

AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DO VÍRUS DA INFECÇÃO HIPODERMAL E NECROSE HEMATOPOIÉTICA (IHHNV) NO CAMARÃO ROSA, *Farfantepenaeus subtilis*, INFECTADO EXPERIMENTALMENTE

Evaluation of the genetic variability of the virus of hypodermal infection and haematopoietic necrosis (IHHNV) in experimentally-infected brown shrimp, *Farfantepenaeus subtilis*

Rubens Galdino Feijó^{1,4}, Michel Toth Kamimura², Diana Magalhães de Oliveira², Raimundo Bezerra Costa², Manuel Antonio A. Furtado-Neto³, Maria das Graças Lima Coêlho⁴, Rodrigo Maggioni^{2,5}

RESUMO

As viroses são as patologias que causam maior impacto na carcinicultura e, conseqüentemente, os maiores prejuízos econômicos registrados no setor. O Vírus da Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética Viral (IHHNV), apesar de ser considerado um patógeno de baixo impacto em camarões da espécie *Litopenaeus vannamei*, pode trazer algumas implicações econômicas negativas para a indústria camaroneira, como redução na taxa de crescimento e queda de produtividade. Um experimento realizado no Centro de Diagnóstico de Enfermidades de Organismos Aquáticos (CEDECAM, Labomar, UFC) incluiu a detecção do IHHNV por PCR, em camarões da espécie nativa *Farfantepenaeus subtilis* infectados experimentalmente per os. Durante a análise dos resultados amplicons não previstos foram observados. Tais amplicons poderiam ser gerados por modificações genéticas nos vírus ou por amplificações não específicas, caso em que a precisão do diagnóstico molecular poderia ser questionada. O presente trabalho teve como objetivo investigar a variabilidade do IHHNV através do sequenciamento dos amplicons produzidos. As seqüências produzidas foram comparadas com aquelas já publicadas, mostrando que não há variabilidade suficiente para comprometer os resultados do diagnóstico molecular por PCR. Os vírus encontrados foram ainda comparados com outros de diversas origens, mostrando maior similaridade com aqueles provenientes do Havaí e Equador.

Palavras-chaves: *Farfantepenaeus subtilis*, IHHNV, variabilidade genética, sequenciamento de DNA, carcinicultura.

ABSTRACT

Viruses are the pathologies that cause greater impact in the shrimp farming and consequential biggest economic damages registered in the sector. Despite Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) is considered a pathogen of low impact in *Litopenaeus vannamei* species, it can bring some negative economic implications for the shrimp industry, as reduction of growth rates and low productivity. An experiment carried through in the Center of Aquatic Organisms Disease Diagnosis (CEDECAM, Labomar, UFC) included the PCR detection of the IHHNV in native species of shrimps *Farfantepenaeus subtilis* experimentally per os infected. Results analysis showed no expected amplicons that could be generated by genetic modifications in the virus or non-specific amplifications, where the precision of the molecular diagnosis could be questioned. The present work had as objective to approach the variability of the IHHNV through the genetic sequencing of produced amplicons. These sequences were compared with those already published, showing that it does not have enough variability to compromise the results of the PCR molecular diagnosis. Additionally, the identified virus was compared with others of different origins, showing great similarity with that proceeding from the Hawaii and Equador.

Key words: *Farfantepenaeus subtilis*, IHHNV, genetic variability, DNA sequencing, shrimp farming.

