



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR - LABOMAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MARINHAS TROPICAIS**

ROSA HELENA REBOUÇAS

**COLONIZAÇÃO DE TECIDOS E LÍQUIDO CORPÓREO DO CAMARÃO
Litopenaeus vannamei POR *Vibrio parahaemolyticus* AUTÓCTONE DO AMBIENTE DE
CULTIVO**

FORTALEZA

2017

ROSA HELENA REBOUÇAS

COLONIZAÇÃO DE TECIDOS E LÍQUIDO CORPÓREO DO CAMARÃO
Litopenaeus vannamei **POR** *Vibrio parahaemolyticus* **AUTÓCTONE DO AMBIENTE DE**
CULTIVO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutor. Área de concentração: Utilização e manejo de ecossistemas marinhos e estuarinos.

Orientador: Profa. Dra. Oscarina Viana de Sousa.

Coorientador: Profa. Dra. Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira.

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- R242c Rebouças, Rosa Helena.
 Colonização de tecidos e líquido corpóreo do camarão *Litopenaeus vannamei* por *Vibrio parahaemolyticus* autóctone do ambiente de cultivo / Rosa Helena Rebouças. – 2017.
 80 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar, Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, Fortaleza, 2017.
 Orientação: Profa. Dra. Oscarina Viana de Sousa.
 Coorientação: Profa. Dra. Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira.
1. Aquicultura. 2. Patologia. 3. Microscopia ótica. I. Título.

CDD 551.46

ROSA HELENA REBOUÇAS

COLONIZAÇÃO DE TECIDOS E LÍQUIDO CORPÓREO DO CAMARÃO
***Litopenaeus vannamei* POR *Vibrio parahaemolyticus* AUTÓCTONE DO AMBIENTE DE**
CULTIVO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor. Área de concentração: Utilização e manejo de ecossistemas marinhos e estuarinos.

Aprovada em: 23/07/2017.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Oscarina Viana de Sousa (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Vicente Vieira Faria
Universidade Federal do Ceará (UFC)

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

Prof. Dr. Pedro Carlos Cunha Martins
Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA)

Profa. Dra. Renata Albuquerque Costa
Faculdades INTA - Sobral

Dedico esse trabalho à
“Mamãezinha querida”, minha maior
incentivadora.

AGRADECIMENTOS

A jornada percorrida para obtenção do título de Doutora em Ciências Marinhas Tropicais não foi um caminho solitário. Foram muitas as pessoas que contribuíram, torceram, incentivaram e inspiraram na realização desta conquista. Primeiramente agradeço a Deus pelo discernimento e pela força a mim concedidos, sem Sua presença em minha vida não haveria vitória.

Minha gratidão especial a profissional que me inspirou a seguir o “caminho da microbiologia”: Professora Regine Helena S. dos F. Vieira. Sua paixão e competência na arte de ensinar me encantaram no primeiro dia de aula na disciplina Microbiologia do Pescado no curso de Engenharia de Pesca. Obrigada por mais uma vez abrir as portas do seu laboratório e da sua convivência. “Uma vez reginete, sempre reginete”.

Minha querida orientadora Professora Oscarina Viana de Sousa: quando crescer, eu quero ser igual a você! Partilhar da sua companhia, amizade e sabedoria é uma grande felicidade. A você todo meu respeito e admiração. Muito obrigada por tudo.

Muito obrigada a toda equipe da Central Analítica da UFC por me receber e acompanhar nas análises com todo zelo e responsabilidade.

Minha gratidão às pessoas que fazem parte do Laboratório CEDECAM/CEAC: Gracinha, Renata, Jamille, Fagner, Rubens, em especial ao Professor Rodrigo Maggioni.

Aos professores Alberto Nunes (LABOMAR-UFC), Luis Fernando Marins (FURG) e Hassan Sabry pela doação dos animais, ração e demais materiais necessários para execução deste trabalho.

À minha família de coração que me acolheu e colaborou durante a realização dos experimentos desta tese... por ordem alfabética agradeço à: Francisco Silvanio, Giselle, Graciene Fernandes, Hemilly Praxedes, Italo Magno, Jamille, Jéssica Lucinda, Jéssica Frota, Juliana e Diego, Karla Catter, Mariana Lima, Mariana Franco, Rafael Sanro, Raul Vitor, Rebeca, Rubson Mateus, Thiara Amaral. Em especial, as minhas irmãs de coração Fátima Cristiane, Francisca Gleire e Jade Abreu, contar com a amizade de vocês é muito importante para mim. À Marina Tereza, partilhar da sua experiência como pessoa e pesquisadora contribuíram para meu engrandecimento pessoal e profissional. *Gracias por las lecciones de español.*

Durante os experimentos no CEAC tive a colaboração da administradora Ariana, dos auxiliares de serviços gerais, Samara e Seu Zé. Obrigada pelo apoio e prontidão para ajudar.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram com esta tese meu MUITO OBRIGADA!

RESUMO

A atividade de carcinicultura no nordeste do Brasil vem sendo ameaçada pelo desencadeamento de doenças de origem viral e bacteriana. Mundialmente, desde 2009, vem acontecendo nos cultivos de camarão surtos de uma doença emergente conhecida como “doença da necrose hepatopancreática aguda” (AHPND, sigla em inglês) tendo o *V. parahaemolyticus* como agente etiológico. Essa infecção tem chamado a atenção de criadores devido às elevadas taxas de mortalidade registradas nas larviculturas de camarão. As rotas de invasão desse patógeno nos tecidos de camarões *Litopenaeus vannamei* não são conhecidos. Seu entendimento é parte fundamental na compreensão dos mecanismos patogênicos, além de contribuir com a elaboração de estratégias de prevenção contra surgimento da doença. Assim, o objetivo desta pesquisa foi o de monitorar as interações da bactéria *V. parahaemolyticus* na hemolinfa e tecidos de juvenis do camarão *L. vannamei*. Para isso foi utilizada uma estirpe de *V. parahaemolyticus* em bioensaios de invasão, por imersão, em 20 juvenis de camarões *L. vannamei*. Foram realizadas análises microbiológicas e microscópicas das amostras de fluido e tecidos. As amostragens foram realizadas nos tempos 0, 24, 48 e 72h após a inoculação. Não foi detectada a presença de bactérias do gênero *Vibrio* na hemolinfa pelas contagens com meio de cultura Agar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose (TCBS) para os animais oriundos dos tanques controle negativo e experimental. Foram detectadas contagens de *Vibrio* spp. nas amostras de hepatopâncreas dos tanques controle negativo e experimental: (0h: 2,2 logUFC/g e 24h: 0,6 logUFC/g); (0h: 0,3 logUFC/g e 48h: 1,1 logUFC/g) e para amostras do intestino (24h: 1 logUFC/g); (0h: 0,7 logUFC/g e 24h: 0,6 logUFC/g). As contagens de *V. parahaemolyticus* resultaram na detecção da bactéria nos tecidos do hepatopâncreas (48h: 0,7 logUFC/g e 72h: 0,8 logUFC/g) e intestino médio (72h: 0,7 logUFC/g) para os animais do experimento desafio. Por meio das análises microscópicas, observamos coerência entre as contagens em placas e a presença bacteriana nos tecidos. A colonização tecidual pelo *V. parahaemolyticus* acontece de maneira diferenciada, com fixação em um primeiro momento nos tecidos do intestino médio seguida de uma instalação tecidual mais intensa no hepatopâncreas. A partir desse protocolo outras possibilidades e abordagens se tornam viáveis usando o *V. parahaemolyticus* como indicador, viabilizando o acompanhamento da colonização do organismo e análise paralela dos mecanismos imunológicos de camarões e favorecendo o desenvolvimento de tecnologias para prevenção ou tratamento de eventos de vibrioses nos cultivos de camarão.

Palavras-chave: Aquicultura. Patologia. Microscopia ótica.

ABSTRACT

Shrimp farming activity in Northeast Brazil has been threatened by viral and bacterial diseases outbreaks. In a world scale, since 2009, shrimp farms have been emerging from an emerging disease known as "acute hepatopancreatic necrosis disease" (AHPND), with *V. parahaemolyticus* as the etiological agent. This infection has attracted the attention of farmers because of the high mortality rates recorded in shrimp larvae. Invasion routes of this pathogen in *Litopenaeus vannamei* shrimp tissues are not very clear, and their understanding is a fundamental part for the comprehension of its pathogenic mechanisms, as much as for contributing to the elaboration of strategies in order to prevent the further outbreaks. Thus, the objective of this study was to monitor interactions of *V. parahaemolyticus* in the hemolymph and young tissues of *L. vannamei* shrimp. In order to proceed with this, a strain of *V. parahaemolyticus* was used, in oral invasion bioassays, in young *L. vannamei* shrimps. Microbiological and microscopic analyzes of fluid and tissue samples were performed. Samples were taken at 0, 24, 48 and 72 h after inoculation. Presence of bacteria of the *Vibrio* genus in the hemolymph was not detected by the counts with *Thiosulfate Citrate Bile Sucrose* (TCBS) medium for the animals from the negative and experimental control tanks. Counts of *Vibrio* spp. were detected in hepatopancreas samples from negative and experimental control tanks: (0h: 2.2 logCFU / g and 24h: 0.6 logCFU / g); (0h: 0.3 logCFU / g and 48h: 1.1 logCFU / g) and for intestine samples (24h: 1 logCFU / g); (0h: 0.7 logCFU / g and 24h: 0.6 logCFU / g). Count of *V. parahaemolyticus* resulted in the detection of the bacterium in hepatopancreas tissues (48h: 0.7 logCFU / g and 72h: 0.8 logCFU / g) and medium intestine (72h: 0.7 logCFU / g) for challenge experiment. By microscopic analysis, we observed a consistency between plaque counts and bacterial presence in tissues. Tissue colonization by *V. parahaemolyticus* occurred in a differentiated way, with fixation at first in the tissues of the midgut followed by a more intense tissue installation in the hepatopancreas. From this protocol, other possibilities and approaches become viable using *V. parahaemolyticus* as an indicator. A good example is the possibility of monitoring colonization of the organism, and a parallel analysis of the immunological mechanisms of shrimp favoring the development of technologies in order to prevent or treat vibriosis events in shrimp culture.

