



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PESCA**

**GISELLE ADAYLLANA DE VASCONCELOS SILVA**

**SUSCEPTIBILIDADE AO VÍRUS DA MIONECROSE INFECCIOSA (IMNV) DE JUVENIS DE CAMARÕES *Penaeus vannamei* CULTIVADOS SOB DIFERENTES DENSIDADES EM SISTEMA SIMBIÓTICO**

**FORTALEZA**

**2023**

GISELLE ADAYLLANA DE VASCONCELOS SILVA

SUSCEPTIBILIDADE AO VÍRUS DA MIONECROSE INFECCIOSA (IMNV) DE JUVENIS DE CAMARÕES *Penaeus vannamei* CULTIVADOS SOB DIFERENTES DENSIDADES EM SISTEMA SIMBIÓTICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Pesca. Área de Concentração: Biotecnologia e Genética de Organismos Aquáticos.

Orientador: Prof. Dr. Rubens Galdino Feijó.

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- S58s Silva, Giselle Adayllana de Vasconcelos.  
Susceptibilidade ao vírus da mionecrose infecciosa (IMNV) de juvenis de camarões *Penaeus vannamei* cultivados sob diferentes densidades em sistema simbiótico / Giselle Adayllana de Vasconcelos Silva. – 2023.  
57 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2023.  
Orientação: Prof. Dr. Rubens Galdino Feijó.
1. Carcinicultura. 2. Vias de infecção. 3. Papila viral. 4. Cepa. I. Título.
- CDD 639.2
-

GISELLE ADAYLLANA DE VASCONCELOS SILVA

SUSCEPTIBILIDADE AO VÍRUS DA MIONECROSE INFECCIOSA (IMNV) DE JUVENIS DE CAMARÕES *Penaeus vannamei* CULTIVADOS SOB DIFERENTES DENSIDADES EM SISTEMA SIMBIÓTICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Pesca. Área de Concentração: Biotecnologia e Genética de Organismos Aquáticos.

Aprovada em: 27/07/2023

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Rubens Galdino Feijó (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Rodrigo Maggioni  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Luiz Gonzaga do Nascimento Neto  
Instituto Federal do Ceará (IFCE)

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pois toda honra e glória à Ele.

À minha família. De modo especial à minha mãe Sebastiana, minhas irmãs Grasi e Rafinha e minha sobrinha Mariana.

Ao IFCE, que tive a oportunidade de estar, mais uma vez, acessando as dependências da instituição, executando o projeto propriamente dito. Agradecer de modo especial à toda equipe do LABIAq-IFCE/Acaraú naquele período: Alann, Juliana, Prof. Davi, Afonso, Débora, Aninha, Bruna, Felipe e Camila.

Ao CEDECAM, pela parceria e colaboração no processamento das amostras. Em especial, Gracinha e Rafael.

À Juliana, Jhonatas e Fágner pelas sugestões para a escrita e organização de dados deste trabalho.

Ao professor Dr. Rodrigo Maggioni pela orientação inicial no projeto do mestrado.

Ao professor, então orientador, Dr. Rubens Galdino Feijó pelas observações, reuniões e delineamento do corpo desse trabalho até aqui.

À banca na qualificação e defesa do mestrado.

À todos os amigos pela companhia e parceria durante essa etapa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## RESUMO

Doenças de agente etiológico viral acometeram e acometem a produção brasileira de camarão, a exemplo da Mionecrose Infecciosa (IMN). O estabelecimento de um equilíbrio microbiológico e ambiental em sistemas de cultivo pode permitir ótimas condições de crescimento, principalmente nas fases iniciais de desenvolvimento do camarão, quando o sistema imunológico do animal ainda está em desenvolvimento. Quanto menos desafios forem encontrados nesta fase, maior eficiência produtiva poderá ser observada. Dito isso, o presente trabalho teve como objetivo geral avaliar a susceptibilidade de juvenis de camarões *Penaeus vannamei* cultivados em sistema simbiótico ao desafio experimental com o IMNV. A metodologia consistiu na realização de desafio viral através da administração via oral (*i.e.*, *per os*) de tecido contaminado com IMNV utilizando juvenis de camarões marinhos oriundos de diferentes densidades de cultivo em sistemas simbióticos. Os dados de sobrevivência e a verificação de sinais clínicos de IMN foram registrados ao longo do experimento e tiveram 30 dias de duração. Para as análises moleculares, as coletas foram realizadas no tempo 0, 7°, 14° e 21° dia pós-infecção (d.p.i). Para as análises histopatológicas, foi observada as amostras de camarões coletados e fixados no 21° d.p.i. As curvas de mortalidade não apresentaram diferença estatística entre as curvas de sobrevivência do grupo 6 PL/L - I e o grupo controle ( $p > 0,05$ ), porém significativamente distintas dos grupos 2 PL/L - I e 4 PL/L - I ( $p < 0,05$ ). Não foram observadas alterações histopatológicas sugestivas da IMN nos animais pertencentes ao grupo controle. Já no grupo de camarões desafiados, foram observadas lesões teciduais características da doença. O desafio experimental *per os* se mostrou eficiente para o estabelecimento de um processo infeccioso em juvenis de *P. vannamei*; animais cultivados na densidade de 6 PL/L em sistemas simbióticos de cultivo se mostraram menos susceptíveis ao IMNV quando comparados com animais oriundos de cultivos simbióticos em menores densidades (2 PL/L e 4 PL/L). Os resultados de diagnóstico molecular apresentaram-se inconclusivos e variáveis entre si. Com base nas análises histopatológicas e moleculares realizadas no presente estudo recomenda-se o isolamento viral e/ou sequenciamento de DNA das amostras obtidas ao longo do desafio experimental com o intuito da identificação de novas variantes do IMNV ou de novos patógenos que venham a causar prejuízos a carcinicultura brasileira.

**Palavras-chave:** carcinicultura; vias de infecção; papila viral; cepa.

## ABSTRACT

Viral etiologic agent diseases affected and still affect Brazilian shrimp production, such as Infectious Myonecrosis (IMN). The establishment of a microbiological and environmental balance in culture systems can allow optimal growth conditions, especially in the early stages of shrimp development, when the animal's immune system is still developing. The fewer challenges encountered in this phase, the greater productive efficiency can be observed. That said, the present work had as general objective to evaluate the susceptibility of juveniles of *Penaeus vannamei* shrimp cultivated in a symbiotic system to the experimental challenge with IMNV. The methodology consisted of carrying out a viral challenge through the oral administration (i.e., *per os*) of tissue contaminated with IMNV using juvenile marine shrimp from different cultivation densities in symbiotic systems. Survival data and verification of clinical signs of IMN were recorded throughout the experiment and lasted for 30 days. For molecular analyses, collections were performed on the 0, 7th, 14th and 21st days post-infection (d.p.i). For histopathological analyses, shrimp samples collected and fixed at 21° d.p.i were observed. The mortality curves showed no statistical difference between the survival curves of the 6 PL/L - I group and the control group ( $p > 0,05$ ), but significantly different from the 2 PL/L - I and 4 PL/L - I groups ( $p < 0,05$ ). Histopathological alterations suggestive of IMN were not observed in animals belonging to the control group. In the group of challenged shrimp, tissue lesions characteristic of the disease were observed. The experimental challenge *per os* proved to be efficient for the establishment of an infectious process in juveniles of *P. vannamei*; animals grown at a density of 6 PL/L in symbiotic culture systems were less susceptible to IMNV when compared to animals from symbiotic cultures at lower densities (2 PL/L and 4 PL/L). Molecular diagnosis results were inconclusive and variable among themselves. Based on the histopathological and molecular analyzes carried out in the present study, it is recommended viral isolation and/or DNA sequencing of the samples obtained during the experimental challenge in order to identify new IMNV variants or new pathogens that may cause damage brazilian shrimp farming.

**Keywords:** shrimp farms; infection pathways; viral papilla; strains.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	8
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1	Carcinicultura brasileira.....	11
2.2	Principais enfermidades virais na carcinicultura brasileira.....	12
2.2.1	<i>Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV)</i> .....	13
2.3	Sistemas de biocontrole.....	16
2.3.1	<i>Tecnologia de Bioflocos (BFT)</i> .....	16
2.3.2	<i>Simbióticos</i> .....	18
2.4	Controle de doenças e resistência imunológica nos sistemas de biocontrole.....	19
3	METODOLOGIA.....	22
3.1	Cultivos preliminares.....	22
3.2	Preparo e validação de tecido contaminado com IMNV.....	23
3.3	Ensaio de desafio experimental para a análise da suscetibilidade ao IMNV de camarões cultivados em sistemas simbióticos.....	24
3.4	Extração de RNA e síntese de cDNA.....	26
3.5	Análises moleculares por <i>Nested</i> RT-PCR e RT-qPCR.....	27
3.6	Análise histopatológica.....	28
3.7	Análise estatística.....	29
4	RESULTADOS.....	30
4.1	Sobrevivência.....	30
4.2	Histopatologia.....	32
4.3	Análises moleculares por RT-PCR [ <i>Nested</i> RT-PCR, RT-qPCR (SYBR Green®) e RT-qPCR (TaqMan™)]......	33
5	DISCUSSÃO.....	35
6	CONCLUSÃO.....	40
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	41
	REFERÊNCIAS.....	42



**APÊNDICE A - ALINHAMENTO MÚLTIPLO ENTRE OS GENOMAS DAS VARIANTES DO IMNV E OS PRIMERS E SONDA UTILIZADAS NO PRESENTE ESTUDO.....**

## 1 INTRODUÇÃO

A aquicultura é o cultivo em um espaço confinado e controlado de organismos aquáticos tais como peixes, crustáceos, moluscos, algas, répteis e qualquer outra forma de vida aquática de interesse econômico produtivo. A atividade produtiva se divide em diferentes modalidades, onde a carcinicultura refere-se à criação de crustáceos (SCHULTER; VIEIRA FILHO, 2017).

A grande diversidade climática e condições ambientais locais em todo o mundo, deu origem a um rico e diversificado número de espécies utilizadas em diferentes condições e sistemas de produção aquícola (água doce, água salobra, água marinha e água salina interior), onde uma gama de atores costeiros vêm investindo no setor, e ao mesmo tempo, como corporações multinacionais de empresas privadas, pesquisadores, governos, organizações não governamentais ambientais e comunidades costeiras (BRITSCH; LESLIE; STOLL, 2021; SILVER *et al.*, 2015).

Em 2020, a produção de pescados pela aquicultura atingiu 87,5 milhões de toneladas (responsável por 49,0% da produção total mundial). No período de 1990 à 2020, a aquicultura mundial apresentou uma taxa média de crescimento de 6,7% ao ano (FAO, 2022).

A espécie *Penaeus vannamei* segue na liderança de cultivo mundial de crustáceos, representando 5,8 milhões de toneladas em 2020, constituindo 51,7% da produção total do que foi cultivado, isso significa que os camarões marinhos dominam a produção de crustáceos e são uma importante fonte de ganhos em moeda estrangeira para uma série de países em desenvolvimento na Ásia e na América Latina (FAO, 2022).

No Brasil, em 2021, foram produzidos 78,6 milhões de quilos de camarões marinhos cultivados, apresentando um crescimento de 18,1% em relação ao ano anterior. É uma atividade que cresce pelo quarto ano consecutivo, destacando-se a região Nordeste (principalmente os estados do Ceará e Rio Grande do Norte) com 99,7% da produção nacional, demonstrando a recuperação da atividade após a ocorrência de surtos da Síndrome da Mancha Branca (WSS) (IBGE, 2021).

Não somente a WSS, mas outras doenças de agente etiológico viral acometeram e acometem a produção nacional de camarão, a exemplo da Mionecrose Infecciosa (IMN) (SARDOU *et al.*, 2022). A IMN é uma enfermidade de notificação obrigatória (WOAH, 2021) e teve seu primeiro relato em 2002 no estado do Piauí, Brasil (LIGHTNER *et al.*, 2006) e posteriormente em países como a Indonésia, Índia e China, na Ásia (SAHUL HAMEED *et al.*, 2017; SENAPIN *et al.*, 2007; WAN *et al.*, 2023) e no Egito, na África (ALY *et al.*, 2021).

Em 2003, para os produtores brasileiros, a doença causou prejuízos estimados em US\$ 20 milhões (NUNES; MARTINS; GESTEIRA, 2004) e US\$440 milhões até o final de 2005 (ANDRADE *et al.*, 2007). Em relação ao cultivo mundial, as perdas já se concentram em valores acima de US\$ 1 bilhão (LIGHTNER, 2012).

Diferentes fatores de estresse, como oscilações de temperatura e salinidade extremas, bem como a baixa qualidade da água e deficiência alimentar, suprimem a imunidade dos organismos cultivados, aumentando o risco de um surto da doença (DUAN *et al.*, 2018; PRASAD *et al.*, 2017). Outros fatores como: períodos de mudas, fases lunares e marés, elevadas densidades de estocagem, baixos níveis de oxigênio dissolvido e alta concentração de matéria orgânica, também são gatilhos para a manifestação de doenças infecciosas (NUNES; MARTINS; GESTEIRA, 2004).

Nesse sentido, o manejo de microrganismos na água e solo, bem como equilíbrio da microbiota dos organismos cultivados a partir do uso de probióticos, prebióticos e sistemas de bioflocos são exemplos de protocolos e métodos de regimes de biocontrole que se interligam e que são implementados nas atividades aquícolas a fim de minimizar a manifestação e disseminação de enfermidades virais e/ou bacterianas, aliando sustentabilidade e produtividade (ROMANO, 2020).

Protocolos simbióticos são soluções orgânicas que apresentam desempenhos e resultados positivos em ganho de peso animal, taxa de sobrevivência, redução na quantidade de matéria orgânica nos tanques, morfologia intestinal e parâmetros hematológicos, contribuindo para um melhor equilíbrio no ambiente produtivo (LAICE *et al.*, 2021; SILVA *et al.*, 2020).

Diante de todo o incremento que o sistema simbiótico de produção oferece, resultados positivos com dietas simbióticas em desafios experimentais com patógenos bacterianos já foram documentados, como por exemplo por Yao *et al.* (2021). Contudo, até o presente momento, poucos artigos relatam aplicações diretas de manejos simbióticos em camarões cultivados, sendo mais direcionados as manipulações dietéticas, sem deixar de mencionar a escassez de projetos voltados ao estudo das enfermidades virais e sua relação com os sistemas simbióticos.

O estabelecimento de um equilíbrio microbiológico no ambiente de cultivo pode permitir ótimas condições de crescimento, principalmente nas fases iniciais de desenvolvimento do camarão, quando o sistema imunológico do animal ainda está em desenvolvimento, sendo mais suscetível a infecções por microrganismos patogênicos (ANGTHONG *et al.*, 2021; HOLT *et al.*, 2020). Quanto menos desafios forem encontrados nesta fase, maior eficiência produtiva poderá ser observada (ANGTHONG *et al.*, 2021).

Dito isso, o presente trabalho teve como objetivo geral avaliar a susceptibilidade de juvenis de *Penaeus vannamei* cultivados em sistema simbiótico ao desafio experimental com o IMNV. Como objetivos específicos, estabeleceu-se a validação da eficiência do desafio oral (*i.e.*, *per os*) para bioensaios de infecção experimental de camarões *P. vannamei* com o IMNV; e a análise da influência do cultivo simbiótico em diferentes densidades frente à infecção por IMNV. A hipótese testada defende que juvenis de *P. vannamei* cultivados em menores densidades em um sistema simbiótico são menos susceptíveis ao IMNV.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Carcinicultura brasileira

A aquicultura no Brasil começou no século XVII, mas ganhou *status* profissional apenas na década de 1970. Portanto, quando comparada a outras atividades de produção de proteína animal, é considerada como uma atividade relativamente jovem no país, com cerca de meio século de existência (VALENTI *et al.*, 2021).

As iniciativas para o cultivo de camarão no Brasil ocorreram especificamente por intermédio do governo do Rio Grande do Norte. A espécie *Penaeus japonicus* foi escolhida para produção de camarão, pois detinha-se de um conhecimento prévio sobre reprodução, larvicultura e engorda em cativeiro. Essa iniciativa envolveu a Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Norte (EMPARN) para desenvolver pacote tecnológico que possibilitasse a adaptação da espécie exótica às condições locais (FIGUERÊDO *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2015).

Ao longo de três anos, as pesquisas da EMPARN mostraram-se promissoras e alcançaram bons resultados sobre reprodução, larvicultura e engorda para o cultivo da espécie (SANTOS *et al.*, 2015). Entretanto, a viabilidade de impulsionar a carcinicultura brasileira com o *P. japonicus* foi descartada, pois faltavam mais planos de pesquisas e validações tecnológicas. Além disso, a espécie não se adaptou bem com o fim da estiagem nordestina, sendo impossível assegurar sua maturação e sobrevivência em períodos de chuvas intensas (MOLES; BUNGE, 2002; SANTOS *et al.*, 2015; SCHWAB; WEBER; LEHMANN, 2002).