¹ Mestrando em Ciências Tropicais Marinha, Universidade Federal do Ceará, Av. da Abolição, 3207, Fortaleza, Ceará, e-mail: rubensfeijo2005@yahoo.com.br

² Núcleo de Genômica e Bioinformática (NUGEN) - Universidade Estadual do Ceará, Av. Parajana, 1700, CEP 60740000, e-mail: nugen@uece.br

³ Professor Adjunto, Departamento de Engenharia de Pesca, Instituto Ciências do Mar (LABOMAR/UFC), Av. da Abolição, 3207, Fortaleza, Ceará, e-mail: mfurtado99@yahoo.com.br

⁴ Centro de Diagnósticos de Enfermidades de Organismos Aquáticos (CEDECAM), Av. da Abolição, 3207, Fortaleza, Ceará, e-mail: cedecam@labomar.ufc.br

⁵ Faculdade de Educação Ciência e Letras do Central (FECLESC), Rua José Queiroz de Pessoa, 2554, CENTRO, CEP: 63900000-Quixadá, CE-Brasil, e-mail: rmaggioni@uclan.ac.uk

INTRODUÇÃO

A carcinicultura marinha representa uma alternativa para a crescente demanda por alimentos de origem aquática e vem-se constituindo mundialmente numa importante atividade sócio-econômica, cujos reflexos positivos têm favorecido sobremaneira as regiões onde é desenvolvida (BRASIL, 2001). Como toda atividade zootécnica, a carcinicultura brasileira encontra sérias dificuldades em decorrência do surgimento e disseminação de enfermidades que podem vir a comprometer o seu desenvolvimento em potencial. Dentre as enfermidades que acometem o setor, as viroses são responsáveis pelos maiores prejuízos econômicos registrados.

O Vírus da Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética (IHHNV) é um vírus cosmopolita que infecta grande parte das espécies de camarões peneídeos selvagens e cultivados, tendo sido detectado também em pós-larvas e juvenis do camarão de água doce *Macrobrachium rosenbergii* (Lightner, 1996b; Hsieh *et al.*, 2006). O IHHNV é um vírus de simetria icosaédrica, não envelopado, com aproximadamente 22 nm e densidade de 1,40 g/ml em CsCl. Contém DNA de fita simples com um tamanho de 4,1 kb e tem um capsídeo com quatro polipeptídeos de peso molecular 74, 47, 39 e 37,5 kDa. Devido a estas características foi classificado como um membro da família Parvoviridae (Bonami *et al.*, 1990; Bonami & Lightner, 1991; Mari *et al.*, 1993; Nunan *et al.*, 2000).

A detecção do IHHNV pode ser feita por métodos histológicos e moleculares. Os métodos moleculares, que utilizam marcadores genéticos específicos para seu diagnóstico são: "dot-blot", hibridização *in situ*, reação em cadeia de polimerase (PCR) e PCR em tempo-real (Lightner, 1996a; Bell & Lightner, 1988; Lightner *et al.*, 1992; Tang & Lightner, 2001). A primeira ocorrência do IHHNV em camarões foi observada em *Litopenaeus stylirostris* no Havaí (Lightner *et al.*, 1983). Recentemente, foi relatada na Austrália a descoberta de uma variante que mostra uma divergência de 90,1% para seqüências de nucleotídeos correspondentes na variante havaiana (Tang *et al.*, 2003). Este fato afetou significativamente o diagnóstico molecular por PCR dos camarões contaminados, sendo necessária a utilização de sete pares de primers, dos quais apenas o par IHHNV392R/F (Tang *et al.*, 2000) foi reagente com as amostras, confirmando a presença do vírus. Nesse estudo foi constatado que a variante do IHHNV encontrado na Austrália possui um maior potencial infeccioso para a espécie *Penaeus monodon* (Krabetsve *et al.*, 2004).

O presente trabalho teve como objetivo investigar a variabilidade do IHHNV através do seqüen-

ciamento de amplicons produzidos durante experimento envolvendo diagnóstico molecular por PCR (Coelho, 2006) realizado no Centro de Diagnóstico de Enfermidades de Organismos Aquáticos (LABOMAR/UFC). Nesse experimento, bandas que podem ser produzidas por amplificação não específica foram detectadas durante os testes, e os vírus foram comparados geneticamente com aqueles previamente descritos, a fim de avaliar a sua origem e provável rota de ingresso no sistema de cultivo brasileiro.