Keywords: Aquaculture. Pathology. Optical microscopy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Representação esquemática do sistema digestório de camarão peneídeo.....	25
------------------	--	----

LISTA DE QUADROS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg	Micrograma
μL	Microlitro
ABCC	Associação Brasileira de Criadores de Camarão
AHPND	Doença da Necrose Hepatopancreática Aguda (sigla em inglês)
amp ^r	Resistência à Ampicilina
AVIB	Associação de Biologistas de Víbrio
B	Branco
BA	Bahia
CE	Ceará
CEAC	Centro de Estudos em Aquicultura Costeira
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DSMZ	Coleção Germânica de Microorganismos e Culturas Celulares
SEM	Síndrome da Mortalidade Precoce (sigla em inglês)
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
FURG	Universidade Federal do Rio Grande
G	Gravidade ou Gramas
H	Hora
HP	Hepatopâncreas
INT	Intestino Médio
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
kDa	Kilodalton
L	Litro
LAMAP	Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado
LB	Luria Bertani
M	Marcador Molecular
Min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
OD	Densidade Ótica (sigla em inglês)
ORI	Origem de Replicação
PBS	Solução Salina Fosfatada (sigla em inglês)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (sigla em inglês)
PE	Pernambuco
RJ	Rio de Janeiro
RPM	Rotação Por Minuto
RN	Rio Grande do Norte
QS	<i>Quorum Sensing</i>
Seg	Segundo
Spp	Espécie
TCBS	Tiosulfato Citrato Bile Sacarose
TE	Tampão de Eluição
TBE	Tris-Borato-EDTA
<i>Tdh</i>	Hemolisina Termoestável Direta
<i>Tl</i>	Hemolisina Termolável
<i>Trh</i>	Hemolisina Termoestável Relacionada a Hemolisina
TSA	Ágar Triptona Soja (sigla em inglês)

UFC	Unidade Formadora de Colônia
UV	Ultravioleta
V	Volts
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
®	Marca Registrada
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
H ₂ O	Água
HCl	Ácido Clorídrico
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
NaCl	Cloreto de Sódio
°C	Grau Célsius
p/v	Relação Peso Volume
US\$	Dólar
λ	Comprimento de Onda

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	OBJETIVOS.....	16
1.1.1	Objetivo geral.....	16
1.1.2	Objetivos específicos.....	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1	O gênero <i>Vibrio</i>	17
2.1.1	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	18
2.1.2	<i>Mecanismos de patogenicidade bacteriana e defesa imunológica em camarão</i>	19
2.1.3	<i>Vibrioses na carcinicultura</i>	21
2.1.4	<i>Rotas de infecção de Vibrio spp. em camarão</i>	25
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1	Seleção das estirpes.....	30
3.1.1	<i>Identificação bioquímica e fatores de virulência</i>	30
3.1.2	<i>Caracterização genotípica dos isolados de V. parahaemolyticus</i>	31
3.1.2.1	<i>Extração do DNA</i>	31
3.1.2.2	<i>Amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para as estirpes de V. parahaemolyticus</i>	31
3.1.2.3	<i>Corrida eletroforética dos produtos da PCR com gene tl</i>	31

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
----------	------------------------------------	-----------

6	CONCLUSÃO.....	60
----------	-----------------------	-----------

6.1	Considerações finais.....	60
-----	---------------------------	----

7	REFERÊNCIAS.....	61
----------	-------------------------	-----------

1 INTRODUÇÃO

O camarão branco *Litopenaeus vannamei* é a espécie de maior importância econômica, sendo a mais cultivada em todo o mundo (HUYNH *et al.*, 2011). Nos anos de 2010 a 2015 o cultivo mundial dessa espécie produziu em média 3 milhões de toneladas, arrecadando o equivalente a U\$ 15 bilhões. Para o mesmo período, a média de produção de camarão no Brasil foi de 69 mil toneladas, alcançando cifras de U\$ 378 mil (FAO, 2017). Apesar de seu potencial econômico a indústria aquícola vem sendo continuamente ameaçada pelo surgimento de doenças resultando em produções ineficientes e consequente redução nos lucros obtidos com essa atividade (MOSS *et al.*, 2012; SOTO-RODRIGUEZ *et al.*, 2012).

Um aspecto no cultivo de camarões relacionado com a susceptibilidade a doenças é o estresse animal provocado por perturbações das condições ecológicas nos viveiros. Além do estresse ambiental, o desencadeamento das doenças na carcinicultura pode ser estimulado pelas práticas de manejo que causam endogamia, diminuindo a resistência aos patógenos (KAUTSKY *et al.*, 2000; DOYLE, 2016).

A presença de patologias no camarão é um dos principais problemas enfrentado pelos carcinicultores, implicando no aumento da taxa de mortalidade dos animais cultivados e se refletindo diretamente na eficiência técnica do produtor (SILVA e SAMPAIO, 2009). Entre essas patologias, a ocorrência de doenças infecciosas nos cultivos de camarões marinhos teve um efeito devastador, causando colapso na produção de grandes países produtores e desencadeando grandes perdas para a indústria. A partir de então, as enfermidades passaram a ser vistas como um obstáculo econômico e uma ameaça a viabilidade da atividade (NUNES e MARTINS, 2002).

Entre as enfermidades que acometem a carcinicultura, as de origens bacterianas e virais são as que mais afetam o camarão de cultivo. Dentre as infecções de origem bacteriana, destacam-se as vibrioses que são ocasionadas por micro-organismos patogênicos e oportunistas encontrados na água e no sedimento, podendo também estar presente na microbiota intestinal de camarões saudáveis (DOURADO, 2009). Recentemente, algumas estirpes de *Vibrio parahaemolyticus* tem despertado atenção dos carcinicultores devido estar relacionada como agente etiológico da Doença da Necrose Hepatopancreática

Aguda (AHPND) que surgiu emergencialmente na Ásia no ano de 2009 provocando mortalidade em massa nos cultivos. (TRAN *et al.*, 2013; DE LA PEÑA *et al.*, 2015; LAI *et al.*, 2015). No Brasil esta enfermidade ainda não foi notificada. No entanto, a AHPND já foi confirmada no México em 2013 e por se tratar de uma patologia mediada por plasmídio, sua disseminação para outros países, incluindo o Brasil, pode ser uma questão de tempo (NUNAN, 2014; DANGTIP *et al.*, 2015; HAN *et al.*, 2015).

Apesar da importância, pouco se sabe sobre a etiologia de algumas enfermidades, incluindo as vibrioses o que significa incapacidade de resposta a eventos de doenças (MENDES *et al.*, 2009). Estudos sobre as rotas de infecção de bactérias do gênero *Vibrio* são ainda limitados. A geração de conhecimento nessa área é fundamental para a compreensão da etiologia e patogênese das doenças e dos fatores determinantes para o desencadeamento no ambiente de cultivo, com consequente desenvolvimento de novas estratégias de controle dessas infecções. Essas pesquisas sobre as vias de infecção devem ser realizadas com a utilização de novas tecnologias e protocolos, incluindo bactérias geneticamente marcadas, com o uso de proteína fluorescente, microscopia eletrônica de transmissão e hibridização *in situ* (AGUIRRE-GUZMÁN *et al.* 2010; VINOJ, VASEEHARAN e BRENNAM, 2014).

O objetivo da presente pesquisa foi descrever a rota de colonização do fluido corpóreo e tecidos de camarões *L. vannamei* por *V. parahaemolyticus*. Considerando a hipótese de que a colonização da hemolinfa e órgãos de camarões *L. vannamei* por bactérias do gênero *Vibrio* ocorre de forma diferencial. Desta forma, reconhecendo que a elucidação das rotas e sítios de invasão de patógenos bacterianos nos sistemas de camarão são importantes para a gestão e sustentabilidade da atividade de carcinicultura e o aprimoramento de estratégias de controle biológico (uso de probióticos e prebióticos).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Descrever a colonização do *Vibrio parahaemolyticus* na hemolinfa e tecidos de juvenis do camarão *Litopenaeus vannamei*.

1.1.2 Objetivos específicos

- Realizar teste desafio usando estirpe de *V. parahaemolyticus*;
- Quantificar vibrios totais na hemolinfa, intestino médio e hepatopâncreas de juvenis de camarões cultivados após o teste desafio usando uma estirpe de *V. parahaemolyticus*;
- Descrever a colonização na hemolinfa, intestino médio e hepatopâncreas de camarões por *V. parahaemolyticus*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O gênero *Vibrio*

Pertencem ao gênero *Vibrio* bactérias Gram-negativas muitas vezes curvas, facultativamente anaeróbias não formadoras de esporos e móveis por meio de um flagelo polar. O crescimento da maioria é estimulado pela presença de cloreto de sódio (DESMACHELIER, 1999). São habitantes naturais dos ecossistemas marinho e estuarino, onde geralmente se localizam as fazendas de cultivo de camarão (GOPAL *et al.*, 2005; AUSTIN, 2010). Segundo definição feita por Baumann e Schubert (1984), a família Vibrionaceae inclui os seguintes gêneros: *Vibrio*, *Aeromonas*, *Photobacterium* e *Plesiomonas*. Esses micro-organismos foram classificados juntos não só por serem encontrados principalmente na água, mas também por serem capazes de causar doença gastrointestinal em humanos. Entretanto, as técnicas biomoleculares estabeleceram que esses gêneros possuem apenas uma relação distante e pertencem a famílias distintas: *Vibrio* e *Aeromonas* são classificadas na família Vibrionaceae e Aeromonadaceae, respectivamente, e as *Plesiomonas* devido sua íntima relação com *Proteus* foram colocadas na família das Enterobacteriaceae (MURRAY *et al.*, 2004). Atualmente, o número de espécies aceitas para o gênero *Vibrio* é de 137 (incluindo subespécies) (DSMZ, 2017). No entanto, esse número ainda está em expansão, devido ao desenvolvimento de métodos de identificação de grupos ou espécie-específicos que proporcionam novas descobertas sobre a ecologia das bactérias pertencentes à família Vibrionaceae (AVIB, 2013).

