



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ROBERT LENOCH

**INFECÇÃO PELO VÍRUS DA MANCHA BRANCA (WSSV) E
VÍRUS DA INFECÇÃO HIPODERMAL E NECROSE
HEMATOPOIÉTICA (IHHNV) NA CARCINICULTURA
CATARINENSE**

Londrina
2011

ROBERT LENOCH

**INFECÇÃO PELO VÍRUS DA MANCHA BRANCA (WSSV) E
VÍRUS DA INFECÇÃO HIPODERMAL E NECROSE
HEMATOPOIÉTICA (IHHNV) NA CARCINICULTURA
CATARINENSE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri

Londrina
2011

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Instituto Federal Catarinense
Campus Araquari - SC**

L569i Lench, Robert, 1959-

Infecção pelo vírus da mancha branca (WSSV) e vírus da infecção hipodermal e necrose hematopoiética (IHHNV) na carcinicultura catarinense / Robert Lench. – Londrina, 2011.

98 f. : il. color. ; 30 cm

Orientador: Amauri Alcindo Alfieri

Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, 2011

Bibliografia: f. 46-57; 72-75; 88-91.

1. Carcinicultura. 2. Vírus. 3. Doença da mancha branca. 4. Infecção hipodermal e necrose hematopoiética. 5. Hospedeiros naturais. I. Alfieri, Amauri Alcindo. II. Universidade Estadual de Londrina. III. Título.

CDU 639.512:578

ROBERT LENOCH

**INFECÇÃO PELO VÍRUS DA MANCHA BRANCA (WSSV) E VÍRUS
DA INFECÇÃO HIPODERMAL E NECROSE HEMATOPOIÉTICA
(IHHNV) NA CARCINICULTURA CATARINENSE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade Animal).

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marco Antônio Bacellar Barreiros
UFPR – Palotina – PR

Prof. Dr. Eduardo Luis Cupertino Ballester
UFPR – Palotina – PR

Prof. Dr. Ricardo Castelo Branco Albinati
UFBA – BA

Prof. Dr. Julio Herman Leonhardt
UEL – Londrina – PR

Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri
UEL – Londrina – PR

Londrina, 09 de fevereiro de 2011

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos e Biologia Molecular do então Colégio Agrícola Senador Carlos Gomes de Oliveira da Universidade Federal de Santa Catarina, atual Instituto Federal Catarinense – *Campus Araquari* e no Laboratório de Virologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade Animal) pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, sob a orientação do Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri.

Os recursos financeiros para o desenvolvimento do projeto foram obtidos junto ao

CPNq : Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico / MCT

Edital/Chamada MCT CNPq 02/2006 – Universal

Processo n. 472.291/2006-8

DEDICATÓRIA

**À Deus,
na sua imensa misericórdia e força
que preenche o nosso vazio nos momentos mais difíceis,
e nos ensina que se prestarmos ouvidos à sabedoria,
inclinando o coração à prudência,
invocando à inteligência
então alcançaremos o conhecimento.**

**À minha Família,
por sua compreensão nas minhas ausências,
para minha esposa Célia por todo o seu apoio e incentivo na minha formação,
aos meus filhos Camila e Rafael que na sua forma silenciosa de apoio
são os meus maiores incentivos para progredir.**

**Ao iniciar qualquer atividade, concentre-se nela, não se deixe apegar a outros
pensamentos,
pois o princípio ZEN é o exato momento,
o aqui e o agora.**

AGRADECIMENTOS

Aos colegas de trabalho de Araquari que com a sua concorrência saudável não nos deixam ficarmos parados. E em especial aos colegas Jonas Cunha Espindola e Mauricio Lehmann, que juntos temos trilhado este longo caminho pela Aquicultura.

Aos professores e funcionários da UEL que sempre foram acolhedores e prestativos nas minhas necessidades.

E em especial aos professores Amauri Alcindo Alfieri, Alice Fernandes Alfieri e Marco Antonio Bacellar Barreiros, que apoiaram as idéias, forneceram as condições para a realização e, principalmente, acreditaram em nosso trabalho.

LENOCH, R. **Infecção pelo vírus da mancha branca (WSSV) e vírus da infecção hipodermal e necrose hematopoiética (IHHNV) na carcinicultura catarinense.** 2011. 98 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal, Área de Concentração: Sanidade Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

RESUMO

As doenças de etiologia viral apresentam grande impacto na criação de camarões marinhos em todas as regiões do mundo comprometendo o desenvolvimento da carcinicultura. Entre as principais doenças, a doença da mancha branca (WSSD) e a infecção hipodermal e necrose hematopoiética (IHHN) estão presentes no estado de Santa Catarina e tem causado prejuízos consideráveis à atividade camaroneira. O objetivo deste estudo foi avaliar a frequência da ocorrência do vírus da mancha branca (WSSV) e do vírus da infecção hipodermal e necrose hematopoiética (IHHNV) em fazendas de camarão marinho cultivado na região norte-catarinense. O estudo foi realizado no período de 2005 a 2008 em 12 fazendas. A amostragem ($n=440$) consistiu de tecidos de camarões coletados em vários períodos de cultivo que incluiu pós-larvas, na chegada à fazenda, camarões com 30, 60 e 90 dias de cultivo, por ocasião da despesca e de animais com qualquer idade quando da presença de sinais clínicos. Nestas ocasiões também foram coletadas amostras de tecidos de animais nativos assintomáticos, possíveis hospedeiros naturais, como caranguejos (*Aratus pisoni* e *Uca thayeri*), siris (*Callinectes sapidus*), zooplâncton, peixes e camarões nativos (*Penaeus schmitti*). As coletas foram realizadas nos tanques de cultivo, nos reservatórios e no canal de despesca das fazendas. A presença do WSSV e do IHHNV foi avaliada por meio de reações de PCR realizadas de acordo com as recomendações descritas pela OIE. Entre as 12 fazendas avaliadas, o WSSV foi identificado em 9 (75,0%) sendo que em 1 (11,1%) a infecção foi assintomática e nas 8 (88,9%) fazendas restantes foram observados animais com sinais clínicos e taxas de mortalidade entre 75 a 100%. Das 440 amostras obtidas de camarão *Litopenaeus vannamei*, 93 (21,13%) foram positivas para o WSSV. O vírus foi também identificado em 22 (10,47%) amostras de tecidos obtidas de organismos nativos como caranguejo, siri, zooplâncton e camarão nativo, sugerindo o papel destes animais como hospedeiros naturais. A infecção pelo IHHNV apresentou caráter endêmico no período e região estudados tendo sido identificada tanto em amostras de camarão cultivado quanto em amostras provenientes de animais nativos. Das 411 amostras de camarão *L. vannamei* avaliadas 210 (48,9%) foram positivas para o IHHNV. Em animais nativos ($n=74$) foram encontradas taxas de positividade que variaram entre 20,8% em caranguejo da espécie *Aratus pisoni* e 33,3% em amostras provenientes de camarão nativo da espécie *Penaeus schmitti*. Os resultados desse estudo demonstraram que no litoral norte do estado de Santa Catarina as infecções ocasionadas pelo WSSV e pelo IHHNV apresentaram-se amplamente distribuídas tanto em criações de camarões *L. vannamei* quanto em hospedeiros naturais.

Palavras-chave: Camarão. Vírus. Doença da mancha branca. Infecção hipodermal e necrose hematopoiética. Hospedeiros naturais. PCR.

LENOCH, R. **Infection of white spot syndrome virus (WSSV) and infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV) infection in shrimp farming in Santa Catarina.** 2011. 98 f. Thesis (Doctorate in Animal Science, Concentration Area: Animal Health) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

ABSTRACT

The viral diseases have great impact on the marine shrimp farming all over the world compromising of the shrimp industry development. Among the major shrimp diseases, the white spot syndrome disease (WSSD) and infectious hypodermal and haematopoietic necrosis (IHHN) are present in the state of Santa Catarina, South of Brazil and have caused considerable damage to the shrimp farming activity. The aim of this study was to assess the presence of white spot syndrome virus (WSSV) and infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV) in shrimp farms in the north coast of Santa Catarina State. The study was conducted from 2005 to 2008 in 12 farms. The samples ($n=440$) consisted of shrimp tissues collected at various periods of cultivation that included post-larvae, on arrival at the farm, shrimp at 30, 60, and 90 days of culture and in the final cycle of the production. Were also included in the study shrimp samples of animals presenting clinical signs. On these situations were also collected tissue samples of asymptomatic native animals, possible natural hosts, such as crabs (*Aratus pisoni*, *Uca thayeri*, and *Callinectes sapidus*), zooplankton, fish, and native shrimp (*Penaeus schmitti*). The samples were collected in farm ponds and in farms reservoirs. The presence of WSSV and IHHNV was evaluated by polymerase chain reaction carried out according the OIE recommendations. Among the 12 farms included in this study the WSSV was identified in 9 (75.0%) farms. In 1 (11.1%) farm the infection was asymptomatic and in the 8 (88.9%) remaining farms were observed animals with clinical signs and mortality rates between 75 to 100%. Of the 440 samples of *Litopenaeus vannamei* shrimp, 93 (21.13%) were positive for WSSV. The virus was also identified in 22 (10.47%) tissue samples obtained from native organisms such as crabs, shrimp, and zooplankton, suggesting the role of these animals as natural hosts. The IHHNV infection was endemic in period and region studied and the virus was identified in both samples of farmed shrimp as well as samples from native animals. Of the 411 samples of *L. vannamei* shrimp evaluated 210 (48.9%) were positive for IHHNV. In native animals ($n=74$) were found positivity rates ranging from 20.8% in the crab *Aratus pisoni* species and 33.3% in samples from native shrimp of the species *Penaeus schmitti*. The study results showed that in the northern coast of Santa Catarina, Brazil the infections caused by WSSV and IHHNV are widely distributed in both shrimps *L. vannamei* cultivate as in natural hosts.