MATERIAL E MÉTODOS

No presente estudo foram examinados vírus provenientes de oito camarões da espécie *Farfantepenaeus subtilis* infectados experimentalmente *per os*, com músculo fresco de *Litopenaeus vannamei* contaminado com o IHHNV (Coelho 2006). Dentre os indivíduos considerados reagentes após o diagnóstico molecular por PCR, bandas não específicas foram observadas em alguns casos (Coelho 2006). Pleópodos dos camarões infectados preservados em etanol a 95% foram utilizados para as análises genéticas. A extração do DNA genômico total foi realizada a partir de 20 mg de tecido muscular de pleópodo, seguindo o protocolo de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico descrito por Sambrook *et al.* (1989). Antes de sua utilização na PCR, o DNA foi quantificado por espectrofotometria e teve sua qualidade verificada através da aplicação de 1 µL da amostra em gel de agarose a 1%, contendo brometo de etídio.

Cada PCR conteve 1X de tampão proprietário Qiagen correspondendo a uma concentração final de 1,5 mM de MgCl₂; 200 µM de dNTP's; 0,6 µM de cada primer (389-F 5'-CGGAACACAACCGACTTTA-3' e 389-R 5'-GGCCAAGACCAAAA-TACGAA-3'); 1,5 unidades da enzima *Qiagen Taq* DNA polimerase; 10 a 50 ng de DNA da amostra; água ultra pura em quantidade suficiente para um volume de 15 µL. A termociclagem foi realizada em um termociclador *Primus 96^{plus}* (MWG-BIOTECH), obedecendo as seguintes condições: 1 ciclo a 95 °C/ 5 min, para garantir desnaturação inicial completa; 35 ciclos de 95°C/30s, 55°C/30s e 72°C/1min; e extensão final a 72°C/7min. Tanto a composição da reação como as condições de ciclagem seguem protocolos padronizados (OIE, 2003). As amplificações foram verificadas pela aplicação de uma alíquota de 2 µL do produto da PCR em gel de agarose a 1 %, contendo o tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) e brometo de etídio. A corrida eletroforética foi realizada com a potência 60 W de corrente contínua. O gel foi visualizado em um transiluminador ultravioleta *Transilluminator-FBTI*

88 (FisherBiotech®) e registrado utilizando-se o sistema de fotodocumentação *ImageAide* 3.0 (Spectronics Corp.).

Após purificação com o *PCR Purification Kit - Pure Link™* (Invitrogen Life Technology®) os produtos de PCR foram seqüenciados por ciclagem com a utilização do *BigDye Terminator v3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems®), em reações de 10 µL, conforme instruções do fabricante. Os produtos da reação de seqüenciamento foram purificados por precipitação em isopropanol e lidas no seqüenciador automático ABI 3100 do Núcleo de Genômica e Bioinformática (NUGEN, UECE). As seqüências produzidas foram analisadas a partir do alinhamento com seqüências previamente publicadas, disponíveis no banco de dados GenBank do National Center for Biotechnology Information (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov). Para o alinhamento foi utilizado o programa Clustal X, versão 1.83 (Thompson *et al.*, 1997) o qual também foi utilizado para a construção da árvore filogenética.

RESULTADOS

O IHNV foi detectado em seis dos oito camarões analisados, pela amplificação por PCR do amplicon de tamanho esperado, 389 pb, o qual corresponde a um fragmento do gene da proteína não-estrutural 1 do vírus (OIE 2003). Dentre as seis amostras diagnosticadas como IHNV-positivas, cinco seqüências foram produzidas, com tamanhos variando entre 221 e 251 pb. A composição média das seqüências estudadas foi de A=29%, T=26%, G=20% e C=25%, e não foram observadas diferenças significativas entre elas ($\chi^2 = 1,79$; $P = 1,00$). As buscas por homologia comprovaram que as seqüências correspondem efetivamente ao fragmento esperado (valor esperado = 0,0).