Poucas espécies de *Vibrio* são relacionadas como agente etiológico em doenças humanas causadas pela ingestão de alimento marinho ou contato com água contaminada com víbrio (HUEHN *et al.*, 2014). Dentre as espécies de *Vibrio* patogênicas para humanos, se destacam o *V. cholerae*, agente etiológico da cólera, que possui distribuição cosmopolita sendo encontrada em rios e oceanos. A espécie *V. cholerae* se divide em sorogrupos determinados pela presença ou ausência do antígeno O. O sorogrupo O1 toxigênico se divide em biótipos *Clássico* e *El Tor*, além da existência do sorotipo O139 (ABBOUDE *et al.*, 1993; ALBERT *et al.*, 1993; ABBOUD *et al.*, 2007).

Estirpes bacterianas de *V. parahaemolyticus* são reconhecidas como importantes

causadores de gastroenterite relacionada ao consumo de mariscos contaminados (MERCOGLIANO *et al.*, 2014; YUXUE *et al.*, 2015). Enquanto *V. alginolyticus* e *V. vulnificus* podem estar associados a infecções de feridas ou septicemia primária de origem marinha em pacientes imunodeprimidos. (MERCOGLIANO *et al.*, 2014). Um levantamento de dados realizado sobre os casos de doenças humanas provocadas por *V. alginolyticus* nos EUA entre os anos de 1988 a 2012 demonstraram que das 1331 infecções provocadas por este patógeno, 96% ocorreram em estados costeiros e sendo a maioria (86%) relacionada a atividades na água (SLIFKA JACOBS, NEWTON e MAHON, 2007).

Em camarões marinhos, essas bactérias estão envolvidas em várias doenças infecciosas que causam mortalidade e perdas econômicas nos cultivos (GOARANT e MERIEN, 2006; SAKAI *et al.*, 2007; SOTO-RODRIGUEZ *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2014). No ambiente aquático, em condições de estresse as espécies de *Vibrio* tornam-se agentes patogênicos mortais para camarões (LIGHTNER, 2005). Ainda assim, em um ambiente natural é difícil definir quais são os agentes estressores que estimulam a expressão da patogenicidade em uma determinada comunidade microbiana. Uma vez que a resposta à condição estressante vai variar de organismo para organismo (SUNG *et al.*, 2001). A resposta imune dos camarões pode ser afetada por condições ambientais desfavoráveis que causam estresse, aumentando sua vulnerabilidade a bactérias autóctones como o vîbrio (KUMAR *et al.*, 2014).

Para o entendimento dos processos infecciosos se faz necessária uma descrição das bactérias patogênicas presentes nos viveiros de camarão (WALLING *et al.*, 2010). Várias espécies de *Vibrio* possuem importância como patógenos para a aquicultura marinha, como *V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *Listonella (Vibrio) anguillarum* e, mais recentemente, o *V. parahaemolyticus* (HU *et al.*, 2012).

2.1.1 *Vibrio parahaemolyticus*

A bactéria *V. parahaemolyticus* foi descoberta por Tsunesaburo Fujino após um surto de gastroenterite provocado pela ingestão de “shirasu” (sardinhas novas não submetidas à cocção) no ano de 1950 em Osaka, Japão (SHINODA, 2011). Os isolados foram primeiramente nomeados como *Pasteurella parahaemolytica* e somente dez anos

depois, os autores Fujino *et al.* (1965 apud SHINODA, 2011) reexaminaram os isolados de “shirasu” propondo o nome científico *V. parahaemolyticus*.

Vibrio parahaemolyticus é um habitante natural de ambientes estuarinos e costeiros, moderadamente halofílico capaz de crescer em concentrações de NaCl de até 8% (YANG *et al.*, 2010). Sua virulência em humanos está fortemente ligada a genes que codificam para hemolisina termoestável direta (*tdh*) e seu homólogo hemolisina relacionada a hemolisina termoestável (*trh*) (WEST, KLEIN e LOVELL, 2013).

Além da patogenicidade em humanos, essa estirpe bacteriana tem sido descrita como patógena para camarões peneídeos em várias partes do mundo (KUMAR *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2014; YINGKAJORN *et al.*, 2014; SOTO-RODRIGUEZ *et al.*, 2015) sendo um importante causador de mortalidade e perdas econômicas na atividade da carcinicultura (LOMELÍ-ORTEGA e MARTÍNEZ-DÍAZ, 2014). Estudos realizados por Kumar *et al.* (2014) confirmaram o papel do *V. parahaemolyticus* como patógeno oportunista podendo causar mortalidade em larga escala em camarão branco do Pacífico *L. vannamei*. Sua patogenicidade está relacionada à doença da necrose hepatopancreática aguda (AHPND) também conhecida como a síndrome da mortalidade precoce (EMS) que surgiu em 2009 na Ásia (NUNAN, *et al.*, 2014; SOTO-RODRIGUEZ *et al.*, 2015). Estirpes de *V. parahaemolyticus* isoladas de cultivos de camarão acometidos pela AHPND não apresentaram os genes *tdh* e *trh*. Indicando que os genes responsáveis pela virulência em humanos não são os mesmos para camarões (SOTO-RODRIGUEZ *et al.*, 2015; CHOI *et al.*, 2016; LÓPEZ-LEÓN *et al.*, 2016).

2.1.2 Mecanismos de patogenicidade bacteriana e defesa imunológica em camarão

O camarão branco *L. vannamei* é a espécie de camarão mais cultivada no mundo, e como resultado da intensificação da carcinicultura, muitas fazendas apresentam doenças virais e bacterianas (vibrioses) despertando a preocupação em relação a sanidade dos animais e estimulando as pesquisas sobre o sistema imunológico dos invertebrados (BURGENTS *et al.*, 2005; CHIU-HSIA *et al.*, 2007). Os mecanismos envolvidos na patogênese e a reação de defesa resultado das vibrioses ainda não estão claramente compreendidos. No entanto, em todos os filos animais, a fagocitose é considerada como

uma forma central e importante para eliminar micro-organismos ou outras partículas pequenas (VAN DE BRAAK *et al.*, 2002).

Em algumas espécies patogênicas pertencentes à família Vibrionaceae tem sido demonstrado que os fatores de virulência são regulados através de uma rede complicada de *quorum sensing* (QS) (LI, YEH e CHEN, 2010). O QS é um sistema de intercomunicação bacteriana que controla a expressão de múltiplos genes em resposta à densidade populacional (YE *et al.*, 2008). Estão envolvidas nesse processo a produção, liberação e subsequente detecção de moléculas sinalizadoras químicas chamadas de auto-indutoras (HENKE e BASSLER, 2004). As bactérias usam o processo de comunicação QS para controlar as transições entre comportamentos individuais e de grupo, existindo em víbrios, dois fatores de transcrição mestre, *AphA* e *LuxR*, que coordenam a resposta QS (VAN KESSEL *et al.*, 2013). Fatores de virulência, desenvolvimento de biofilme e a motilidade flagelar são mediados pelo *AphA* que é um pequeno regulador de transcrição PadR-familiar DNA-obrigatório que desempenha várias funções em *V. parahaemolyticus* (WANG *et al.*, 2013).

Bactérias do gênero *Vibrio* produzem enzimas proteolíticas extra-celulares que possuem papel na obtenção de nutrientes via digestão de vários substratos protéicos e muitas podem desempenhar papel importante na virulência (ELGAML, HIGAKI e MIYOSHI, 2013; LEE *et al.*, 2002). O ciclo tradicional de infecção bacteriana compreende as fases de entrada do patógeno, seguida pelo seu estabelecimento, multiplicação, uso de mecanismos para evitar a defesa do hospedeiro, danos e saída (DONNENBERG, 2000). Esses diferentes passos envolvem a expressão de fatores de virulência, tais como: produção de fatores de adesão; produção de exopolissacarídeos e biofilmes; produção de enzima lítica; sideróforos e aquisição de ferro e bacteriófagos (RUWANDEEPIKA *et al.*, 2012).

Após infectar *P. monodon* com *V. anguillarum*, Van de Braak *et al.* (2002) realizaram amostragens da hemolinfa do camarão em diferentes tempos (5 min., 10 min., 2h, 24h, 48h e 7 dias) verificando que as contagens desse patógeno decresceram com o passar do tempo. Paralelo às contagens bacterianas, procederam a histologia dos tecidos, onde foi detectada o encapsulamento da bactéria pelos hemócitos após o período de 24h e aglutinação na hemolinfa após 10 min. da exposição ao patógeno. A presença de mecanismos e barreiras de defesa imunológica em camarão foi sugerida após desafio com

V. parahaemolyticus, quando houve ausência do patógeno na hemolinfa e músculo e as contagens nas brânquias decresceram até o seu desaparecimento (AGUIRRE-GUZMÁN *et al.*, 2010). A microbiota natural do camarão pode também atuar como mecanismo de defesa contra outros patógenos bacterianos. Shakila *et al.* (2006) pesquisaram a ação antagônica de bactérias isoladas do intestino de *Penaeus monodon*, observando atividade antibacteriana contra espécies dos gêneros *Pseudomonas* sp., *Photobacterium* sp., *Bacillus* sp. e frente a culturas de *Aeromonas hydrophila*, *A. sobria* e do patógeno de camarões *V. vulnificus*.

