-Farfante (1967) como a sub-espécie *Penaeus aztecus subtilis*. Em 1972 Borukovsky propôs o sub-gênero *Farfantepenaeus*, que incluía a espécie *Penaeus aztecus*. Numa recente revisão taxonômica da família Penaeidae (Perez-Farfante & Kensley 1997), *Farfantepenaeus* passou para o nível de gênero. Apesar de controvérsias filogenéticas a nomenclatura mais usada hoje em dia para esta espécie é *Farfantepenaeus subtilis* resultando na seguinte classificação taxonômica:

Filo- Arthropoda  
Superclasse- Crustacea  
Classe- Malacostraca  
Subclasse- Eumalacostraca  
Superordem-Eucarida  
Ordem- Decapoda  
Subordem- Dendrobranchiata  
Superfamília- Penaeoidea  
Família- Penaeidae  
Gênero- *Farfantepenaeus*  
Espécie- *Farfantepenaeus subtilis*

Maggioni *et al.* (2001) realizaram estudo filogenético molecular nas espécies de camarões do Atlântico Ocidental e concluíram que a reconstrução filogenética baseada no 16S mitocondrial confirma o status monofilético dos gêneros *Farfantepenaeus* e *Litopenaeus* descrito por Perez-Farfante & Kensley (1997).

O camarão *F. subtilis* é conhecido no Brasil como camarão marrom, camarão rosa entre outras denominações. Quanto à morfologia, a espécie apresenta: rostro serrilhado que ultrapassa o pedúnculo ocular com dentes dorsais e ventrais. O sulco adrostral é relativamente

curto estreitando-se à medida que se aproxima da extremidade distal do cefalotórax. (Perez-Farfante, 1969). A fêmea possui tético fechado, situado na altura do 5º par de pereiópodos. O macho apresenta o petasma com porção distal aumentada na largura formando um arco. (Perez - Farfante, 1975).

A distribuição geográfica, dessa espécie vai desde as Antilhas ao longo da costa ocidental atlântica da América Central e do Sul até o litoral do Rio de Janeiro no Brasil, (Figura 1), sendo pescada industrialmente desde a Venezuela até o Nordeste do Brasil e ocorre, preferencialmente, em fundos brandos de lodo e lama, até profundidades de 190m (Holthuis, 1980).

Durante o ciclo de vida, a espécie *F. subtilis* habita biótopos bem diferentes, caracterizados pela distância da costa ou pelo grau de salinidade da água. Durante a desova migra para águas profundas e durante o desenvolvimento larval, nas fases de *náuplio*, *protozoae* e *mysis* permanece no ambiente marinho pertencente ao plâncton. No estágio de pós-larva migra em direção à costa através de um processo complexo que envolve migração vertical e corrente de marés. Ao chegar aos estuários e em lagoas costeiras de águas rasas e salobras, as pós-larvas vão a busca de proteção e alimentação adequada, mas também são alvo da pesca artesanal. Depois em alguns meses, os subadultos migram para o mar, onde maturam e realizam sua primeira desova. (Garcia, 1977; Issac & Dias Neto, 1992; Trujillo & Gesteira, 1997).

A reprodução do *F. subtilis* é igual aos demais peneídeos onde existem duas épocas de maior intensidade de desova, dando origem, portanto a duas coortes por ano (Garcia, 1985). Santana (2005), estudando a morfologia do sistema reprodutor feminino da espécie *F. subtilis* concluiu que este é formado por ovários e ovidutos pares e tético. A mesma autora observou que o ovário apresenta sete pares de lóbulos laterais, sendo o último par menos desenvolvido, os ovidutos são túbulos translúcidos ligando o 6º par de lóbulos ovarianos aos gonoporos e o tético apresenta cerdas distribuídas em toda superfície das placas.

Quanto aos aspectos nutricionais, os camarões peneídeos, em geral, apresentam hábito alimentar contínuo e freqüente (Hill & Wassenberg, 1987). Nunes & Parsons (2000) verificaram que o *F. subtilis* é capaz de restabelecer a alimentação logo após uma refeição inicial, porém o consumo alimentar é restrito a um determinado valor, provavelmente associado ao volume estomacal. A espécie *F. subtilis* por ser carnívora, quando em cativeiro exige uma ração mais elaborada possivelmente mais rica em proteínas, não havendo atualmente no mercado, ração que atenda suas exigências nutricionais (Nunes, 1995).

O sistema imune de crustáceos diferentemente dos vertebrados não é específico e não possui nenhuma capacidade de memória, portanto, ele não apresenta imunidade adquirida. Apesar disso, é considerado um sistema complexo, eficiente e altamente desenvolvido que compreende as barreiras físico-químicas representadas por um exoesqueleto rígido de quitina, intestino revestido por membranas peritróficas, além de componentes humorais e celulares (Smith, 1991). As reações de defesa estão associadas à hemolinfa, tecido fluido composto por uma fração celular representada pelos hemócitos, e uma parte líquida, representada pelo plasma, onde residem os fatores humorais (Newman & Bullis, 2001; Barracco, 2004).



**Figura 1-** Mapa localizando a distribuição geográfica do camarão *Farfantepenaeus subtilis*.  
(Cedido por Leonardo Hislei )

## 2.2. O Vírus da Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética (IHHNV)

Atualmente são conhecidas mais de vinte enfermidades virais que acometem os camarões marinhos e que causam grandes impactos na economia global da indústria camaroneira. Estes vírus constituem um fator de grande risco para a produção mundial de camarão, pois já causaram grandes perdas na Ásia, Indo-pacífico e nas Américas (Lightner, 2004). Os patógenos virais de maior significância listados pelo Escritório Internacional de Epizootias (OIE) da Organização Mundial da Saúde Animal são o WSSV, TSV e YHV. O Vírus da Mancha Branca (WSSV) que surgiu inicialmente na Ásia e depois se disseminou pelas Américas é um vírus de elevada infectividade, podendo causar até 100% de mortalidade após a manifestação dos seus sintomas. O Vírus da Síndrome de Taura (TSV) foi descoberto em 1992 em fazendas do Equador e depois se espalhou para outros países das Américas, ele provoca uma doença grave que pode levar a 95% de mortalidade nos camarões cultivados. O Vírus da Cabeça Amarela (YHV) foi descoberto em 1991 em fazendas da Tailândia devido à alta mortalidade observada em cultivos de *P. monodon*, tendo causado graves prejuízos nos cultivos de camarão em todo mundo.(Lightner, 2005).

O Vírus da Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética (IHHNV) também está listado entre os patógenos de significância devido às perdas cumulativas que pode causar aos cultivos. É o menor dos vírus que ataca os camarões peneídeos, apresenta simetria icosaédrica, não envelopado, tamanho aproximado de 22 nm, com uma densidade de 1,40 g/ml em CsCl. Contém DNA de fita simples com 4,1 kb (GenBank AF218266) e tem um capsídeo com os quatro polipeptídios de peso molecular 74, 47, 39 e 37,5 kD. Por causa destas características, o IHHNV foi classificado como um membro da família Parvoviridae e provavelmente membro do gênero *Brevidensovirus* (Bonami *et al.*, 1990; Bonami & Lightner, 1991; Shike *et al.*, 2000).

O IHHNV foi descoberto nas Américas em 1981 por causar doença aguda com alta mortalidade (superior a 90%) na espécie *Litopenaeus stylirostris* (camarão azul do Pacífico), em fazendas de cultivo no Hawai. Os indivíduos apresentavam nas fases jovem e sub-adulto sintomas clínicos como marcada diminuição de consumo de alimento, elevados percentuais de morbidade e mortalidade, obstrução das brânquias e apêndices corporais por organismos epibiontes e epicomensais (Lightner *et al.*, 1983). Ao mesmo tempo, foi verificado que as larvas e pós-larvas infectadas com o IHHNV eram assintomáticas.

A susceptibilidade da infecção pelo vírus IHHN varia entre os gêneros e espécies de peneídeos. O vírus se caracteriza por provocar infecções persistentes e latentes em populações de *L. stylirostris*, e ser menos virulento para as espécies *P. monodon* e *L. vannamei*, levando a uma enfermidade crônica denominada “síndrome da deformidade e do nanismo” (RDS), caracterizada por deformidades do rosto, antenas enrugadas, aspereza da carapaça, deformidades cuticulares, índices reduzidos de crescimento com camarões de pequeno tamanho, levando a uma perda cumulativa na indústria camaroneira (Bell & Lightner, 1984; Brock & Lightner, 1990; Kalagayan *et al.*, 1991). As espécies *Fenneropenaeus indicus* e *F. merguensis* são refratárias ao IHHNV (Lightner *et al.*, 1983; Lightner, 1988). Shike *et al.*, (2000) verificou através do seqüenciamento genômico que o IHHNV é similar ao *Brevdensovirus* que ataca mosquitos. Tang *et al.*, (2000) confirmaram por técnicas de biologia molecular e por histologia que pós-larvas e juvenis de linhagens selecionadas de espécie *L. stylirostris* foram resistentes ao IHHNV. Tang *et al.*, (2003), em estudo de desafio com a espécie *L. stylirostris*, verificou que a pré-infecção com IHHNV induz a resistência contra o vírus da Mancha Branca (WSSV). Estudos posteriores com *Penaeus monodon* revelaram através de testes de PCR que na Austrália e em Madagascar foi encontrado o tipo A de IHHNV com seqüência de nucleotídeos diferente da encontrada no Hawaii (Krabsetsve *et al.*, 2004). Contudo, pesquisa realizada recentemente revelou que o IHHNV tipo A na realidade é uma seqüência que faz parte do genoma do *P. monodon* da África e Austrália (Tang & Lightner, 2006).

A transmissão da doença pode ocorrer de forma vertical, geralmente, através das fêmeas infectadas que passam o vírus para o embrião e eventualmente, através do esperma do macho. Essa forma de transmissão pode ser o fator mais importante do aumento da prevalência do IHHNV em camarões domesticados. Já a transmissão horizontal se dá principalmente por canibalismo ou através da água contaminada (Motte *et al.*, 2003). A transmissão viral através de vetores tem sido estudada, e aves aquáticas como as gaivotas têm sido relatadas como transmissores do IHHNV através das fezes (Vanpatten *et al.*, 2004).