As seqüências aqui produzidas mostraram 99 a 100% de identidade com aquelas provenientes de vírus isolados nas Américas (Havaí e Equador). Para vírus isolados em países asiáticos (Taiwan e Tailândia), a similaridade variou entre 98 e 99%. As menores identidades foram observadas nas comparações com IHNV isolado em países africanos (Madagascar e Tanzânia), que atingiram valores entre 91 e 95% (Tabela I). Uma árvore construída por Neighbour-Joining (Saitou & Nei, 1987) a partir do alinhamento dos fragmentos de DNA do IHNV encontrado em fazendas do Nordeste brasileiro, com seqüências do IHNV isolados em países da América, Ásia e África, evidencia o grau de proximidade filogenética do IHNV encontrado no Brasil em relação aos vírus isolados no Equador e Havaí (Figura 1).

DISCUSSÃO

Tang & Lightner (2002), estudando a variabilidade do IHNV nas Américas, encontraram uma taxa de substituição de nucleotídeos de 0,6% na região referente ao gene da proteína não estrutural 1 do vírus, evidenciando portanto, a conservação da região estudada. Recentemente, foi identificada uma integração da seqüência de DNA do IHNV no genoma do camarão *Penaeus monodon* da África e Austrália. Para evitar a ocorrência de falsos positivos ou negativos no diagnóstico do IHNV por PCR, em decorrência da utilização de primers que não permitem a distinção clara entre o vírus e uma integração genômica, muitas vezes são adotados procedimentos complexos envolvendo o seqüenciamento dos fragmentos gerados por PCR (Tang & Lightner, 2006). No presente estudo o seqüenciamento das amostras permitiu validar o diagnóstico do IHNV para o camarão-rosa, *F. subtilis*, comprovando que este é efetivamente suscetível ao vírus.

Tabela I - Identidade relativa entre cada um dos fragmentos de DNA seqüenciados nesta pesquisa, e as seqüências disponíveis no GenBank para o IHNV, provenientes de várias localidades. Havaí - N° de acesso no GenBank: AF218266; Equador: AY362548; Taiwan: DQ057982; Tailândia: AY102034; Tanzânia: AY124937; Madagascar: AY125423. B1, C1, C4, C6, H15, identificação individual das amostras e seqüências aqui apresentadas. Entre parênteses, número de sítios conservados/extensão total da seqüência.

	B1	C1	C4	C6	H15
Havaí	0,99 (250/251)	0,99 (245/246)	1,00 (221/221)	1,00 (228/228)	1,00 (243/243)
Equador	0,99 (250/251)	0,99 (244/246)	1,00 (221/221)	1,00 (228/228)	1,00 (243/243)
Taiwan	0,98 (247/251)	0,98 (241/246)	0,99 (220/221)	0,99 (226/228)	0,99 (242/243)
Tailândia	0,98 (246/251)	0,98 (241/246)	0,99 (220/221)	0,98 (224/228)	0,98 (238/243)
Tanzânia	0,95 (240/251)	0,95 (234/246)	0,95 (210/221)	0,95 (217/228)	0,95 (231/243)
Madagascar	0,91 (229/251)	0,91 (224/246)	0,91 (201/221)	0,92 (210/228)	0,91 (221/243)

Estudos epidemiológicos utilizando histopatologia, PCR e “dot blot” indicaram que modificações no genoma do IHHNV podem ser responsáveis pela diminuição de sua virulência em camarões da espécie *Litopenaeus stylirostris* coletados na região do Golfo da Califórnia (Shike *et al.*, 2000). Por outro lado, a histopatologia em camarões da espécie *Penaeus monodon*, contaminados com vírus isolados das Filipinas e Tailândia, indicou que uma divergência de 3,8% nas seqüências de nucleotídeos não afeta a patogenicidade do vírus (Tang *et al.*, 2003). Consideráveis variações foram observadas entre as seqüências do IHHNV isolados na Ásia e África e pequeno índice de variabilidade para as dos vírus isolados na América (Tang & Lightner, 2002), quando comparadas com 70% do genoma do vírus descoberto no Havaí. Todos os vírus isolados na América mostram uma alta similaridade com os isolados nas Filipinas, sugerindo, juntamente com aspectos históricos e epidemiológicos, que a introdução do IHHNV nas Américas se deu em decorrência da importação de camarões contaminados da espécie *Penaeus monodon* proveniente desse país (Lightner, 1996b; Tang *et al.*, 2003). Os resultados apresentados na atual pesquisa mostram uma grande consistência em termos geográficos com similaridades diminuindo claramente a partir da América em direção ao Oceano Índico (Figura 1).