Segundo afirmaram Aguirre-Guzmán *et al.* (2010), existia um número significativamente maior de trabalhos científicos abordando a detecção e quantificação de *Vibrio* sp. em camarão comparado ao número de estudos que abordava a patogenicidade específica e as rotas de infecção desses patógenos no camarão. Assim, existe ainda carência de informações que permitam dar subsídios a ações visando a redução de perdas na atividade de cultivo de camarões. Vinoj, Vaseeharan e Brennan (2014) descreveram um método para estudar a patogenicidade e colonização de *V. parahaemolyticus* marcado via plasmídeo com a proteína fluorescente verde (GFP) em hemolinfa, intestino, brânquias e músculo do camarão *Fenneropenaeus indicus*, revelando uma eficiente colonização bacteriana em massa através da região oral até o intestino e outros tecidos.

2.1.3 Vibrioses na carcinicultura

No Brasil a atividade da carcinicultura teve início na década de 1970 experimentando um desenvolvimento intenso e alcançando um patamar de indústria de exportação na década de 1990 (QUEIROZ *et al.*, 2013). A produção nacional de camarão cultivado manteve-se constante ao longo dos anos até 2011, mas as exportações caíram acentuadamente a partir de 2004 (ABREU *et al.*, 2011). A indústria da carcinicultura vem experimentando perdas econômicas significativas e estima-se que, no mundo todo, aproximadamente 60% das perdas por doenças sejam causadas por patógenos virais e 20% por patógenos bacterianos principalmente do gênero *Vibrio* (AGUIRRE-GUZMÁN *et al.*, 2004; FLEGEL, 2012).

A abundância natural dos víbrios em ecossistemas de cultivo de camarão, somada às taxas de multiplicação e capacidade de se adaptar às mudanças ambientais

umentam a preocupação com o surgimento das vibrioses (SAULNIER *et al.*, 2000).

A salinidade é considerada um fator secundário na sobrevivência e crescimento das estirpes de v́brio que se desenvolvem em ambientes com ampla variação de salinidade (2 a 48) (EILER, JOHANSSON e BERTILSSON 2006; SOBRINHO *et al.*, 2010). As regiões costeiras e estuarinas apresentam variações na salinidade (1-40), sendo os locais de escolha preferencial para o cultivo de camarões marinhos. A migração desta atividade agŕcola para regiões interiores surgiu como uma alternativa para minimizar os custos da produção e a pressão sobre as áreas costeiras. Além de aumentar as oportunidades de emprego nas zonas rurais e auxiliar na diversificação da carcinicultura (McGRAW *et al.*, 2002; ARANEDA, PÉREZ e GASCA-LEYVA, 2008). Na região nordeste brasileira há uma forte tendência para a interiorização da carcinicultura como alternativa economicamente viável. No entanto, há a preocupação de que os agentes patognicos para camarões que são comuns para as zonas costeiras possam atravessar a barreira da salinidade e atingir os cultivos de água doce (Informação verbal)¹.

As bactérias do gênero *Vibrio* são reconhecidas como patógenos oportunistas que causam mortalidades em larga escala em cultivos de camarão. As espécies que preocupam mais os carcinicultores são: *Vibrio alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* e *V. nigripulchritudo* (Quadro 1).

¹ Prof. Dr. Pedro Carlos Cunha Martins (UFERSA) em ocasião da sua participação na banca da defesa de tese de Rosa Helena Rebouças intitulada Colonização de tecidos e ĺquido corpóreo do camarão *Litopenaeus vannamei* por *Vibrio parahaemolyticus* autóctone de ambiente de cultivo no dia 23 de junho de 2017 no Instituto de Ciências do Mar – Labomar – UFC.

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

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

Fonte: Elaborada pela autora - * AHPND/EMS - Doença da necrose aguda hepatopâncreática/Síndrome da mortalidade precoce

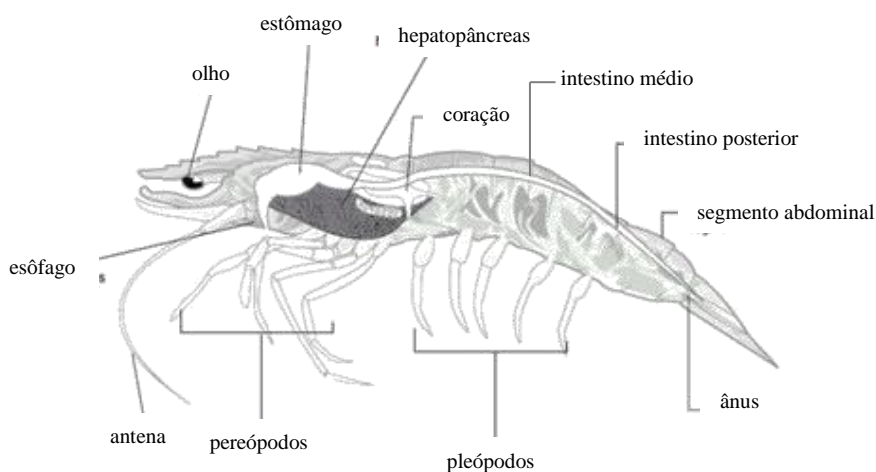
As vibrioses que acometem os cultivos de *L. vannamei* se tornaram um grande problema econômico global, fazendo com que o controle e prevenção de doenças em camarões sejam o alvo principal de estudos recentes (BOWLER *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2015; CAO *et al.*, 2015). A prevenção ou redução da mortalidade em massa na larvicultura de camarão causada por vibrioses ainda é um problema chave para a indústria aquícola. Na maioria dos casos, os antibióticos e antimicrobianos químicos são utilizados rotineiramente para prevenir ou tratar a vibriose em camarões, embora tragam efeitos secundários negativos (WEN *et al.*, 2014; FLORES-MIRANDA *et al.*, 2011; WONGTAVATCHAI, LÓPEZ-DÓRIGA e FRANCIS, 2010). O uso inapropriado de agentes antimicrobianos pode contribuir para a disseminação de genes de resistência no ambiente aquático e para o público consumidor desse crustáceo (YANO *et al.*, 2014). Segundo Adams e Boopathy (2013) a resistência bacteriana aos antimicrobianos traz impactos na escolha de drogas que humanos e animais podem usar, bem como seus resíduos em animais destinados ao consumo podem trazer riscos à saúde dos seres vivos.

Em termos de impacto econômico, diversos países suspenderam ou proibiram a importação de camarão vivo e ou outras formas de produtos de camarão oriundos de países afetados pela AHPND provocada pelo *V. parahaemolyticus* (FAO, 2013). Essa enfermidade foi notificada pela primeira vez em 2009 após causar perdas significantes na produção de camarão no sudeste da Ásia. Inicialmente, não se sabia o que causava essa síndrome, porém em 2013 o agente etiológico foi isolado e identificado como *V. parahaemolyticus* (TRAN *et al.*, 2013; DE LA PEÑA *et al.*, 2015; ZORRIEHZAHRA e BANAEDERAKHSHAN, 2015). Os sinais clínicos da AHPND incluem fraqueza, descoloração e redução do hepatopâncreas que coincidem com as taxas de mortalidade (DE LA PEÑA *et al.*, 2015). Esses sintomas característicos da AHPND são causados por toxinas *PirA* e *PirB* que se assemelham a toxina inseticida binária de espécies de *Photorhabdus* que são proteínas codificadas pelo plasmídeo pVA1 (DANGTIP *et al.*, 2015; HAN *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2015; SIRIKHARIN, *et al.*, 2015). Os genes que codificam essas enzimas são flanqueados por uma sequência codificadora de transposase que é um elemento genético móvel que pode induzir à transferência horizontal. Desta forma, os genes *PirA* e *PirB* podem ser potencialmente disseminados através dos processos de transposição, conjugação e captação plasmídica. Sendo assim, é possível que estirpes não patogênicas se tornem patogênicas (HAN *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2015).

2.1.4 Rota de infecção de *Vibrio* spp. em camarão

As vibrioses em camarões são classificadas como infecções secundárias e oportunistas, ocorrendo em todos os estágios de vida do animal (larval, pós-larval, juvenil e adulta). O processo de infecção causada pelo gênero *Vibrio* em camarão pode ser cuticular, entérico (intestinal) e sistêmico (envolvendo vários órgãos). Quando localizada, apresenta lesões melanizadas na carapaça e/ou abscessos pontuais no hepatopâncreas. Os locais comumente afetados pelos víbrios incluem o órgão linfóide, hepatopâncreas, coração, glândula antenal, tecido conectivo dermal, músculo esquelético e cordão nervoso (NUNES e MARTINS, 2002) (Figura 1).

Figura 1: Representação esquemática do sistema digestório de camarão peneídeo.



Fonte: Fao (2001).

Em pós-larvas de camarão, o *V. harveyi* provoca destruição em massa do sistema digestório, especialmente no hepatopâncreas e intestino anterior (SOONTHORNCHAI *et al.*, 2010). Opacidade do corpo, necrose e letargia foram sintomas observados em larvas e pós-larvas de *L. vannamei* infectadas por *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, e *V. penaeicida* (AGUIRRE-GUZMÁN, VÁSQUEZ-JUAREZ e ASCENCIO, 2001).