Keywords: Shrimp. Virus. White spot disease. Infectious hypodermal and haematopoietic necrosis. Natural hosts. PCR.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1** – Participação relativa, em percentagem, dos principais países produtores de produtos originados da aquicultura (FAO, 2010)..... 16
- Figura 2** – Participação relativa dos principais países produtores da América Latina de produtos originados da aquicultura em toneladas (FAO, 2008) 17
- Figura 3** – Produção dos principais crustáceos cultivados mundialmente (FAO, 2007). 18
- Figura 4** – Principais produtores mundiais de camarão cultivado *Litopenaeus vannamei*, em mil toneladas (FAO, 2009)..... 19
- Figura 5** – Evolução em kg/ha/ano da produtividade brasileira de camarão marinho cultivado (BORGHETTI et al., 2003)20
- Figura 6** – Evolução em toneladas/ano da produção brasileira de camarão marinho cultivado (FAO, 2009)20
- Figura 7** – Valor das divisas produzidas pelo camarão marinho cultivado no Brasil em milhões de dólares americanos e volume de produção em milhares de toneladas (ROCHA; ROCHA, 2010)21
- Figura 8** – Evolução da carcinicultura no estado de Santa Catarina em número de fazendas, área de cultivo e produção em toneladas de camarão fresco (UFSC, 2006)22
- Figura 9** – Fotografia de camarão da espécie *Litopenaeus vannamei* com informações da sua anatomia externa. Foto do autor22
- Figura 10** – Microscopia eletrônica de transmissão do white spot syndrome virus purificado por ultracentrifugação em gradiente de cloreto de céσιο. Preparação de vírus de camarões peneideos corado com 2% de PTA. Escala em 500 nm. Foto cedida pelo Dr. L.C. Romano.....27
- Figura 11** – Calcificações observadas em carapaça de camarão *L. vannamei*. Foto do autor29

Figura 12 – Camarão <i>L. vannamei</i> com lesões macroscópicas sobre a carapaça ocasionadas pela infecção com o white spot syndrome virus. Foto do autor.....	30
Figura 13 – Camarões com coloração avermelhada mortos no fundo de viveiro de produção em cativeiro. Foto do autor	30
Figura 14 – Alterações histopatológicas observadas em células do epitélio subcuticular do estômago de camarão infectado com o white spot syndrome virus (FLEGEL, 2006)	31
Figura 15 – Microscopia eletrônica de transmissão do IHHNV purificado por ultra centrifugação em sacarose. Preparação de vírus de camarões peneídeos corado com 2% de PTA. Escala de 50 nm. Foto cedida pelo Dr. L.C. Romano	34
Figura 16 – Camarões <i>L. vannamei</i> adultos com deformações e diferenças de tamanhos em animais do mesmo lote. Foto do autor.....	36
Figura 17 – Camarão <i>L. vannamei</i> adulto com deformações no corpo e exoesqueleto incompleto. Foto do autor	36
Figura 18 – Camarões <i>L. vannamei</i> adultos com deformações no corpo, grande diferença no tamanho e coloração avermelhada. Foto do autor	37
Figura 19 – Camarões <i>L. vannamei</i> adultos com deformações no rosto. Foto do autor	37
Figura 20 – Camarões <i>L. vannamei</i> adultos com deformações no rosto. Foto do autor	38
Figura 21 – Camarão <i>L. vannamei</i> adulto com aspecto normal. Foto do autor.....	38
Figura 22 – Histologia de tecido da glândula antenal de camarão <i>P. monodon</i> mostrando corpúsculo de inclusão intranuclear (Cowdry tipo A) induzido pela infecção com o IHHNV (FLEGEL, 2006).....	39
Figura 23 – Coleta de hemolinfa do sinus ventral da espécie de camarão <i>L. vannamei</i>	43

ARTIGO A

Figura 1 – Localização das fazendas de camarões marinhos cultivados na região norte catarinense, sinalizadas por círculos brancos. Foto Google Earth, 2011	60
---	----

ARTIGO B

Figura 1 – Distribuição por faixa etária da média das amostras positivas por PCR para o IHNV em amostras de camarão <i>L. vannamei</i> cultivados, durante o período 2005/1 a 2008/1 em fazendas do litoral norte-catarinense, Santa Catarina, Brasil	78
--	----

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

- Tabela 1** – Número de indivíduos para coleta de tecidos utilizado em testes laboratoriais com base na prevalência esperada dos patógenos WSSV e IHHNV em uma população de camarões cultivados (modificado a partir de Amos, 1985; OIE, 2003)42
- Tabela 2** – Número médio de cópias do genoma do WSSV presentes em hemolinfa, pleópodos, brânquias, musculatura e hepatopâncreas de camarão *L. vannamei*, determinada por *real time*-PCR. (LIGHTNER; TANG-NELSON, 2001)44

ARTIGO A

- Tabela 1** – Distribuição das amostras biológicas avaliadas para a identificação do vírus da mancha branca por PCR, de acordo com os ciclos de produção61
- Tabela 2** – Distribuição das amostras biológicas de camarão avaliadas para a identificação do vírus a mancha branca por PCR de acordo com o período de cultivo62
- Tabela 3** – Número de fazendas com a detecção do vírus da mancha branca no período de 2005/1 a 2008/1, com e sem a ocorrência de infecção clínica na região litoral norte do estado de Santa Catarina, Brasil64
- Tabela 4** – Número de viveiros cultivados por fazenda, número de viveiros de camarão *L. vannamei* com animais apresentando sinais clínicos da doença da mancha branca por ciclo de produção na região litoral norte do estado de Santa Catarina, Brasil65
- Tabela 5** – Distribuição dos resultados da PCR para a identificação do *white spot syndrome virus* em camarões marinhos cultivados e em hospedeiros naturais em fazendas do litoral norte do estado de Santa Catarina, Brasil, de acordo com o período de coleta das amostras66

ARTIGO B

- Tabela 1** – Amostras de camarões *L. vannamei* positivas para o IHHNV por PCR, por idade dos animais e ciclo de produção da região norte do estado de Santa Catarina, Brasil76
- Tabela 2** – Amostras de camarões *L. vannamei* positivas para o IHHNV pela PCR, distribuídas de acordo com o ciclo de produção, Santa Catarina, Brasil.77
- Tabela 3** – Amostras de camarões *L. vannamei* positivas pela PCR para o IHHNV, distribuídas de acordo com a faixa etária dos animais, Santa Catarina, Brasil.77
- Tabela 4** – Amostras de possíveis hospedeiros naturais positivos para o IHHNV por PCR, durante o período 2005/1 a 2008/1, em fazendas do litoral nortecatarinense, Santa Catarina, Brasil.78

SUMÁRIO

1 REVISÃO DE LITERATURA	16
AQUICULTURA MUNDIAL E LATINO-AMERICANA.....	16
CARCINICULTURA MUNDIAL.....	18
CARCINICULTURA BRASILEIRA.....	19
CARCINICULTURA NO ESTADO DE SANTA CATARINA.....	21
O CAMARÃO DA ESPÉCIE <i>Litopenaeus vannamei</i>	22
DOENÇAS EM CARCINICULTURA	23
DOENÇA DA MANCHA BRANCA	25
<i>Histórico</i>	25
<i>Etiologia</i>	26
<i>Epidemiologia</i>	27
<i>Sinais clínicos</i>	28
<i>Diagnóstico</i>	30
<i>Controle e profilaxia</i>	31
INFECÇÃO HIPODERMAL E NECROSE HEMATOPOIÉTICA.....	33
<i>Etiologia</i>	33
<i>Epidemiologia</i>	34
<i>Sinais clínicos</i>	35
<i>Diagnóstico</i>	38
<i>Controle e profilaxia</i>	40
MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS VIRAIS EM CAMARÕES	40
<i>Diagnóstico em situação de doença</i>	41
<i>Diagnóstico em crustáceos assintomáticos</i>	41
<i>Conservação das amostras para análises moleculares</i>	42
<i>Seleção de tecidos para análises laboratoriais</i>	44
REFERÊNCIAS.....	47
2 OBJETIVOS	56
2.1 OBJETIVO GERAL	56
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	56
3 ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO	57