Agradecimentos: À Prof^a Dr^a Tereza Cristina Vascelos Gesteira pela orientação e incentivo no desenvolvimento desta pesquisa; ao Veterinário M.Sc João

Mafaldo e à Química M. Sc Cândida Vila Nova pela colaboração nas extrações de DNA; e ao Prof. Dr. Renato César pelo auxílio no processamento dos dados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bell, T.A. & Lightner, D.V. IHHNV disease of *Penaeus stylirostris*: effects of shrimp size on disease expression. *J. Fish Dis.*, v.10, p.165-170, 1988.
- Bonami, J.R.; Brehelin, M.; Mari, J.; Trumper, B. & Lightner, D.V. Purification and characterization of IHHN virus of penaeid shrimps. *J. Gen. Virol.*, v.71, p.2657-2664, 1990.
- Bonami, J.R. & Lightner, D.V. Unclassified viruses of Crustacea, p.597-622, in Adams J.R. & Bonami, J.R. (eds.), *Atlas of Invertebrate viruses*. CRC Press, Boca Raton, 1991.
- BRASIL. *Plataforma tecnológica do camarão marinho cultivado*. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Departamento de Pesca e Aquicultura, 276 p., Brasília, 2001.
- Coelho, M.G.L. *Susceptibilidade do camarão rosa Farfantepenaeus subtilis (Pérez-Farfante, 1967) ao vírus da Infecção Hipodermal e Necrose Hematopóietica (IHHNV)*. Dissertação de Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais, Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, 2006.
- Hsieh, C.Y.; Chuang, P.C.; Chen, L.C.; Chien, T.; Chien, M.S.; Huang, K.C.; Kao, H.F.; Tung, M.C. & Tsai, S.S. Infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV) infections in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture.*, v.258, p.73-79, 2006.
- Krabetsve, K.; Cullen, B.R. & Owens, L. Rediscovery of the Australian strain of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus. *Dis.Aquat.Organ.*, v. 61, p. 153-158, 2004.
- Lightner, D.V. *A Handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, 1996a.
- Lightner, D.V. The penaeid shrimp viruses IHHNV and TSV: epizootiology, distribution