Apesar da inadaptabilidade, o cultivo inicial do *P. japonicus* oportunizou a viabilização da carcinicultura no Brasil, pois havia produtores que tinham experiências com práticas de produção e manejo, além da existência de estruturas para o cultivo (fazendas e larviculturas) (ROCHA, 2014). Pesquisadores e produtores domesticaram camarões nativos para escala comercial de produção, mas o projeto durou apenas 10 anos, pois a produtividade (em termos financeiros) eram suficientes apenas para os custos de produção (RABELO; NUNES, 2006).

Na década de 1980, técnicos e produtores importaram a espécie *P. vannamei*, comumente conhecida como camarão branco do Pacífico ou camarão cinza. Essa espécie apresentou excelente desempenho no Equador e no Panamá, países situados no hemisfério ocidental, portanto suas características eram altamente adaptáveis às condições climáticas brasileiras (RODRIGUES; BORBA, 2013).

Os avanços técnicos no cultivo e manejo para produção de *P. vannamei* foi possível com o domínio tecnológico referente a reprodução e larvicultura da espécie (COSTA; SAMPAIO, 2004). Em 1995-1996, as validações tecnológicas foram se intensificando e a adaptação da espécie se apresentou viável à produção comercial nacional (TAHIM *et al.*, 2019).

Entre os anos de 1988 e 2003, a carcinicultura brasileira teve um crescimento significativo, somando mais de mais 60% ao ano (SANCHES; PANNUTI; SEBASTIANI, 2008). Porém, no período que compreendeu os anos de 2003 e 2004, a produção reduziu em 15,8% em decorrência de problemas como a ação *antidumping* (promovida pelos pescadores do sul dos Estados Unidos), desvalorização do dólar em relação ao real e manifestações de enfermidades virais que afetaram o seu desempenho global. O mercado interno foi então um dos responsáveis pela manutenção da atividade aquícola nos últimos anos, consumindo produtos e subprodutos gerados pelos setores alimentícios de camarão (OSTRENSKY; BORGHETTI; SOTO, 2008).

Com crescimentos significativos, em 2016 a produção aquícola, especificamente do estado do Ceará, teve que enfrentar o vírus da síndrome da mancha branca, causador de uma doença de maior letalidade e contágio e que ataca o epitélio cuticular, brânquias, apêndices e estômago dos camarões (NUNES; FEIJÓ, 2016). Segundo os dados do IBGE (2017), a produção nacional de camarões apresentou uma redução de 21,4% em relação ao ano anterior.

A priori, a intensificação dos sistemas produtivos seria a principal razão para o surgimento de novas enfermidades e o aumento do número de surtos. Sendo estabelecidos então manejos e técnicas de sistemas semi-intensivos ou mesmo extensivos como uma estratégia relevante (NATORI *et al.*, 2011).

No entanto, a realidade da carcinicultura nacional nos dias atuais é de intensificar os sistemas de produção (NUNES, 2019). Para isso existem gargalos que precisam ser superados, tais como as altas taxas de mortalidade devido às enfermidades ou a problemas relacionados à qualidade da água. Portanto, é necessário utilizar pós-larvas (PLs) com maior resistência e tolerância às enfermidades, bem como garantir a manutenção de boas condições de qualidade da água, controle eficiente da temperatura e uma nutrição de alta qualidade (KUBITZA, 2019; NUNES, 2019; VALENTI *et al.*, 2021).

## **2.2 Principais enfermidades virais na carcinicultura brasileira**

As enfermidades de etiologia viral são as que causam maior impacto e consequentemente maiores prejuízos econômicos e sociais à atividade de cultivo de camarão no mundo (ARULMOORTHY *et al.*, 2020). De acordo com *World Organisation for Animal Health* -

WOAH (2021), há pelo menos 5 patógenos virais de notificação obrigatória, sendo eles: *Infectious Hypodermal and Haematopoietic Necrosis Virus* (IHHNV) (BRAZ *et al.*, 2009), *Taura Syndrome Virus* (TSV) (BONAMI *et al.*, 1997), *Infectious Myonecrosis Virus* (IMNV) (NUNES; MARTINS; GESTEIRA, 2004), *White Spot Syndrome Virus* (WSSV) (SEIFFERT; WINKLER; MAGGIONI, 2005) e *Yellow Head Virus genotype 1* (YHV1) (WALKER *et al.*, 2001).

Dos patógenos relatados, a doença causada pelo vírus da Mionecrose Infeciosa (IMNV), desde a sua primeira ocorrência nos sistemas de cultivo brasileiro, vem ocasionando constantes prejuízos à indústria de camarão (NEVES; MARTINS, 2021; SOUSA *et al.*, 2019; VALENTI *et al.*, 2021).

### 2.2.1 *Vírus da Mionecrose Infeciosa (IMNV)*

O vírus da mionecrose infecciosa (IMNV) apresenta uma distribuição geográfica restrita, sendo reportado inicialmente no Brasil (LIGHTNER *et al.*, 2006), posteriormente registrado na Indonésia (SENAPIN *et al.*, 2007; PRASAD *et al.*, 2017), Índia (SAHUL HAMEED *et al.*, 2017; KOKKATTUNIVARTHIL *et al.*, 2018) e, recentemente, no Egito (ALY *et al.*, 2021) e China (WAN *et al.*, 2023).

Estudos filogenéticos baseados em sequências de RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) indicam que o agente etiológico que causa a doença estava intimamente relacionado a um outro vírus, *Giardia lamblia vírus* (GLV), sendo, pois, pertencente à família Totiviridae (DANTAS *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2014; POULOS *et al.*, 2006; TANG *et al.*, 2008). A infecção causada pelo vírus da mionecrose infecciosa, está entre as nove enfermidades de notificação obrigatória para crustáceos e listada no Manual de Testes Diagnósticos para Animais Aquáticos, disponível no portal científico internacional *World Organisation for Animal Health* - WOAH (WOAH, 2021).

O IMNV apresenta simetria icosaédrica, não envelopado, de 45 nm de diâmetro e tem densidade de 1,366 g/ml em cloreto de magnésio. O seu genoma consiste em uma única molécula de fita dupla de RNA (dsRNA) com 8.226 pb. O sequenciamento do genoma viral revelou ainda uma organização em dois quadros de leitura aberta sobrepostas (ORFs). A ORF1, localizada na extremidade 5', compreende 5.127 nt e codifica uma proteína de ligação a RNA putativa e uma proteína de capsídeo, enquanto que o ORF2, na extremidade 3', compreende 2.739 nt e contém a sequência para a codificação da RdRp (POULOS *et al.*, 2006; SENAPIN *et al.*, 2007; NAIM *et al.*, 2015).

Andrade *et al.* (2022) publicaram a descoberta de uma nova variante brasileira de IMNV (Br-1), com 8.185 pb. Esse resultado evidencia riscos para a cadeia produtiva de camarão devido à dificuldade de diagnosticar tais variantes, causando uma subnotificação da enfermidade, sem deixar de mencionar a falta de informações frente o perfil patogênico e de virulência dessas estirpes (VIANA *et al.*, 2022).

A mionecrose infecciosa tem maior ocorrência durante a estação seca, em ciclos de cultivo mais longos e em altas densidades de estocagem (SILVA *et al.*, 2010). Tendo essas condições no ambiente perdurando por vários dias, a enfermidade avança cada vez mais, principalmente levando em consideração que o sistema imunológico de camarões infectados com IMNV respondem apenas em um estágio tardio da doença, quando a recuperação do animal é improvável (COSTA *et al.*, 2009).

Na fase aguda da doença, o camarão apresenta áreas focais a extensas regiões necróticas brancas nos músculos estriados esqueléticos, especialmente nos segmentos distal-abdominais e no leque caudal (LIGHTNER *et al.*, 2004; POULOS *et al.*, 2006). O organismo severamente afetado, demonstrando tais sinais clínicos, torna-se moribundo e a mortalidade pode chegar a 70%, principalmente após um evento de estresse (tais como redes lançadas para captura, variações bruscas na temperatura e salinidade da água) (LIGHTNER, 2011; NUNES *et al.*, 2004).

O estresse induzido pelo ambiente parece ser o principal gatilho para o início crônico e agudo da IMN (POULOS *et al.*, 2006) causando até mesmo infecções múltiplas. As perdas econômicas para a indústria da carcinicultura resultantes de uma coinfeção ainda são difíceis de quantificar e pouco se sabe sobre as interações patógeno-ambiente e patógeno-patógeno em tal cenário (FEIJÓ *et al.*, 2013).

Teixeira-Lopes *et al.* (2011), durante um programa de monitoramento de rotina, detectaram a presença de IHHNV e IMNV em *P. vannamei* simultaneamente. Feijó *et al.* (2013), relataram coinfeção de IMNV e WSSV em camarão branco do Pacífico cultivado no Brasil. E Cruz-Flores *et al.* (2022), detectaram coinfeção de PvSV e IMNV, associada a mortalidades massivas nos cultivos de camarão brasileiro.

A transmissão da doença pode acontecer de maneira horizontal: canibalismo, contaminação pela água e fezes de aves marinhas que se alimentam de camarões moribundos e na própria fonte de alimento natural do camarão (por exemplo, microcrustáceo *Artemia franciscana*) (LIGHTNER, 2011; SILVA *et al.*, 2015a; WOA, 2021) ou por transmissão vertical, dos reprodutores para a prole (SILVA *et al.*, 2016).

Os procedimentos de detecção da Mionecrose Infecciosa envolvem uma série de metodologias e mecanismos de rotina, realizadas principalmente a partir de ferramentas moleculares,



tais como: transcrição reversa seguida por reação em cadeia da polimerase em uma ou duas etapas (*one-step* RT-PCR ou *two-step* RT-PCR) (POULOS; LIGHTNER, 2006; SENAPIN *et al.*, 2007) e RT-PCR em tempo real usando sonda de hibridização TaqMan ou com fluoróforo intercalante SYBR Green (RT-qPCR) (ANDRADE *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2011).

Outras ferramentas moleculares seriam a amplificação isotérmica mediada por *loop* de transcrição reversa e ensaio híbrido de fluxo lateral de ácido nucleico (RT-LAMP-NALF) (ANDRADE; LIGHTNER, 2009), RT-LAMP com uma vareta de medição de fluxo lateral (RT-LAMP-LFD) (PUTHAWIBOOL *et al.*, 2009) e teste de fita imunocromatográfica com sensibilidade aprimorada para a detecção do vírus da mionecrose infecciosa (CHAVISUTHANGKURA *et al.*, 2013; WANGMAN *et al.*, 2016), detecção da proteína do capsídeo principal do vírus usando anticorpos monoclonais (SEIBERT *et al.*, 2010) bem como sistema multiplex PCR baseado em oligonucleotídeo de iniciação dupla (DPO), que detecta simultaneamente vírus de DNA e RNA (SEE *et al.*, 2021).

As alterações citológicas ocasionadas pelo IMNV podem ser evidenciadas por técnicas histopatológicas com coloração por hematoxilina e eosina Mayer-Bennett (H & E) e por hibridização *in situ* (ISH) (ANDRADE, REDMAN; LIGHTNER, 2008; TANG *et al.*, 2005).

As lesões teciduais caracterizadas pela doença são: músculos estriados com recorrente necrose coagulativa multifocal, geralmente acompanhada de acúmulo de líquido entre as fibras musculares, infiltração hemocítica e fibrose. Corpos de inclusão basofílicos escuros também podem ser visualizados dentro do citoplasma das células musculares, em hemócitos, células do tecido conjuntivo e em esferóides no órgão linfóide (ANDRADE, REDMAN; LIGHTNER, 2008; TANG *et al.*, 2005).

A prevenção e o controle da IMN, bem como de outras doenças virais que acometem o camarão, dependem, principalmente, da aplicação de princípios de biossegurança, boas práticas de manejo, imunostimulantes na alimentação e o uso de reprodutores livres ou resistentes de patógenos específicos (SPF ou SPR), a fim de minimizar a propagação na operação de cultivo de *P. vannamei*, pois não existem vacinas ou terapias eficazes para o IMNV (SILVA *et al.*, 2016; SUNARTO; NAIM, 2016; PUSPASARI; WIDOWATI, 2022).

## 2.3 Sistemas de biocontrole

O uso de microrganismos na aquicultura é uma das estratégias mais viáveis para alcançar um sistema sustentável. Resultados bem-sucedidos no uso de sistemas baseados nesses organismos já foram documentados em todo o mundo (BAÑUELOS-VARGAS *et al.*, 2021; HUSSAIN *et al.*, 2021). Em suma, esses sistemas baseiam-se na promoção da comunidade microbiana, sejam microrganismos autotróficos ou heterotróficos, tais como bactérias, ciliados, flagelados, nematoides e microalgas, servindo como fonte direta de alimento para os organismos cultivados, melhoria na qualidade ambiental e efeito modulador no controle de doenças infecciosas; espera-se que esses organismos usem, reciclem e transformem o excesso de nutrientes das fezes, organismos mortos, alimentos não consumidos e diversos metabólitos em biomassa, melhorando a qualidade da água, o metabolismo e a sanidade dos animais (GOH *et al.*, 2022; MARTÍNEZ-CÓRDOVA *et al.*, 2014; ROMANO, 2020).

### 2.3.1 Tecnologia de Bioflocos (BFT)

Na intensificação de sistema de produção de camarões, conseqüentemente há maior oferta de ração e a necessidade de aeração artificial constante, onde pontos limitantes são deflagrados, tais como qualidade de água, devido ao acúmulo de metabólitos em altas densidades de cultivo, bem como a ação de doenças bacterianas e/ou virais emergentes (NUNES, 2019).

A tecnologia de bioflocos entra em cena como uma ferramenta de eficiência produtiva e sustentável, pois permite uma menor descarga e reposição de água, ganho imunológico, bem como otimização do crescimento e sobrevivência semanal de camarões (KUBITZA, 2019, PANIGRAHI *et al.*, 2020).

O cultivo em bioflocos caracteriza-se por um sistema com altas densidades de estocagem (entre 200-400 camarões/m<sup>2</sup>) e fertilizado com fontes ricas em carbono para estimular o surgimento de uma microbiota (que compreende flocos constituídos por bactérias, algas, protozoários e zooplânctons) e que tem a capacidade de assimilar os compostos nitrogenados e transformá-los em proteína microbiana. O sistema BFT requer altas taxas de oxigenação e circulação da água, necessário para o metabolismo microbiano e para a manutenção da homeostase do organismo cultivado (AVNIMELECH, 1999; WEI; LIAO; WANG, 2016).

Diferente do uso de biofiltros em aquicultura, onde classicamente os alimentos não consumidos e/ou fezes são rapidamente removidos, no sistema de bioflocos esses resíduos (partículas inorgânicas e orgânicas), são reaproveitados o máximo possível. As partículas orgânicas

servem de substrato para o crescimento de bactérias heterotróficas, que por vez são importantíssimas para remoção de amônia no sistema, além de diminuir custos com o alimento artificial (AVNIMELECH, 2006; EMERENCIANO *et al.*, 2017).

A otimização dessas células microbianas ricas em proteínas pode variar dependendo de diversos fatores físico-químicos, tais como a relação carbono/nitrogênio (C:N) (MARTINEZ-CORDOVA *et al.*, 2014). Na relação C:N do substrato orgânico, Avnimelech (2006) relatou que quando há a adição de substrato carbonáceo ou alimentação equivalente de baixa proteína, ocorre uma diminuição da amônia e de outras espécies de nitrogênio inorgânico na água.

De acordo com Correia *et al.* (2014) essa possível redução nos níveis de proteína bruta da ração em sistema BFT, não causam prejuízos fisiológicos/nutricionais aos animais cultivados. O biofoco pode servir como fonte de alimento rico em nutrientes ao longo do dia, tais como aminoácidos, proteínas nativas, ácidos graxos e lipídios na forma de diversos microrganismos, e assim promover a redução do fornecimento externo de ração, consequentemente reduzindo os custos de produção (PANIGRAHI *et al.*, 2018; PANIGRAHI *et al.*, 2019). Outros estudos, por sua vez, defendem o uso dos flocos microbianos como uma alimentação suplementar aliada ao manejo padrão de alimentação artificial, em virtude da variabilidade de composição dos flocos, das diferenças nutricionais entre os flocos e a ração e a dificuldade de substituição integral ou parcial da dieta artificial nutricionalmente balanceada (EL-SAYED, 2020).