O IHHNV tem ampla distribuição mundial, no hemisfério oriental, encontra-se distribuído tanto em camarões selvagens como em cultivados. Esta enfermidade já foi registrada nas Filipinas, Japão, Tailândia, Singapura, Indonésia, Oriente Médio, Polinésia Francesa, Nova Caledônia. No hemisfério ocidental encontra-se distribuído na Costa do Pacífico desde o Peru até o México, tanto em espécies de camarões peneídeos cultivados como selvagens. Apesar do IHHNV ter sido detectado em regiões do Pacífico, não se sabe se as espécies de camarões selvagens do Golfo do México, do Caribe e da costa do Atlântico são

susceptíveis a infecção. (Lightner,1996a; Owens *et al*, 1992; Pantoja *et al.*, 1999; Tang & Lightner, 2002).

O IHNV infecta os tecidos de origem ectodermal (brânquias, epiderme, epitélio hipodermal, parte anterior e posterior do trato digestório, cordão nervoso ventral e gânglios associados) e mesodermal (órgão hematopoiético, glândula antenal, gônadas, órgão linfóide, tecido conjuntivo e músculo estriado) e raramente os tecidos derivados do endoderma (Bell & Lightner, 1984; Lightner, 1996b). O diagnóstico clínico pelo método histológico, em preparações coradas pela hematoxilina e eosina, se baseia na presença de “corpos de inclusão” tipo Cowdry A (CAIs), intranucleares, bastante proeminentes, eosinofílicos em núcleos hipertrofiados com cromatina marginada. Esses corpos de inclusão podem ser facilmente confundidos com os apresentados pela infecção com o vírus da Mancha Branca (WSSV). Porém, o que vai diferenciar as duas doenças é que o corpo de inclusão da WSSV se apresenta maior, pálido e sem halo (Lightner, 1996b).

Os métodos moleculares que utilizam marcadores genéticos específicos para o diagnóstico do IHNV são Dot-blot, Hibridização *in situ*, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), PCR em Tempo-Real e Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP). Os métodos baseados em PCR são muito sensíveis e específicos, sendo capazes de produzir em poucas horas quantidades detectáveis da seqüência alvo, até mesmo quando esta é mínima na amostra original. Sua vantagem consiste em detectar níveis muito baixos de infecção, tornando o diagnóstico mais preciso. Porém, esse método exige técnicos especializados e produtos e equipamentos de alto custo. A hibridização *in situ* é menos sensível e demanda mais tempo para o diagnóstico, já a reação de amplificação em LAMP é um método novo que possui alta sensibilidade, é barato e o diagnóstico é rápido. (Lightner *et al.*,1992; Tang & Lightner, 2001; Dhaer *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2006).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Coleta, Aclimação e Identificação da espécie.

Nesta pesquisa foram utilizados 200 camarões juvenis da espécie *F. subtilis* com  $2,56 \pm 0,44$  g (média  $\pm$  desvio padrão;  $n = 200$ ). Foram realizadas três coletas durante o mês de julho de 2005, onde os animais foram capturados por meio de rede de arrasto em ambiente natural no Estuário do Rio Pacoti no município de Eusébio, Estado do Ceará (Figuras 2, 3 e 4) transportados em recipientes de 50L, providos de aeração constante, até o Laboratório de Bioensaio, do Instituto de Ciências do Mar (Labomar/UFC).

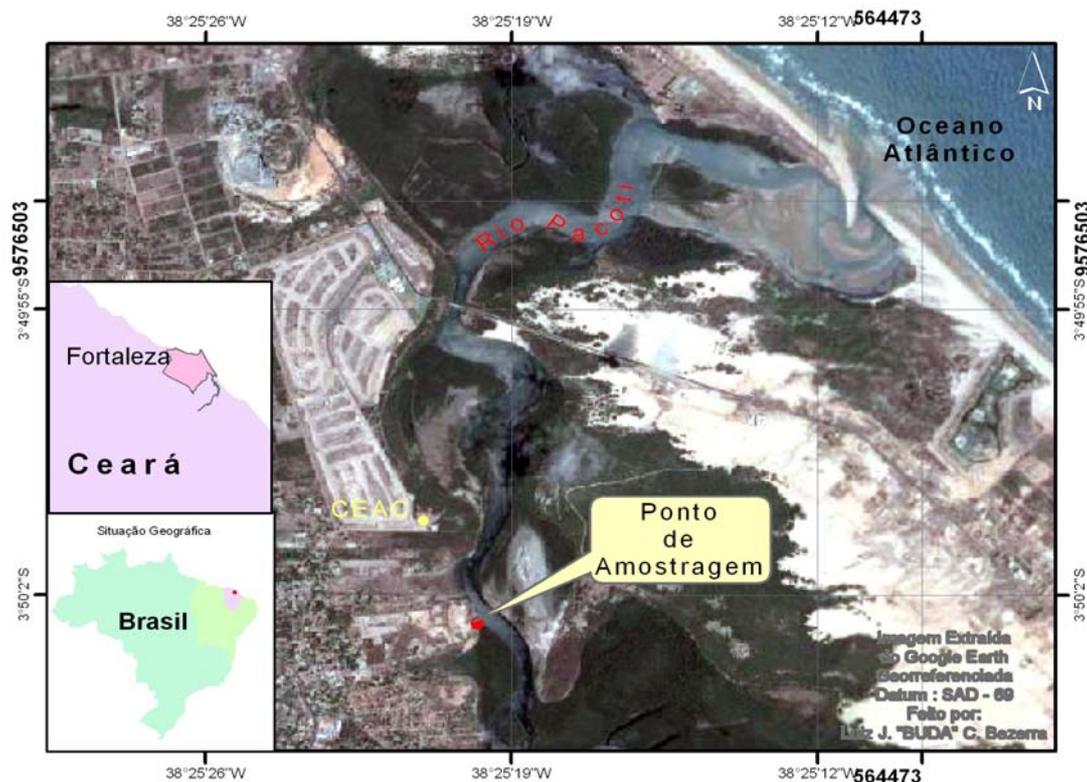


Figura 2- Mapa localizando área de coleta do camarão *Farfantepenaeus subtilis*.

Os camarões foram aclimatados em quatro tanques de 500L ( $123$  camarões/m<sup>2</sup>), contendo água do mar filtrada com salinidade  $30,0$ ; pH  $7,8 \pm 0,5$ ; temperatura  $27,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$  e oxigênio dissolvido  $6,4 \pm 0,2\text{mg}$ . A identificação da espécie foi feita em lupa Leica Zoom 200

e seguiu a chave proposta por Perez-Farfante & Kinsley (1997), que diferenciou a espécie através das seguintes características: cor geralmente marrom podendo apresentar-se acinzentado, exoesqueleto contendo cromatóforos em toda sua extensão, rostro apresentando espinhos dorsais e ventrais, sulcos adrostrais relativamente curtos, estreitando-se à medida que se aproxima da margem posterior da carapaça e tético fechado (Figuras 5 e 6).



**Figura 3-** Localização do ponto de coleta do camarão *F. subtilis*, no estuário do rio Pacoti.



**Figura 4 -** Coleta com rede de arrasto do camarão *F. subtilis*, no estuário do rio Pacoti.



**Figura 5-** Identificação da espécie *F.subtilis*.  
Visão da extensão do sulco adrostral.



**Figura 6-** Identificação da espécie *F.subtilis*.  
Visão dos espinhos rostrais.

### 3.2. Desenho Experimental

Depois de identificados, os 200 camarões foram individualmente distribuídos em tanques de plástico retangulares de cor cinza contendo 5,0L de água marinha clorada, filtro biológico e aeração constante. Os tanques foram arranjados em seis estantes plásticas com controle de luz (Figura 7). Antes de iniciar o desafio, foi coletado um pleópodo de cada indivíduo, extraído DNA e feito PCR para certificação de que os animais estavam livres do vírus IHNV. Após o período de aclimação de sete dias, iniciou-se o desafio que teve duração de 30 dias (20/9 a 19/10 de 2005).



**Figura 7-** Visão do sistema experimental adotado durante os testes de desafio.

A exposição ao vírus se deu de duas maneiras: ingestão de tecido contaminado pelo IHNV (*per os*) e injeção intramuscular de extrato viral. Cada tratamento teve um grupo controle. Após a exposição ao vírus, foi estabelecido um calendário de forma que em 30 dias todos os animais foram sacrificados para análise. As datas de coletas foram no 5º, 10º, 15º, 20º e 30º dia pós – desafio. Foram realizadas cinco coletas aleatórias de 40 animais, 10 indivíduos de cada tratamento e 10 de cada controle. Antes de sacrificar o animal, foi feita a pesagem, coleta de hemolinfa para Contagem Total de Hemócitos (CTH) e extração de

pleópodos para teste diagnóstico de biologia molecular (PCR). Em seguida cada indivíduo foi fixado com solução de Davidson para posterior análise histológica. A metodologia seguida foi a descrita por Lightner (1996b). Os animais que morreram nos dois primeiros dias, pós-tratamento, foram coletados e substituídos, após este período os que morreram fora das datas previstas de coleta foram analisados somente pelo método de PCR. Antes e após o processo de contaminação, os camarões foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial peletizada (Cameronina 35 HP, Purina do Brasil) na proporção 3,5% do peso corporal. Os indivíduos foram mantidos em condições laboratoriais, onde semanalmente foram medidas a salinidade, a temperatura e o oxigênio dissolvido, que foi mantido em fonte contínua. Os animais foram monitorados diariamente para registro de muda, comportamento e observação de sinais clínicos, que pudessem ser relacionados à ação do vírus.