3.1 ARTIGO A	
INFECÇÃO PELO VÍRUS DA MANCHA BRANCA EM CAMARÕES MARINHOS CULTIVADOS NO ESTADO DE SANTA CATARINA, BRASIL (<i>WHITE SPOT SYNDROME VIRUS INFECTION IN CULTIVATED MARINE SHRIMPS IN THE STATE OF SANTA CATARINA, BRAZIL</i>)	57
RESUMO	57
ABSTRACT.....	58
INTRODUÇÃO	58
MATERIAL E MÉTODOS	59
RESULTADOS	63
DISCUSSÃO	66
REFERÊNCIAS.....	68
3.2 ARTIGO B	
DETECÇÃO DO IHHNV (<i>INFECTIOUS HYPODERMAL AND HAEMATOPOIETIC NECROSIS VIRUS</i>) EM CAMARÕES CULTIVADOS E HOSPEDEIROS NATURAIS NA REGIÃO NORTE CATARINENSE (<i>INFECTIOUS HYPODERMAL AND HAEMATOPOIETIC NECROSIS VIRUS (IHHNV) DETECTION IN CULTIVATED MARINE SHRIMPS AND NATURAL HOSTS IN THE NORTHERN REGION OF SANTA CATARINA STATE, BRAZIL</i>)	71
RESUMO	71
ABSTRACT.....	72
INTRODUÇÃO	72
MATERIAL E MÉTODOS	74
RESULTADOS	76
DISCUSSÃO	79
REFERÊNCIAS.....	81
4 CONCLUSÕES.....	85
APÊNDICES	86
APÊNDICE A – Soluções e tampões	87
APÊNDICE B – Protocolo de técnicas	89
APÊNDICE C – Lista de reagentes	91

ANEXOS	92
ANEXO A – Termo de Ciência e Autorização	93
ANEXO B – Figuras de gel de eletroforese	96

1 REVISÃO DE LITERATURA

AQUICULTURA MUNDIAL E LATINO-AMERICANA

A produção aquícola mundial continental e marinha (peixes, crustáceos e moluscos) tem apresentado crescimento contínuo passando de 41,9 milhões de toneladas (t) em 2004 para 55,1 milhões t em 2009, excluindo-se as plantas aquáticas, movimentando um valor de US\$ 98,4 bilhões. As plantas aquáticas produzidas pela aquicultura em 2008, renderam 15,8 milhões de t, movimentando um valor de US\$ 7,4 bilhões (FAO, 2010). Os principais países produtores de produtos oriundos da aquicultura são a China, outros países da Ásia e região do Pacífico (Figura 1), sendo a China responsável por 62% da produção mundial e 51% da geração de receitas mundiais. Outros países representam 11% da produção mundial sendo 4,2% na Europa, 3,0% América Latina e Caribe, 1,5% África, 1,2% América do Norte e 0,6% no Oriente Médio (FAO, 2010).

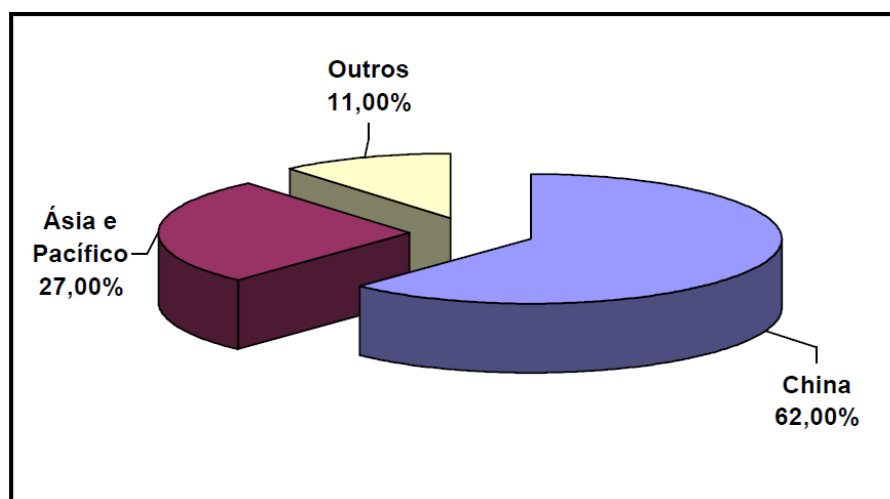


Figura 1 – Participação relativa, em percentagem, dos principais países produtores de produtos originados da aquicultura (FAO, 2010).

Aquicultura tem apresentado crescimento mais rápido do que qualquer outro setor da produção de alimentos de origem animal e em maior ritmo

do que a população mundial. O incremento do consumo per capita dos produtos aquícolas passou de 0,7 kg em 1970 para 7,8 kg em 2008, representando uma taxa média de crescimento anual de 6,9%. É esperado que a aquicultura forneça mais de 50% do pescado para a alimentação humana consumida no ano de 2012 (FAO, 2010). A produção da aquicultura mundial está concentrada nas regiões da Ásia e do Pacífico, com 89% do volume total e 77% do valor produzido. Esses números correspondem à China que responde por 62% do volume da produção mundial e 51% do valor produzido. Atualmente, a aquicultura fornece 45,7% dos peixes de consumo humano, 64,1% de moluscos (mariscos), 76,4% do pescado de água doce, 69% do salmão e 46,4% do camarão marinho que se consome no mundo, gerando 9 milhões de empregos (FAO, 2010).

Os principais produtores da América Latina são Chile, Brasil e México (802.000, 272.000 e 159.000 t, respectivamente), seguidos pelo Equador, Colômbia e Venezuela (FAO, 2008). As produções, em toneladas, dos três principais países estão representadas na figura 2.

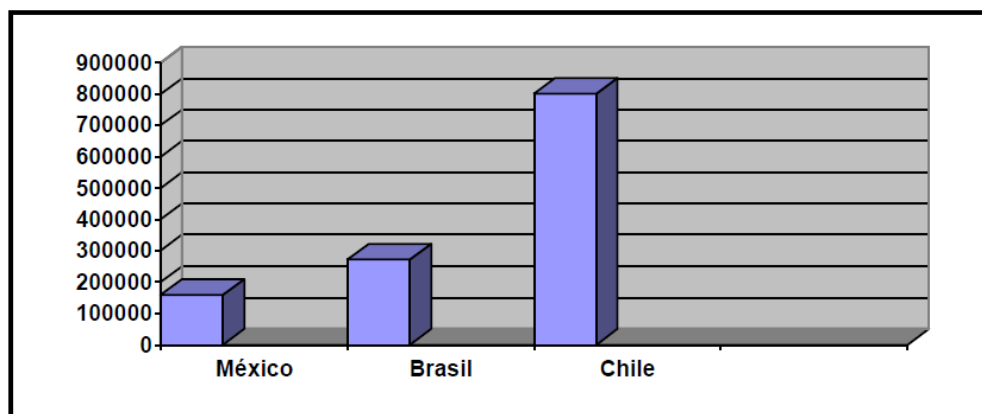


Figura 2 – Participação relativa em toneladas dos principais países produtores da América Latina de produtos originados da aquicultura (FAO, 2008).

Segundo a FAO (2008), no ano de 2006 as exportações latino-americanas de pescados e derivados alcançaram US\$ 10,200 milhões, que representam 12,1% do total das exportações mundiais. A produção aquícola na América do Sul apresentou taxas contínuas de crescimento, no entanto, a atividade se mostra vulnerável aos problemas sanitários, como ocorreu em 1999, quando foi

observada queda de 4,3% na produção continental em função de doenças virais que comprometeram a produção equatoriana de camarões (FAO, 2003).

O Brasil possui 8.500 km de costa marítima que abrange uma zona econômica exclusiva de 4,3 milhões de km². No país estão localizados 12% do total das reservas de água doce do planeta e mais de 2 milhões de hectares (ha) de terras alagadas, além de clima favorável. O potencial do Brasil para a produção de pescado ainda não foi atingido, principalmente no que se refere à aquicultura marinha e de água doce (ROCHA; ROCHA, 2010).

CARCINICULTURA MUNDIAL

A produção mundial de camarões marinhos cultivados a partir do ano de 1985 alcançou aumentos de mais de 20% ao ano. Porém, entre 1990 e 1996 a produção apresentou retração de cerca de 10% devido, principalmente, as doenças virais e problemas ambientais. Com abertura de novas áreas de cultivos em países emergentes a atividade teve um crescimento de 28,7% no período de 2002 a 2004 (FAO, 2007). Dentre a produção de crustáceos marinhos, o predomínio absoluto está na produção de camarões marinhos com 67,5% do volume total produzido, seguido por crustáceos de água doce (lagostins, camarões e caranguejos), figura 3 (FAO, 2007).