Quando a relação entre carbono e nitrogênio está bem balanceada, um efeito benéfico em cadeia ocorre: amônia e excretas nitrogenadas são convertidas em biomassa bacteriana e a adição de carboidratos estimula o crescimento de bactérias heterotróficas, aumentando o consumo de compostos nitrogenados para síntese proteica bacteriana (AVNIMELECH, 1999; AVNIMELECH, 2009; CRAB *et al.*, 2012).

Diferentes fontes de carbono podem ser utilizadas para a estimular o crescimento dos biofocos no cultivo, mantendo a relação C:N nos sistemas, tais como: farelo de arroz, farelo de tapioca, farelo de trigo, melaço de cana-de-açúcar, amido de mandioca, acetado, glicerol, entre outros (EMERENCIANO *et al.*, 2012; VILANI *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2017; ROMANO *et al.*, 2018).

Vários estudos avaliam a qualidade da água, taxa de sobrevivência, crescimento e expressão gênica relacionada às vias metabólicas de *P. vannamei* em diferentes proporções de C:N, tendo resultados aprimorados e significativos em biofocos com C:N de 12-15:1 (CHAKRAPANI *et al.*, 2021; PANIGRAHI *et al.*, 2019; LORENZO *et al.*, 2016; ABBASZADEH *et al.*, 2019).

O conhecimento preciso da composição, estrutura e estabilidade microbiana de um biofoco e seu valor nutricional pode fornecer informações valiosas para melhor compreender a relação ambiente-microbiota-hospedeiro e otimizar a composição da comunidade bacteriana para qualidade de água ideal, desempenho de crescimento e potencial imunomodulador na criação do sistema (PANIGRAHI *et al.*, 2018).

### 2.3.2 Simbióticos

Na aquicultura, o uso de prebióticos, probióticos e simbióticos vem ganhando cada vez mais espaço devido seus inúmeros benefícios (ABDEL-LATIF *et al.*, 2022; BUTT *et al.*, 2021). Os prebióticos dizem respeito às fibras alimentares não digeridas que servem de base e suplemento para o crescimento de bactérias no trato digestório do animal (GUAN; FENG, 2022) e os probióticos são espécies bacterianas que, após instalado um prebiótico, se proliferam no organismo (EL-SHAADONY *et al.*, 2021). Os simbióticos vêm a ser então a combinação de produtos prebióticos e probióticos, manejados e dosados de maneira correta, estimulando as comunidades bacterianas intestinais benéficas e aprimorando, em última análise, as taxas de sobrevivência, bem-estar e saúde animal (CEREZUELA; MESEGUER; ESTEBAN, 2011; HUANG *et al.*, 2023).

Em sistemas simbióticos de cultivo, a manipulação bacteriana ocorre como no sistema BFT, contudo é um método que apresenta certas particularidades, tais como a fonte de carbono que é utilizada para a formação dos flocos, por exemplo *bokashi*, e probiótico, ocorrendo fermentação e purificação do sistema. Além disso, a quantidade de flocos é bem reduzida quando comparados aos sistemas de bioflocos tradicionais. Para tal, a quantidade de carbono adicionado é menor, pois há um comportamento homeostático da comunidade microbiana, indicando uma possível independência do frequente fornecimento de nutrientes, principalmente de carbono (PIMENTEL *et al.*, 2021; PIMENTEL *et al.*, 2023; ROMANO; KUMAR, 2017).

O *bokashi* é um adubo orgânico fermentado (SIQUEIRA; SIQUEIRA, 2013). O método envolve a adição do farelo de arroz (que atua como um prebiótico) e que junto a adição de bactérias probióticas resulta em um efeito simbiótico (FOOTER, 2014). Compreende principalmente as espécies de bactérias ácido-láticas, a exemplo dos gêneros *Lactobacillus*, *Pedococcus*, *Bifidobacterium*, entre outros (SUSSEL, 2021). O *bokashi* também é um aditivo funcional de alimentação para as dietas à base de proteínas vegetais na aquicultura (LIM *et al.*, 2021).

Os simbióticos podem fornecer efeitos sinérgicos para o cultivo de camarões marinhos (SILVA *et al.*, 2020). Em resultados preliminares, esses autores avaliaram a influência da fermentação anaeróbica e aeróbica de farelo (arroz e trigo) e melação no cultivo de camarão marinho na fase de berçário. Em conclusão, a utilização da fermentação de carboidrato (simbiótico) apresentou efeitos positivos, considerando os parâmetros de desempenho zootécnico, com valores de sobrevivência superiores a 90% e fator de conversão alimentar médio de 1,07, atingindo produtividades de 1,99 kg/m<sup>3</sup>.

A fermentação de farelo de arroz e adição de *Bacillus*, foram testadas no cultivo de bagres africanos (*Clarias gariepinus*) por Romano *et al.* (2018). O uso desse simbiótico melhorou significativamente o crescimento, a eficiência alimentar e a proteína bruta do peixe. Portanto, o uso de farelo de arroz fermentado e *Bacillus* pode ser uma estratégia altamente eficaz em sistema de troca zero de água, ao mesmo tempo que melhora significativamente o crescimento e a eficiência alimentar dos organismos cultivados (ROMANO *et al.*, 2018).

O sistema simbiótico compreende menor aporte de carbono, facilitando cultivos intensivos em maiores áreas, melhor distribuição homogênea entre as bactérias heterotróficas e nitrificantes (possibilitando a formação de flocos bacterianos e a remoção do nitrogênio residual do sistema), disponibilidade de alimento natural para os organismos cultivados (fitoplâncton e zooplâncton) e a redução na carga orgânica, tendo, pois, menores concentrações de sólidos suspensos e uma maior estabilidade quanto aos compostos nitrogenados quando comparado aos sistemas intensivos (OLIVEIRA *et al.*, 2022; PIMENTEL *et al.*, 2021; PIMENTEL *et al.*, 2023).

#### **2.4 Controle de doenças e resistência imunológica nos sistemas de biocontrole**

O sistema BFT traz inúmeros benefícios para o cultivo de camarão, dentre eles: melhores condições de biossegurança, menor ou nenhuma troca de água, melhora da imunidade dos animais cultivados, maior sustentabilidade e um aumento na produtividade (COSTA; JÚNIOR, 2018). O ambiente rico em microrganismos oferecidos pelo sistema BFT pode atuar como um imunoestimulante, evitando a disseminação sistêmica de patógenos (PILOTTO *et al.*, 2020).

No estudo realizado por Silva e colaboradores (2021), a adição de *Brachionus plicatilis* e *Navicula* sp. contribuíram para melhores parâmetros de desempenho de camarões no sistema de bioflocos de viveiro. Mesmo que não houvesse um efeito significativo sobre a resistência do camarão ao WSSV, o uso do tratamento BFT-N (Biofoco total com adição de *Navicula* sp.)

apresentou-se benéfico em virtude da ausência de lesões no tecido do estômago de camarões infectados com WSSV (SILVA *et al.*, 2021).

A aplicação da tecnologia bioflocos pode contribuir para a robustez do camarão cultivado por imunestimulação e que esse efeito é independente do tipo de fonte de carbono usada para cultivar os flocos microbianos. Essa conclusão é apresentada por Ekasari *et al.* (2014), após realizarem um teste de desafio por injeção com o vírus da mionecrose infecciosa (IMNV), os níveis de atividade fenoloxidase (PO) e explosão respiratória (RB) nos camarões de todos os tratamentos com bioflocos foram maiores do que os dos camarões desafiados do tratamento controle. Um aumento da imunidade também foi sugerido pela sobrevivência do camarão desafiado nos grupos de bioflocos experimentais, que foi significativamente maior em comparação aos camarões desafiados no tratamento controle.

Boopathy, Kern e Corbin (2015), demonstraram a eficiência dos bioflocos ao adicionar um inóculo de *Bacillus* sp., onde houve um aumento no processo de remoção da amônia e nitrito da água, além de suprimir o crescimento de patógenos na água, como o *Vibrio harveyi*.

Os níveis de expressão de mRNA dos genes de resposta imune de *P. vannamei* são regulados positivamente nos sistemas de bioflocos, desempenhando assim um papel essencial na imunidade inata do camarão. Em bioflocos tratados com 40% de proteína, os genes imunes de camarão foram altamente regulados, como *SOD*, *serina protease*, peptídeos antimicrobianos, *cMnSOD*, *hemocianina*, *profenoloxidase (proPO)* e *peroxinectina*, conforme estudo de Panigrahi *et al.* (2019).

Panigrahi e colaboradores (2020), demonstram que em geral o sistema de cultivo em viveiro baseado em bioflocos são eficazes para o desempenho de crescimento, qualidade da água, tolerância a doenças da dinâmica microbiana e expressão de genes imunológicos de *P. vannamei*. Alguns genes imunológicos como a *proPO*, *crustina*, *MAS*, *serina protease*, *alfa-2-M*, genes antivirais e *RAN* são regulados positivamente nos tratamentos com bioflocos, podendo melhorar o sistema imunológico do camarão quando desafiado contra cepas patogênicas (PANIGRAHI *et al.*, 2020).

Os simbióticos também têm sido amplamente usados para promover o crescimento e o sistema imunológico dos animais aquáticos, aumentando a colonização das comunidades bacterianas intestinais que resultam na promoção de benefícios à saúde, através do aumento das respostas imunológicas, diminuindo assim a mortalidade cumulativa após um desafio por um patógeno específico (HUYNH *et al.*, 2017).

A administração de dietas simbióticas reforça as propriedades antioxidantes da imunidade inata dos organismos cultivados (DEVI *et al.*, 2019). Yao *et al.* (2021) apresentam que a

suplementação de simbióticos na dieta do camarão branco do Pacífico melhora significativamente o desempenho de crescimento, utilização de ração, imunidade não específica, saúde intestinal e resistência à infecção por *Vibrio parahaemolyticus*.

Suplementação simbiótica também gera um incremento na atividade de THC, fenoloxidase, fagocitose e produção de ânions superóxidos, além de regular positivamente a expressão de genes envolvidos no sistema ativador do proPO (*ProPO2* e *A2M*) e defesas antioxidantes (*SOD* e *GPx*), e a de peptídeos antimicrobianos (*Pen2*, *ALF*, *Crus* e *Lyz*) (ABIDIN *et al.*, 2022).

Oktaviana e colaboradores (2014), após realizarem estudos com o intuito de avaliar os efeitos sobre as respostas imunes virais e a coinfeção bacteriana dada ao camarão branco do Pacífico, concluíram que dieta suplementada simbiótica diária apresenta maiores taxas de sobrevivência e maiores valores na contagem total de hemócitos (THC), PO e RB, em comparação ao controle positivo, prevenindo, então, a coinfeção por IMNV e *V. harveyi* em *P. vannamei*.

### 3 METODOLOGIA

O presente estudo consistiu na realização de desafio viral experimental através da administração via oral (*per os*) de tecido contaminado com IMNV em juvenis de camarões marinhos oriundos de sistema simbiótico de produção. Para isso, foi realizada a produção, validação e quantificação viral de tecido infectado IMNV para a etapa de infecção experimental utilizando juvenis de camarões *P. vannamei*. Para o desafio experimental, juvenis de camarão oriundos de diferentes densidades de cultivo simbiótico foram alimentados com tecidos de camarões infectados com o IMNV. Análises moleculares por *Nested* RT-PCR e RT-PCR e histopatológicas foram executadas para o monitoramento da evolução da IMN em camarões oriundos de sistemas simbióticos de produção.

#### 3.1 Cultivos preliminares

Os juvenis de camarões *P. vannamei* utilizados no desafio experimental foram oriundos de cultivo (em estufa) em densidades de 2, 4 e 6 pós-larvas (PLs/L). Os animais foram inicialmente povoados com peso médio de 0,003g, totalizando um número de 20.000, 40.000 e 60.000 PLs/tanque.

As PLs foram mantidas em tanques circulares elevados de PEAD (Polietileno de Alta Densidade) com um volume útil de 10m<sup>3</sup>, sob aeração constante, alimentadas diariamente com ração comercial (40% de proteína). Ao sistema de cultivo foi adicionado probiótico e farelo de arroz como fonte de carbono e substrato para o estímulo do crescimento de populações de bactérias heterotróficas e demais microrganismos de sistemas simbióticos.

O cultivo foi mantido em salinidade 32 ppt, oxigênio dissolvido 6,65 mg/L<sup>-1</sup>, pH 8,05 e sólidos em suspensão de 2 ml/L<sup>-1</sup> (COUTINHO, 2022). O manejo com a manipulação de C:N resultam em menores quantidades de sólidos suspensos, mantendo, pois, as concentrações de amônia em níveis fisiológicos toleráveis aos animais cultivados, seguindo o proposto por Romano e Kumar (2017).



### 3.2 Preparo e validação de tecido contaminado com IMNV

Camarões *P. vannamei* sintomáticos para a IMN foram obtidos de fazendas de cultivo no estado de Ceará com histórico de altos índices de mortalidade nos sistemas de produção (Figura 1).

Figura 1. Exemplo de camarão utilizado para a obtenção de macerado de tecido infectado com sinal clínico sugestivo para mionecrose infecciosa.



Fonte: Própria autora.

Aproximadamente 3 kg de camarões sintomáticos para a IMN foram acondicionados em gelo e transportados para o Centro de Diagnóstico de Enfermidades de Organismos Aquáticos (CEDECAM) - Labomar-UFC, para a homogeneização do tecido e aplicação de técnicas de diagnósticos moleculares para a detecção do IMNV.

As amostras de tecido muscular abdominal dos camarões selecionados foram maceradas e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, a técnica de RT-qPCR foi utilizada para confirmar a presença do IMNV no macerado de tecido recém preparado, seguindo protocolo descrito por Andrade *et al.* (2007), bem como qPCR para confirmar a ausência do WSSV (NUNAN; LIGHTNER, 2011) e do IHHNV (BRAZ *et al.*, 2009), para validar que o tecido estava exclusivamente infectado por IMNV, conforme protocolo adaptado de Prior *et al.* (2003).

### 3.3 Ensaios de desafio experimental para a análise da suscetibilidade ao IMNV de camarões cultivados em sistemas simbióticos

O desafio viral foi conduzido na unidade experimental instalada nas dependências do Laboratório de Biotecnologia Aquícola (LABIAq) do Instituto Federal do Ceará, *campus* Acaraú. A unidade experimental compreendeu 20 aquários de plástico injetado com capacidade de 20 L (29 x 23 x 41,7 cm), dos quais foram preenchidos em 15 L. Em cada aquário havia a conexão de dois canos PVC, um para o abastecimento e outro para a drenagem, tendo a água da drenagem direcionada para um sistema de desinfecção antes do descarte no ambiente (Figura 2).

Figura 2. Unidade experimental de desafio viral do Laboratório de Biotecnologia Aquícola do IFCE/Acaraú (LABIAq-IFCE/Acaraú).



Fonte: Própria autora.

Os juvenis de *P. vannamei* utilizados foram fornecidos pelo próprio LABIAq, provenientes dos seus cultivos simbióticos em estufa (conforme descrito no subtópico 5.1). Após 31 dias do cultivo em sistema simbiótico, os juvenis com peso de aproximadamente  $0,48\text{g} \pm 0,018\text{g}$ ,  $0,26\text{g} \pm 0,011\text{g}$  e  $0,18\text{g} \pm 0,033\text{g}$ , oriundos, respectivamente, dos cultivos com densidade 2, 4 e 6 PLs/L, foram transferidos para as unidades experimentais de desafio viral, mantidos em “água clara”, sob aeração constante, havendo renovação de 50% da água a cada 24

horas. Os parâmetros físico-químicos foram monitorados e mantidos nas seguintes condições: pH 7,5, alcalinidade de 100 mg/L de CaCO<sub>3</sub>, temperatura de 25 a 28°C, salinidade 30 ppt e fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro.

Para o desafio viral, os juvenis oriundos das densidades de 2 PL/L, 4 PL/L e 6 PL/L em cultivo simbiótico foram mantidos a uma densidade de 3 juvenis/litro durante 30 dias de desafio viral, com 3 repetições cada, totalizando 1.080 juvenis. Os aquários foram identificados de acordo com a densidade de origem e o alimento fornecido, conforme descrição a seguir: I) juvenis alimentados com macerado de tecido infectado com IMNV e ração comercial e II) juvenis alimentados exclusivamente com ração comercial (grupo controle), conforme ilustrado na Figura 3.

Em todos o grupo infectado houve uma alternância na oferta da alimentação, sendo alimentados com tecido de camarão contaminado com o IMNV duas vezes ao dia (08h00 e 14h00) e ração comercial também duas vezes ao dia (11h00 e 17h00), durante 7 dias, ambos em uma quantidade correspondente a 5% da biomassa estocada. Ao final dos 7 dias, os animais infectados foram alimentados exclusivamente com ração comercial, até o fim do experimento. No grupo controle, no decorrer do bioensaio, os juvenis foram alimentados apenas com ração comercial, 4 vezes ao dia (08h00, 11h00, 14h00 e 17h00), também em uma quantidade correspondente a 5% da biomassa estocada.