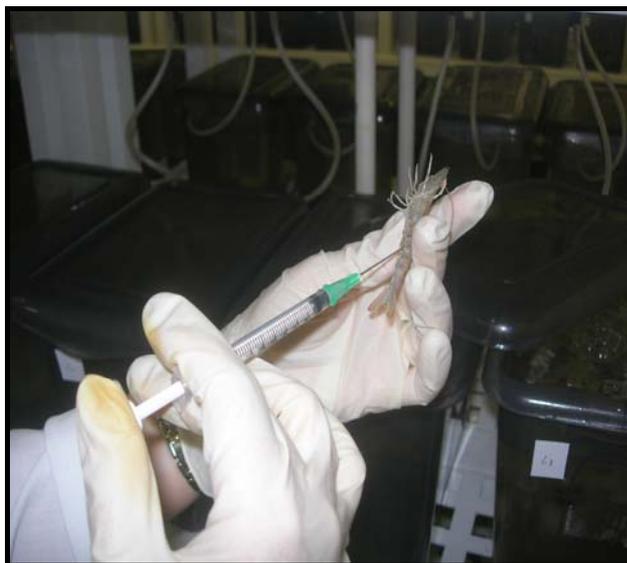
### **Formas de exposição ao IHHNV - Protocolo proposto pela OIE 2003.**

**Tratamento I** – Cinquenta camarões livres do patógeno investigado foram alimentados durante três dias com tecido da espécie *L. vannamei* infectado com IHHNV comprovado por PCR. A exposição oral (*per os*) foi feita uma vez ao dia em substituição a um dos arraçoamentos, em quantidade proporcional a 3,5% do peso corporal (Figura 8). Os 50 animais do grupo controle foram alimentados similarmente durante três dias, porém com tecido de *L. vannamei* livre de IHHNV.



**Figura 8** - Ensaio I (Via oral).

**Tratamento II** – Cinquenta animais sadios foram expostos ao vírus através de injeção intramuscular de extrato viral do tecido da espécie *L.vannamei* infectado com IHHNV. Na inoculação em apenas um dia, foi injetado um volume de 0,01ml por grama de peso, no terceiro segmento abdominal, utilizando-se uma seringa BD estéril de um ml e agulha BD 0,45 x 13 (Figura 9). Os 50 animais do grupo controle tiveram o mesmo tratamento, porém o extrato injetado foi de músculo de *L. vannamei* livre de IHHNV.



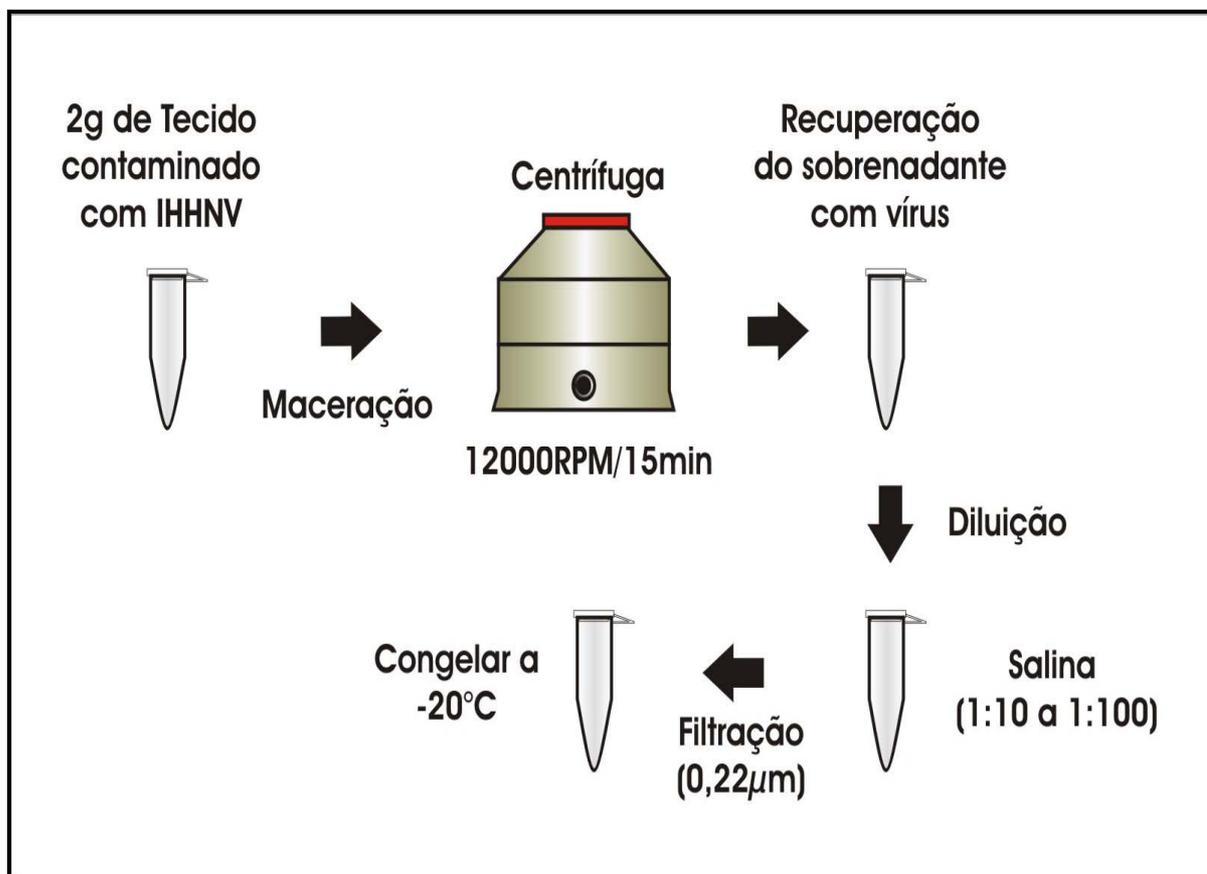
**Figura 9-** Ensaio II (Via intramuscular)

### 3.3 Preparação do extrato viral

A preparação do extrato viral seguiu a metodologia proposta pela Organização Mundial da Saúde Animal (OIE, 2003; White *et al.*, 2002) (Figura 10). Foram pesadas duas gramas do tecido contaminado com IHHNV, feita diluição 1: 5 em tampão TNE (Tris-NaCl-EDTA), homogeneizada mecanicamente, centrifugada a 12.000 rpm por 15min. e recuperado o sobrenadante que continha a partícula viral.

O sobrenadante foi diluído a 1:10 depois 1: 100 em solução salina estéril (2%) e em seguida filtrado em membrana de acetato celulose 0,22  $\mu$ m, utilizando-se seringa com suporte

de filtro Swinny de aço inoxidável 13mm para facilitar a remoção de contaminantes bacterianos. O extrato filtrado foi usado no desafio viral injetando-se 0,01 mL por grama de peso do camarão, no segundo segmento abdominal.



**Figura 10-** Preparação extrato viral a partir de músculo contendo IHNV (OIE, 2003; White *et al.*, 2002).

### 3.4 Obtenção do Controle Positivo

O Controle Positivo foi obtido através da extração de DNA do músculo de camarão da espécie *L.vannamei* com sintomas de IHNV, proveniente de uma fazenda localizada no baixo Jaguaribe.

A PCR revelou banda em 389pb e a especificidade da banda foi comprovada a partir do seqüenciamento no Núcleo de Genômica e Bioinformática-NUGEN, uma unidade multi-usuário pertencente à Faculdade de Veterinária - FAVET, Universidade Estadual do Ceará – UECE.

### **3.5 Análise das amostras**

#### **3.5.1 Contagem Total de Hemócitos (CTH)**

Para a coleta da hemolinfa nas cinco amostragens foram utilizadas seringas de 1mL contendo solução tamponada Tris-HCL 1M (Tris-HCl 0,01M; Sacarose 0,25M; Citrato de Sódio 0,1M; pH 7,6 e formalina a 5%), usada como anticoagulante na proporção de 1: 3. A hemolinfa foi retirada da região ventral do hemocelo no início do primeiro segmento abdominal. O material foi transferido para micro tubos e mantido sob refrigeração. O procedimento para a Contagem Total de Hemócitos (CTH) foi semelhante ao usado para a contagem de células sanguíneas humanas, utilizando câmara de Neubauer e analisadas em microscópio de luz (Hennig *et al.*, 1999).