Burgents *et al.* (2005) experimentaram um processo de infecção por *V. campbelli* em pós-larvas de camarão *L. vannamei* observando invasão deste patógeno em brânquias, hepatopâncreas, órgão linfóide, coração e hemolinfa. Pesquisadores no entanto alertam que estudos sobre as rotas de infecção por bactérias do gênero *Vibrio* em camarões são influenciados pelos protocolos, estirpes bacterianas empregadas e dose infectante

(SAULNIER *et al.*, 2000; BURGENTS *et al.*, 2005; AGUIRRE-GUZMÁN *et al.*, 2010; VINOJ, VASEEHARAN e BRENNAN, 2014) (Quadro 2).

Quadro 2: Investigações realizadas sobre as rotas de invasão de estirpes bacterianas do gênero *Vibrio* em camarão cultivado.

Bactéria	Crustáceo	Protocolo de infecção	Locais de infecção	Referência
<i>V. anguillarum</i>	<i>P. monodon</i>	Injeção	Hemolinfa, órgão linfóide	VAN DE BRAAK <i>et al.</i> , 2002
<i>V. campbelli</i>	<i>L. vannamei</i>	Injeção (10 ⁴ UFC/mL)	Hemolinfa, órgão linfóide, coração, brânquias, hepatopâncreas	BURGENTS <i>et al.</i> , 2005
<i>V. campbelli</i>	<i>L. vannamei</i>	Injeção (10 ⁴ UFC/mL)	Coração, órgão linfóide, hepatopâncreas, músculo, brânquias	BURGE <i>et al.</i> , 2007
<i>V. anguillarum</i>	<i>F. chinensis</i>	Injeção (10 ⁷ UFC/mL)	Órgão linfóide	YANG <i>et al.</i> , 2008
<i>V. alginolyticus</i>	<i>L. vannamei</i>	Injeção (10 ⁵ UFC/mL)	Hemolinfa	LI, YEH e CHEN, 2008
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>L. vannamei</i>	Imersão (10 ⁶ UFC/mL)	Brânquias, hepatopâncreas	AGUIRRE-GUZMAN <i>et al.</i> , 2010
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>F. indicus</i>	Imersão (10 ³ a 10 ⁸ UFC/mL)	Músculo, brânquias, intestino, hemolinfa	VINOJ, VASEEHARAN e BRENNAN <i>et al.</i> , 2014
<i>V. furnissi</i>	<i>P. monodon</i>	Injeção (10 ⁵ UFC/mL)	Hemolinfa	SUBRAMANIAN <i>et al.</i> , 2014
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>L. vannamei</i>	Imersão (10 ⁶ UFC/mL)	Órgãos e tecidos	PEÑA-NAVARRO e VARELA-MEJÍAS, 2015
<i>V. harveyi</i>	<i>Black Tiger Shrimp</i>	Imersão (10 ⁶ UFC/mL)	Intestino	RUNGRASSAM EE <i>et al.</i> , 2016

Fonte: elaborada pela autora.

Foram testadas as possíveis rotas de infecção de *V. parahaemolyticus* em espécies distintas de camarão, *L. vannamei* e *Fenneropenaeus indicus*, respectivamente. O protocolo de infecção utilizado nestes testes foi o de imersão dos animais ao inóculo bacteriano. Sendo observadas respostas diferentes no que se refere ao processo infeccioso e resposta imunológica (AGUIRRE-GUZMÁN *et al.*, 2010; VINOJ, VASEEHARAN e BRENNAN 2014).

No trabalho apresentado por Aguirre-Guzmán *et al.* (2010) foi detectada a presença de *V. parahaemolyticus* após 30 min. de infecção seguida de um decréscimo até o desaparecimento, sugerindo que existe algum mecanismo que inibiu o processo infeccioso até a eliminação da bactéria. O mesmo comportamento não foi notado por Vinoy, Vaseeharan e Brennan (2014) em camarões *F. indicus* imersos em água contendo inóculo de *V. parahaemolyticus*. Neste as contagens do patógeno e dos tecidos infectados mostraram-se crescentes ao longo do experimento.

A resposta imunológica do camarão frente à patologia ocasionada por víbrios pode também variar de acordo com o estágio de vida do animal. Em estudo realizado por Soonthornchai *et al.* (2010) ao infectar por imersão pós-larvas e juvenis de *Penaeus monodon* com *V. harveyi*, observaram a mortalidade das pós-larvas em dois dias de experimento em contraste com a sobrevivência dos juvenis a altas doses da bactéria.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Seleção das estirpes

Foram selecionadas cinco cepas de *V. parahaemolyticus* pertencentes ao acervo microbiológico do Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado (LAMAP/LABOMAR-UFC). Essas estirpes foram isoladas de ambiente de carcinicultura no Estado do Ceará, Brasil e fazem parte do projeto de pós-doutorado desenvolvido pela pesquisadora Dra. Francisca Gleire Rodrigues de Menezes intitulado “Monitoramento de resistência a substâncias antimicrobianas em áreas costeiras com concentração em cultivos de camarão *L. vannamei*”.

Alguns critérios foram obedecidos para eleição dos isolados, tais como: origem do isolado, identificação fenotípica e genotípica para *V. parahaemolyticus*, positividade para detecção dos fatores de virulência (gelatinase, caseinase, fosfolipase, lipase e β -hemólise).

3.1.1 Identificação bioquímica e fatores de virulência

As cepas utilizadas foram identificadas previamente de acordo com Noguerola e Blanch (2008) e apresentaram o seguinte perfil fenotípico com respostas positivas para as provas: descarboxilação da lisina e ornitina, crescimento a 3, 6 e 8% de NaCl, crescimento a 20, 30, 35 e 40°C, citrato, gelatinase, indol, NO₂, oxidase, L-arabinose, arabinose, manitol, ampicilina 10 μ g, O129/10 μ g; e respostas negativas para as provas: arginina, crescimento a 0% de NaCl, crescimento a 4 e 10°C, arginina, hidrólise da esculina, gás, luminescência, ONPG, Voges-Proskauer, decomposição da xantina, lactose, inositol, melibiose, ramnose, salicina, sorbitol, sacarose e O129/150 μ g. Os fatores de virulência foram testados para os isolados confirmados como pertencentes ao gênero *Vibrio* spp. de acordo com Austin *et al.* (2005) e Liuxy, Lee e Chen (1996) (Quadro 3).

Quadro 3: Características dos isolados identificados bioquimicamente como *V. parahaemolyticus*.

Cepa	Origem	Provas de virulência (+)
52	Água (CD)	GEL; CAS; FOS; β
53	Água (CD)	GEL; CAS; FOS; LIP
106	Hepatopâncreas	GEL; CAS; FOS; LIP; β
194	Hemolinfa	GEL; CAS; FOS; β
195	Hemolinfa	GEL; CAS; FOS; β

CD = canal de drenagem de viveiro de camarão; GEL = Gelatinase; CAS = Caseinase; FOS = Fosfolipase; LIP = Lipase; β = Beta-hemólise. Fonte: Acervo LAMAP.

As identificações bioquímicas foram ser confirmadas por meios moleculares com a finalidade de evitar resultados falso-positivos (CROCI *et al.*, 2007).

3.1.2 Caracterização genotípica dos isolados de *V. parahaemolyticus*

3.1.2.1 Extração do DNA

As estirpes bacterianas previamente identificadas por métodos bioquímicos como sendo *V. parahaemolyticus* foram testadas com o gene *tl* (hemolisina termolábil), específico para a espécie. A extração do DNA Total foi efetuada utilizando-se o kit de extração *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Ref.: A1125 - Promega). O DNA, produto da extração, foi estocado em refrigerador com temperatura de aproximadamente 10°C.

3.1.2.2 Amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para as estirpes de *V. parahaemolyticus*

No processo de amplificação foi utilizada como controle positivo, uma estirpe de referência: *V. parahaemolyticus* cedida pelo Instituto Oswaldo Cruz-RJ (IOC 18950). Para confirmar geneticamente as espécies de *V. parahaemolyticus* foi utilizado o gene *tl* com sequência dos iniciadores *Forward*: 5'-AAA GCG GAT TAT GCA GAA GCA CTG-3' e *Reverse*: 5'-GCT ACT TTC TAG CAT TTT CTC TGC-3'. As ciclagens foram efetuadas em Termociclador (Amplitherm) nas condições indicadas no Quadro 4:

Quadro 4: Etapas da amplificação do DNA bacteriano utilizando *primer tl*.

Etapas	Temperatura/Tempo
Desnaturação inicial	94°C/3 minutos
Desnaturação (30 ciclos)	94°C/1 minuto
Anelamento	58°C/1 minuto
Extensão	72°C/1 minuto
Extensão final	72°C/5 minutos

Fonte: BEJ *et al.*, 1999.

3.1.2.3 Corrida eletroforética dos produtos da PCR com gene *tl*

Os produtos da PCR foram aplicados em gel de agarose 1% preparado com tampão Tris-Borato-EDTA 1X (TBE 1X) e a corrida eletroforética realizada em 120 volts (V)

em tampão TBE. A cada cavidade do gel foram aplicados 5 μ L da amostra acrescida de 1 μ L de *Gel Red* (Invitrogen) e 2 μ L de *Blue Juice* (Invitrogen). O padrão molecular 1Kb plus DNA Ladder foi usado como referência dos geis para identificação das bandas. Os geis foram analisados em equipamento de fotodocumentação (Kodak EDAS290).