Os dados de sobrevivência dos camarões e a verificação de sinais clínicos característicos de IMN foram registrados 2 vezes ao dia (8h00 e 17h00) durante todo o experimento. Para as análises moleculares por *Nested* RT-PCR e RT-qPCR foram amostrados 5 camarões por aquário, randomicamente selecionados. Para as análises moleculares, as coletas foram realizadas no tempo 0 (antes do desafio *per os*), e no 7°, 14° e 21° dia pós-infecção (d.p.i). Para as análises histopatológicas, foram coletados e fixados 5 camarões por aquário no 21° d.p.i com tecido contaminado com o IMNV.

Figura 3. Desenho representativo da organização dos aquários do desafio *per os* identificados de acordo com a densidade de origem e alimento fornecido. Controle: ração comercial. Infectado: ração comercial + tecido contaminado.



Fonte: Própria autora.

### 3.4 Extração de RNA e síntese de cDNA

Para a realização das análises moleculares de diagnóstico, o RNA total foi extraído de amostras de pleópodos com a utilização do reagente Trizol (Invitrogen®), seguindo as instruções do fabricante. As amostras foram incubadas durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, foi adicionado 200  $\mu\text{L}$  de clorofórmio, sendo agitado durante 1 minuto no vórtex, e logo depois incubadas a temperatura ambiente por 15 min. Em seguida, para a separação das fases, as amostras foram centrifugadas a  $12.000\times g/15 \text{ min}/4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Em um tubo de 1,5 mL, transferiu-se 450  $\mu\text{L}$  da fase superior (RNA total), já contendo 500  $\mu\text{L}$  de álcool isopropílico. As amostras foram novamente incubadas durante 15 minutos, e centrifugadas a  $12.000\times g$  por 10 min a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . O sobrenadante foi removido por inversão, com total atenção para não perder o pélete. Subseqüentemente, as amostras foram lavadas com 1 mL de etanol 75%, agitadas no vórtex e centrifugadas a  $7.500\times g/5 \text{ min}/4 \text{ }^\circ\text{C}$ . O etanol foi descartado e os tubos invertidos sobre um papel toalha para secagem em temperatura ambiente (10 minutos).

O RNA total foi eluído em 40 µL de água ultrapura (Invitrogen®) e a sua quantificação foi a partir do espectrofotômetro NanoDrop® 2000 da ThermoFisher Scientific, com espectro de absorção com um pico característico em 260 nm. O cDNA foi sintetizado com o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Life Technologies®) em um volume de 10 µL de reação final contendo 1 µL de RT Buffer (10×), 0,4 µL de dNTPs mix (25×), 1 µL de RT random primers (10×), 0,5 µL de MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50 U), 2,1 µL de H<sub>2</sub>O Nuclease-Free e 5,0 µL de RNA total. As amostras foram inseridas no termociclador Veriti™ 96-well thermal cycler (Applied Biosystems®) a 25°C/10 min, seguidos de 37°C/120 min e 85°C/5 min. O cDNA foi armazenado a -20°C para posteriormente ser utilizado nas análises de quantificação viral por RT-qPCR.

### 3.5 Análises moleculares por *Nested* RT-PCR e RT-qPCR

As reações de RT-qPCR para a quantificação da carga viral foram realizadas em um volume final de 10 µL, contendo 5 µL TaqMan™ Universal Master Mix II com UNG (Applied Biosystems®), 0,3 µL (10 µM) de cada *primer*, IMNV412F (5'-GGA-CCT-ATC-ATA-CAT-AGC-GTT-TGC-A-3') e IMNV545R (5'-AAC-CCA-TAT-CTA-TTG-TCG-CTG-GAT-3'), 0,15 µL (10µM) da sonda de hidrólise (IMNVp1) (5'-6FAM CCA-CCT-TTA-CTT-TCA-ATA-CTA-CAT-CAT-CCC-CGG TAMRA-3'), 1 µL (10-25 ng) de cDNA e 3,25 µL de água ultrapura (Invitrogen®). A verificação qualitativa das amostras foi feita utilizando-se o fluoróforo intercalante SYBR Green® (Invitrogen®), nas seguintes proporções: 5 µL de *Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen®), 0,3 µL (10 µM) de cada *primer*, 0,2 µL do corante ROX, 1 µL de cDNA e 3,2 µL de água ultrapura (Invitrogen®), totalizando 10 µL de reação final; os *primers* utilizados foram os mesmos da reação quantitativa, com exceção da sonda de hidrólise.

Um controle negativo, contendo todos os reagentes (com exceção do cDNA alvo) e uma série de diluições (10×) do controle positivo pTOPO-IMNV equivalente a 10<sup>8</sup>, 10<sup>7</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>2</sup> cópias do IMNV também foram adicionados à placa para a reação da RT-qPCR. O controle positivo pTOPO-IMNV consiste de uma construção genética resultante da ligação de um fragmento de 908 pb do IMNV ao pCR® 2.1-TOPO vector (Invitrogen®).

Como teste adicional, realizou-se também uma adaptação da RT-PCR convencional e uma adaptação da RT-qPCR utilizando *primers* da 2ª etapa da *nested*-PCR (POULOS; LIGHTHER, 2006) a fim de detectar as novas variantes do IMNV. Os *primers* utilizados foram

4725NF (5'-GGCACATGCTCAGAGACA-3') e 4863NR (3' - AGCGCTGAGTCCAGTCTTG-5'). As concentrações de reagentes e condições de termociclagem adotadas para ambas as adaptações seguiram o descrito pela WOAAH (2021) para o segundo passo da *nested*-PCR e os controles foram os mesmos mencionados anteriormente. Além disso, para a *Nested* RT-PCR houve ainda a etapa de eletroforese para revelar os *amplicons* gerados, sendo realizada em gel de agarose a 1,5%, fotodocumentado pelo sistema EDAS 290 (Kodak®) e as imagens processadas pelo *software* KODAK 1D ImageAnalysis (Kodak®).

Para a verificação e a quantificação do número de cópias do IMNV foi utilizada a plataforma 7500 Real-time PCR system (Applied Biosystems®). As condições de amplificações obedeceram aos seguintes passos: incubação a 50°C por 2 min, seguido da ativação da Platinum®Taq DNA polimerase a 95°C por 2 min, com 40 ciclos de 15s a 95°C e por fim 30s a 60°C. Os dados foram coletados durante a etapa de extensão final (60°C). O número de cópias virais de cada amostra foi estipulado de acordo com o *software* SDS 1.3.1 (Applied Biosystems®).

Todas as amostras foram testadas em duplicata e foram consideradas positivas quando ambas as réplicas apresentaram amplificação válida. A quantificação do número de cópias do IMNV, *primers* e sonda descritos foram baseados nas metodologias de Poulos *et al.* (2006) e Andrade *et al.* (2007), sugeridos pela WOAAH (2021).

### 3.6 Análise histopatológica

Para análise histopatológica, as amostras de camarões foram fixadas em solução de Davidson's AFA (11,5% de ácido acético, 22% de formalina e 33% de etanol) e imersas nessa mesma solução por 24 horas, conforme Bell e Lightner (1998). Os tecidos foram cortados, armazenados em histocassetes e desidratados em banhos sucessivos de teor crescente de álcool (70% a 100%) e, em seguida, diafanizados em xilol e inclusos por parafina por meio do processador automático LUPETEC PT05 e emblocados com auxílio do emblocador HESTION TEC 2800. Após 24 horas foram realizados os cortes histológicos com espessura de 5 µm no micrótomato LEICA MR2125RT. 24 horas após fixação do tecido na lâmina, foram corados com hematoxilina e eosina, onde as lamínulas foram fixadas com Entellan™ (Sigma-Aldrich®). As lâminas histológicas foram visualizadas em microscópio óptico para avaliação de lesões sugestivas de infecção por IMNV.

### **3.7 Análise estatística**

A curva de sobrevivência dos organismos foi comparada entre as diferentes densidades do sistema simbiótico utilizando o teste de Log-rank (Mantel-Cox), estimado pela metodologia Gehan-Breslow-Wilcoxon. Foram considerados significativamente estatísticos os resultados com nível de confiança de 95,0% ( $p < 0,05$ ). Para realização dessas análises, utilizou-se o software GraphPad©.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Sobrevivência

No 8º d.p.i foram observadas as primeiras mortalidades nos aquários de 2, 4 e 6 PL/L infectados com tecido contaminado com IMNV, sendo nos 14º e 20º d.p.i as ocorrências de maiores mortalidades nesse mesmo grupo (Figura 4). No grupo controle, 6 PL/L - C apresentou o menor valor de mortalidade média, com 0,19% ao dia; seguido de 2 PL/L - C, com 0,22%, sendo o maior valor de mortalidade média atribuído a 4 PL/L - C, com 11,1%. Entre o grupo infectado, o menor registro de sobrevivência foi de 2 PL/L - I, com uma mortalidade média de 2,67% de camarões por dia, seguindo de 4 PL/L - I, com média de 2,41% e 6 PL/L - I com média de 0,78% ao dia.

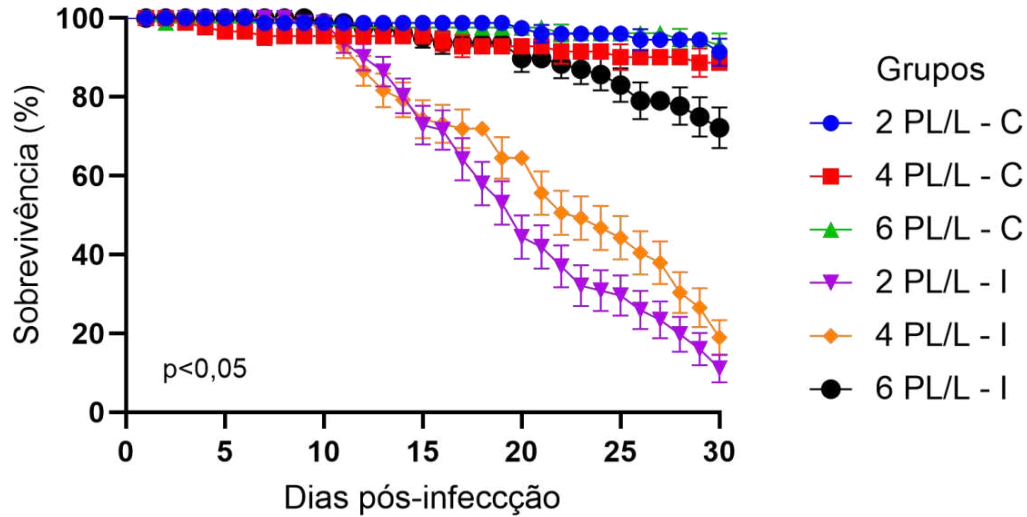
Ao final do desafio, os juvenis do grupo controle, 2 PL/L - C, 4 PL/L - C, e 6 PL/L - C, obtiveram uma sobrevivência de 93,2%, 88,9% e 94,4%, respectivamente. Já os juvenis do grupo que receberam tecido infectado, totalizaram sobrevivência de 20,0% (2 PL/L - I), 27,8% (4 PL/L - I) e 76,7% (6 PL/L - I).

A partir da análise de Long-rank (Montel-cox), as curvas de mortalidade entre o grupo controle e infectados apresentaram diferenças estatísticas significativas entre si ( $p < 0,05$ ), com exceção de 6 PL/L - I onde não foram verificadas diferenças estatísticas entre as curvas de sobrevivência do grupo controle ( $p > 0,05$ ), mas que foi significativamente distinto do 2 PL/L - I e 4 PL/L - I ( $p < 0,05$ ).

Juvenis do grupo controle, além da sobrevivência média de 92,2% ao longo dos 30 dias do experimento, não foram observados sinais clínicos macroscópicos sugestivos de mionecrose infecciosa. A Figura 5 demonstra as ocorrências de sinais clínicos sugestivos da doença e mortalidade nos aquários do grupo infectado com manejo de tecido positivo para IMNV. A verificação de sinais clínicos foi realizada diariamente ao longo de todo o experimento e em todos os aquários.



Figura 4. Sobrevivência dos camarões pertencentes aos grupos controles e infectados ao longo de 30 dias de infecção experimental *per os* com extrato de tecido contaminado com IMNV. Legenda: 2, 4 e 6 PL/l – densidade de cultivo; C - controle; I – Infectados.



Fonte: Própria autora.

Figura 5. Registro de camarões com músculo opaco nos aquários alimentados com tecido positivo para IMNV.

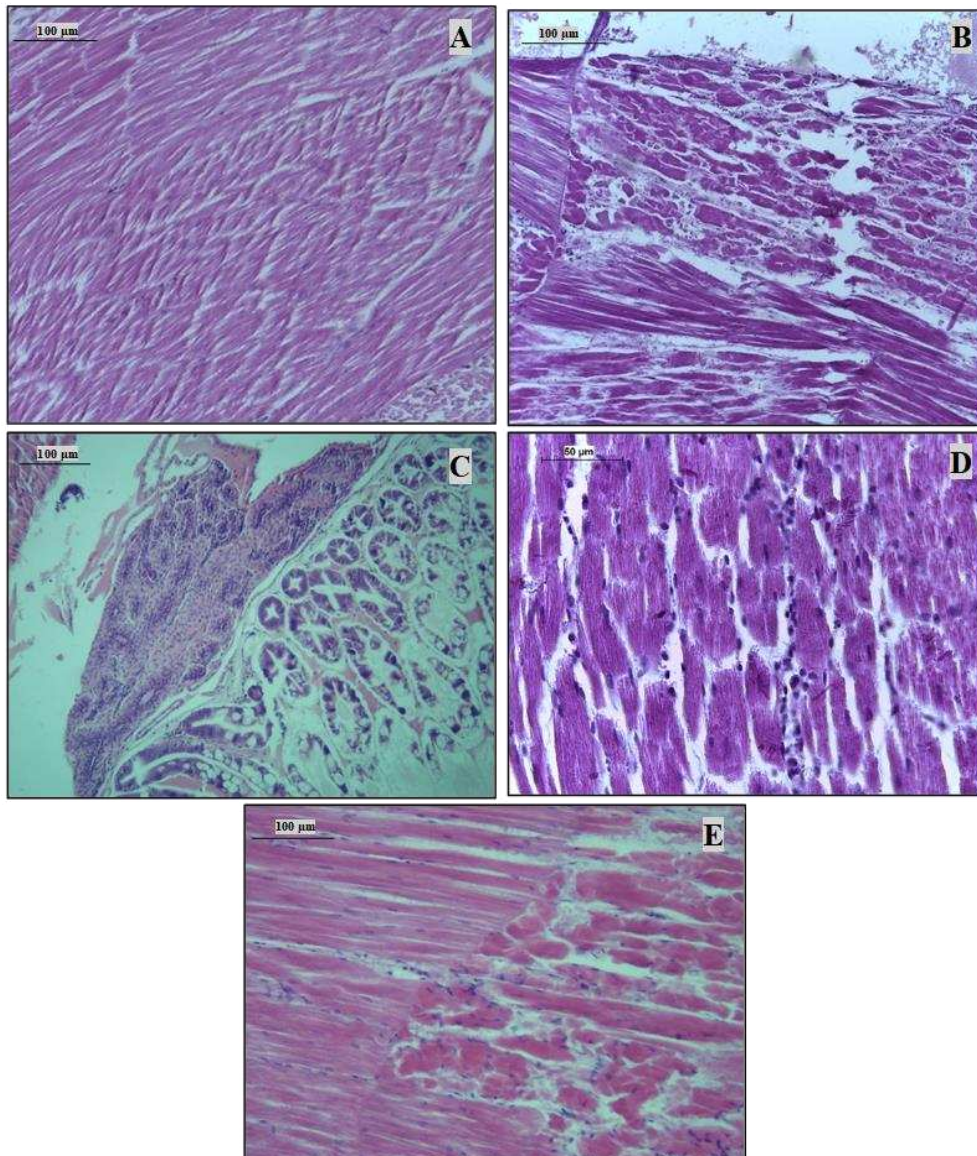


Fonte: Própria autora.

## 4.2 Histopatologia

Não foram observadas alterações histopatológicas sugestivas da doença da mionecrose infecciosa nos juvenis do grupo controle. Já nos juvenis do grupo infectado, foram observadas lesões teciduais características da doença, como: leve infiltração hemocítica nos músculos estriados, fibrose, necrose de liquefação com substituição do tecido muscular por tecido fibroso e esferóides no órgão linfóide (Figura 6).