#### **3.5.2 Histologia**

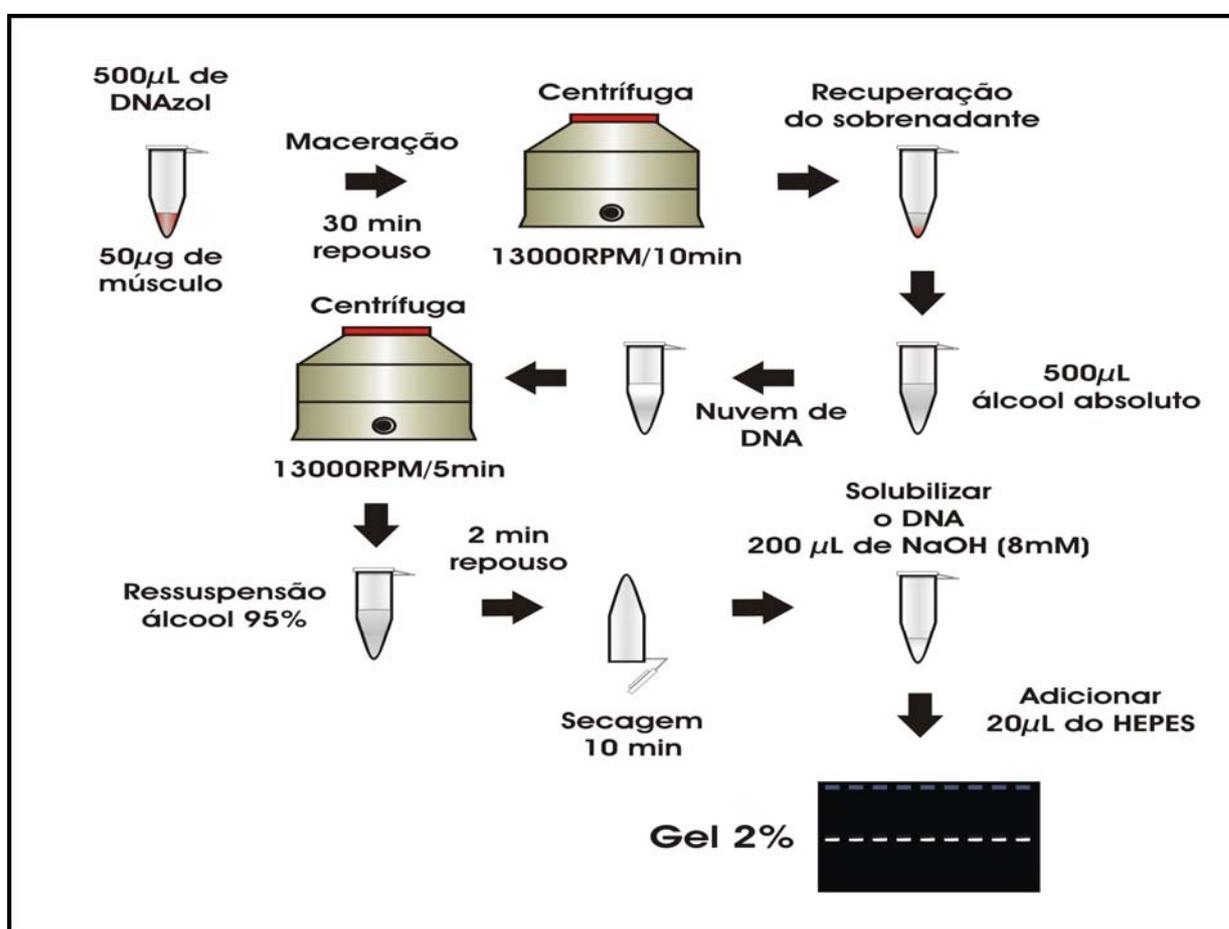
Os camarões foram removidos dos aquários conforme calendário, e fixados em solução de Davidson (Bell & Lightner, 1988). Após 24h foram transferidos para álcool 70%. Durante o processamento, obedecendo à técnica de histologia clássica de Junqueira & Carneiro (2004), as amostras foram seccionadas em três partes: cefalotórax, terceiro e sexto segmento abdominal, a seguir foram submetidas à desidratação em série crescente de álcool e clarificadas em xilol. A infiltração em parafina foi realizada em estufa á 60°C. Os cortes de 4µm foram fixados em lâminas, corados por Hematoxilina & Eosina e observadas em microscópio de luz. As análises histológicas foram baseadas na literatura de patologia de crustáceos (Brock & Main, 1994; Lightner, 1996b).

#### **3.5.3 Extração do DNA**

O protocolo aplicado para a detecção do vírus em estudo, pelo método de PCR, foi o descrito pela Organização Mundial da Saúde Animal (OIE-2003) e Maniatis *et al.* (1989) (Figura 11), que envolve três etapas: Extração do DNA, Amplificação e Eletroforese. Foram extraídos cinco pleópodos de cada indivíduo colocados em tubos estéreis, etiquetados e

imediatamente congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Para extração do DNA total do músculo contido nos pleópodos, foi utilizado reagente DNAzol (Invitrogen Life Technologies), seguindo – se protocolo recomendado pelo fabricante.

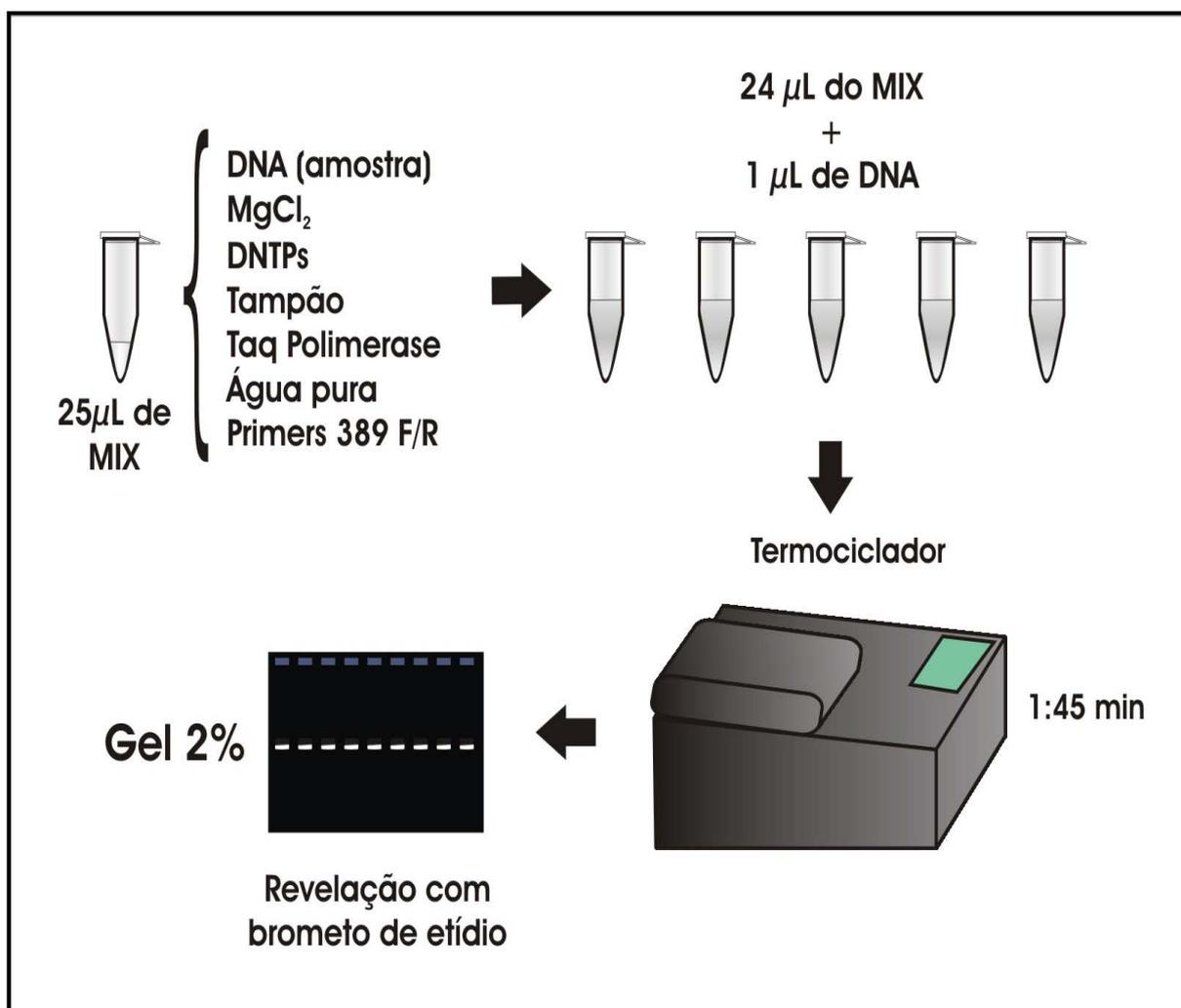
Cerca de 50mg de tecido foi pesado e macerado em um tubo de 1,5mL juntamente com 500 $\mu\text{L}$  de DNAzol, agitado e deixado em temperatura ambiente por 30 min. Em seguida foi centrifugado a 13.000 x g por 10 min, recuperado o sobrenadante, adicionado 500 $\mu\text{L}$  de álcool absoluto, misturado suavemente e deixado em repouso por 3 min. Novamente centrifugado á 13.000 x g por 5 min para precipitar o DNA e eliminado o sobrenadante. A seguir foi feita a ressuspensão do precipitado adicionando 500 $\mu\text{L}$  de álcool 95%, misturado suavemente seis vezes e deixado sedimentar por 1 min. Descartou-se o sobrenadante e foi deixado para secar em temperatura ambiente por 10 min. Solubilizou – se o DNA em 200ul de Hidróxido de Sódio (NAOH) – 8 Mm e foi adicionado 20 $\mu\text{L}$  de tampão Hepes (0,1M) para neutralizar o pH. Em seguida foi feito gel de agarose a 2%, contendo brometo de etídio para verificação da qualidade do DNA extraído.



**Figura 11** - Extração do DNA pelo protocolo padrão do reagente DNAzol

### 3.5.4 Reação de PCR para detecção do IHHNV no músculo do camarão desafiado.

Como está demonstrado na Figura 12, foi feita uma mistura (MIX) contendo 1  $\mu$ L dos primers 389F e 389R cujo desenho da seqüência de bases foi o descrito no GenBank AF218266 (Tabela I) e os demais reagentes (Tabela II) para volume total de 25  $\mu$ L. Em seguida foi adicionado 24  $\mu$ L dessa mistura em tubos de 100  $\mu$ L juntamente com 1  $\mu$ L do DNA extraído do desafio I e controle e desafio II e controle. Cada ensaio incluiu um controle positivo e um controle negativo. Em seguida foram levados ao termociclador para a amplificação do DNA, iniciando com um ciclo de desnaturação por 5min a 95°, seguido por 35 ciclos de 30s a 95°C, 30s a 55°C e 1min a 72°C e um passo final a 72°C por 7min (Tabela III).



**Figura 12-** Reação de PCR para detecção do IHHNV usando protocolo descrito pela Organização Mundial da Saúde Animal (OIE-2003) e Maniatis *et al.* (1989).

**Tabela I- Primers usados na reação de PCR para detecção do IHHNV**  
Seq. Ref. GenBank AF218266

Vírus	Primers ( 5' - 3' )	Posição na seq. de referência
IHHNV	F: 5'-CGG-AAC-ACA-ACC-CGA-CTT-TA-3'	1.180
	R: 5'-GGC-CAA-GAC-CAA-AAT-ACG-AA-3'	1.460

**Tabela II - Preparação do MIX de PCR para detecção do IHHNV**

PCR reagentes	IHHNV (volume 25ul)	Concentrações Finais
H <sub>2</sub> O pura	16.30µl	qsp
MgCl <sub>2</sub>	1.0µl	2mM
dNTPs	2.0µl	200mM
Tampão	2.5µl	20mM Tris-HCl (pH 8,4) 50mM KCl
Primer F	1.0µl	0,4 µM
Primer R	1.0µl	0,4 µM
Enzima Taq	0.2µl	0,04 U/µl
Amostra	1.0µl	n.a.