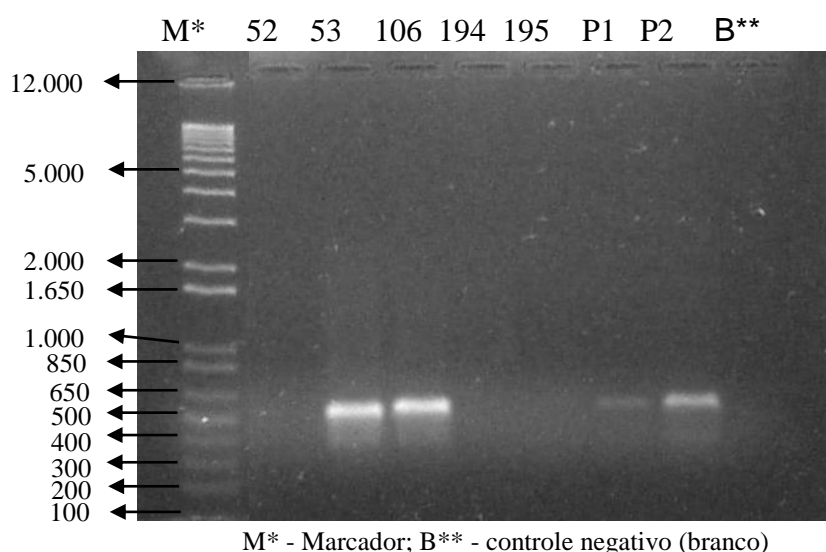
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Escolha dos isolados

Entre cinco isolados com características de *V. parahaemolyticus* apenas dois (02) foram confirmados genotipicamente baseado na presença do gene *tl*. Durante a caracterização fenotípica, alguns isolados presuntivos de *V. parahaemolyticus* podem demonstrar reações atípicas na série de testes bioquímicos (DILEEP *et al.*, 2003; CROCI *et al.*, 2007; TERZI, BÜYÜKTANIR, YURDUSEV 2009).

A Figura 10 apresenta o resultado da corrida eletroforética dos isolados identificados bioquimicamente e analisados geneticamente com os primers *tl* para confirmação da espécie como *V. parahaemolyticus*.

Figura 10: Perfil eletroforético da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) de cinco cepas classificadas fenotipicamente como *V. parahaemolyticus* com os primers do gene *tl* utilizado para detectar a espécie. Os padrões P1 e P2 são, respectivamente, gene *tl* e *V. parahaemolyticus* IOC 18950.



A hemolisina termolábil (*tlh*) é uma exotoxina que ataca e provoca a lise incompleta na membrana dos eritrócitos com liberação da hemoglobina, possui ação de fosfolipase A2/lisofosfolipase. Algumas hemolisinas como *tdh* e *trh* possuem papéis na virulência bem esclarecidos, enquanto a ação virulenta da *tlh* ainda não está bem definida (SHINODA *et al.*, 1991; ZHANG e AUSTIN, 2005).

O gene *tl* vem sendo utilizado com eficiência para confirmar geneticamente os isolados identificados bioquimicamente como sendo *V. parahaemolyticus* ratificando sua

especificidade para identificação deste patógeno (CHAKRABORTY, SURENDRAN e JOSEPH, 2008; TERZI, BÜYÜKTANIR, YURDUSEV, 2009).

6 CONCLUSÃO

A colonização tecidual pelo *V. parahaemolyticus* acontece de maneira diferenciada, com fixação em um primeiro momento nos tecidos do intestino médio seguida de uma instalação tecidual mais intensa no hepatopâncreas. Durante o acompanhamento das bactérias nos camarões, por cultivo e microscopia, não foi detectada presença de espécies de *Vibrio* cultiváveis e do *V. parahaemolyticus* (106T) nas amostras de hemolinfa o que está relacionado a presença de hemócitos que atuam no sistema de defesa desses crustáceos.

6.1 Considerações finais

A facilidade de detecção e interpretação dos resultados mostram a importância dessa estirpe como uma ferramenta no estudo e entendimento do papel do *V. parahaemolyticus* como patógeno em camarões marinhos. A partir desse protocolo, outras possibilidades e abordagens se tornam viáveis usando o *V. parahaemolyticus* como indicador. Um bom exemplo é a possibilidade de acompanhamento da colonização do organismo e análise paralela dos mecanismos imunológicos do camarão favorecendo o desenvolvimento de tecnologias para prevenção ou tratamento de eventos de vibrioses nos cultivos de camarão.

7 REFERÊNCIAS

- ABREU, M. C. S.; MATTOS, P.; LIMA, P. E. S.; PADULA, A. D. Shrimp farming in coastal Brazil: Reasons for market failure and sustainability challenges. **Ocean & Coastal Management**, v.54, p. 658-667, 2011.
- ADAMS, D.; BOOPATHY. R. Use of formic acid to control vibriosis in shrimp aquaculture. **Institute of Molecular Biology**, Slovak Academy of Sciences, v. 68, p. 1017-1021, 2013.
- AGUIRRE-GUZMÁN, G.; VÁSQUEZ-JUAREZ, R.; ASCENCIO, F. Differences in the susceptibility of american white shrimp larval substages (*Litopenaeus vannamei*) to four *Vibrio* species. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 78, p. 215-219, 2001.
- AGUIRRE-GUZMÁN, G.; RUÍZ, H. M.; ASCENCIO, F. A review of extracellular virulence product of *Vibrio* species important in diseases of cultivated shrimp. **Aquaculture Research**, v. 35, p. 1395-1404, 2004.
- AGUIRRE-GUZMÁN, G.; SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, J. G.; PÉREZ-CASTAÑEDA, R.; PALACIOS-MONZÓN, A.; TRUJILLO-RODRÍGUEZ, T.; CRUZ-HERNÁNDES, N. I. Pathogenicity and infection route of *Vibrio parahaemolyticus* in american white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Journal of the world aquaculture society**, v. 41, n. 3, p. 464-470, 2010.
- ALBERT, M. J.; SIDDIQUE, A. K.; ISLAM, M. S.; FARUQUE, A. S.; ANSARUZZAMAN, M.; FARUQUE, S. M.; SACK, R. B. Large outbreak of clinical cholera due to *Vibrio cholerae* non-01 in Bangladesh. **The Lancet**, v. 341, n. 8846, p. 704, 1993.
- ARANEDA, M.; PÉREZ, E. P.; GASCA-LEYVA, E. White shrimp *Penaeus vannamei* culture in freshwater at three densities: condition state based on length and weight. *Aquaculture*, v. 283, p. 13-18, 2008.
- AUSTIN, B.; AUSTIN, D.; SUTHERLAND, R.; THOMPSON, F.; SWINGS, J. Pathogenicity of vibrios to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) and *Artemia* nauplii. **Environmental microbiology**, v. 7, n. 9, p. 1488-1495, 2005.
- AUSTIN, B. Vibrios as causal agents of zoonoses. **Veterinary Microbiology**, v.140, p. 310-317, 2010.
- AVIB – **Association of Vibrio biologists 2013**. Disponível em: <<<http://www2.ioc.fiocruz.br/vibrio/AVib/Species.html>>> Acesso em: 19 ago. 2015.
- BAUMANN, P.; SCHUBERT, R. H.W. Family II. Vibrionaceae. Vernon 1965. In Krieg N.R.; Holt, J. G. (eds): **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, vol I, p. 516-550, Baltimore, Williams & Wilkins, 1984.
- BEJ, A. K.; PATTERSON, D. P.; BASHER, C. W.; VICKERY, M. C. L.; JONES, D. D.; KAYSNER, C. A. Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh*. **Journal of Microbiological Methods**, Netherlands, v. 36, p. 215-225, 1999.

BOWLER, B.; LIMSUWAN, C.; CHUCHIRD, N.; ESPINOZA, C.; ROJAS, P. Use of functional diets improves survival of *Vibrio*-infected shrimp. **The Global Aquaculture Advocate**, p. 26-27, 2015.

BURGENTS, J. E.; BURNETT, L. E.; STABB, E. V.; BURNETT, K. G. Localization and bacteriostasis of *Vibrio* introduced into the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, **Developmental and Comparative Immunology**, v. 29, p.681-691, 2005.

CAO, H.; AN, J.; ZHENG, W.; HE, S. *Vibrio cholerae* pathogen from the freshwater-cultured whiteleg shrimp *Penaeus vannamei* and control with *Bdellovibriobacteriovorus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 130, p. 13–20, 2015.

CHAKRABORTY, R. D.; SURENDRAN, P. K.; JOSEPH, T. C. Isolation and characterization of *Vibrio parahaemolyticus* from seafoods along the southwest coast of India. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, v. 24, p. 2045-2054, 2008.

CHIU-HSIA, C.; YUAN-KUANG, G.; CHUN-HUNG, L.; TZU-MING, P.; WINTON, C. Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induce by *Lactobacillus plantarum*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 23, p. 364-377, 2007.

CHOI, M.; STEVENS, A. M.; SMITH, S. A.; TAYLOR, D. P.; KUHN, D. D. Strain and dose infectivity of *Vibrio parahaemolyticus*: the causative agent of early mortality syndrome in shrimp. **Aquaculture Research**, 2016.

CROCI, L.; SUFFREDINI, E.; COZZI, L.; TOTI, L.; OTTAVIANI, D.; PRUZZO, C.; SERRATORE, P.; FISCHETTI, R.; GOFFREDO, E.; LOFFREDO, G.; MIONI, R. Comparison of different biochemical and molecular methods for the identification of *Vibrio parahaemolyticus*. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 102, p. 229-237, 2007.

DANGTIP, S.; SIRIKHARIN, R.; SANGUANRUT, P.; THITAMADEE, S.; SRITUNYALUCKSANA, K.; TAENGCHAIYAPHUM, S.; MAVICHAK, R.; PROESPRAIWONG, P.; FLEGEL, T. W. AP4 method for two-tube nested PCR detection of AHNPD isolates of *Vibrio parahaemolyticus*. **Aquacultures Reports**, v. 2, p. 158-162, 2015.

DE LA PEÑA, L. D.; CABILLON, N. A. R.; CATEDRAL, D. D.; AMAR, E. C.; USERO, R. C.; MONOTILLA, W. D.; CALPE, A. T.; FERNANDEZ, D. D. G.; SALOMA, C. P. Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHNPD) outbreaks in *Penaeus vannamei* and *P. monodon* cultured in the Philippines. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 116, p. 251-254, 2015.