Figura 6. Fotomicrografia de cortes histológicos corados com H&E referentes ao grupo controle (A) e infectado (B, C, D, E) do desafio experimental. A – Tecido muscular saudável. B – Fibrose no tecido muscular. C - Esferóide no órgão linfóide. D - Infiltração hemocítica no tecido muscular. E - Necrose de liquefação com substituição do tecido muscular por tecido fibroso. Aumento com objetiva: 4 e 10x.



Fonte: Própria autora.

### 4.3 Análises moleculares por RT-PCR [*Nested* RT-PCR, RT-qPCR (SYBR Green®) e RT-qPCR (TaqMan™)]

O tecido infectante de IMNV apresentou uma carga de  $1,5 \times 10^4$  cópias de IMNV/ $\mu\text{g}$  de RNA total (macerado viral).

Pode-se observar que no grupo controle, os animais da densidade de origem 4 PL/L-C foi identificado uma carga viral apenas no T21, com valor de  $9,57 \times 10^1$  cópias do IMNV/ $\mu\text{g}$  de RNA total, conforme a Tabela 1. Outra densidade do grupo controle com identificação positiva para o IMNV foi 6 PL/L-C, quantificado apenas no T14 (14º d.p.i), com uma carga viral de  $2,88 \times 10^2$  cópias do IMNV/ $\mu\text{g}$  de RNA total.

Nos aquários do grupo infectado, 2 PL/L-I apresentou  $2,72 \times 10^2$  e  $4,94 \times 10^3$  cópias do IMNV/ $\mu\text{g}$  de RNA total no T7 e T21, respectivamente. Os aquários com densidade de origem 4 PL/L-I,  $9,20 \times 10^2$  e  $1,54 \times 10^3$  cópias do IMNV/ $\mu\text{g}$  de RNA total no T7 e T21. E 6 PL/L-I também registrando quantificação no T7 e T21 com  $2,14 \times 10^2$  e  $2,28 \times 10^4$  cópias do IMNV/ $\mu\text{g}$  de RNA total, respectivamente.

A Tabela 1 apresenta ainda o comparativo entre os resultados obtidos nas análises moleculares por *Nested* RT-PCR, RT-qPCR (SYBR Green® e Taqman™).

Tabela 1. Comparativo entre os resultados das metodologias de PCR utilizadas no presente trabalho. Legenda: 2, 4 e 6 PL/L – densidade de cultivo; C - controle; I – Infectados. Tempos de coleta: T0; T7; T14; T21 (coletas realizadas ao longo do experimento). Resultados da PCR: +: Positivo e Nd: Não detectado.

(continua)

Tempo de coleta	Grupos	<i>Nested</i> RT-PCR	RT-qPCR (SYBR Green®)	RT-qPCR (Taqman™)
T0	2PL/L – C	Nd	Nd	Nd
	4PL/L – C	Nd	Nd	Nd
	6PL/L – C	Nd	Nd	Nd
	2PL/L – I	Nd	Nd	Nd
	4PL/L – I	Nd	Nd	Nd
	6PL/L – I	Nd	Nd	Nd
T7	2PL/L – C	Nd	Nd	Nd
	4PL/L – C	+	+	Nd
	6PL/L – C	+	Nd	Nd
	2PL/L – I	+	+	$2,72 \times 10^3 \pm 0,37 \times 10^1$
	4PL/L – I	Nd	Nd	$9,20 \times 10^2 \pm 0,56 \times 10^1$
	6PL/L – I	+	+	$2,14 \times 10^2 \pm 0,39 \times 10^1$

Fonte: Própria autora.

Tabela 1. Comparativo entre os resultados das metodologias de PCR utilizadas no presente trabalho. Legenda: 2, 4 e 6 PL/l – densidade de cultivo; C - controle; I – Infectados. Tempos de coleta: T0; T7; T14; T21 (coletas realizadas ao longo do experimento). Resultados da PCR: +: Positivo e Nd: Não detectado.

(conclusão)

Tempo de coleta	Grupos	<i>Nested</i> RT-PCR	RT-qPCR (SYBR Green®)	RT-qPCR (Taqman™)
T14	2PL/L – C	+	Nd	Nd
	4PL/L – C	+	+	Nd
	6PL/L – C	+	Nd	$2,88 \times 10^2 \pm 0,83 \times 10^1$
	2PL/L – I	+	Nd	Nd
	4PL/L – I	+	Nd	Nd
	6PL/L – I	+	Nd	Nd
T21	2PL/L – C	Nd	Nd	Nd
	4PL/L – C	Nd	Nd	$9,57 \times 10^1 \pm 0,21 \times 10^1$
	6PL/L – C	Nd	Nd	Nd
	2PL/L – I	+	+	$4,94 \times 10^3 \pm 0,76 \times 10^1$
	4PL/L – I	+	+	$1,54 \times 10^3 \pm 0,65 \times 10^1$
	6PL/L – I	+	Nd	$2,28 \times 10^4 \pm 0,12 \times 10^1$

Fonte: Própria autora.

## 5 DISCUSSÃO

Para esta pesquisa realizou-se um desafio viral *per os* em juvenis de *P. vannamei*, a fim de analisar a influência do cultivo simbiótico em diferentes densidades frente à infecção por IMNV. Diversos são os trabalhos que têm como objetivo investigar, e/ou atualizar, a eficiência de um sistema/manejo, onde metodologias como os bioensaios de infecção são constantemente aplicadas (ANAYA-ROSAS *et al.*, 2019; HERNÁNDEZ-SANDOVAL *et al.*, 2022; RAHI *et al.*, 2022). O procedimento de infecção é simulado conforme a via de exposição, dose infectante e tempo, observando variáveis como sobrevivência, crescimento e resposta imune, por exemplo (AGUILERA-RIVERA *et al.*, 2018; GARCÍA-MENDEL *et al.*, 2020; YILDIRIM-AKSOY *et al.*, 2022).

Os testes são delineados para que se possa desenvolver todo esse pacote experimental, a fim de entender o comportamento e interações de um patógeno naquele determinado contexto ambiental, além de avaliar estratégias que reduzam a propagação da doença (ESCOBEDO-BONILLA *et al.*, 2005; ESCOBEDO-BONILLA *et al.*, 2006; RAMOS-CARREÑO *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2015b; VALENTE *et al.*, 2020).

As vias comumente utilizadas em bioensaios de infecção viral são: injeção intramuscular (NOBLE *et al.*, 2020), alimentação dos animais com tecidos infectados (*per os*) (CARO *et al.*, 2023) e imersão dos animais em um ambiente contaminado com carga viral diluída (NOBLE *et al.*, 2017).

Nos desafios virais, a via intramuscular é um método constantemente utilizado por fornecer o meio mais uniforme e confiável para infectar os camarões, pois há uma dose definida sendo entregue à cada animal, analisando-se padrões de mortalidade relacionados à doença em um período de tempo estabelecido. Por meio dessa técnica é possível também avaliar produtos antivirais de forma mais precisa, bem como desenvolver diagnósticos altamente sensíveis e específicos para uma doença, por exemplo (ESCOBEDO-BONILA *et al.*, 2006; HOWLADER *et al.*, 2020; KUMAR *et al.*, 2022; LIU *et al.*, 2019).

No entanto, é um método que não reproduz uma rota de transmissão natural, pois as partículas virais se espalham rapidamente por toda a hemolinfa, superando barreiras físicas e atingindo células suscetíveis em um curto intervalo de tempo (ESCOBEDO-BONILA *et al.*, 2006; THUONG *et al.*, 2016a), além de ser exaustivo a sua aplicação em larga escala (NOBLE *et al.*, 2017).

Nos testes de desafio *per os*, as ofertas das cargas de infecção são menos uniformes e necessita-se de maior tempo para a mortalidade cumulativa alcançar 50%, por exemplo (NOBLE *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2015b; THUONG *et al.*, 2016a). Contudo, é considerada um método simples e econômico, reprodutível em larga escala, e que mimetiza as infecções naturais que ocorrem em fazendas de camarão por canibalismo (SATO; NISHIZAWA; YOSHIMIZU, 2008; SILVA *et al.*, 2015b; DOMÍNGUEZ-BORBOR *et al.*, 2019; JHA *et al.*, 2020).

É importante considerar que durante a alimentação, as partículas que estão na água são lixiviadas, permitindo outras vias de infecção (DEY *et al.*, 2020; DOMÍNGUEZ-BORBOR *et al.*, 2019; HAMANO *et al.*, 2015), correlacionando, indiretamente, por exemplo, às metodologias de “desafio por imersão”, que têm o processo da muda e lesões na cutícula como um impacto na transmissão do vírus (CORTEEL *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2021; THUONG *et al.*, 2016b).

Em complemento, o trabalho de Gryse *et al.* (2020) demonstra que as regiões sem revestimento cuticular, à exemplo do “Nefrocomplexo”, são importantes portas de entrada de vírus, bem como Liu *et al.* (2021) que apresentam a glândula antenal como uma rota de infecção de WSSV, onde o estresse salino pode induzir uma replicação mais rápida da doença. Logo, o desafio *per os* permite que haja diferentes processos naturais de infecção ocorrendo simultaneamente.

Sendo assim, para esse estudo, a metodologia *per os* se mostrou eficiente na propagação da infecção nos camarões pertencentes ao grupo desafiado, evidenciado pela presença de sinais clínicos e mortalidades ao longo do experimento, contribuindo com outros trabalhos que também demonstram a eficiência do método como descrito por Sabry-Neto e Nunes (2015) ao validaram que a sobrevivência do *P. vannamei* começou a diminuir progressivamente após o desafio *per os* com IMNV.

Embora *per os* seja de uma aplicação técnica mais simples, ela é efetiva em estudos de produtos antivirais complexos, como o observado por Jha *et al.* (2020) que confirmaram a propagação do vírus através de tecido infectado pelo IMNV, com taxas de sobrevivências específicas; testando e validando a ação antiviral do extrato etanólico de *Cynodon dactylon* frente ao vírus em questão.

A infecção *per os* também é viável em estudos de identificação de agentes infecciosos, como demonstrado por Yang *et al.* (2022) que isolaram três cepas altamente letais de *V. parahaemolyticus* de diferentes fazendas e, mediante *per os*, foi possível reproduzir a mesma patologia em animais experimentais e reisolá-las com sucesso.

Os resultados do presente estudo relataram menor mortalidade na maior densidade de origem (6 PL/L), tanto no grupo controle, quanto infectado, com sobrevivência final de 94,4% e 76,7% respectivamente. Para o presente estudo, o cultivo de camarões em alta densidade em sistema simbiótico parece não ter uma relação direta com o aumento da susceptibilidade a infecções virais. Diferentemente do que foi observado por Lin *et al.* (2015), ao cultivar *P. vannamei* em 2, 10, 20, 30 e 40 camarões L<sup>-1</sup>, onde as taxas de mortalidades eram maiores nos tratamentos de maiores densidades de cultivo, com redução nos níveis de transcrição de genes imunológicos que influenciam na resposta fagocitária e na depuração do organismo contra a doença.

Irani *et al.* (2023) também demonstra que a alta densidade populacional se apresenta como um estressor crônico, diminuindo a sobrevivência e crescimento dos organismos aquáticos, pois reduz significativamente a expressão do gene *IGF-I* (fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1), levando a um declínio na absorção de aminoácidos e ácidos graxos e seu armazenamento na forma de proteínas e lipídios.

Embora vários trabalhos apresentem o efeito negativo da alta densidade de cultivo em relação à sobrevivência e, por consequência, aos parâmetros imunológicos do animal (NATH; HALDAR, 2020; SAID, EL-BARBARY; AHMED, 2022; TAO *et al.*, 2021; WANG *et al.*, 2019), 6 PL/L, mesmo que originalmente de maior densidade, apresentava menor biomassa, pois eram animais de menor gramatura. Já 2 PL/L (menor densidade) apresentou maior biomassa dentre os grupos, o que pode justificar os resultados obtidos em virtude da oferta de uma maior quantidade de tecido infectado que foi ofertado com base na biomassa animal estocada.

Domínguez-Borbor *et al.* (2019), ao realizarem desafio *per os* com WSSV, observaram que à medida que se incrementava os valores de proporção de tecidos infectados distribuídos aos camarões durante o desafio, a carga viral também aumentava, significativamente. Em proporção de 1,5, 2,5, 5,0 e 10,0% do músculo camarão infectado pelo WSSV, continham  $3,14 \times 10^6$ ,  $1,13 \times 10^7$ ,  $1,80 \times 10^7$  e  $6,29 \times 10^8$  cópias virais por  $\mu\text{g}$ , respectivamente, gerando maior registro de mortalidade no sistema conforme à biomassa ofertada. Ou seja, diferentes valores de biomassa, provocam diferentes níveis de mortalidade, correlacionadas, significativamente, com a carga viral.

No caso da mionecrose infecciosa, por exemplo, os primeiros relatos de surtos da doença registraram taxas de mortalidade variando entre 30 e 70%, relacionadas à primeira variante identificada (NUNES; MARTINS; GESTEIRA, 2004). Já no caso de surtos ocasionados pela variante mais recente (MZ593846), os relatos apontam mortalidades mínimas de 80%, atrelado ao fato dessa mesma variante apresentar uma maior distância genética em relação às demais,

corroborando para as diferenças fenotípicas e a consequente agressividade da infecção (ANDRADE *et al.*, 2022). Sabry-Neto e Nunes (2015) realizaram desafio com IMNV e registraram uma carga viral de  $1,82 \times 10^3$  cópias de IMNV/ $\mu$ L RNA com sobrevivência média de 23,2% no grupo infectado. Interessantemente, para o presente estudo, a maior carga viral detectada por RT-qPCR foi de  $2,28 \times 10^4$  cópias do IMNV/ $\mu$ g de RNA total, para camarões pertencentes ao grupo 6 PL/L-I, com sobrevivência média de 76,7%.

A carga viral não responde unicamente pela letalidade de uma doença, sendo os índices de mortalidade também influenciados pela condição do hospedeiro, especialmente com relação a genética, nutrição e imunologia, e pela qualidade ambiental na qual os mesmos estão inseridos, caracterizado pelo trinômio hospedeiro-patógeno-ambiente (KIBENGE, 2016; SNIESZKO, 1973).

No que diz respeito ao patógeno, as características fenotípicas dos mesmos devem ser identificados, pois é sabido que diferentes estirpes apresentam diferenças de patogenicidade, virulência e manifestação de sinais clínicos (VIANA *et al.*, 2022), notificando-se, ano após ano, novas cepas virais e/ou bacterianas, e em diferentes grupos de animais de cultivo (ABBADI *et al.*, 2021; ANDRADE *et al.*, 2022; CRUZ-FLORES *et al.*, 2022; ERRANI *et al.*, 2022; LI *et al.*, 2022; LIAO *et al.*, 2022; XU *et al.*, 2023).

O monitoramento de vírus nos sistemas de cultivo, a partir de metodologias moleculares de diagnóstico, são de suma importância para que se possa assegurar uma eficiência produtiva (VOLPE *et al.*, 2023). Dentre os vários métodos diagnósticos que foram desenvolvidos ao longo dos anos para identificar o IMNV, a *nested* RT-PCR e RT-qPCR são os testes padrão-ouro de diagnóstico recomendados pela WOA (2021).

Ambos os métodos fornecem resultados precisos e confiáveis (ANDRADE *et al.*, 2007; SENAPIN *et al.*, 2007; POULOS; LIGHTNER, 2006). No entanto, houve uma discordância entre os resultados referentes a detecção do IMNV por *Nested* RT-PCR e RT-qPCR (SYBR e TaqMan) obtidos no presente estudo (Tabela 1).

Inconsistências nos resultados de diagnóstico de PCR também foram observadas por Sritunyalucksana *et al.* (2006), ao comparar os métodos de PCR para detecção do WSSV na Tailândia, argumentando-se que os resultados altamente variáveis seriam mais prováveis de surgir quando da ocorrência de uma baixa quantidade de vírus na amostra original (e no extrato de DNA resultante) do que de um protocolo de teste com falhas.

Sabe-se que mutações no genoma viral podem ocasionar polimorfismos que dificultam, ou até mesmo impedem, o anelamento dos *primers* durante uma PCR, impossibilitando a iden-



tificação do fragmento alvo, gerando a não detecção ou subnotificação de um vírus (MUSTHAQ *et al.*, 2006; VIANA *et al.*, 2022). Assim, para o presente estudo, a partir de uma análise complementar, verificou-se, por alinhamento múltiplo entre todas as sequências catalogadas no GenBank até o momento, os polimorfismos já identificados e seu impacto no anelamento de *primers* e da sonda de hidrólise utilizados (APÊNDICE A).