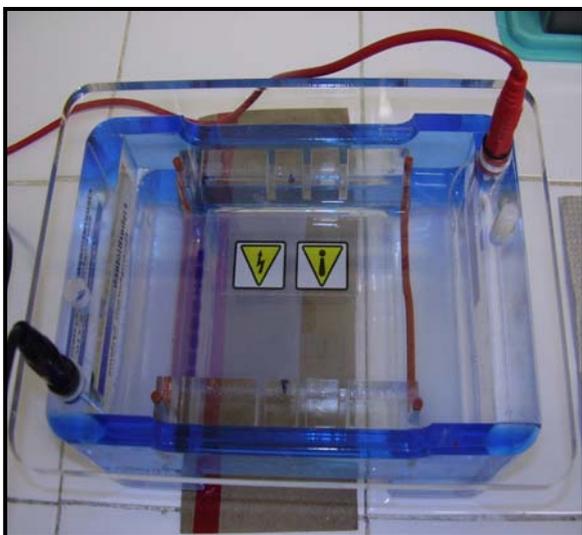
Concentração dos reagentes fabricados pela INVITROGEN: dNTPS ( 2,5mM cada), MgCl<sub>2</sub> (50mM), Primer's (10pmol/uL), Tampão PCR 10x, Taq.brazilian( 5U/uL )

**Tabela III - Parâmetros de termociclagem para detecção do IHHNV**

Primers	Tempo	Temperatura	Nº ciclos
IHHNV 389 F/R	5min	95°	1
	30s, 30s, 1min	95°C, 55°C, 72°C	35
	7min	72°C	1

### 3.5.5 Eletroforese

Após completar o número de ciclos, 10 $\mu$ L do produto do PCR (amostras e controles) foram aplicados em gel de agarose 2%, imerso em 150 ml do tampão TAE 1x (Tris- acetato 4mM e EDTA 1mM) contendo 2 $\mu$ L de brometo de etídio 10mg/mL. Após a corrida, o gel foi levado ao transluminador e visualizado em UV, fotografado e os resultados interpretados (Figuras 13 e 14 ).



**Figura 13-** Corrida em gel de agarose a 2%



**Figura 14-** Fotodocumentação do PCR.

### 3.5.6 Hibridização *in situ*

Os blocos contendo tecido dos indivíduos que foram PCR reagentes, foram enviados para o Laboratório de Aqüicultura, Patologia e Ciências Veterinárias / Microbiologia da Universidade de Tucson- Arizona (USA) para serem analisados por um segundo método diagnóstico, a técnica de hibridização *in situ*. Cortes de 4 $\mu$ m foram obtidos dos blocos, processados e em seguida foram utilizadas sondas de DNA complementares de alta especificidade.

As sondas de DNA usadas no protocolo de hibridização *in situ* foram marcadas com digoxigenin (DIG), método de marcação com iniciadores aleatórios (Lightner,1996). O kit de

detecção usado foi Boehringer Mannheim Biochemical. A concentração da sonda foi determinada pelo método direto descrito no kit, que utiliza o controle DIG-DNA marcado e compara com a sonda marcada. A concentração final das sondas de DNA foi de 10 - 25 ng para 1ml da solução de hibridização. A hibridização *in situ* é uma técnica mais sensível que a imuno-histoquímica, porém inferior à reação em cadeia da polimerase (PCR).

### **3.5.7 Seqüenciamento**

As amostras que após PCR revelaram bandas em 389pb foram encaminhadas ao Núcleo de Genômica e Bioinformática- NUGEN-UECE, para seqüenciamento por ciclagem, pelo método modificado de Sanger (Hillis & Moritz,1996), usando a mistura comercial BigDye Terminator v3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) segundo recomendações do fabricante. A pesquisa foi feita para confirmar a similaridade entre as bandas encontradas e as seqüências no GenBank, usando ferramenta BLAST do Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI) disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O desafio de susceptibilidade ao IHHNV, ao qual foram submetidos camarões juvenis da espécie *F. subtilis* durante 30 dias, tendo 100 animais desafiados (50 via oral e 50 via intramuscular), resultou em baixa mortalidade, indicando que esse vírus não causa infecção letal à espécie investigada e que a mesma tem boa tolerância ao patógeno. Esse resultado confirma a variação de susceptibilidade da infecção pelo IHHNV entre as espécies de peneídeos. Lightner *et al.* (1983a) verificou que o referido vírus causava doença aguda com alta mortalidade no camarão *Penaeus stylirostris*, já para indivíduos das espécies *P. monodon* e *L. vannamei* se apresenta menos virulento, com baixa mortalidade (Kalagayan *et al.*, 1991).

Dos indivíduos desafiados por via oral, seis morreram nas duas primeiras semanas e destes apenas dois se apresentaram reagente para o IHHNV. Não houve mortalidade nos animais desafiados via injeção intramuscular, nem nos grupos controle. Sinais clínicos da infecção pelo IHHNV, descritos por Kalagayan *et al.* (1991) para a espécie *L. vannamei*, como deformidades do rosto, antenas enrugadas, aspereza da carapaça, deformidades cuticulares ou índices reduzidos de crescimento, não foram detectados em *F. subtilis* durante o período experimental.

Dos 50 animais que se alimentaram com tecido IHHNV positivo, cinco (10%) se mostraram susceptíveis à infecção. O DNA isolado e submetido a análise de PCR usando primers 389F e 389R após amplificação confirmou 100% de similaridade com o IHHNV.

Já nos 50 animais que receberam injeção intramuscular do extrato viral, não foi verificada replicação do IHHNV, sugerindo que os mesmos foram resistentes ao vírus inoculado ou que o número de cópias do genoma viral não foi suficiente para ser detectado pelo método tradicional de PCR (Tabela IV). Apesar de não ter sido possível dosar a carga viral do extrato inoculado ou no músculo ofertado, acredita-se que a baixa prevalência de contaminação via oral e a ausência de infecção pela injeção do extrato pode ser devida à resposta individual que os organismos manifestam frente a um agente potencialmente infectante. Dhar *et al.* (2001) testando linhagens do super camarão *P. stylirostris* frente à inoculos dos IHHNV e WSSV usando a ferramenta “Real-Time Quantitative PCR” como técnica de diagnóstico, demonstraram que o IHHNV se replicava em níveis muito baixos e que a linhagem testada era altamente susceptível ao WSSV.

O resultado das análises de PCR das cinco amostragens dos 50 camarões juvenis, que se alimentaram com músculo contendo IHHNV no curso de 30 dias, demonstrou que dos 10

animais que foram sacrificados aleatoriamente após o 5º dia, três se apresentaram reagentes ao IHHNV, dos 10 animais que foram sacrificados no 10º dia e os 10 animais sacrificados no 15º dia, apenas um de cada se apresentou reagente para o IHHNV. Não foi detectada infecção nos animais amostrados após o 20º dia do desafio provavelmente porque o sistema imune destes animais foi capaz de defendê-los da infecção pelo agente viral. (Tabela V; Figura 15). A escolha do esquema de amostragens realizadas a cada cinco dias após desafio, permitiu acompanhar melhor o comportamento da espécie *Farfantepenaeus subtilis*, frente ao vírus testado.

**Tabela IV - Prevalência do IHHNV detectado na espécie *F. subtilis* através de análise de PCR no músculo dos camarões desafiados.**

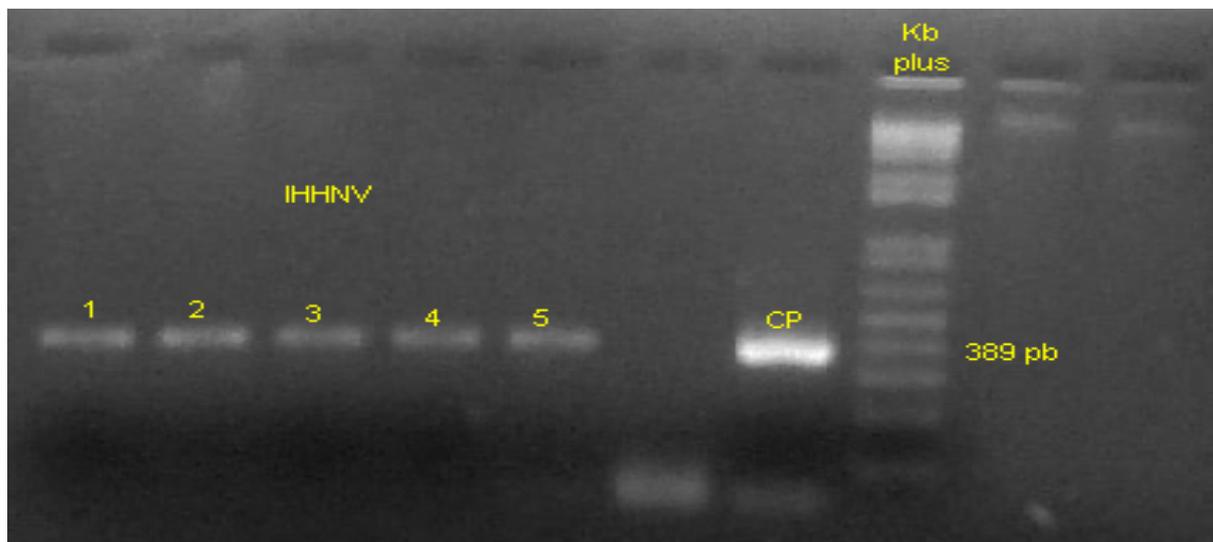
Testes	Nº de indivíduos testados	IHHNV+	IHHNV + (%)
Desafio I (via oral)	50	5	10,0
Desafio II (via intramuscular)	50	—	—

**Tabela V - Número de camarões da espécie *F. subtilis* IHHNV reagentes, desafiados por via oral com IHHNV, distribuídos por período amostral.**

Período amostral Desafio I	Nº de animais por amostragens	Nº de animais IHHNV reagentes
5º dia	10	3
10º dia	10	1
15º dia	10	1
20º dia	10	—
30º dia	10	—

Na avaliação histopatológica dos 100 camarões desafiados (Tabela VI) não foram achadas características do IHHNV, como corpos de inclusão tipo “Cowdry A” (CAIs) observados nos núcleos das células de tecidos de origem endodérmica e ectodérmica (Lightner, 1996). Porém houve infecção subclínica em 10% dos 50 animais desafiados por via oral. Essa observação corrobora com os achados de Tang e Lightner (2001) que trabalharam com IHHNV isolados de camarões provenientes de várias regiões geográficas. Os

pesquisadores infectaram camarões de diferentes espécies e verificaram que os achados histológicos nem sempre correspondem ao nível de infecção detectada por outras técnicas de diagnóstico como é o caso do PCR que é mais sensível e específico.