DESMACHELIER, P. M. *Vibrio*: Introduction, including *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*. **Encyclopedia of Food Microbiology**, p. 2237-2242, 1999.

DILEEP, V.; KUMAR, H. S.; KUMAR, Y.; NISHIBUCHI, M.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. Application of polymerase chain reaction for detection of *Vibrio parahaemolyticus* associated with tropical seafoods and coastal environment. **Letters in Applied Microbiology**, v. 36, n. 6, p. 423-427, 2003.

DONNENBERG, M. S. Pathogenic strategies of enteric bacteria. **Nature**, v. 406, p. 768-774, 2000.

DOURADO, J. **Vibriose em camarões marinhos (*Litopenaeus vannamei*, Boone 1931) cultivados no litoral de Pernambuco, Brasil**. Dissertação de Mestrado em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, 47f., 2009.

DSMZ. *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*

Disponível em:

<<http://www.dsmz.de/bactnom/bactname.htm>> Acesso em 16 de março de 2017).

DOYLE, R. W. Inbreeding and disease in tropical shrimp aquaculture: a reappraisal and caution. **Aquaculture Research**, v. 47, p. 21-35, 2016.

EILER, A.; JOHANSSON, M.; BERTILSSON, S. Environmental influences on *Vibrio* populations in northern temperate and Boreal Coastal Waters (Baltic and Skagerrak Seas). **Applied Environmental Microbiology**, v. 72, n. 9, p. 6004-6011, 2006.

ELGAML, A.; HIGAKI, K.; MIYOSHI, S. Regulation system of serine protease production in *Vibrio vulnificus* strain NCIMB 2137, a metalloprotease-gene negative strain isolated from a disease of eel. **Aquaculture**, v. 416, p. 315-321, 2013.

FAO. Aquaculture development. 1, Good aquaculture feed manufacturing practice, by Stephen-Hassard, Q.D., Tacon, A.G.J., Dominy, W.G. & Frazer-Dominy, S. **FAO Technical Guidelines for Responsible Fisheries**, 5, Suppl. 1, 47 pp. Roma, FAO, 2001.

FAO. Report of the FAO/MARD technical workshop on early mortality syndrome (EMS) or acute hepatopancreatic necrosis syndrome (AHPNS) of cultured shrimp (under TCP/VIE/3304). Hanoi, Viet Nam. **FAO Fisheries and Aquaculture Report**, n. 1053, Rome, 54 p., 2013.

FAO. Fisheries and aquaculture department. Fishery statistics collection. 2017. Disponível em: <<<http://http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquaculture-production/en>>> acessado em: 23/02/2017.

FLEGEL, T. W. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 110, p. 166-173, 2012.

FLORES-MIRANDA, M. C.; LUNA-GONZÁLEZ, A.; CAMPA-CÓRDOVA, Á. I.; GONZÁLEZ-OCAMPO, H. A.; FIERRO-CORONADO, J. A.; PARTIDA-ARANGURE, B. O. Microbial immunostimulants reduce mortality in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio sinaloensis* strains. **Aquaculture**, v. 320, p. 51-55, 2011.

GOARANT, C.; MERIEN, F. Quantification of *Vibrio penaeicida*, the etiological agent of Syndrome 93 in New Caledonian shrimp, by real-time PCR using SYBR Green I chemistry. **Journal of microbiological methods**, v. 67, n. 1, p. 27-35, 2006.

GOARANT, C.; ANSQUER, D.; HERLIN, J.; DOMALAIN, D.; IMBERT, F.; DECKER, S. "Summer syndrome" in *Litopenaeus stylirostris* in New Caledônia: Pathology and epidemiology of the etiological agents, *Vibrio nigripulchritudo*. **Aquaculture**, v. 253, p. 105-113, 2006.

GOPAL, S.; OTTA, S. K.; KUMAR, S., KARUNASAGAR, I.; NISHIBUCHI, M.; KARUNASAGAR, I. The occurrence of *Vibrio* species in tropical shrimp culture environments; implications for food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v.102, p. 151– 159, 2005.

HENKE, J. M.; BASSLER, B. L. Bacterial social engagements. **Trends in Cell Biology**, v. 14, n. 11, 2004.

HU, Y.; DENG, T.; SUN, B.; SUN, L. Development and efficacy of an attenuated *Vibrio harveyi* vaccine candidate with cross protectivity against *Vibrio alginolyticus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 32, p. 1155-1161, 2012.

HUEHN, S.; EICHORN, C.; URMERSBACH, S.; BREIDENBACH, J.; BECHLARS, S.; BIER, N.; ALTER, T.; BARTELT, E.; FRANK, C.; OBERHEITMANN, B.; GUNZER, F.; BRENNHOLT, N.; BÖER, S.; APPEL, B.; DIECKMAN, R.; STRAUCH, E. Pathogenic vibrios in environmental, seafood and clinical sources in Germany. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, n. 7, p. 843-850, 2014.

HUYNH, T. G.; YEH, S. T.; LIN, Y. C.; SHYU, J. F.; CHEN, L. L.; CHEN, J. C. White shrimp *Litopenaeus vannamei* immersed in seawater containing *Sargassum hemiphyllum* var. chinense powder and its extract showed increased immunity and resistance against *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 31, p. 286-293, 2011.

KAUTSKY, N.; RÖNNBÄCK, P.; TEDENGREN, M.; TROELL, M.; Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. **Aquaculture**, v. 191, p. 145-161, 2000.

KUMAR, B. K.; DEEKSHIT, V. K.; RAJ, J. R. M.; RAI, P. SHIVANAGOWDA, B. M.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. Diversity of *Vibrio parahaemolyticus* associated with disease outbreak among cultured *Litopenaeus vannamei* (Pacific white shrimp) in India. **Aquaculture**, v. 433, p. 247-251, 2014.

LAI, H. C., NG, T. H.; ANDO, M.; LEE, C. T.; CHEN, I. T.; CHUANG, J. C.; MAVICHAK, R.; CHANG, S. H.; YEH, M. D.; CHIANG, Y. A.; HARUKO. Pathogenesis of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. **Fish & shellfish immunology**, v. 47, n. 2, p. 1006-1014, 2015.

LI, C., YEH, S.; CHEN, J. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* following *Vibrio alginolyticus* injection. **Fish & Shelfish Immunology**, v. 25, p. 853-860, 2008.

LI, C.; YEH, S.; CHEN, J. Innate immunity of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* weakened by the combination of a *Vibrio alginolyticus* injection and low-salinity stress. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 28, p. 121–127, 2010.

LI, C.; LI, H.; WANG, S.; SONG, X.; ZHANG, Z.; QIAN, Z; ZUO, H. XU, X.; WENG, S.; HE, J. The c-Fos and c Jun from *Litopenaeus vannamei* play opposite roles in *Vibrio parahaemolyticus* and white spot syndrome virus infection. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 52, p. 26-36, 2015.

- LI, H.; WANG, S.; LÜ, K.; YIN, B.; XIAO, B.; LI, S.; HE, J.; LI, C. An invertebrate STING from shrimp activates an innate immune defense against bacterial infection. **FEBS letters**, v. 591, n. 7, p. 1010-1017, 2017.
- LIGHTNER, D. V. **A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp**. World Aquaculture Society, Baton Rouge, 305 p. 1996.
- LIGHTNER, D. V. Biosecurity in shrimp farming: pathogen exclusion through use of SPF stock and routine surveillance. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 36, n. 3, p. 229-248, 2005.
- LIUXY, P. C.; LEE, K. K.; CHEN, S. N.. Pathogenicity of different isolates of *Vibrio harveyi* in tiger prawn, *Penaeus monodon*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 22, n. 6, p. 413-416, 1996.
- LOMELÍ-ORTEGA, C. O; MARTÍNEZ-DÍAZ, S. F. Phage therapy against *Vibrio parahaemolyticus* infection in the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae. **Aquaculture** p. 208-2011, 2014.
- LÓPEZ-LEÓN, P.; LUNA-GONZÁLEZ, A.; ESCAMILLA-MONTES, R.; FLORES-MIRANDA, M. C.; FIERRO-CORONADO, J. A.; ALVÁREZ-RUIZ, P.; DIARTE-PLATA, G. Isolation and characterization of infectious *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of AHPND, from the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 44, n. 3, p. 470, 2016.
- MCGRAW, W. J.; DAVIS, D. A.; TEICHERT - CODDINGTON, D.; ROUSE, D. B. Acclimation of *Litopenaeus vannamei* postlarvae to low salinity: influence of age, salinity endpoint, and rate of salinity reduction. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 33, n. 1, p. 78-84, 2002.
- MENDES, E. S.; LIRA, S. F.; GÓES, L. M. N. B.; DOURADO, J.; MENDES, P. P.; ALVES, C. A. B. *Vibrio* spp. isolados de camarão e água doce de cultivo de fazenda marinha em Pernambuco. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 4, p. 1191-1199, 2009.
- MERCOGLIANO, F.; VITULLO, M.; TAMBURRO, M.; SAMMARCO, M. L.; GRASSO, G. M.; LUZZI, I.; RIPABELLI, G. *Vibrio* spp infections of clinical significance and implication for public health. **Annali di igiene: medicina preventiva i di comunita**, v. 24, n. 1, p. 85-102, 2014.
- MOSS, S. M.; MOSS, D. R.; ARCE, S. M.; LIGHTNER, D. V.; LOTZ, J. M. The role of selective breeding and biosecurity in the prevention of disease in penaeid shrimp aquaculture. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 110, p. 247-250, 2012.
- MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; KOBAYASHI, G. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica – 4ª edição**. Editora Guanabara Koogan. 762p. 2004.
- NOGUEROLA, I.; BLANCH, A. R. Identification of *Vibrio* spp. with a set of dichotomous keys. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, n. 1, p. 175-185, 2008.
- NUNAN, L.; LIGHTNER, D.; PANTOJA, C.; GOMEZ-JIMENEZ, S. Detection of acute

hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.111, p. 81-86, 2014.