O alinhamento realizado identificou que ambos os *primers* do primeiro passo da *nested-PCR* não são eficientes para se anelarem às sequências genéticas referentes às variantes KF8366757 e KJ636782 (GenBank); e além disso, o *primer reverse* dessa mesma etapa não se anela às sequências EF061744, KJ636783 e MZ593846 (GenBank). Os *primers* do segundo passo da *nested-PCR*, por sua vez, são complementares a todas as sequências. Contudo, a amplificação do segundo passo é prejudicada em decorrência da não complementaridade do primeiro passo, possivelmente causando a subnotificação de cinco das nove variantes conhecidas.

Ao abordarmos a RT-qPCR sob a mesma perspectiva de alinhamento e complementaridade às sequências genéticas das variantes, observamos que ambos os *primers* e sonda não são compatíveis à cepa MZ593846 (GenBank). Além disso, o *primer forward* não é complementar à KR815474 (GenBank); o *primer reverse*, às sequências EF061744, KF8366757, KJ636782 e KJ636783 (GenBank); e a sonda IMNVp1, às KJ636782 e KJ636783 (GenBank), totalizando 6 sequências provavelmente subdiagnosticadas pela abordagem em tempo real. Quando verificamos a *nested-PCR* e a RT-qPCR simultaneamente, observamos que a variante mais recente não é detectável por qualquer das metodologias empregadas.

As observações de tais fatos culminaram em uma proposta de adaptação entre as duas técnicas, empregando o par de *primers* do segundo passo da *nested-PCR* (4725NF e 4863NR) à amplificação qualitativa por RT-qPCR, uma vez que esse par de *primers* se mostrou complementar a todas as sequências e gera um *amplicon* compatível com a técnica de tempo real.

Contudo, os dados obtidos continuaram inconclusivos, levantando algumas hipóteses como, possivelmente o desenho dos *primers* ser específico para reações convencionais do tipo *nested*, que variam suas cargas virais relativas ao longo da infecção (ESCOBEDO-BONILLA, 2021), gerando os resultados dessincronizados apresentados da Tabela 1.

Com base em evidências moleculares e sinais clínicos identificados nos camarões experimentados no presente estudo, recomenda-se a investigação da possibilidade da coinfeção do IMNV com outras variantes do patógeno (ANDRADE *et al.*, 2022), além da ocorrência de outras enfermidades virais com sintomatologias similares às atribuídas a IMN, a exemplo da ocorrência do nodavírus de *Penaeus vannamei* (PvNv) (TANG *et al.*, 2007) ou ainda de infecção associada a *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* (SINGARAVEL *et al.*, 2020).

## 6 CONCLUSÃO

- O desafio *per os* é eficiente para estabelecer um processo infeccioso em juvenis de *P. vannamei*.
- Animais cultivados na densidade de 6 PL/L em sistemas simbióticos de cultivo se mostraram menos susceptíveis a infecção quando comparados às menores densidades, 4 e 2 PL/L.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os resultados obtidos sugerem a ocorrência de uma nova variante do IMNV ainda não relatada ou até mesmo a ocorrência de um novo patógeno com manifestações clínicas similares a IMN.
- Recomenda-se o isolamento viral e/ou sequenciamento de DNA das amostras obtidas no presente estudo para a identificação de novas variantes do IMNV e, consequentemente, o desenvolvimento de novos *primers* para o diagnóstico molecular.

## REFERÊNCIAS

- ABBASZADEH, A. *et al.* Effects of different carbon sources and dietary protein levels in a biofloc system on growth performance, immune response against white spot syndrome virus infection and cathepsin L gene expression of *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture Research**, [S. l.], v. 50, n. 4, p. 1162-1176, 2019.
- ABDEL-LATIF, H. M. R. *et al.* Shrimp vibriosis and possible control measures using probiotics, postbiotics, prebiotics, and synbiotics: A review. **Aquaculture**, [S. l.], v. 551, p. 737951, 2022.
- ABIDIN, Z. *et al.* Effect of dietary supplementation with *Moringa oleifera* leaf extract and *Lactobacillus acidophilus* on growth performance, intestinal microbiota, immune response, and disease resistance in whiteleg shrimp (*Penaeus vannamei*). **Fish & Shellfish Immunology**, [S. l.], v. 127, p. 876-890, 2022.
- AGUILERA-RIVERA, D. *et al.* Immune response of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, previously reared in biofloc and after an infection assay with *Vibrio harveyi*. **Journal of the World Aquaculture Society**, [S. l.], v. 50, n. 1, p. 119-136, 2018.
- ALY, S. M. *et al.* Studies on infectious myonecrosis virus (IMNV) and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in cultured penaeid shrimp in Egypt. **Dis. Aquat. Org.**, [S. l.], v. 143, p. 57-67, 2021.
- ANAYA-ROSAS, R. E. *et al.* Effects of a co-culture of marine algae and shrimp (*Litopenaeus vannamei*) on the growth, survival and immune response of shrimp infected with *Vibrio parahaemolyticus* and *White Spot Virus* (WSSV). **Fish & Shellfish Immunology**, [S. l.], v. 87, p. 136-143, 2019.
- ANGTHONG, P. *et al.* Transcriptomic analysis of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) reveals insights into immune development in their early life stages. **Sci. Rep.** [S. l.], v. 11, p. 13881, 2021.
- ANDRADE, T. P. D. *et al.* Novel infectious myonecrosis virus (IMNV) variant is associated with recent disease outbreaks in *Penaeus vannamei* shrimp in Brazil. **Aquaculture**, [S. l.], v. 544, p. 738159, 2022.
- ANDRADE, T. P. D.; LIGHTNER, D. V. Development of a method for the detection of infectious myonecrosis virus by reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification and nucleic acid lateral flow hybrid assay. **Journal of Fish Diseases**, [S. l.], v. 32, p. 911-924, 2009.
- ANDRADE, T. P. D.; REDMAN, R. M.; LIGHTNER, D. V. Evaluation of the preservation of shrimp samples with Davidson's AFA fixative for infectious myonecrosis virus (IMNV) in situ hybridization. **Aquaculture**, [S. l.], v. 278, p. 179-188, 2008.
- ANDRADE, T. P. D. *et al.* Real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay using TaqMan probe for detection and quantification of Infectious myonecrosis virus (IMNV). **Aquaculture**, [S. l.], v. 264, p. 9-15, 2007.

- ARULMOORTHY, M. P. *et al.* Major viral diseases in culturable penaeid shrimps: a review. **Aquaculture International**, [S. l.], v. 28, p. 1939-1967, 2020.
- AVNIMELECH, Y. Bio-filters: The need for an new comprehensive approach. **Aquacultural Engineering**, [S. l.], v. 34, p. 172–178, 2006.
- AVNIMELECH, Y. **Biofloc technology – A practical guide book**. The Word Aquaculture Society. Batom Rouge, Lousiana. 2009. 182p.
- AVNIMELECH, Y. Carbon / nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. **Aquaculture**, [S. l.], v. 176, p. 227-235, 1999.
- BAÑUELOS-VARGAS, I. *et al.* Antioxidant and immune response of juvenile red tilapia (*Oreochromis* sp) cultured at different densities in sea water with biofloc plus probiotics. **Aquaculture**, [S. l.], v. 544, p. 737112, 2021.
- BELL, T.; LIGHTNER, D. V. **A handbook of normal penaeid shrimp histology**. 1. ed. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Luisiana, 1988. 114p.
- BONAMI, J. R. *et al.* Taura syndrome of marine penaeid shrimp: characterization of the viral agent. **J. Gen. Virol.**, [S. l.], v. 78, p. 313–319, 1997.
- BOOPATHY, R.; KERN, C.; CORBIN, A. Use of Bacillus consortium in waste digestion and pathogen control in shrimp aquaculture. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v. 102, p. 159–164, 2015.
- BRAZ, R. F. S. *et al.* Prevalence of infectious hypodermal and hematopietic necrosis virus (IHHNV) in *Penaeus vannamei* cultured in northeastern Brazil. **Aquaculture**, [S. l.], v. 228, n. 1-2, p. 143-146, 2009.
- BRITSCH, M. L.; LESLIE, H. M.; STOLL, J. S. Diverse perspectives on aquaculture development in Maine. **Marine Policy**, [S. l.], v. 131, p. 104697, 2021.
- BUTT, U. D. *et al.* Overview of the latest developments in the role of probiotics, prebiotics and synbiotics in shrimp aquaculture. **Fish & Shellfish Immunology**, [S. l.], v. 114, p. 263-281, 2021.
- CARO, L. F. A. A laboratory challenge model for evaluating enyterocytozoon hepatopenaei susceptibility in selected lines of pacific whiteleg shrimp *Penaeus vannamei*. **Journal of Invertebrate Pathology**, [S. l.], v. 196, p. 107853, 2023.
- CORTEEL, M. *et al.* Molt stage and cuticle damage influence white spot syndrome virus immersion infection in penaeid shrimp. **Vet. Microbiol**, [S. l.], n. 137, v. 3-4, p. 209-216, 2009.
- CEREZUELA, R.; MESEGUER, J.; ESTEBAN, M. A. Current Knowledge in Synbiotic Use for Fish Aquaculture: A Review. **Journal of Aquaculture Research & Development**, [S. l.], v. 1, p. 1-7, 2011.

- CHAVISUTHANGKURA, P. *et al.* Simple and rapid detection of infectious myonecrosis virus using a immunochromatographic strip test. **Arch. Virol.**, [S. l.], v. 158, p. 1925-1930, 2013.
- CHAKRAPANI, S. *et al.* Three different C:N ratios for Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei* under practical conditions: Evaluation of growth performance, immune and metabolic pathways. **Aquaculture Research**, [S. l.], v. 52, n. 3, p. 1255-1266, 2021.
- CORREIA, E. S. *et al.* Intensive nursery production of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* using two commercial feeds with high and low protein content in a biofloc-dominated system. **Aquacultural Engineering**, [S. l.], v. 59, p. 48-54, 2014.
- COSTA, A. M. *et al.* Immune assessment of farm-reared *Penaeus vannamei* shrimp naturally infected by IMNV in NE Brazil. **Aquaculture**, [S. l.], v. 291, p. 141–146, 2009.
- COSTA, B. B.; JÚNIOR, D. P. S. Cultivo de camarões em sistemas de bioflocos no Brasil: uma alternativa sustentável às intensificações na aquicultura. **Arq. Ciên. Mar**, Fortaleza, v. 51, n. 2, p. 116 – 130, 2018.
- COSTA, E. F.; SAMPAIO, Y. Geração de empregos diretos e indiretos na cadeia produtiva do camarão marinho cultivado. **Revista Economia Aplicada**, [S. l.], v. 8, n. 2, p. 1-19, 2004.
- COUTINHO, Alann Guedes. **Avaliação da densidade de estocagem de pós-larvas de camarões *Penaeus vannamei* em sistema simbiótico de cultivo**. 2022. 52f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca). Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2022.
- CRAB, R. *et al.* Biofloc technology in aquaculture: Beneficial effects and future challenges. **Aquaculture**, [S. l.], v. 356-357, p. 351-356, 2012.
- CRUZ-FLORES, R. *et al.* Identification of a Novel Solinvivirus with Nuclear Localization Associated with Mass Mortalities in Cultured Whiteleg Shrimp (*Penaeus vannamei*). **Viruses**, [S. l.], v. 14, n. 10, p. 2220, 2022.
- DANTAS, M. D. A. *et al.* Analysis of new isolates reveals new genome organization and a hypervariable region in infectious myonecrosis virus (IMNV). **Virus Research**, [S. l.], v. 203, n. 4, p. 66-71, 2015.
- DEVI, G. *et al.* Effect of symbiotic supplemented diet on innate-adaptive immune response, cytokine gene regulation and antioxidant property in *Labeo rohita* against *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**, [S. l.], v. 89, p. 687-700, 2019.
- DEY, B. K. *et al.* Causative agent, diagnosis and management of white spot disease in shrimp: A review. **Reviews in Aquaculture**, [S. l.], v. 12, n.2, p. 822-865, 2020.
- DOMÍNGUEZ-BORBOR, C. *et al.* An effective white spot syndrome virus challenge test for cultured shrimp using different biomass of the infected papilla. **MethodsX**, [S. l.], v. 6, p. 1617-1626, 2019.

- DUAN, Y. *et al.* Physiological and immune response in the gills of *Litopenaeus vannamei* exposed to acute sulfide stress. **Fish & Shellfish Immunology**, [S. l.], v. 81, p. 161-167, 2018.
- EKASARI, J. *et al.* Immune response and disease resistance of shrimp fed biofloc grown on different carbon sources. **Fish & Shellfish Immunology**, [S. l.], v. 41, p. 332-339, 2014.
- EL-SAYED, A. F. M. Use of biofloc technology in shrimp aquaculture: a comprehensive review, with emphasis on the last decade. **Reviews in Aquaculture**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 676-705, 2020.
- EL-SHAADONY, M. T. *et al.* The functionality of probiotics in aquaculture: An overview. **Fish & Shellfish Immunology**, [S. l.], v. 117, p. 36-52, 2021.
- EMERENCIANO, M. G. C. *et al.* Biofloc Technology (BFT): A Tool for Water Quality Management in Aquaculture, p. 91-109. In: TUTU, H. (edt.). **Water Quality**. IntechOpen, London, p.92-109, 2017.
- EMERENCIANO, M. G. C. *et al.* Biofloc technology application as a food source in a limited water exchange nursery system for pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817). **Aquaculture Research**, [S. l.], v. 43, n. 3, p. 447-457, 2012.
- ERRANI, F. *et al.* Development and diagnostic validation of a one-step multiplex RT-PCR assay as a rapid method to detect and identify Nervous Necrosis Virus (NNV) and its variants circulating in the Mediterranean. **PLOS ONE**, [S. l.], v. 17, n. 8, p. 1-16, 2022.
- ESCOBEDO-BONILLA, C. M. Mini review: Virus interference: History, types and occurrence in crustaceans. **Front. Immunol.**, [S. l.], v. 12, p. 674216, 2021.
- ESCOBEDO-BONILLA, C. M. *et al.* *In vivo* titration of White Spot Syndrome Virus (di) in specific pathogen-free *Litopenaeus vannamei* by intramuscular and oral routes. **DAO**, [S. l.], v. 66, p. 163-170, 2005.
- ESCOBEDO-BONILLA, C. M. *et al.* Standardized White Spot Syndrome Virus (WSSV) inoculation procedures for intramuscular or oral routes. **DAO**, [S. l.], v. 68, p.181-188, 2006.
- FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2020** - Sustainability in action. Rome. 2020, 224 p. Disponível em: < <https://bityli.com/fioqd> >. Acesso em: 29 mar. 2023.
- FEIJÓ, R. G. *et al.* Infectious myonecrosis virus and white spot syndrome virus co-infection in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) farmed in Brazil. **Aquaculture**, [S. l.], v. 380-383, p. 1-5, 2013.
- FIGUERÊDO, M. C. B.; ROSA, M. F.; GONDIM, R. S. Sustentabilidade ambiental da carcinicultura no Brasil: desafios para a pesquisa. **Revista Econômica do Nordeste**, [S. l.], v. 34, n. 2, 2003.
- FOOTER, A. **Bokashi Composting: Scraps to Soil in Weeks**. New Society Publisher: Gabriola, BC, Canada, 2014. 166p.