**Figura 15-** Resultado de PCR para camarões juvenis da espécie *F. subtilis* desafiados com o vírus IHHN por via oral. Fotografia do gel de amplificação usando o par de primers IHHNV 389F/R. As amostras 1, 2, e 3 representam a detecção do vírus no 5º dia após desafio. As amostras 4 e 5 representam respectivamente indivíduos IHHNV positivos nos 10º e 15º dias de desafio.

Não foi detectado IHHNV pelo método hibridização *in situ* nas cinco amostras reagentes pelo método PCR (Tabela VI). A análise demonstrou que a confirmação nem sempre é possível, pois a técnica de PCR é bem mais sensível que a hibridização *in situ*. Carr *et al.* (1996) realizaram um estudo comparativo entre as técnicas de *dot blot*, hibridização *in situ* e PCR e observaram em uma mesma amostra resultados PCR positivos, e resultados negativos quando empregaram as outras técnicas. Os autores concluíram que a infecção por IHHNV tem um limite mais baixo de detecção, quando são empregados métodos que não usam a amplificação, como é o caso do PCR. Outra explicação apresentada foi que os diagnósticos que empregam testes sorológicos são baseados na viremia ativa por ocasião da amostragem e o resultado da hibridização *in situ* depende da presença dos corpos de inclusão (CAIs) no tecido analisado. Nunan *et al.* (2000) investigando a eficiência de métodos de diagnose do IHHNV, argumentaram que a técnica de hibridização *in situ* além de ser demorada não é tão sensível quanto o PCR tradicional.

**Tabela VI** - Análises realizadas em camarões juvenis da espécie *F. subtilis* desafiados por via oral com IHHNV.

Análises	5 dias	10 dias	15 dias	20 dias	30 dias
PCR	+	+	+	-	-
Análise histológica	-	-	-	-	-
Hibridização in situ	-	-	-	-	-

(+) = detectado; (-) = não detectado

O seqüenciamento do controle positivo e das amostras reagentes para o IHHNV confirmou a especificidade do amplicon de 389 pb. O alinhamento de uma seqüência de 316 pb, com seqüências depositadas no GenBank, do Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI), usando a ferramenta BLASTn confirmou uma identidade de 100% com a seqüência correspondente no genoma completo do IHHNV, GenBank AF218266 (Figura 16), tanto entre este e o Controle Positivo, quanto com as amostras reagentes.

```
> gi|38112397|gb|AY355308.1 Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus isolate
Taiwan C nonstructural protein 2, nonstructural protein 1,
and capsid protein genes, complete cds
Length=3742

Score = 466 bits (235), Expect = 3e-128
Identities = 242/243 (99%), Gaps = 1/243 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 140 CTCTCCGGACGGAACGCCAAACTTCACCAATTACAGATCATGGTGACCACTGGCACATCACA 199
      |||
Sbjct 1216 CTCTCCGGACGGAACGCCAAACTTCACCAATTACAGATCATGGTGACCACTGGCACATCACA 1275

Query 200 TACTCCGGACACCCCAACCAATAAGACCCAGACATAGAGCTACAATCCTCGCCTATTTGGGA 259
      |||
Sbjct 1276 TACTCCGGACACCCCAACCAATAAGACCCAGACATAGAGCTACAATCCTCGCCTATTTGGGA 1335

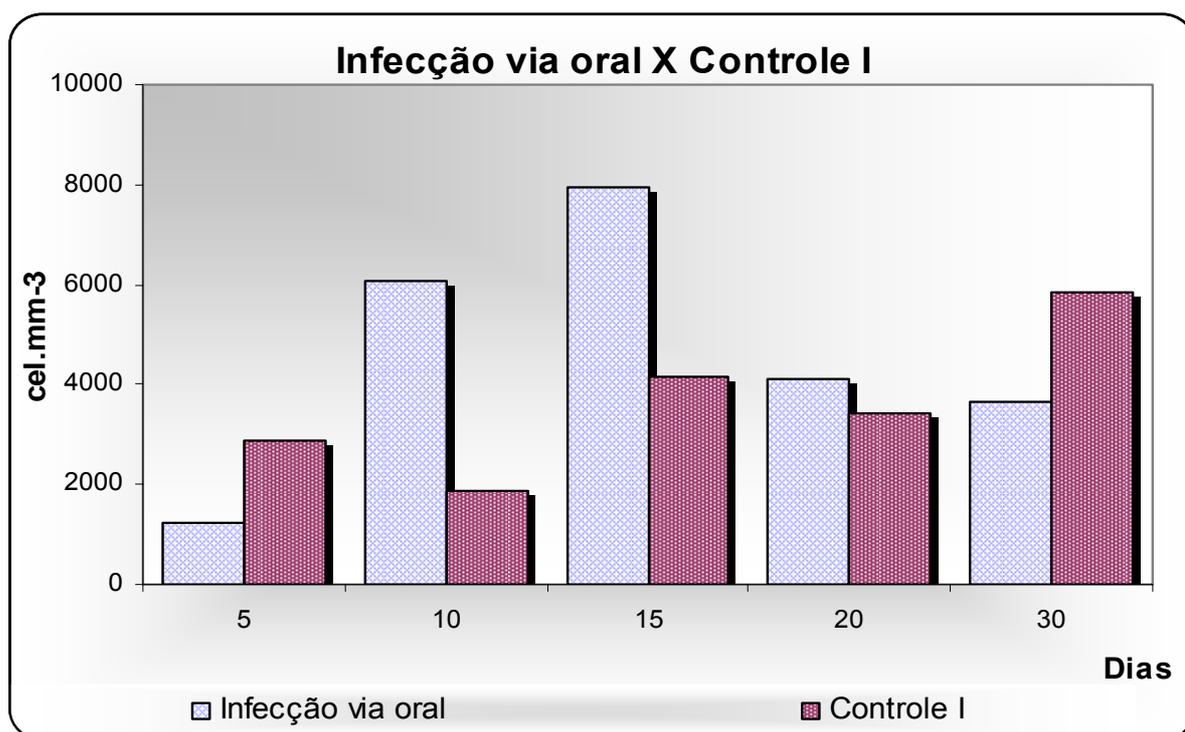
Query 260 GTTACCTTTGCTGCCAGAGCCGAAGCTGAAAGCGACTACGGTACTTGTAGAAATATCAAG 319
      |||
Sbjct 1336 GTTACCTTTGCTGCCAGAGCCGAAGCTGAAAGCGACTACGGTACTTGTAGAAATATCAAG 1395

Query 320 AGATGGATACTCTATCTTATCAGATACGGTATTGAAACGGCTTTTGGTATTTGNGTCTTGG 379
      |||
Sbjct 1396 AGATGGATACTCTATCTTATCAGATACGGTATTGAAACGGCTTTTGGTATTTG-GTCTTGG 1454

Query 380 CCA 382
      |||
Sbjct 1455 CCA 1457
```

**Figura 16**- Alinhamento entre as seqüências de 316 pb, depositadas no GenBank, usando a ferramenta BLASTn que confirmou identidade de 100% com a seqüência correspondente no genoma completo do IHHNV.

A Contagem Total de Hemócitos (CTH) dos animais desafiados via oral variou ao longo do experimento. No 5º dia após desafio oral que corresponde à primeira coleta a quantidade de hemócitos circulantes foi baixa (1.220 cél/mm<sup>3</sup>), no 10º e 15º dias que correspondem a segunda e terceira coletas houve aumento para 6.040 cél/mm<sup>3</sup> e 7.960 cél/mm<sup>3</sup> respectivamente (Figura 17).



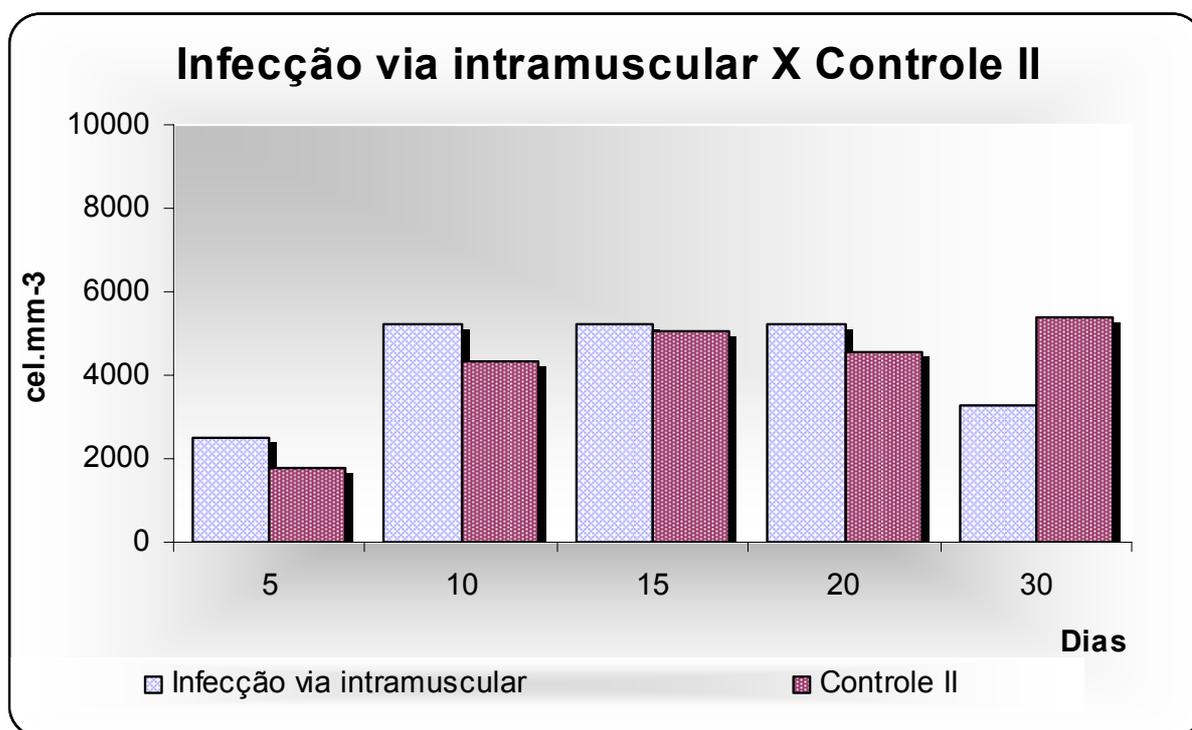
**Figura 17-** Valores médios de CTH nos camarões desafiados por via oral e grupo controle em diferentes dias de exposição ao IHNV.