NUNES, A. J. P.; MARTINS, P. C. Avaliando o estado de saúde de camarões marinhos na engorda. **Panorama da aquicultura**, v. 12, n. 72, p. 23-33, 2002.

QUEIROZ, L.; ROSSI, S.; MEIRELES, J.; COELHO, C. Shrimp aquaculture in the federal state of Ceará, 1970 - 2012: Trends after mangrove forest privatization in Brazil. **Ocean & Coastal Management**, v. 73, p. 54-62, 2013.

RUWANDEEPIKA, H. A. D.; JAYAWEERA, T. S. P.; BHOWMICK, P. P.; BOSSIER, P.; DEFOIRDT, T. Pathogenesis, virulence factors and virulence regulation of vibrios belonging to the *Harveyi* clade. **Reviews in Aquaculture**, v. 4, p. 59-74, 2012.

SAKAI, T.; TATSUMU, H.; YUASA, K.; KAMAISHI, T.; MATSUYAMA, T.; MIWA, S.; OSEKO, N.; IIDA, T. Mass mortality of cultured Kuruma prawn *Penaeus japonicus* caused by *Vibrio nigripulchritudo*. **Fish Pathology**, v. 42, p. 141-147, 2007.

SAULNIER, D.; HAFFNER, P.; GOARANT, C.; LEVY, P.; ANSQUER, D. Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. **Aquaculture**, v. 191, p. 133-144, 2000.

SHAKILA, R. J.; SARAVANAKUMAR, R.; VYLA, S. A. P.; JEYASEKARAN, G.; JASMINE, G. I. Antagonistic activity of the gut microflora isolated from farmed tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Asian Fisheries Science**, v. 19, p. 247-255, 2006.

SHINODA, S.; MATSUOKA, H.; TSUCHIE, T.; MIYOSHI, S. I.; YAMAMOTO, S.; TANIGUCHI, H.; MIZUGUCHI, Y. Purification and characterization of a lecithin-dependent haemolysin from *Escherichia coli* transformed by a *Vibrio parahaemolyticus* gene. **Microbiology**, v. 137, n. 12, p. 2705-2711, 1991.

SHINODA, S. Sixty years from the discovery of *Vibrio parahaemolyticus* and some recollections. **Biocontrol Science**, v. 16, n. 4, p. 129-137, 2011.

SILVA, J. L. M.; SAMPAIO, L. M. B. Eficiência, gestão e meio ambiente na carcinicultura do Rio Grande do Norte. **Revista de economia e sociologia rural**, v. 47, n. 4, p. 883-902, 2009.

SIRIKHARIN, R.; TAENGCHAIYAPHUM, S.; SANGUANRUT, P.; CHI, T. D.; MAVICHAK, R.; PROESPRAIWONG, P.; NUANGSAENG, B.; THITAMADEE, S.; FLEGEL, T. W.; SRITUNYALUCKSANA, K. Characterization and PCR detection of binary, Pir-like toxins from *Vibrio parahaemolyticus* isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. **Plos One**, v. 10, n. 5, p. 1-16, 2015.

SLIFKA JACOBS, K. M.; NEWTON, A. E.; MAHON, B. E. *Vibrio alginolyticus* infections in the USA, 1988–2012. **Epidemiology & Infection**, v. 145, n. 7, p. 1491-1499, 2017.

SOBRINHO, P. S. C.; DESTRO, M. T.; FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Correlation between environmental factors and prevalence of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters harvested in the southern coastal area of São Paulo State, Brazil. **Applied Environmental Microbiology**, v. 76, n. 4, p. 1290-1293, 2010.

- SOTO-RODRIGUEZ, S. A.; GOMEZ-GIL, B.; LOZANO, R.; RIO-RODRÍGUEZ, R.; DIÉGUEZ, A. L.; ROMALDE, J. L. Virulence of *Vibrio harveyi* responsible for the “Bright-red” Syndrome in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.109, p. 307–317, 2012.
- SOTO-RODRIGUEZ, S. A.; GOMEZ-GIL, B.; LOZANA-OLVERA, R.; BETANCOURT-LOZANO, M.; MORALES-COVARRUBIAS, M. S. Field and experimental evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the causative agent of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) of cultured shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in northwestern Mexico. **Journal Applied Environmental of Microbiology**, v. 81, n. 5, p. 1689-1699, 2015.
- SUNG, H.; HSU, S.; CHEN, C.; TING, Y; CHAO, W. Relationships between disease outbreak in cultured tiger shrimp *Penaeus monodon* and the composition of *Vibrio* communities in pond water and shrimp hepatopancreas during cultivation. **Aquaculture**, v.192, p. 101-110, 2001.
- TERZI, G.; BÜYÜKTANIR, Ö.; YURDUSEV, N. Detection of the *tdh* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus* isolates in fish and mussels from Middle Black Sea Coast of Turkey. **Letters in applied microbiology**, v. 49, n. 6, p. 757-763, 2009.
- TRAN, L.; NUNAN, L.; REDMAN, L. R.; MOHNEY, L. L.; PANTOJA, C. R.; FITZSIMMONS, K.; LIGHTNER, D. V. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 105, p. 45-55, 2013.
- VAN DE BRAAK, C. B. T.; BOTTERBLOM, M. H. A.; TAVERNE, N.; VAN MUISWINKEL, W. B.; ROMBOUT, J. H. W. M.; VAN DER KNAAP, W. P.W. The roles of haemocytes and the lymphoid organ in the clearance of injected *Vibrio* bacteria in *Penaeus monodon* shrimp. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 13, p. 293-309, 2002.
- VINOJ, G.; VASEEHARAN, B.; BRENNAN. Green fluorescent protein visualization of *Vibrio parahaemolyticus* infections in Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus* (H Milne Edwards). **Aquaculture Research**, v. 45, p. 1989-1999, 2014.
- WALLING, E.; VOUREY, E.; ANSQUER, D.; BELIAEFF, B.; GOARANT, C. *Vibrio nigripulchritudo* monitoring and strain dynamics in shrimp pond sediments. **Journal of Applied Microbiology**, v.108, p. 2003–2011, 2010.
- WEN, C.; XUE, M.; LIANG, H.; ZHOU, S. Evaluating the potential of marine Bacteriovorax sp. DA5 as a biocontrol agent against vibriosis in *Litopenaeus vannamei* larvae. **Veterinary Microbiology**, v. 173, p. 84-91, 2014.
- WEST, C.K.G.; KLEIN, S.L.; LOVELL, C.R. High frequency of virulence factor genes *tdh*, *trh*, and *tlh* in *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from a Pristine Estuary. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 7, p. 2247-2252, 2013.
- WONGTAVATCHAI, J.; LÓPEZ-DÓRIGA, M. V.; FRANCIS, M. J. Effect of AquaVac™ Vibromax™ on size and health of post larva stage of Pacific White shrimp *Litopenaeus vannamei* and Black Tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Aquaculture**, v. 308, p. 75–81, 2010.

YANG, L.; ZHAN, L.; HAN, H.; GAO, H.; GUO, Z.; QIN, C.; YANG, R.; LIU, X.; ZHOU, D. The low-salt stimulon in *Vibrio parahaemolyticus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, p. 49-54, 2010.

YANG, C.; ZHANG, J.; LI, F.; MA, H.; ZHANG, Q.; PRIYA, T. A. J.; ZHANG, X.; XIANG, J. A toll receptor from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* is responsive to *Vibrio anguillarum* infection. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 24, p. 564-574, 2008.

YANO, Y.; HAMANO, K.; SATOMI, M.; TSUTSUI, I.; BAN, M.; AUE-UMNEOY, D. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Vibrio* species related to food safety isolated from shrimp cultured at inland ponds in Thailand. **Food Control**, v. 38, p. 30-36, 2014.

YE, J.; MA, Y.; LIU, Q.; ZHAO, D. L.; WANG, Q. Y.; ZHANG, Y. X. Regulation of *Vibrio alginolyticus* virulence by the LuxS quorum-sensing system. **Journal of Fish Diseases**, v. 31, p. 161-169, 2008.

YINGKAJORN, M.; MITRAPARP-ARTHORN, P.; NUANUALSUWAN, S.; POOMWISED, R.; KONGCHUAY, N.; KHAMHAENG, N.; VUDDHAKUL. Prevalence and quantification of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* during shrimp culture in Thailand. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 112, p. 103-111, 2014.

YUXUE, L.; YINGHUI, L.; SHUYU, W.; JIN, M.; ZENGKANG, X.; RILIN, C.; JOHN, D. K.; XIAOLU, S.; YAN, LU.; YAQUN, Q.; YIMAN, L.; XU, X.; HANWU, M.; ZHONGJIE, L.; HONGJIE, Y.; JAY, K. V.; LU, R.; QINGHUA, H.; JINQUAN, C. Risk factors for *Vibrio parahaemolyticus* infection a Southern Coastal Region of China. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 12, n. 11, p. 881-886, 2015.

ZHANG, X.; YAN, B.; BAI, X.; BI, K.; GAO, H.; QIN, G. Isolation and characterization of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio rotiferianus* associated with mass mortality of chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). **Journal of Shellfish Research**, v.33, n. 1, p.61-68, 2014.

ZORRIEHZAHRA, M. J.; BANAEDERAKHSHAN, R. Early mortality syndrome (EMS) as new emerging threat in shrimp industry. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, v. 3, n. 2s, p. 64-72, 2015.