- GARCÍA-MENDEL, D. I. *et al.* *Bacillus licheniformis* BCR 4-3 increases immune response and survival of *Litopenaeus vannamei* challenged with *Vibrio parahaemolyticus* IPNGS16. **Aquaculture International**, [S. l.], v. 28, p. 2303–2318, 2020.
- GOH, J. X. H. *et al.* Harnessing the potentialities of probiotics, prebiotics, synbiotics, paraprobiotics, and postbiotics for shrimp farming. **Reviews in Aquaculture**, [S. l.], v. 14, n. 3, p. 1478-1557, 2022.
- GRYSE, G. M. A. *et al.* The shrimp nephrocomplex serves as a major portal of pathogen entry and is involved in the molting process. **PNAS**, [S. l.], v. 117, n. 45, p. 28374-28383, 2020.
- GUAN, Z.; FENG, Q. Chitosan and Chitooligosaccharide: The Promising Non-Plant-Derived Prebiotics with Multiple Biological Activities. **Int. J. Mol. Sci.**, [S. l.], v. 23, n. 12, p. 6761, 2022.
- HAMANO, K. *et al.* Waterborne and cannibalism-mediated transmission of the Yellow head virus in *Penaeus monodon*. **Aquaculture**, [S. l.], v. 437, p. 161–166, 2015.
- HERNÁNDEZ-SANDOVAL, P. *et al.* Increase in the survival of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected with white spot virus and fed a diet supplemented with coconut (*Cocos nucifera*) oil. **Abanico Vet.**, [S. l.], v. 12, p. 1-21, 2022.
- HOLT, C. C. *et al.* Understanding the role of the shrimp gut microbiome in health and disease. **Journal of Invertebrate Pathology**, [S. l.], p. 107387, 2020.
- HOWLADER, P. *et al.* Antiviral activity of *Cynodon dactylon* on white spot syndrome virus (WSSV)-infected shrimp: an attempt to mitigate risk in shrimp farming. **Aquaculture International**, [S. l.], v. 28, p. 1725–1738, 2020.
- HUANG, M-Y. *et al.* Dietary supplementation of synbiotic *Leuconostoc mesenteroide* B4 and dextran improves immune regulation and disease resistance of *Penaeus vannamei* against *Vibrio parahaemolyticus*. **Fish & Shellfish Immunology**, [S. l.], v. 123, p. 108498, 2023.
- HUSSAIN, A. S. *et al.* Effects of culturing the Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* in “biofloc” vs “synbiotic” systems on the growth and immune system. **Aquaculture**, [S. l.], v. 542, p. 736905, 2021.
- HUYNH, T. G. *et al.* Current applications, selection, and possible mechanisms of actions of synbiotics in improving the growth and health status in aquaculture: A review. **Fish & Shellfish Immunology**, [S. l.], v. 64, p. 367-382, 2017.
- IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção Pecuária Municipal. Rio de Janeiro, v. 46, p.1-8, 2017. Disponível em: < [https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm\\_2017\\_v45\\_br\\_informativo.pdf](https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2017_v45_br_informativo.pdf)>. Acesso em: 25 de mai. de 2023.
- IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção Pecuária Municipal. Rio de Janeiro, v. 49, p.1-12, 2021. Disponível em: < [https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm\\_2021\\_v49\\_br\\_informativo.pdf](https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2021_v49_br_informativo.pdf)>. Acesso em: 25 de mai. de 2023.



IRANI, M. *et al.* Production of Pacific white shrimp under different stocking density in a zero-water exchange biofloc system: Effects on water quality, zootechnical performance, and body composition. **Aquacultural Engineering**, [S. l.], v. 100, p. 102313, 2023.

JHA, R. K. *et al.* Study on the efficacy of *Cynodon dactylon* against Infectious Myonecrosis Virus (IMNV) in *Penaeus vannamei*. **bioRxiv**, [S. l.], p. 09.374074, 2020.

KIBENGE, F. S. B. Determinants of Emergence of Viral Diseases in Aquaculture. *In*: KIBENGE, F. S. B; GODOY, M. G. (edt.). **Aquaculture Virology**. London: Elsevier, 2016, p. 95-116.

KOKKATTUNIVARTHIL, S. *et al.* New set of PCR primers for SYBR green-based qPCR detection of IMNV in India. **Aquaculture**, [S. l.], v. 495, p. 726-730, 2018.

KUMAR, S. S. *et al.* An Indigenous, Field-Deployable, Lateral Flow Immunochromatographic Assay Rapidly Detects Infectious Myonecrosis in Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Marine Biotechnology**, [S. l.], v. 24, p. 1110–1124, 2022.

LAICE, L. M. *et al.* Use of symbiotics in biofloc (BFT)-based Nile tilapia culture: Production performance, intestinal morphometry and hematological parameters. **Aquaculture**, [S. l.], v. 520, p. 735715, 2021.

LI, X. *et al.* Isolation and Characterization of a Novel *Vibrio natriegens* - Infecting Phage and Its Potential Therapeutic Application in Abalone Aquaculture. **Biology**, v. 11, n. 11, p. 1670, 2022.

LIAO, X.; HE, J.; LI, C. Decapod iridescent virus 1: An emerging viral pathogen in aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, v. 14, n. 4, p. 1779-1789, 2022.

LIGHTNER, D. V. *et al.* Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. **Journal of invertebrate pathology**, [S. l.], v. 110, n. 2, p. 174-183, 2012.

LIGHTNER, D. V. Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): a review. **J. Invertebr. Pathol.**, [S. l.], v. 106, n. 1, p. 110-130, 2011.

LIGHTNER, D. V. *et al.* Infectious myonecrosis (IMN): a new virus disease of *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, [S. l.], v. 242, p. 353, 2004.

LIGHTNER, D. V. *et al.* Application of molecular diagnostic methods to penaeid shrimp diseases: advances of the past 10 years for control of viral diseases in farmed shrimp. **Developments in Biologicals**, [S. l.], v. 126, p. 117–122, 2006.

LIGHTNER, D. V.; REDMAN, R. M. Shrimp diseases and current diagnostic methods. **Aquaculture**, v. 164, p. 201–220, 1998.

LIM, L.S. *et al.* Valorization of Bokashi leachate as feed additive in tilapia farming. **Environmental Research**, v. 198, p. 110472, 2021.

- LIN, Y. *et al.* Crowding of white shrimp *Litopenaeus vananmei* depresses their immunity to and resistance against *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus. **Fish & Shellfish Immunology**, [S. l.], v. 45, n. 1, p. 104-111, 2015.
- LIU, H. L. *et al.* A real-time PCR for the detection of infectious myonecrosis virus in penaeid shrimp. **Journal of Invertebrate Pathology**, [S. l.], v. 113, p. 237-239, 2013.
- LIU, H. *et al.* Evolutionary genomics of mycovirus-related dsRNA viruses reveals cross-family horizontal gene transfer and evolution of diverse viral lineages. **BMC Evolutionary Biology**, [S. l.], v. 12, n. 91, p. 1-15, 2012.
- LIU, Y. *et al.* A novel complement C3 like gene (*Lv-C3L*) from *Litopenaeus vannamei* with bacteriolytic and hemolytic activities and its role in antiviral immune response. **Fish & Shellfish Immunology**, [S. l.], v. 91, p. 376-387, 2019.
- LIU, F. *et al.* Antennal gland of shrimp as an entry for WSSV infection. **Aquaculture**, [S. l.], v. 530, p. 735932, 2021.
- LORENZO, M. A. *et al.* Intensive hatchery performance of Pacific White shrimp in the bio-floc system under three different fertilization levels. **Aquacultural Engineering**, [S. l.], Essex, v. 72, p. 40–44, 2016.
- MARTÍNEZ-CÓRDOVA, L. R. *et al.* Microbial-based systems for aquaculture of fish and shrimp: an updated review. **Reviews in Aquaculture**, [S. l.], v. 6, p. 1-18, 2014.
- MOLES, P.; BUNGE, J. **Shrimp farming in Brazil: An industry overview**. Roma: FAO, 2002. 26p.
- MUSTHAQ, S. S. *et al.* Variability in the tandem repetitive DNA sequences of white spot syndrome virus (WSSV) genome and suitability of VP28 gene to detect different isolates of WSSV from India. **Aquaculture**, [S. l.], v. 256, n. 1, p. 32-41, 2006.
- NAIM, S. *et al.* Extended genome sequences of penaeid shrimp infectious myonecrosis virus strains from Brazil and Indonesia. **Archives of Virology**, [S. l.], v. 160, p. 1579–1158, 2015.
- NATH, S.; HALDAR, C. Effects of Stress among shrimp post-larvae stocked at high stocking density in nursery culture system: a review. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, [S. l.], v. 9, n. 5, p. 2987-2996, 2020.
- NATORI, M. M.; SUSSEL, F. R.; SANTOS, E. C. B.; PREVIERO, T. C.; VIEGAS, E. M. M.; GAMEIRO, A. H. Desenvolvimento da carcinicultura marinha no Brasil e no mundo: avanços tecnológicos e desafios. **Informações Econômicas**, [S. l.], v. 41, n. 2, p. 61-73, 2011.
- NEVES, S. R. A.; MARTINS, P. C. C. Surgimento das doenças virais na carcinicultura brasileira: impactos e estratégias da gestão de saúde. **Brazilian Journal of Development**, [S. l.], v. 7, n. 6, p. 61925-61944, 2021.
- NOBLE, T. H. *et al.* Comparison of methods for uniformly challenging Black Tiger shrimp (*Penaeus monodon*) with gill-associated virus. **Aquaculture**, [S. l.], v. 473, p. 191-196, 2017.

- NOBLE, T. H. *et al.* Genetic parameters for tolerance to gill-associated virus under challenge-test conditions in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Aquaculture**, [S. l.], v. 516, p. 734428, 2020.
- NUNAN, L. M.; LIGHTNER, D. V. Optimized PCR assay for detection of White Spot Syndrome Virus (WSSV). **Journal of Virological Methods**, [S. l.], v. 171, p. 318-321, 2011.
- NUNES, A. J. P. A intensificação no cultivo de camarões: uma tendência para melhorar a eficiência produtiva e econômica. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 175, p. 49-61, 2019.
- NUNES, A. J. P.; FEIJÓ, R. G. Convivência com o vírus da mancha branca no cultivo de camarão marinho no Brasil. **Revista da ABCC**, Recife, v. 18, n. 2, p. 30-36, 2016.
- NUNES, A. J. P.; FEIJÓ, R. G. Vírus da Mancha Branca e a convivência no cultivo de camarão marinho no Brasil. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 162, p. 36-47, 2017.
- NUNES, A. J. P.; MARTINS, P. C. C.; GESTEIRA, T. C. V. Carcinicultura ameaçada, produtores sofrem com as mortalidade decorrentes do Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV). **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 83, p. 37-51, 2004.
- OKTAVIANA, A.; WIDANARNI.; YUHANA, M. The use of synbiotics to prevent IMNV and *Vibrio harveyi* co-infection in *Litopenaeus vannamei*. **HAYATI Journal of Biosciences**, [S. l.], v. 21, n. 3, p. 127-134, 2014.
- OLIVEIRA, R. A. C.; ALMEIDA, R. V. M.; DANTAS, M. D. A.; CASTRO, F. N.; LIMA, J. P. M. S.; LANZA, D. C. F. *In silico* single strand melting curve: a new approach to identify nucleic acid polymorphisms in Totivirida. **BMC Bioinformatics**, [S. l.], v. 15, n. 243, p. 1-14, 2014.
- OLIVEIRA, V. Q. *et al.* Effect of ionic adjustment frequency in low-salinity water on zootechnical performance, water quality and mineral composition of *Litopenaeus vannamei* in a synbiotic nursery system. **Aquaculture**, [S. l.], v. 561, p. 738632, 2022.
- OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. B.; SOTO, S. **Aqüicultura no Brasil: o desafio é crescer**. Brasília, 2008. 276 p.
- PANIGRAHI, A. *et al.* Evaluation of biofloc generation protocols to adopt high density nursery rearing of *Penaeus vannamei* for better growth performances, protective responses and immuno modulation in biofloc based technology. **Aquaculture**, [S. l.], v. 522, p. 735095, 2020.
- PANIGRAHI, A. *et al.* Carbon: Nitrogen (C:N) ratio level variation influences microbial community of the system and growth as well as immunity of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in biofloc based culture system. **Fish and Shellfish Immunology**, [S. l.], v. 81, p. 329-337, 2018.
- PANIGRAHI, A. *et al.* Influence of differential protein levels of feed on production performance and immune response of pacific white leg shrimp in a biofloc-based system. **Aquaculture**, [S. l.], v. 503, p. 118-127, 2019.

- PILOTTO, M. R. *et al.* Environmental rearing conditions are key determinants of changes in immune gene expression patterns in shrimp midgut. **Developmental & Comparative Immunology**, [S. l.], v. 106, p. 103618, 2020.
- PIMENTEL, O. A. L. F. *et al.* Assessment of different ionic adjustment strategies in low-salinity water on the growth of *Litopenaeus vannamei* and microbial community stoichiometry in a synbiotic nursery system. **Aquaculture Research**, [S. l.], v.53, n.1, p.50-62, 2021.
- PIMENTEL, O. A. L. F. *et al.* Ionic adjustments do not alter plankton composition in low salinity *Penaeus vannamei* intensive nursery with synbiotic system. **Chemistry and Ecology**, [S. l.], v.29, n.4, p.357-375, 2023.
- POULOS, B. T.; LIGHTNER, D. Detection of infectious myonecrosis virus (IMNV) of penaeid shrimp by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). **Diseases of aquatic organisms**, [S. l.], v. 73, p. 69-72, 2006.
- POULOS, B. T. *et al.* Purification and characterization of infectious myonecrosis virus of penaeid shrimp. **Journal of General Virology**, [S. l.], v. 87, p. 987-996, 2006.
- PRASAD, K. P. *et al.* Infectious Myonecrosis Virus (IMNV) – An alarming viral pathogen to Penaeid shrimps. **Aquaculture**, [S. l.], v. 477, p. 99-105, 2017.
- PRIOR, S. *et al.* Controlled bioassay systems for determination of lethal infective doses of tissue homogenates containing Taura syndrome or white spot syndrome virus. **Diseases of Aquatic Organisms**, [S. l.], v. 54, p. 89-96, 2003.
- PUSPASARI, K.; WIDOWATI, Z. Infectious myonecrosis virus disease. *In*: KIBENGE, F. S. B.; BALDISSEROTTO, B.; CHONG, R. S-M. (edt.). **Aquaculture Pathophysiology**. London: Elsevier, 2022. p. 63-61.
- PUTHAWIBOOL, T. *et al.* Detection of shrimp infectious myonecrosis virus by reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. **Journal of Virological Methods**, [S. l.], v. 159, p. 27-31, 2009.
- RAMOS-CARREÑO, S. *et al.* White spot syndrome virus (WSSV) infection in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) exposed to low and high salinity. **Archives of Virology**, [S. l.], v. 159, p. 2213–2222, 2014.
- RABELO, D.; NUNES, T. **Carcinicultura no Ceará: oportunidades e desafios**. Fortaleza: Instituto Agropecuário do Ceará, 2006. 24p.
- RAHI, M. L. *et al.* Physiological, biochemical and genetic responses of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) to differential exposure to white spot syndrome virus and *Vibrio parahaemolyticus*. **Aquaculture**, [S. l.], v. 546, p.737337, 2022.
- ROCHA, I. P. As perdas de oportunidade pelo setor pesqueiro brasileiro, com ênfase para a carcinicultura marinha: histórico, entraves e perspectivas de recuperação. **Revista ABCC**, Recife, v. 16, n. 1, p. 19-23, 2014.

RODRIGUES, J.; BORBA, M. Carcinicultura Brasileira: Estatísticas e revelações. **Feed & food**, [S. l.], n. 72, p. 40-42, 2013.

ROMANO, N. *et al.* Fermenting rice bran as a carbon source for biofloc technology improved the water quality, growth, feeding efficiencies, and biochemical composition of African catfish *Clarias gariepinus* juveniles. **Aquaculture Research**, [S. l.], v. 49, n. 12, p. 3691-3701, 2018.

ROMANO, N.; KUMAR, V. Vegetarian Shrimp: Pellet-free Shrimp Farming. **World Aquaculture**, [S. l.], v. 48, n. 4, p. 36-39, 2017.

ROMANO, N. Probiotics, prebiotics, biofloc systems, and other biocontrol regimens in fish and shellfish aquaculture. p. 219-242. *In*: KIBENGE, F. S. B.; BALDISSEROTO, B.; CHONG, R. S-M. (edt). **Aquaculture Pharmacology**. London, United Kingdom: Elsevier, 2020. 401 p.

SABRY-NETO, H.; NUNES, A. J. P. Performance and immunological resistance of *Litopenaeus vannamei* fed a  $\beta$ -1,3/1,6-glucan-supplemented diet after *per os* challenge with the Infectious myonecrosis virus (IMNV). **Revista Brasileira de Zootecnia**, [S. l.], v. 44, n. 5, p. 165-173, 2015.

SAHUL HAMEED, A. S. *et al.* Studies on the occurrence of infectious myonecrosis virus in pond-reared *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in India. **Journal of Fish Diseases**, [S. l.], v. 40, n. 12, p. 1-8, 2017.

SAID, M. M.; EL-BARBARY, Y. A.; AHMED, O. M. Assessment of Performance, Microbial Community, Bacterial Food Quality, and Gene Expression of Whiteleg Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Reared under Different Density Biofloc Systems. **Aquaculture Nutrition**, [S. l.], v. 2022, n. 3499061, p. 1-13, 2022.

SANCHES, E. G.; PANNUTI, C. V.; SEBASTIANI, E. F. A piscicultura marinha como opção para a carcinicultura brasileira. **Revista Aquicultura & Pesca**, [S. l.], v. 36, n. 12, p. 12-19, 2008.

SANTOS, C. S.; ARAÚJO, M. V. P.; ALMEIDA, S. T. A carcinicultura no Rio Grande do Norte: perspectivas e desafios. **DESENVOLVE: Revista de Gestão do Unilasalle**, [S. l.], v. 4, n. 2, p. 131-153, 2015.