Hennig *et al.*(1998) e Le Moullac & Haffner (2000), trabalhando com parâmetros hematológicos em diversas espécies de camarão, afirmam que a CTH varia muito em função do ambiente do stress e da espécie em estudo. No presente estudo, o decréscimo na CTH no início do desafio, pode ter sido resultante da reação do sistema imune devido à entrada do vírus no organismo do camarão, resultando na redução dos hemócitos em circulação, uma vez que estas células são mobilizadas para os sítios de infecção. Yoganandhan *et al.* (2003) também observaram um declínio do número total de hemócitos no início do experimento com o camarão *Penaeus indicus* infectado com o vírus da mancha branca.

De acordo com o teste t de Student para dados independentes não houve diferença estatisticamente significativa ( $p \geq 0,05$ ) entre a CTH do desafio I e controle I. Söderhäll *et*

al.(1999) e Bachère *et al.* (2000) sugeriram que a resposta imunológica dos camarões aos patógenos virais, caso exista, seria totalmente diferente da observada para bactérias e fungos, onde ocorre a uma massiva agregação de hemócitos, formação de nodulações e padrões de reconhecimento de moléculas. Segundo esses autores, os camarões e outros crustáceos, provavelmente, respondem aos patógenos virais de uma forma ativa e específica.

A variação da CTH nos camarões desafiados por via intramuscular e controle (desafio II) em diferentes dias de exposição ao IHHNV foi menor do que a observada nos indivíduos expostos ao vírus por via oral. Não houve diferença estatisticamente significativa na CTH entre o desafio II e controle II no decorrer do experimento. Contudo, a resposta imunológica observada com a diminuição dos hemócitos em circulação no 5º dia após injeção poderia ser atribuída à migração destas células para os tecidos, tanto para combater a entrada do vírus, como também para agir na hemostasia e no reparo do tecido traumatizado pela injeção. (Figura 18).



**Figura 18-** Valores médios de CTH nos camarões desafiados por via intramuscular e grupo controle em diferentes dias de exposição ao IHHNV.

## 5. CONCLUSÕES

1. O estudo demonstrou que a espécie nativa *Farfantpenaeus subtilis* capturada no Estuário do Rio Pacoti no município de Eusébio, Estado do Ceará é susceptível ao IHHNV.

2. O IHHNV não causa infecção letal à espécie investigada e que a mesma demonstrou ter boa tolerância ao patógeno.

3. Em virtude do IHHNV não causar doença aguda, como observada em outros peneídeos, o *Farfantpenaeus subtilis* representa uma alternativa concreta para ampliar o número de espécies cultivadas.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCC. Associação Brasileira dos Criadores de Camarão Marinho. Estatística de Produção. **Revista da ABCC**, ano 8, nº 1, p.7-18, 2006.

BACHÈRE, E., FUCHS, R. & SÖDERHALL K. Special issue on shrimp response to pathogens. **Aquaculture**, p.191, 2000.

BARRACCO, M. A. Mecanismos de resistência a doenças em crustáceos. **Sanidade de Organismos Aquáticos**, Ed. Varela, p. 51-74, 2004.

BARBIERE JÚNIOR, R.C. & OSTRENSKI NETO, A. **Camarões Marinhos – Engorda**, v. II, Aprenda Fácil, Viçosa, 2002.

DEPARTAMENTO DE PESCA E AQUICULTURA, **Plataforma Tecnológica do Camarão Marinho Cultivado**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, 276, 2001.

BELL, T.A., LIGHTNER, D.V. IHHN virus: infectivity and pathogenicity studies in *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, v.38, p.185-194, 1984.

BELL, T.A. & LIGHTNER, D.V. IHHN disease of *Penaeus stylirostris*: effects of shrimp size on disease expression. **J. Fish Dis**, v.10, p.165-170, 1987.

BELL, T.A., LIGHTNER, D.V. **A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology**. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, 114 p., 1988.

BONAMI, J.R.; BREHELIN, M.; MARI, J.; TRUMPER, B. & LIGHTNER, D.V. Purification and characterization of IHHN virus of penaeid shrimps. **J. Gen. Virol**, v. 71, p. 2657-2664, 1990.

BONAMI, J.R. & LIGHTNER, D.V. Unclassified Viruses of Crustacea, in Adams J.R. & Bonami, J.R. ( ed), **Atlas of Invertebrate Viruses CRC Press**, Boca Raton, Florida, USA, Chapter 24, p. 597-622, 1991.

BORGHETTI, N. R. B.; OSTRENSKY, A. & BORGUETTI, J. R. Aquicultura – Uma visão geral sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no Mundo. Disponível em : [http:// www.institutohorus.org.br/download/artigos/TeseLeandroAngeloPereira.pdf](http://www.institutohorus.org.br/download/artigos/TeseLeandroAngeloPereira.pdf). Acesso em: 4 abril, 2006.

BROCK, J. A. & MAIN, K. A Guide to the Common Problems and Diseases of Cultured *Penaeus vannamei*. **Oceanic Institute, Makapuu Point**, P.O. Box 25280, Honolulu, Hawaii, USA, p. 241, 1994.

CARR W.H., SWEENEY J.N., NUNAN L., LIGHTNER D.V., HIRSCH H.H. & REDDINGTON J. J. The use of an infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus gene probe serodiagnostic field kit for the screening of candidate specific pathogen-free *Penaeus vannamei* broodstock. **Aquaculture**, 147, p. 1-8, 1996.

DHAR, A.K. ; ROUX, M.M. & KLIMPEL, K.R. Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus and white spot virus in shrimp using real-time quantitative PCR and SYBR green chemistry. **J. Clin. Microbiol.** Aug. v. 39 (8), p. 2835–2845. 2001.

GARCIA, S. Biologie et dynamique des populations de crevettes roses, *Penaeus duorarum notialis* (Perez farfante, 1967) en **Cote d’Ivoire. Trav. Doc. Orstom**, Paris, 79; p 271 ,1977.

GARCIA, S. Reproduction, stock assessment models and population parameters in exploited penaeid shrimp populations, p. 139-158, in Rothlisberg, P.C.; Hill, B.J. & Staples, D.J. (eds.). **Proceedings of the Seconde Australian National Prawn Seminar**. Simpson Halligan, Brisbane, Australia, 1985.

HILL, B. J. & WASSENBERG, T. J. Feeding behaviour of adult tiger prawns *Penaeus esculentus* under laboratory conditions. **Austr. J. Mar. Fresh. Res.**, v. 38, p 183-190, 1987.

HILLIS DM, C MORITZ AND BK MABLE. **Molecular Systematics**, 2nd ed. Sinauer, Sunderland. 655 pp. (eds).1996.

HOLTHUIS, L.B. FAO species catalogue. Vol. 1: Shrimp and prawns of the world. An annotated catalogue of species of interest to fisheries. **FAO Fish. Synop**, 125(1): p. 271, 1980.

HENNIG, O.; ITAMI, T.; MAEDA, M.; KONDO, M.; NATSUKARI, Y. & TAKAHASHI, Y. Analyses of hemolymph immunoparameters in kuruma shrimp infected with penaeid rod-shaped DNA vírus. **Fish Pathology**, v. 33, p. 389-393, 1998

ISSAC, V.J. & DIAS NETO, J. **Camarão–Rosa da Costa Norte**. Coleção Meio Ambiente, Ibama, Brasília, 1992.

JORY. D. E. Comentários sobre Biossegurança e Criação de Camarão. **Revista da ABCC**, Recife, ano 6, n.4 , p.68-71, 2004.

JUNQUEIRA, L.C. & CARNEIRO. J. **Histologia Básica**. Editora Guanabara Koogan S.A, 10º Edição, Rio de Janeiro, p.488, 2004.

KRABSETSVE , K; CULLEN, B. R & OWENS L. The Rediscovery of the Australian Strain of Infectious Hypodermal and Haematopoietic Necrosis Virus (IHHNV). **Dis. Aquatic Org** 61:153-158. 2004.

KALAGAYAN, G. ; GODIN, D. ; KANNA, R. ; HAGINO, G. ; SWEENEY, J. ; WYBAN, J. & BROCK, J. IHHN virus as an etiological factor in runt-deformity syndrome of juvenile *Penaeus vannamei* cultured in Hawaii. **J. World Aquaculture Soc**, v.22, p.235-243,1991.

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

LIGHTNER, D.V. Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. Pp, in McVey J.P. ed, **Handbook of Mariculture**. Vol. 1. Crustacean Aquaculture, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, p.289-320, 1983.

LIGHTNER D.V. eds, **Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture**. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, p. 8-127, 1988.

LIGHTNER D.V. The penaeid shrimp viruses IHHNV 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, 1996a.

LIGHTNER, D.V. A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. **World Aquaculture Society**, Baton Rouge, Louisiana, 1996b.