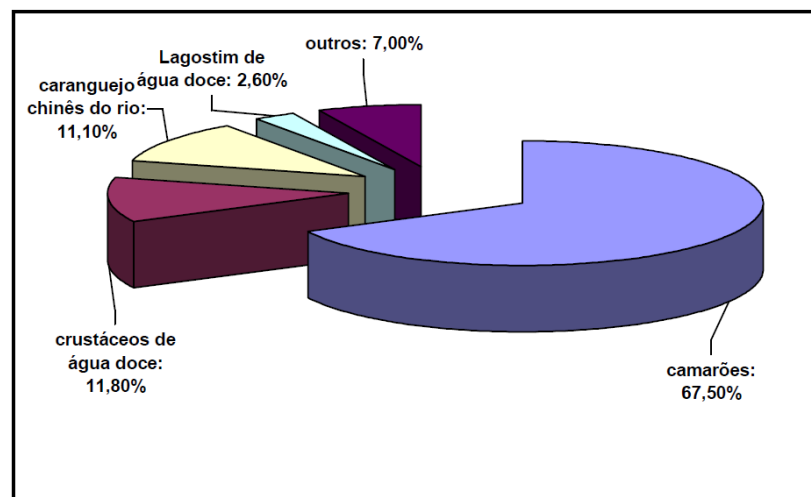


Figura 3 – Produção dos principais crustáceos cultivados mundialmente (FAO, 2007).

Os principais produtores mundiais de camarão cultivado estão localizados na Ásia, sendo o principal produtor a China (1.265.636 t), seguida por Tailândia (501.200 t), Vietnam (376.700 t), Indonésia (330.155 t), Índia (107.665 t), Bangladesh (63.600 t) e Filipinas (42.655 t). Nas Américas o principal produtor é o Equador (150.000 t), seguido de países da América Central (122.314 t) e do Brasil (65.000 t) (FAO, 2009) (Figura 4).

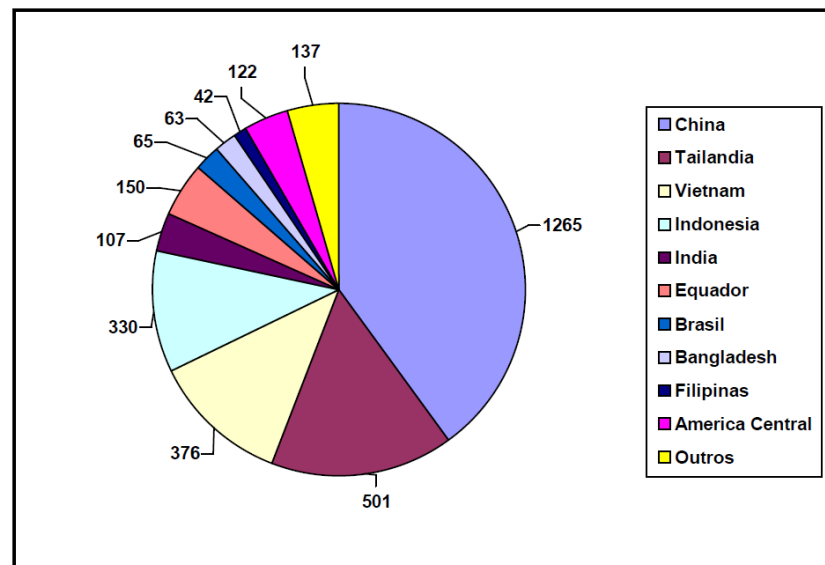


Figura 4 – Principais produtores mundiais de camarão cultivado *Litopenaeus vannamei*, em mil toneladas (FAO, 2009)

CARCINICULTURA BRASILEIRA

No Brasil, a partir de 1996, com a adoção da espécie *Litopenaeus vannamei* (PEREZ-FARFANTE; KENSLEY, 1997), importada do Pacífico Sul, a carcinicultura apresentou crescimento contínuo e dinâmico. Com o domínio do ciclo reprodutivo e a auto-suficiência na produção de náuplios e pós-larvas (PL) em laboratórios, o setor passou a utilizar a tecnologia desenvolvida em outros países para a criação dessa espécie (ROCHA, 2003). O desempenho do cultivo de camarão marinho no período de 1998-2002 revelou extraordinárias cifras de crescimento. A produtividade média nacional cresceu de 1.680 kg/ha em 1998 para 5.548 kg/ha em 2002, posicionando o Brasil em primeiro lugar entre todos os países

produtores neste indicador de eficiência tecnológica e com a projeção alcançada para 8.000 kg/ha em 2005. As figuras 5 e 6 apresentam dados da produção brasileira de camarões marinhos cultivados (BORGHETTI et al., 2003).

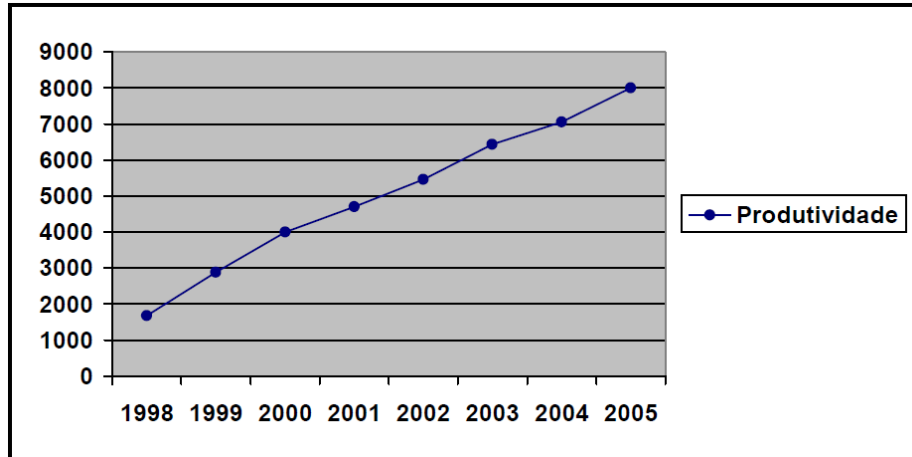


Figura 5 – Evolução em kg/ha/ano da produtividade brasileira de camarão marinho cultivado (BORGHETTI et al., 2003).

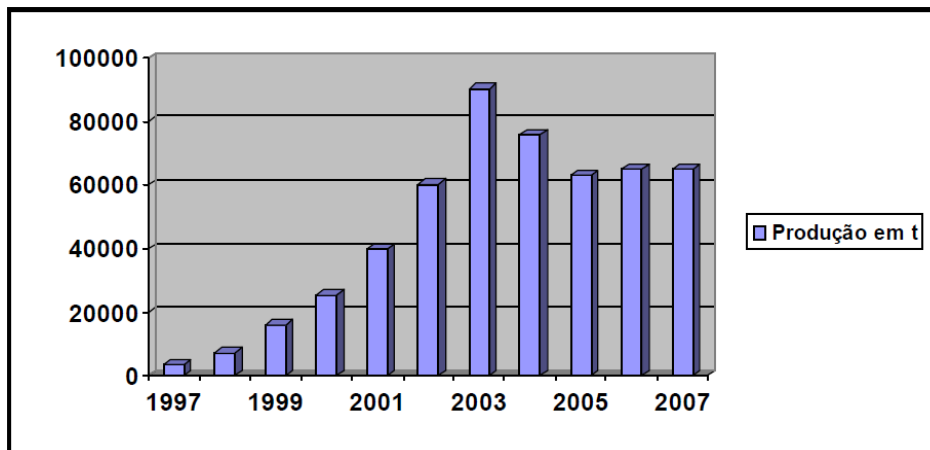


Figura 6 – Evolução em toneladas/ano da produção brasileira de camarão marinho cultivado (FAO, 2009).

O modelo brasileiro de produção se baseia no sistema semi-intensivo, com o uso limitado de recursos naturais (água e solo) e tecnologia voltada para a produtividade e a sustentabilidade ambiental (BORGHETTI et al., 2003). Duas características importantes marcaram o crescimento do cultivo de camarão marinho no Brasil destacando-se a participação do pequeno produtor, que

representa 75% do total dos produtores e a geração de empregos diretos e indiretos por ha de produção (ABCC, 2004). A figura 7 apresenta a produção brasileira em milhares de toneladas e os valores de recursos financeiros em milhões de dólares americanos gerados pelo setor no período de 1998 a 2008.