SARDOU, S. S. T. *et. al.* Ocorrência das principais doenças virais na carcinicultura brasileira - Revisão de literatura. **Revista da Medicina Veterinária do UNIFESO**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 43-49, 2022.

SATOH, J.; NISHIZAWA, T.; YOSHIMIZU, M. Protection against white spot syndrome virus (WSSV) infection in kuruma shrimp orally vaccinated with WSSV rVP26 and rVP28. **Diseases of Aquatic Organisms**, [S. l.], v. 82, p. 89 - 96, 2008.

SCHULTER, E. P.; VIEIRA FILHO, J. E. R. **Evolução da piscicultura no Brasil: diagnóstico e desenvolvimento da cadeia produtiva de tilápia**. Texto para discussão. Ipea: Rio de Janeiro, 2017, 42 p.

SCHWAB, B.; WEBER, M.; LEHMANN, B. **Key Management challenges for the development and growth of a shrimp farm in northeast Brazil: a case study of Camanor Produtos Marinhos Ltda.** Rome: FAO, 2002. 33p.

SEE, S. A. *et al.* Biosafety evaluation and detection of shrimp viruses on field samples using dual priming oligonucleotide (DPO) system based multiplex PCR assay. **Gene Reports**, [S. l.], v. 23, p. 101158, 2021.

SEIBERT, C. H. *et al.* Detection of major capsid protein of infectious myonecrosis virus in shrimps using monoclonal antibodies. **Journal of Virological Methods**, [S. l.], v. 169, p. 169-175, 2010.

SEIFFERT, W. Q.; WINCKLER, S.; MAGGIONI, D. A mancha branca em Santa Catarina. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 87, p. 51-53, 2005.

SENAPIN, S. *et al.* Outbreaks of infectious myonecrosis virus (IMNV) in Indonesia confirmed by genome sequencing and use of an alternative RT-PCR detection method. **Aquaculture**, [S. l.], v. 266, p. 32-38, 2007.

SINGARAVEL, V. *et al.* Photobacterium damsela subsp. damsela associated with bacterial myonecrosis and hepatopancreatic necrosis in broodstock Pacific white leg shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). **Aquaculture International**, [S. l.], v. 28, p. 1-16, 2020.

SILVA, A. E. M. *et al.* Effect of *Brachionus plicatilis* and *Navicula* sp. on Pacific white shrimp growth performance, *Vibrio*, immunological responses and resistance to white spot virus (WSSV) in nursery biofloc system. **Aquaculture**, [S. l.], v. 535, p. 736335, 2021.

SILVA, L. O. B. *et al.* Utilização do sistema simbiótico em berçário de camarões marinhos. **Aquaculture Brasil**, [S. l.], v. 19, p. 11-15, 2020.

SILVA, S. M. B. C. *et al.* *Artemia franciscana* as a vector for infectious myonecrosis virus (IMNV). **Journal of Invertebrate Pathology**, [S. l.], v. 126, p. 1-5, 2015a

SILVA, S. M. B. C.; PINHEIRO, A. C. A. S.; COIMBRA, M R. M. Quantitation of infectious myonecrosis virus in different tissues of naturally infected Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, using real-time PCR with SYBR Green chemistry. **Journal of Virological Methods**, [S. l.], v. 177, p. 197-201, 2011.

SILVA, S. M. B. C. *et al.* Experimental infection of infectious myonecrosis virus (IMNV) in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). **Aquacult. Int.**, [S. l.], v. 23, p. 563-576, 2015b.

SILVA, S. M. B. C. *et al.* Vertical transmission of Infectious myonecrosis virus in *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, [S. l.], v. 459, p. 216-222, 2016.

SILVA, U. L. *et al.* Carbon sources and C:N ratios on water quality for Nile Tilapia farming in biofloc system. **Rev. Caatinga**, [S. l.], v. 30, n. 4, p. 1017-1027, 2017.

- SILVA, V. A. *et al.* A multi-season survey for infectious myonecrosis in farmed shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in Pernambuco, Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, [S. l.], v. 104, p. 161-165, 2010.
- SILVER, J. J. *et al.* Blue economy and competing discourses in international oceans governance. **The Journal of Environment & Development**, [S. l.], v. 24, n. 2, p. 135–160, 2015.
- SIQUEIRA, A. P. P.; SIQUEIRA, M. F. B. **Bokashi: adubo orgânico fermentado**. Niterói: Programa Rio Rural, 2013. 16p.
- SNIESZKO, S. F. Diseases of fishes and their control in the US. *In*: THE TWO LAKES FIFTH FISHERY MANAGEMENT, 1973, Romsey. **Anais [...]**. Londres: Janssen Services, 1973. p. 55-66.
- SOUSA, R. R. *et al.* Marine shrimp farming in the state of Ceará: an analysis of the productive and economic parameters, in the period 2003-2012. **Brazilian Journal of Development**, [S. l.], v. 5, n. 12, p. 33525-33540, 2019.
- SRITUNYALUCKSANA, K. *et al.* Comparison of PCR testing methods for white spot syndrome virus (WSSV) infections in penaeid shrimp. **Aquaculture**, [S. l.], v.255, n.1–4, p.95-104, 2006.
- SUNARTO, A.; NAIM, S. Totiviruses of Crustaceans, p. 425-439. *In*: KIBENGE, F. S. B.; GODOY, M. G (edt). **Aquaculture Virology**. London, United Kingdom: Elsevier, 559 p. 2016.
- SUSSEL, Fábio. Fermentados: moda ou tendência? **Revista Aquaculture Brasil**, ed. 24, p. 60-61, 2021.
- TAHIM, E. F.; DAMACENO, M. N.; ARAÚJO, I. F. Trajetória tecnológica e sustentabilidade ambiental na cadeia de produção da carcinicultura no Brasil. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, [S. l.], v. 57, n. 1, p. 93-108, 2019.
- TANG, K. F. J. Development of *in situ* hybridization and RT-PCR assay for the detection of a nodavirus (PvNV) that causes muscle necrosis in *Penaeus vannamei*. **Diseases of Aquatic Organisms**, [S. l.], v. 75, n. 3, p. 183-190, 2007.
- TANG, J. *et al.* Infectious myonecrosis virus has a totivirus-like, 120-subunit capsid, but with fiber complexes at the fivefold axes. **PNAS**, [S. l.], v. 105, n. 45, p. 17526-17531, 2008.
- TANG, K. F. J. *et al.* *In situ* hybridization demonstrates that *Litopenaeus vannamei*, *L. stylirostris* and *Penaeus monodon* are susceptible to experimental infection with infectious myonecrosis virus (IMNV). **Diseases of Aquatic Organisms**, [S. l.], v. 63, p. 261–265, 2005.
- TAO, C. T. *et al.* Influence of stocking density on survival and growth of larval and postlarval white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931) applied biofloc technology. **AACL Bioflux**, [S. l.], v. 14, n. 3, p. 1801-1810, 2021.

- TEIXEIRA-LOPES, M. A. *et al.* Natural co-infection with infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) and infectious myonecrosis virus (IMNV) in *Litopenaeus vannamei* in Brazil. **Aquaculture**, [S. l.], v. 312, n. 1-4, p. 212-216, 2011.
- THUONG, K. V. *et al.* Effects of acute change in salinity and moulting on the infection of white leg shrimp (*Penaeus vannamei*) with white spot syndrome virus upon immersion challenge. **Journal of Fish Diseases**, [S. l.], v. 39, n. 12, p. 1403-1412, 2016b.
- THUONG, K. V. *et al.* Per os infectivity of white spot syndrome virus (WSSV) in white-legged shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and role of peritrophic membrane. **Veterinary Research**, [S. l.], v. 47, n. 39, p. 1-12, 2016a.
- VALENTE, C. S. *et al.* White spot syndrome virus (WSSV) disturbs the intestinal microbiota of shrimp (*Penaeus vannamei*) reared in biofloc and clear seawater. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 104, p. 8007–8023, 2020.
- VALENTI, W. C. *et al.* Aquaculture in Brazil: past, present and future. **Aquaculture Reports**, [S. l.], v. 19, p. 100611, 2021.
- VIANA, J. T. *et al.* Variantes virais: uma ameaça a carcinicultura. **Revista Aquaculture Brasil**, ed. 25, p. 25-29, 2022.
- VILANI, F. G. *et al.* Strategies for water preparation in a biofloc system: Effects of carbon source and fertilization dose on water quality and shrimp performance. **Aquacultural Engineering**, [S. l.], v. 74, p. 70-75, 2016.
- VOLPE, E. *et al.* Advances in viral aquatic animal disease knowledge: the molecular methods contribution. **Biology**, [S. l.], v. 12, n. 3, p. 466, 2023.
- WALKER, P. J. *et al.* Yellow head complex viruses: Transmission cycles and topographical distribution in the Asia-Pacific Region. In: BROWDY, C. L.; JORY, D.E (edt). *The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture, Aquaculture 2001*.
- WAN, X. *et al.* A confirmed case of infectious myonecrosis virus (IMNV) infection in cultured *Penaeus vannamei* in China. **Aquaculture**, [S. l.], v.577, p.739953, 2023.
- WANG, Y. *et al.* The effect of rearing density on immune responses of hepatopancreas and intestine in *Litopenaeus vananmei* against *Vibrio parahaemolyticus* E1 challenge. **Fish & Shellfish Immunology**, [S. l.], v. 93, p. 517-530, 2019.
- WANGMAN, P. *et al.* Sensitivity improvement of immunochromatographic strip test for infectious myneclerosis virus detection. **Aquaculture**, [S. l.], v. 453, p. 163-168, 2016.
- WEI, Y. F.; LIAO, S. A.; WANG, A. The effect of different carbon sources on the nutritional composition, microbial community and structure of bioflocs, **Aquaculture**, [S. l.], v. 465, p. 88–93, 2016.
- WOAH - World Organisation for Animal Health. **Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals**. Paris, França: 2021. Disponível em: <<https://bityli.com/O0QYL>>. Acesso em: 10 abr. 2023.



XU, T. *et al.* A Global Survey of Hypervirulent *Aeromonas hydrophila* (vAh) Identified vAh Strains in the Lower Mekong River Basin and Diverse Opportunistic Pathogens from Farmed Fish and Other Environmental Sources. **Microbiology Spectrum**, [S. l.], v. 20, n. 20, p. 1-15, 2023.

YANG, F. *et al.* Highly lethal *Vibrio parahaemolyticus* strains cause acute mortality in *Penaeus vannamei* post-larvae. **Aquaculture**, [S. l.], v. 548, p. 737605, 2022.

YAO, W. *et al.* Effects of dietary synbiotics supplementation methods on growth, intestinal health, non-specific immunity and disease resistance of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Fish & Shellfish Immunology**, [S. l.], v. 112, p. 46-44, 2021.

YILDIRIM-AKSOY, M. *et al.* Immunological and biochemical changes in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, challenged with *Vibrio parahaemolyticus*. **Microbial Pathogenesis**, [S. l.], v. 172, p. 105787, 2022.

**APÊNDICE A – ALINHAMENTO MÚLTIPLO ENTRE OS GENOMAS DAS VARI-  
ANTES DO IMNV E OS PRIMERS E SONDA UTILIZADAS NO PRESENTE ES-  
TUDO**

*Primers* do primeiro passo da *nested-PCR* oficial para diagnóstico do IMNV

4587F	1	CGACGCTGCTAACCATAACAA	20
AY570982	1	CGACGCTGCTAACCATAACAA	5237
EF061744	1	CGACGCTGCTAACCATAACAA	5237
KF8366757	1	CGACGCTGCTAACCATAACAA	5237
KJ556923	1	CGACGCTGCTAACCATAACAA	5237
KJ636782	1	CGACGCTGCTAACCATAACAA	5237
KJ636783	1	CGACGCTGCTAACCATAACAA	5237
KR815474	1	CGACGCTGCTAACCATAACAA	5237
MZ593846	1	CGACGCTGCTAACCATAACAA	5237
NC_007915	1	CGACGCTGCTAACCATAACAA	5237
4914R	1	ACTTGATCGAACAGCCGAGT	20
AY570982	5535	ACTTGATCGAACAGCCGAGT	5555
EF061744	5535	ACTTGATCGAACAGCCGAGT	5555
KF8366757	5535	ACTTGATCGAACAGCCGAGT	5555
KJ556923	5535	ACTTGATCGAACAGCCGAGT	5555
KJ636782	5535	ACTTGATCGAACAGCCGAGT	5555
KJ636783	5535	ACTTGATCGAACAGCCGAGT	5555
KR815474	5535	ACTTGATCGAACAGCCGAGT	5555
MZ593846	5535	ACTTGATCGAACAGCCGAGT	5555
NC_007915	5535	ACTTGATCGAACAGCCGAGT	5555

*Primers* do segundo passo da *nested-PCR* oficial para diagnóstico do IMNV

4725NF	1	GGCACATGCTCAGAGACA	18
AY570982	5368	GGCACATGCTCAGAGACA	5385
EF061744	5368	GGCACATGCTCAGAGACA	5385
KF8366757	5368	GGCACATGCTCAGAGACA	5385
KJ556923	5368	GGCACATGCTCAGAGACA	5385
KJ636782	5368	GGCACATGCTCAGAGACA	5385
KJ636783	5368	GGCACATGCTCAGAGACA	5385
KR815474	5368	GGCACATGCTCAGAGACA	5385
MZ593846	5368	GGCACATGCTCAGAGACA	5385
NC_007915	5368	GGCACATGCTCAGAGACA	5385
4863NR	1	CAAGACTGGACTCAGCGCT	19
AY570982	5485	CAAGACTGGACTCAGCGCT	5503
EF061744	5485	CAAGACTGGACTCAGCGCT	5503
KF8366757	5485	CAAGACTGGACTCAGCGCT	5503
KJ556923	5485	CAAGACTGGACTCAGCGCT	5503
KJ636782	5485	CAAGACTGGACTCAGCGCT	5503
KJ636783	5485	CAAGACTGGACTCAGCGCT	5503

KR815474	5485	CAAGACTGGACTCAGCGCT	5503
MZ593846	5485	CAAGACTGGACTCAGCGCT	5503
NC_007915	5485	CAAGACTGGACTCAGCGCT	5503

*Primers e sonda para RT-qPCR oficiais para diagnóstico do IMNV*

IMNV412F	1	GGACCTATCATAACATAGCGTTGCA	24
AY570982	1058	GGACCTATCATAACATAGCGTTGCA	1081
EF061744	1058	GGACCTATCATAACATAGCGTTGCA	1081
KF8366757	1058	GGACCTATCATAACATAGCGTTGCA	1081
KJ556923	1058	GGACCTATCATAACATAGCGTTGCA	1081
KJ636782	1058	GGACCTATCATAACATAGCGTTGCA	1081
KJ636783	1058	GGACCTATCATAACATAGCGTTGCA	1081
KR815474	1058	GGACCTATCATAACATAGCGTTGCA	1081
MZ593846	1058	GGACCTATCATAACATAGCGTTGCA	1081
NC_007915	1058	GGACCTATCATAACATAGCGTTGCA	1081

IMNVp1	1	CCACCTTTACTTTCAATACTACATCATCCCCGG	1123
AY570982	1091	CCACCTTTACTTTCAATACTACATCATCCCCGG	1123
EF061744	1091	CCACCTTTACTTTCAATACTACATCATCCCCGG	1123
KF8366757	1091	CCACCTTTACTTTCAATACTACATCATCCCCGG	1123
KJ556923	1091	CCACCTTTACTTTCAATACTACATCATCCCCGG	1123
KJ636782	1091	CCACCTTTACTTTCAATACTACATCATCCCCGG	1123
KJ636783	1091	CCACCTTTACTTTCAATACTACATCATCCCCGG	1123
KR815474	1091	CCACCTTTACTTTCAATACTACATCATCCCCGG	1123
MZ593846	1091	CCACCTTTACTTTCAATACTACATCATCCCCGG	1123
NC_007915	1091	CCACCTTTACTTTCAATACTACATCATCCCCGG	1123

IMNV545R	1	ATCCAGCGACAATAGATATGGGTT	24
AY570982	1165	ATCCAGCGACAATAGATATGGGTT	1188
EF061744	1165	ATCCAGCGACAATAGATATGGGTT	1188
KF8366757	1165	ATCCAGCGACAATAGATATGGGTT	1188
KJ556923	1165	ATCCAGCGACAATAGATATGGGTT	1188
KJ636782	1165	ATCCAGCGACAATAGATATGGGTT	1188
KJ636783	1165	ATCCAGCGACAATAGATATGGGTT	1188
KR815474	1165	ATCCAGCGACAATAGATATGGGTT	1188
MZ593846	1165	ATCCAGCGACAATAGATATGGGTT	1188
NC_007915	1165	ATCCAGCGACAATAGATATGGGTT	1188