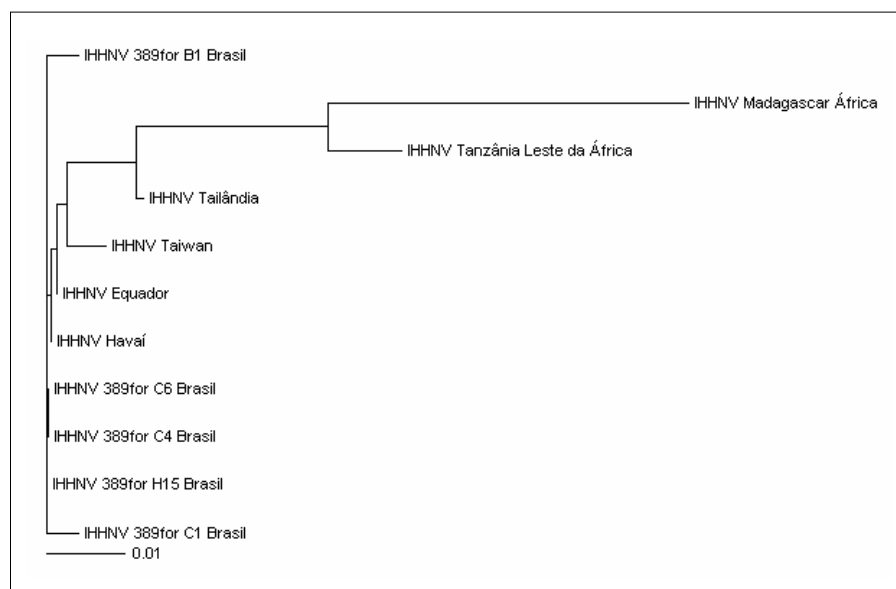


Figura 1 - Árvore construída pelo método “neighbor-joining” (Saitou & Nei, 1987), a partir de alinhamentos entre seqüências parciais do gene que codifica a proteína não estrutural 1 do IHHNV (*Ihhnvsp1*).

and the impact on international trade of two penaeid shrimp viruses in the Americas. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, v.15, p.579-601, 1996b.

Lightner, D.V.; Poulos, B.T.; Bruce, L.; Redman, R.M.; Mari, J. & Bonami, J.R. New developments in penaeid virology: application of biotechnology in research and disease diagnosis for shrimp viruses of concern in the Americas, p.233-253, in Fulks, W. & Main, K. (eds.), *Diseases of cultured penaeid shrimp in Asia and the United States*. The Oceanic Institute, 430 p., Honolulu, 1992.

Lightner, D.V.; Redman, R.M. & Bell, T.A. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis a newly recognized virus disease of penaeid shrimp. *J. Invertebr. Pathol.*, v.42, p.62-70, 1983.

Mari, J.; Bonami, J.R. & Lightner, D.V. Partial cloning of the genome of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus, an unusual parvovirus pathogenic for penaeid shrimps: Diagnosis of the disease using a specific probe. *J. Gen. Virol.*, v.74, p.2637-2643, 1993.

Nunan, L.M.; Poulos, B.T. & Lightner, D.V. Use of polymerase chain reaction for detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp. *Mar. Biol. Technol.*, v.2, p.319-328, 2000.

OIE-Office International des Epizooties. *International Aquatic Animal Health Manual*. (6th edition), Paris, 2003. Disponível em: <http://www.priberam.pt/dlpo>.

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

Saitou, N & Nei, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, v.4, p.406-425, 1987.

Sambrook, J.F.E.F. & Maniatis, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd edition, New York, 1989.

Shike, H.; Dhar, A.K.; Burns, J.C.; Shimizu, C.; Jousset, F.X.; Klimple, K.R. & Bergoin, M. Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis virus of shrimp related to mosquito *Brevdensoviruses*. *Virology*, v.277, p.167-177, 2000.

Tang, K.F.J.; Durand, S.V.; White, B.L.; Redman, R.M.; Pantoja, C.R. & Lightner, D.V. Postlarvae and juveniles of a selected line of *Penaeus stylirostris* are resistant to infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus infection. *Aquaculture*, v.190, p.203-210, 2000.

Tang, K.F.J. & Lightner, D.V. Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp by real-time PCR. *Dep. Veter. Sci. Microbiol.*, v.44, p.79-85, 2001.

Tang, K.F.J. & Lightner, D.V. Low sequence variation among isolates of Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV) originating from Hawaii and the Americas. *Dis Aquat Org.*, v.49, p.93-97, 2002.

Tang, K.F.J. & Lightner, D.V. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV)-related sequences in the genome of the black tiger prawn *Penaeus monodon* from Africa and Australia. *Virus Res.*, v.118, p.185-191, 2006.

Tang, K.F.J.; Poulos, B.T.; Wang, J.; Redman, R.M.; Shih, H.H. & Lightner, D.V. Geographic variations among Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV) isolates and characteristics of their infection. *Dis Aquat Org.*, v.53, p.91-99, 2003.

Thompson, J.D.; Gibson, T.J.; Plewniak, F.; Jeanmougin, F. & Higgins, D.G. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, v.24, p.4876-4882, 1997.