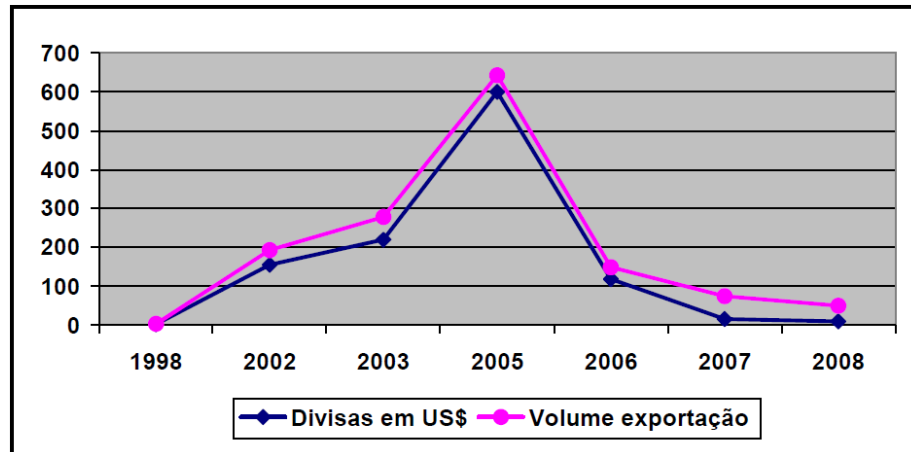


Figura 7 – Valor das divisas produzidas pelo camarão marinho cultivado no Brasil em milhões de dólares americanos e volume de produção em milhares de toneladas (ROCHA; ROCHA, 2010).

CARCINICULTURA NO ESTADO DE SANTA CATARINA

A atividade da carcinicultura comercial no estado de Santa Catarina iniciou-se no ano de 1996 na região sul do estado compreendendo a região do município de Laguna. O Programa de Cultivo de Camarões Marinhos desenvolvido pela EPAGRI (Empresa de Desenvolvimento Agropecuária de Santa Catarina) e o Laboratório de Camarões Marinhos da UFSC (Universidade Federal de Santa Catarina) fomentaram a atividade no estado. A figura 8 apresenta a evolução do número de fazendas, área de tanques de cultivo e a produção em toneladas de camarão fresco no estado de Santa Catarina no período de 2001 a 2006.

Evolução da Carcinicultura Catarinense

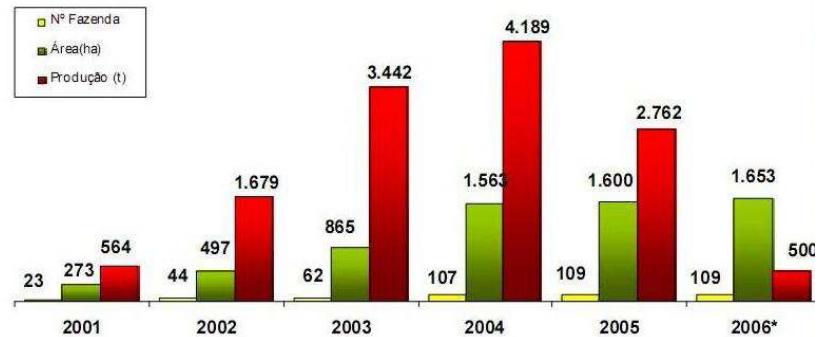


Figura 8 – Evolução da carcinicultura no estado de Santa Catarina em número de fazendas, área de cultivo e produção em toneladas de camarão fresco (UFSC, 2006).

O CAMARÃO DA ESPÉCIE *Litopenaeus vannamei*

O camarão branco do Pacífico, *Litopenaeus vannamei* (figura 9), responde por 20% da produção mundial de camarões. Seu habitat natural compreende a região do leste do Pacífico, de Tumbes, região norte do Peru até Sonora no México. A principal área de cultivo do *L. vannamei* é o continente americano e dessa espécie de camarão o conhecimento científico e tecnológico de cultivo é mais desenvolvido (BARBIERI JUNIOR; OSTRENSKY NETO, 2001).

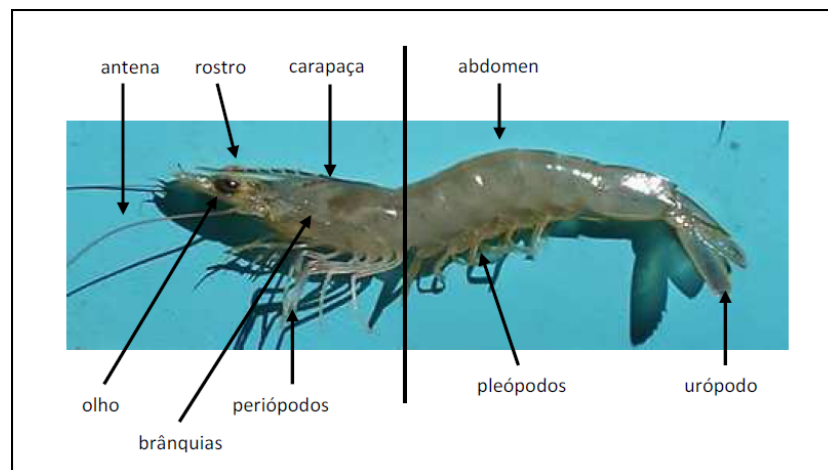


Figura 9 – Fotografia de camarão da espécie *Litopenaeus vannamei* com informações dasua anatomia externa. Foto do autor.

DOENÇAS EM CARCINICULTURA

Assim como em qualquer outra atividade zootécnica a carcinicultura brasileira tem enfrentado grandes obstáculos em decorrência de enfermidades que comprometem o seu potencial de desenvolvimento (ABCC, 2005). Na carcinicultura, enfermidade significa qualquer alteração adversa na saúde ou no desenvolvimento de camarões ou de populações de camarões cultivados. No cultivo, as enfermidades são desencadeadas quando ocorre desequilíbrio entre as condições ambientais do viveiro, o estado de saúde dos camarões cultivados e os agentes potencialmente patogênicos. As enfermidades infecciosas são causadas por patógenos transmissíveis (vírus, bactérias, protozoários e fungos), enquanto as não infecciosas são resultantes de agentes abióticos (efeitos nutricionais, genéticos, ambientais e físicos). Sob situações de desequilíbrio no ambiente de cultivo os camarões são submetidos a condições de estresse, gerando alteração em seu estado imunológico. Nessas circunstâncias, a população cultivada pode sofrer infecção por potenciais micro-organismos patogênicos, levando os indivíduos à debilitação ou a morte (NUNES; MARTINS, 2004).

A atividade da carcinicultura vem experimentando rápida evolução, principalmente na intensificação dos sistemas e das técnicas de produção, com consequente aumento da lucratividade e da eficiência produtiva. No entanto, o sistema de produção semi-intensivo em uso no Brasil implica na utilização mais intensiva dos recursos naturais e do maior aporte de efluentes aos ecossistemas próximos às fazendas, uma das consequências desse processo é a possibilidade de surgimento e da disseminação de enfermidades. A manutenção do setor produtivo sob rigorosa vigilância sanitária representa um constante desafio que deve ser enfrentado para que seja possível a adoção de medidas oportunas de controle e prevenção de doenças (BORGHETTI et al., 2003).

No sistema de produção semi-intensivo o risco sanitário aumenta na medida em que ocorre a intensificação da produção. As medidas de intensificação da produção que oferecem risco epidemiológico são correlacionadas com melhoramentos genéticos que induzem endogamia na população; aumento da densidade de 30 camarões/m² atualmente em uso para 90 a 120 camarões/m², que

é comumente praticada no nordeste brasileiro; fatores econômicos, como melhor preço do produto que induzem os proprietários a intensificação das atividades como redução do vazio sanitário; aquisição de pós-larvas (PLs) originadas de outras regiões; aumento da oferta de alimentos diminuindo a qualidade da água; e renovação mais constante da água aumentando a emissão de efluentes (LENOCH, 2004). Os principais riscos para a atividade são as carências de investimentos em ciência e tecnologia nas áreas de nutrição e prevenção de doenças (BORGHETTI et al., 2003).

Em contraste com as espécies animais terrestres, o conhecimento relativo às enfermidades de animais aquáticos é ainda muito limitado. A sensibilidade dos diferentes métodos de diagnóstico ainda não foi suficientemente avaliada e, após o estabelecimento em áreas de cultivo, a competência técnica para a erradicação de enfermidades ainda é pequena. Consequentemente, programas de prevenção e controle de enfermidades tornam-se de fundamental importância em todo o mundo com o objetivo de manter o cultivo do camarão marinho como uma atividade ecológica e economicamente sustentável (BACHÈRE, 2000; RODRIGUEZ; MOULLAC, 2000; PÁEZ-OSUNA, 2001).