LIGHTNER, D.V. The Penaeid Shrimp Viral Pandemics due to IHHNV, WSSV, TSV and YHV: History in the Americas and Current Status. [http: www.lib.noaa.gov/japan/aquaculture/proceedings/report32/lightner\\_corrected.pdf](http://www.lib.noaa.gov/japan/aquaculture/proceedings/report32/lightner_corrected.pdf). Acesso em: janeiro, 2004.

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

LIGHTNER D.V.; BELL T.A.; REDMAN R.M. & PEREZ L.A. A collection of case histories documenting the introduction and spread of the virus disease IHHN in penaeid shrimp culture facilities in Northwestern Mexico. **ICES Marine Science Symposia**, 194, 97-105, 1992.

LIGHTNER D.V.; POULOS B.T.; BRUCE L.; REDMAN R.M., MARI J. & BONAMI J.R. New developments in penaeid virology: application of biotechnology in research and disease diagnosis for shrimp viruses of concern in the Americas, p.233-253 in Fulks W. & Main K. ( eds). **Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States**, The Oceanic Institute, Makapuu Point, Honolulu, Hawaii, USA, 1992.

LIGHTNER, D.V. ; REDMAN, R. M. & BELL, T. Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis a newly recognized virus disease of penaeid shrimp. **J. Invertebr. Pathol**, v. 42, p. 62-70, 1983.

MACKAY, I. M.; ARDEN, K. E. & NITSCHKE. A Real-Time PCR in Virology. **Nucleic Acids Research**, v.30. p.1292-1305, 2002.

MAGGIONI, R. ; ROGERS, A .D.; MACLEAN, N. & D'INCAO, F. Molecular Phylogeny of Western Atlântic *Farfantepenaeus* and *Litopenaeus* shrimp based on mitochondrial 16S sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 18 (1), p. 66-73, 2001.

MAIA, E. M & NUNES, A. J. P Cultivo de *Farfantepenaeus subtilis*. Resultados das performances de engorda intensiva. **Panorama da Aqüicultura**, v.13, p.37-41. 2003.

MALDONADO, M.; RODRÍGUEZ, J.; BLAS, I.; ECHEVERRIA, F. Comportamiento hemocitario en familias de *Litopenaeus vannamei* desafiadas al WSSV. **CIVA 2003**, p. 891-899, 2003.

MANIATIS, T., FRITSCH, E.F., SAMBROOK, J. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 2° edition, chapter 6, 1989.

MOTTE E.; YUGCHA E.; LUZARDO J.; CASTRO F.; LECLERCQ G.; RODRGUEZ J.; MIRANDA P.; BORJA O.; SERRANO J.; TERREROS M.; MONTALVO K.; NARVAEZ A.; TENORIO N.; CEDENO V.; MIALHE E. & BOULO V. Pevention of IHHNV vertical transmission in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* . **Aquaculture**, Volume 219, Issues 1-4, 2, p. 57-70, 2003.

NEWMAN, S. G.; BULLIS, R. A. Immune Mechanisms of shrimp: form, function and practical application, p. 226- 233, in Craig, L. ; Browdy , Darryl, E & Jory. (eds.), The New Wave Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture. Banton Rouge, LA USA, **The World Aquaculture Societ**, 2001.

NUNAN, L. M., POULOS, B. T. & LIGHTNER, D. V. Use of polymerase chain reaction for detection of infectious hypodermal and hematopietic necrosis virus in penaeid shrimp. **Marine Biology Technology**, 2, p. 319-328, 2000.

NUNES, A. J. P. Dieta e Manejo Alimentar em Viveiros de Cultivo Semi- Intensivo no Nordeste. **Panorama da Aqüicultura**, v. 5, n. 32, p.10-14, 1995.

NUNES, A. J. P. & PARSONS, G. J. Size-related feeding and gastric evacuation measurements for the Southern brown shrimp *Penaeus subtilis*. **Aquaculture**, v. 187, p. 133-155, 2000.

OWENS, L. ; ANDERSON, I.G. ; KENWAY, M. ; TROTT, L. & BENZIE J.A. H. Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis virus (IHHNV) in a hybrid penaeid prawn from tropical Australia. **Dis. Aquat. Org**, v. 14, p. 219-228, 1992.

OIE- OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. **International Aquatic Animal Health Manual**. (6th ed.) , Paris. 2003. Disponível em: <http://www.priberam.pt/dlpo>. Acesso em: 1 janeiro, 2004.

PANTOJA, C. R.; LIGHTNER, D. V. & HOLTSCMIT, K. H. Prevalence and geographic distribution of IHHN parvovirus in wild penaeid shrimp (Crustacea: Decapoda) from the Gulf of California, Mexico. **J. Aquat. Anim. Health**, v.11, p. 23-34, 1999.

PEREZ -FARFANTE, I. A new species and two new subspecies of shrimp of the genus *Penaeus* from western Atlantic. **Proc. Biol. Soc. Wash**, v.80, p. 83-100, 1967.

PEREZ -FARFANTE, I. Western Atlantic shrimps of genus *Penaeus*. **Fish. Bull**, v. 67, p. 461-591, 1969.

PEREZ -FARFANTE, I. Spermatophores and Thelyca of the American White shrimp, genus *Penaeus*, subgenus *Litopenaeus*. **Fish. Bull.**, 73, p. 463-486, 1975.

PEREZ-FARFANTE, I. Illustrated key to penaeoid shrimp of commerce in the Americas. NOAA Technical Report. Department of Commerce. National Oceanic and Atmospheric Administration. **National Marine Fisheries Service**, p. 32, 1988.

PEREZ- FARFANTE, I ; KENSLEY, B. F. Peaneoide and Sergestoid shrimps and prawns of the world: keys and diagnoses for the families and genera. **Memoires du Museum National d'Hostoire Naturelle**. Tome 175, p 1-223, 1997.

PRIMACK, R. B. & RODRIGUES, E. A introdução de espécies exóticas e a crise da biodiversidade. *Biologia da Conservação*. Disponível em: [htt://www.icb.ufmg.br/~beds/arquivos/Impactrec.pdf](http://www.icb.ufmg.br/~beds/arquivos/Impactrec.pdf) . Acesso em : janeiro, 2005.

ROCHA, I. P. Uma Análise da Produção, Demanda e Preços do Camarão no Mercado Internacional. **Revista da ABCC**, ano 7, n.2, p.24-35, 2005.

RODRIGUES, J. Carcinicultura Marinha- Desempenho em 2004. **Revista da ABCC**, Recife, p.38-44, ano 7, n.2 , 2005.

SANTANA, I. C. H. Estudo Morfológico do Sistema Reprodutor Feminino do Camarão *Farfantepenaeus subtilis* (Pèrez-Farfante, 1967), do Litoral Cearense. **Dissertação de Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais**, Universidade Federal do Ceará, 89p, Fortaleza, 2005.

SHIKE, H.; DHAR , A. K.; BURNS, J. C.; SHIMIZU, C.; JOUSSET, F. X.; KLIMPLE, K.R. & BERGOIN, M. Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis virus of shrimp related to Mosquito Brevidensovirus. **Virology**. v. 277, p.167–177, 2000.

SMITH, V. J. Invertebrate Immunology: phylogenetic, ecotoxicological and biomedical implications. **Comparative Haematology International**, v.1, p. 61-76, 1991.

SUN, Z. F.; Hu, C. Q.; REN, C. H. & SHEN, Q. Sensitive and rapid detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in shrimps by loop-mediated isothermal amplification. **Journal of Virological Methods**, v. 131,p. 41-46, 2006.

SÖDERHALL, K. Editorial: Invertebrate immunity. Special issue. **Development and Comparative Immunology**. v.23, p. 263-442. 1999.

TANG , K. F. J.; DURAND S. V.; WHITE, B. L.; REDMAN, R. M.; PANTOJA, C. R. & LIGHTNER, D. V. Postlarvae and juveniles of a selected line of *Penaeus stylirostris* are resistant to Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus Infection **Aquaculture**, v. 90, p.203-210, 2000.

TANG, K.F.J. & LIGHTNER, D.V. Detection and Quantification of Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus in penaeid shrimp by real-time PCR. **Dis. Aquat. Org.** v. 44, p.79-85,2001.

TANG, K. F.J. & LIGHTNER, D.V. High genetic variation among isolates of Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV) collected from southeast Asia, Madagascar and east Africa. Book of Abstracts, Aquaculture America 2002. **World Aquaculture Society**, Baton Rouge, LA, USA. p. 328, 2002.

TANG, K.F.J.; DURAND, S.V.; WHITE, B.L.; REDMAN, R.M.; MOHNEY, L.L. & LIGHTNER, D.V. Induced resistance to White Spot Syndrome Virus Infection in *Penaeus stylirostris* through pre-infection with Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus- a preliminary study. **Aquaculture**. 216, p.19– 29, 2003.

TANG, K. F.J. & LIGHTNER, D.V. Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV)-related sequences in the genoma of the black tiger prawn *Penaeus monodon* from Africa and Australia. **Virus Research** 118, p.185-191, 2006.

TRUJILLO, L. R. & GESTEIRA, T.C. V. **Reprodução controlada de Camarões Peneideos**. p 75, 1997.

VANPATTEN, K. A.; NUNAN, L. M. & LIGHTNER, D. V. Seabirds as potential vectors of penaeid shrimp viruses and the development of a surrogate laboratory model utilizing domestic chickens **Aquaculture**, v.241, p. 31-46, 2004.

WHITE, B.L.; SCHOFIELD, P.J.; POULOS, B.T. & LIGHTNER, D.V. A laboratory challenge method for estimating Taura syndrome virus resistance in selected lines of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **J. Was.** v. 33 (3), p. 341– 348. 2002.

WOUTERS , R.; LAVENS, P.; NIETO, J. & SORGELOS, P. Penaeid shrimp broodstock nutrition: an updated review on research and development. **Aquaculture**, v. 202, p.1-21, 2001.

YOGANANDHAN, K.; THIRUPATHI, A. S. & HAMEED A. S. S. Biochemical, physiological and hematological changes in white spot syndrome virus-infected shrimp, *Penaeus indicus*. **Aquaculture**, v. 221, p. 1-11, 2003