Os crustáceos podem ser comprometidos por inúmeras doenças. Estas são especialmente evidentes em camarões peneídeos de cultivo. Todas as doenças de crustáceos que apresentam significado econômico e social caracterizam-se por serem doenças infecciosas. Como característica as doenças de crustáceos que estão listadas no *International Aquatic Animal Health Code* (the Code) destacam-se por: i) apresentarem restrição de áreas geográficas; ii) não serem passíveis de terapias curativas; iii) serem potencialmente excludentes; iv) apresentarem grande impacto econômico e social. A lista para Doenças de Notificação Obrigatória para a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) pode ser visualizada no quadro 01, disponível em www.oie.int/eng/normes/fcode/em_capitre_1.1.3.htm (OIE, 2009).

Quadro 1 – Doenças em crustáceos de notificação obrigatória para OIE (OIE, 2009).

Doença	Agente etiológico	Principal hospedeiro
<i>Taura syndrome</i>	vírus	Camarões peneídeos
<i>White spot disease</i>	vírus	Camarões peneídeos e outros crustáceos decápodos
<i>Yellowhead disease</i>	vírus	Camarões peneídeos
<i>Infectious hypodermal and haematopoietic necrosis</i>	vírus	Camarões peneídeos
<i>Crayfish plague (Aphanomyces astaci)</i>	fungo	Crustáceos
<i>Necrotising hepatopancreatitis</i>	bactéria	Camarões peneídeos
<i>Infectious myonecrosis</i>	vírus	Camarões peneídeos
<i>White tail disease</i>	vírus	Crustáceos
<i>Milky haemolymph disease of spiny lobsters (Panulirus spp)</i>	bactéria	Crustáceos

As doenças de maior ocorrência em nosso meio são a doença da mancha branca (*white spot syndrome disease*), a infecção hipodermal e necrose hematopoiética (HHNV) e a mionecrose infecciosa viral (IMNV).

DOENÇA DA MANCHA BRANCA

A Doença da Mancha Branca, causada pelo vírus da mancha branca (*white spot syndrome virus -WSSV*), é altamente infecciosa e letal. A taxa de mortalidade pode alcançar 100% em poucos dias de cultivo de camarões. A Doença da Mancha Branca, desde a sua primeira descrição no início da década de 1990, é considerada a doença infecciosa que mais prejuízo econômico tem ocasionado à carcinicultura marinha em todo o mundo sendo descritos valores da ordem de US\$10 bilhões em perdas (OIE, 2009).

Histórico

O WSSV foi primeiramente relatado na China em 1993, em cultivo de camarão *Fenneropenaeus chinensis*, relatos posteriores foram registrados no

Japão, Korea, Tailândia, Taiwan, Indonésia e Índia em cultivo de *F. chinensis*, *Penaeus monodon*, *Marsupenaeus japonicus* e *Fenneropenaeus indicus* (CHOU et al., 1995; WINARO, 1995; WONGTEERASUPAYA et al., 1995; HEO et al., 1998; MOHAN et al., 1998; NUNAN et al., 1998). Nos Estados Unidos da América, Lightner et al., (1995) registraram a ocorrência do WSSV no Texas e na Carolina do Sul, em cultivos de *L. vannamei*, *L. stylirostris* e *L. setiferus*. Magbanua et al., (2000) registraram a ocorrência do vírus nas Filipinas. Em 1999, foi descrita a ocorrência do WSSV em diferentes países da América Central, inicialmente em Honduras e na Nicarágua e, posteriormente, no Panamá e Equador (SÁNCHEZ-MARTÍNEZ et al., 2007). Em novembro de 2004 as fazendas de camarão localizadas ao longo da lagoa do Imaruí no município de Laguna, estado de Santa Catarina, foram infectadas pelo WSSV, atingindo 1.400 ha de viveiros. A mortalidade chegou a 90% causando prejuízos de cerca de US\$3 milhões (SEIFFERT et al., 2006). Em 20 de janeiro de 2005 ocorreu a primeira notificação junto à OIE da infecção de camarões marinhos cultivados pelo WSSV no Brasil (disponível em ftp://ftp.oie.int/infos_san_archives/eng/2005/en_05012_1v18n03.pdf).

Etiologia

O WSSV, classificado no gênero *Whispovirus* da família *Nimaviridae*, apresenta genoma constituído por DNA dupla fita (dsDNA) com aproximadamente 290 kpb. O virion, com 120-150 x 270-290 nm, apresenta envelope trilaminar e formato baciliforme com um apêndice semelhante a um flagelo em uma das extremidades (Figura 10). Três sequências genômicas completas (AF369029 – Tailândia, AF440570 – Taiwan e AF332093 – China) estão disponíveis em bases públicas de dados como o *GenBank*. Embora sejam descritas estirpes virais provenientes de regiões geográficas distintas que apresentam variabilidade genotípica, até o momento, todas as estirpes virais são classificadas em uma única espécie viral (VLAK et al., 2004; OIE, 2009).

A partir do ano 2000 foram identificadas diversas proteínas virais do WSSV. Proteínas estruturais, presente no envelope ou no capsídeo e proteínas não-estruturais. As proteínas não-estruturais são funcionais e estão envolvidas na

replicação do genoma viral e inibição das funções da célula hospedeira (Liu et al., 2006). As proteínas estruturais compõem a partícula viral e desempenham papel importante na montagem do vírus e entrada na célula hospedeira. As proteínas estruturais do envelope viral são a VP28, VP19 (VAN HULTEN et al., 2000b), VP466 (HUANG et al., 2002), VP281 (HUANG et al., 2002b), VP22 (ZHANG et al., 2002), VP76 (HUANG et al., 2005), VP124 (ZHU et al., 2005), VP110 (LI et al., 2006). As proteínas estruturais que fazem parte do nucleocapsídeo são VP15 (VAN HULTEN et al., 2002), VP26 e VP24 (VAN HULTEN et al., 2000b), VP35 (CHEN et al., 2002), VP51, VP76 (WU; YANG 2006).



Figura 10 – Microscopia eletrônica de transmissão do *white spot syndrome virus* purificado por ultracentrifugação em gradiente de cloreto de céσιο. Preparação de vírus de camarões peneídeos corado com 2% de PTA. Escala em 500 nm. Foto cedida pelo Dr. L.C. Romano.

Epidemiologia

O WSSV mantém-se viável em condições laboratoriais na água do mar por 30 dias a 30°C (MOMOYAMA et al., 1998) e em viveiros de cultivo por 3 a 4

dias (NAKANO et al., 1998). São mais de 50 os hospedeiros naturais do WSSV, entre os quais muitos são frequentemente identificados nos cultivos (OIE, 2009). O vírus pode infectar grande número de espécies de crustáceos aquáticos marinhos, peixes de estuários, caranguejos, lagostas e lagostins (MAEDA et al., 2000), rotíferos (YAN et al., 2004), moluscos marinhos, vermes poliquetas (VIJAYAN et al., 2005), crustáceos não-decápodas incluindo a *Artemia salina* (CHANG et al., 2002), copépodos, artrópodes crustáceos aquáticos como *Isopoda* e larvas do inseto *Euphydradae* (OIE, 2009). Todas estas espécies podem acumular altas concentrações do virion. Embora não haja evidencia da replicação viral nestes organismos, eles são considerados importantes veículos na transmissão horizontal, pois muitos destes animais são predados pelos camarões (LO; KOU, 1998).

A infecção manifesta-se nas formas endêmica ou epidêmica, com transmissão vertical (transovariana) e horizontal por consumo de tecidos infectados (predação e canibalismo) e pela água. A transmissão pode ocorrer a partir de animais aparentemente saudáveis, bem como de animais moribundos e mortos (LO; KOU, 1998). A prevalência do WSSV é altamente variável podendo ser menor que 1% em populações selvagens e até 100% em animais de cultivo (LO; KOU, 1998). Surto com a manifestação de sinais clínicos podem ser induzidos por fatores estressantes como mudanças bruscas na salinidade e temperatura da água inferior a 30°C (VIDAL et al., 2001). A presença do WSSV nem sempre significa uma condição terminal, pois em condições ambientais não estressantes camarões infectados podem sobreviver até o final do ciclo produtivo (OIE, 2009).

Sinais clínicos

O WSSV compromete preferencialmente os tecidos de origem embrionária ectodermal e mesodermal, especialmente o epitélio cuticular e os tecidos conectivos subcuticulares (MOMOYAMA et al., 1994; WONGTEERASUPAYA et al., 1995). O diagnóstico clínico da Doença da Mancha Branca baseia-se em sinais macroscópicos, como a presença de manchas brancas cuticulares sobre o exoesqueleto, mudanças de coloração e a ocorrência de alta taxa de mortalidade em curto período de tempo. As manchas cuticulares são

depósitos de sais de cálcio na epiderme cuticular, apresentam cerca 0,5 a 3 mm de diâmetro e, em casos mais avançados, podem ser facilmente observadas a olho nu. Devido à sua coloração escura as manchas são mais evidentes na espécie *P. monodon*. No *L. vannamei*, as manchas brancas podem não ocorrer ou não serem facilmente observadas a olho nu (Figura 11) (OIE, 2009). Destaca-se que o diagnóstico da Doença da Mancha Branca em camarões não pode ser baseado exclusivamente na visualização de sinais de inclusões brancas na cutícula, pois infecções bacterianas também causam a formação de inclusões brancas na carapaça em ausência da infecção pelo WSSV (WANG et al., 2000). Esses sinais também podem estar presentes quando os animais estão sob condições ambientais estressantes, como em água com alta alcalinidade (OIE, 2009).

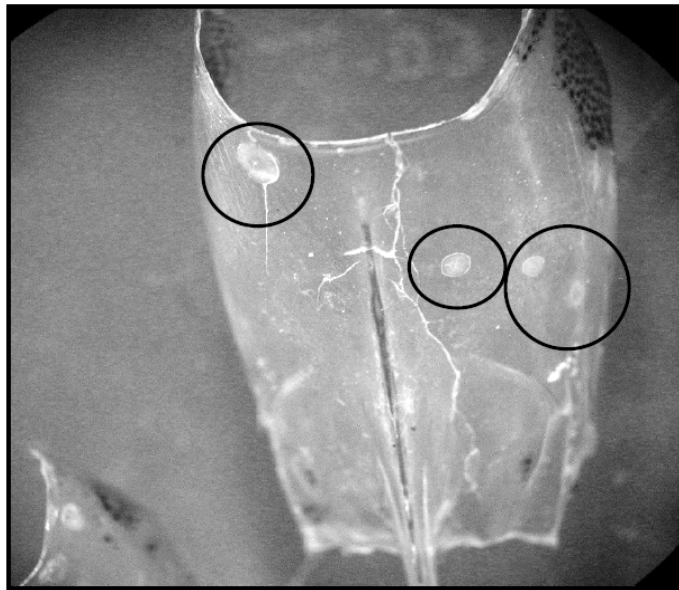


Figura 11 – Calcificações observadas em carapaça de camarão *L. vannamei*. Foto do autor.

Entre outros sinais observados em camarões infectados com o WSSV destacam-se: i) letargia; ii) nado superficial e lento; iii) baixo consumo de alimentos; iv) coloração rosada a pardo-avermelhado no corpo; v) cauda vermelha associada à expansão de cromatóforos; vi) alta mortalidade (próxima de 100%) nos primeiros 3 a 10 dias após o aparecimento dos sinais clínicos (Figuras 12 e 13) (OIE, 2009).



Figura 12 – Camarão *L. vannamei* com lesões macroscópicas sobre a carapaça ocasionadas pela infecção com o *white spot syndrome virus*. Foto do autor.



Figura 13 – Camarões com coloração avermelhada mortos no fundo de viveiro de produção em cativeiro. Foto do autor.

Diagnóstico

O diagnóstico clínico baseia-se na presença de sinais clínicos associados ou não às alterações das condições ambientais (OIE, 2009). Animais moribundos ou animais com sinais clínicos constituem a amostragem de eleição para a realização de exames laboratoriais. Os métodos de diagnóstico recomendados são sorológicos ou etiológicos como a PCR (reação em cadeia da

polimerase), hibridação *in situ* e sequenciamento de DNA. Os tecidos devem ser preservados de acordo com a metodologia a ser empregada. Preferencialmente devem ser colhidas amostras de pleópodos, brânquias, hemolinfa, estômago e músculo abdominal de até cinco indivíduos jovens ou adultos que podem ser armazenados sob a forma de *pool* (FLEGEL, 1997; OIE 2009).

As lesões histopatológicas da infecção pelo WSSV incluem expansão do núcleo celular em tecidos meso e ectodérmicos, presença de inclusões intranucleares basofílicas e vacúolos citoplasmáticos. O tecido mais apropriado para o diagnóstico é o epitélio subcuticular. Corte histológico do epitélio subcuticular do estômago é apresentado na figura 14 (FLEGEL, 2006).

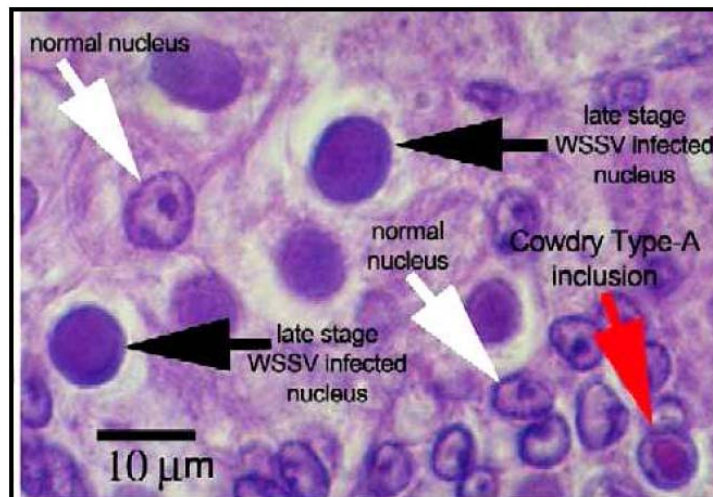


Figura 14 – Alterações histopatológicas observadas em células do epitélio subcuticular do estômago de camarão infectado com o *white spot syndrome virus* (FLEGEL, 2006).

Os métodos de detecção do WSSV baseados em anticorpos poli ou monoclonais são rápidos e apropriados para uso no campo. Porém, esses métodos apresentam baixa sensibilidade, pois somente são preconizados para o diagnóstico em tecido de animais com alta carga viral e são recomendados para a confirmação de diagnóstico clínico (OIE, 2009).

As técnicas moleculares como a PCR são de alta sensibilidade e especificidade. A OIE (2009) preconiza a metodologia descrita por Lo et al., (1997).

Resultado positivo na primeira etapa da PCR indica infecção viral grave. Resultados positivos somente na segunda etapa da reação (*nested-PCR*) sugerem a existência de infecção crônica (OIE, 2009). A PCR pode ser empregada para o diagnóstico do WSSV em uma população assintomática em tecidos coletados por técnica não destrutiva e amostragem em *pool* de animais sendo, portanto, altamente recomendada em programas sanitários.

Controle e Profilaxia

O controle sanitário deve estar baseado no conhecimento do estado de saúde dos animais na área de cultivo e ser avaliado em inspeções rotineiras e na padronização de procedimentos de amostragem, seguidas de diagnóstico laboratorial de acordo com as normas internacionais. Deve ainda promover ações preventivas, visando impedir o ingresso de agentes patogênicos nos cultivos, ou sempre que possível ações para a erradicação de enfermidades. Um programa sanitário para crustáceos somente poderá lograr êxito em situações onde o esforço do controle oficial esteja associado à educação sanitária, esclarecendo os carcinicultores sobre os riscos inerentes e sobre as formas para evitar transtornos e perdas econômicas. Muitas ameaças estão associadas a procedimentos que ocorrem na ausência de controle legal, tais como cultivos não licenciados, movimentação não autorizada, ingressos clandestinos de pós-larvas, entre outros (MACIEL, 2002).

Alguns métodos experimentais de prevenção como injeção intramuscular do WSSV inativado ou da proteína estrutural recombinante (VP28) e bactérias recombinantes inativadas, expressando a VP28, incorporadas aos alimentos induziram maior taxa de sobrevivência em animais desafiados com o WSSV (WITTEVELDT et al., 2004; OIE, 2009). Outra metodologia potencial é o RNA de interferência (RNAi). O dsRNA gene específico do WSSV ou cadeias longas de dsRNA induzem alta atividade anti-WSSV, protegendo os camarões da infecção (ROBALINO et al., 2005).

INFECÇÃO HIPODERMAL E NECROSE HEMATOPOIÉTICA

O vírus da infecção hipodermal e necrose hematopoiética (*infectious hypodermal and haematopietic necrosis virus* -IHHNV) é cosmopolita e infecta grande parte das espécies de camarões peneídeos selvagens e cultivados. O IHHNV, também tem sido detectado em pós-larvas e juvenis do camarão de água doce *Macrobrachium rosenbergii* (LIGHTNER, 1996b; HSIEH et al., 2006).

Etiologia

O IHHNV, agente etiológico da infecção hipodermal e necrose hematopoiética, está classificado no gênero *Brevdensovirus*, família *Parvoviridae*. O virion, de formato icosaédrico, tem 20-22 nm de diâmetro, densidade de 1,40 g/mL⁻¹ em CsCl e não apresenta envelope (Figura 15). O genoma é constituído por DNA fita simples com tamanho estimado de 4,1 kb e o capsídeo viral apresenta quatro polipeptídeos de massa molecular 74, 47, 39 e 37,5 kD (FALQUET et al., 2005). Até o momento foram descritos três genótipos do IHHNV denominados Tipo 1, identificado no continente Americano e no leste da Ásia, principalmente Filipinas; Tipo 2, no Sul e no Leste da Ásia; Tipo 3A, no leste da África, Índia e Austrália e o Tipo 3B, presente no oeste Indo-Pacífico incluindo a região da Madagascar, Ilhas Maurício e Tanzânia. Os dois primeiros genótipos infectam as principais espécies de camarões cultivados, o *L. vannamei* e o *P. monodon* (TANG; LIGHTNER, 2006, TANG et al., 2007). As seqüências relatadas dos genótipos 3A e 3B foram encontradas inseridas no genoma do *P. monodon* da região leste da África, Austrália e região Indo-Pacífico ocidental. As seqüências relatadas do IHHNV encontradas no genoma do *P. monodon* não são infecciosas para o *P. vannamei* e *P. monodon* (TANG; LIGHTNER, 2006, TANG et al., 2007).



Figura 15 – Microscopia eletrônica de transmissão do IHHNV purificado por ultracentrifugação em sacarose. Preparação de vírus de camarões peneídeos corada com 2% de PTA. Escala de 50 nm. Foto cedida pelo Dr. L.C. Romano.

Epidemiologia

O IHHNV é comumente encontrado no sudeste da Ásia, em populações selvagens de *P. monodon*, nas Américas em *P. vannamei*, *P. stylirostris* e também em outros camarões selvagens (FEGAN; CLIFFORD, 2001; LIGHTNER et al., 2009; NUNAN et al., 2001). Nos cultivos o IHHNV é encontrado em *P. vannamei* e *P. stylirostris* podendo a sua prevalência alcançar 100% (LIGHTNER et al., 1983; CHAYABURAKUL et al., 2004). Também está presente em camarões selvagens na costa americana do Oceano Pacífico onde foram encontradas taxas de infecção de 28% em *L. vannamei* selvagens coletados na costa do Pacífico no Panamá (NUNAN et al., 2001) e 51 a 63% em *L. vannamei* selvagens coletados da costa do Pacífico no Equador, Colômbia e Panamá (MOTTE et al., 2003). A transmissão do IHHNV pode ocorrer pela via horizontal, por canibalismo ou contaminação da água de abastecimento dos viveiros (TANG et al., 2000; LOTZ, 1997; BELL; LIGHTNER, 1984), ou pela via vertical por meio de ovos infectados (MOTTE et al., 2003).

Sinais clínicos

O IHHNV geralmente infecta os tecidos de origem embrionária ectodermal e mesodermal e as principais lesões são encontradas nas brânquias, epitélio cuticular, tecidos conectivos e hematopoiéticos, órgãos linfóides, glândula da antena e o cordão nervoso ventral (LIGHTNER et al., 1992). O Camarão Azul do Pacífico (*P. stylirostris*), quando infectado com o IHHNV apresenta quadro clínico agudo e mortalidade superior a 90%. Nesta espécie os animais juvenis e subadultos são os mais gravemente comprometidos (LIGHTNER; REDMAN, 1998). No camarão *L. vannamei* a infecção pelo IHHNV não produz sinais clínicos clássicos, sendo que o mais evidente é a Síndrome do Rostro Deformado (RDS), que produz alterações anatômicas no rostro e no corpo do camarão e grandes diferenças no tamanho entre animais do mesmo lote (BROCK; LIGHTNER, 1990; KALAGAYAN et al., 1991). Estas lesões são mais comuns em animais juvenis de *L. vannamei* e *P. monodon* (BELL; LIGHTNER, 1984; PRIMAVERA; QUINTIO, 2000). A gravidade e a prevalência da RDS em populações infectadas de juvenis e adultos de *L. vannamei* indicam a ocorrência da infecção durante o estágios larvais ou de pós-larvas (PLs) (BRAY et al., 1994; CARR et al., 1996, LIGHTNER, 1996b). Populações de camarões juvenis com RDS mostram diferenças de tamanhos com animais menores do que o esperado para a idade (Figuras 16 a 21). O Coeficiente de Variação (CV= a divergência normal dividida pelas médias de grupos de tamanhos diferentes dentro de uma população) para uma população com RDS pode atingir valores entre 30 a 90%, enquanto que em populações livres de IHHNV e portanto sem RDS, o CV oscila entre 10 a 30% (BROWDY et al, 1993; BRAY et al., 1994; LIGHTNER, 1996b). Análises comparativas demonstram que criações de *L. vannamei* infectadas com o IHHNV apresentam perdas econômicas de 10 a 50% superiores àquelas criações livres de IHHNV (LIGHTNER; REDMAN, 1998).



Figura 16 – Camarões *L. vannamei* adultos com deformações e diferenças de tamanhos em animais do mesmo lote. Foto do autor.



Figura 17 – Camarão *L. vannamei* adulto com deformações no corpo e exoesqueleto incompleto. Foto do autor.



Figura 18 – Camarões *L. vannamei* adultos com deformações no corpo, grande diferença no tamanho e coloração avermelhada. Foto do autor.



Figura 19 – Camarões *L. vannamei* adultos com deformações no rostro. Foto do autor.



Figura 20 – Camarões *L. vannamei* adultos com deformações no rosto. Foto do autor.



Figura 21 – Camarão *L. vannamei* adulto com aspecto normal. Foto do autor.

Diagnóstico

A prevalência e a gravidade da infecção pelo IHNV em uma população estão diretamente relacionadas com fatores ambientais estressantes,

como altas densidades populacionais e qualidade de água em seus limites como baixa concentração de oxigênio dissolvido e altas concentrações de amônia e nitritos (OIE, 2009). Na definição da amostragem a ser colhida para a realização de exames laboratoriais, preferencialmente, devem ser avaliadas amostras provenientes de animais moribundos ou de animais com sinais clínicos. Os métodos de diagnóstico mais recomendados são a histopatologia, a PCR, a *dot-blot* DNA e a hibridização *in situ*. Os tecidos devem ser preservados de acordo com a metodologia a ser empregada e são recomendadas amostras de pleópodos, brânquias e hemolinfa (OIE 2009).

O diagnóstico histopatológico do IHHNV baseia-se na presença de corpúsculo de inclusão intranuclear (Cowdry tipo A). Este achado é mais frequente em tecido fixado com líquido de Davidson (LIGHTNER, 1996b). Em tecidos corados com HE observa-se expansão eosinofílica do núcleo, com halo limitado por cromatina em tecidos meso e ectodérmicos, figura 22 (ALDAY DE GRAINDORGE; FLEGEL, 1999; LIGHTNER, 1996a). Ressalta-se que apenas as lesões histopatológicas não são suficientes para caracterizar a infecção de camarões com o IHHNV (FLEGEL, 2006).

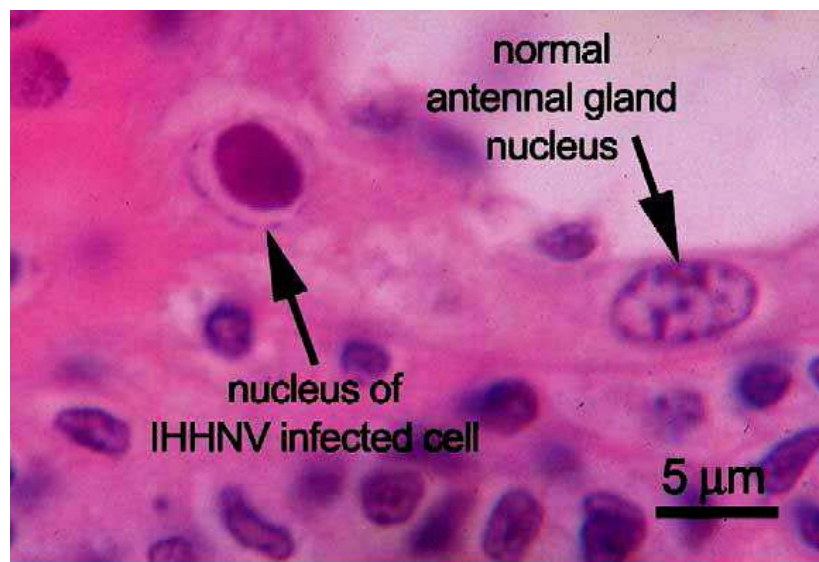


Figura 22 – Histologia de tecido da glândula antenal de camarão *P. monodon* mostrando corpúsculo de inclusão intranuclear (Cowdry tipo A) induzido pela infecção com o IHHNV (FLEGEL, 2006).

Controle e profilaxia

Diversas práticas podem ser aplicadas com sucesso no controle da infecção pelo IHHNV. O diagnóstico laboratorial utilizando-se a PCR é recomendado para a determinação da prevalência da infecção pelo IHHNV nos animais de um lote, em uma fazenda de cultivo, em populações selvagens ou em ovos e PLs comercializadas para povoamento das fazendas (FEGAN; CLIFFORD, 2001; MOTTE et al., 2003). Esta metodologia permite a criação de lotes SPF (*specific pathogen free*) para o IHHNV em cultivo de *L. vannamei* e *P. stylirostris* (LIGHTNER, 2005). A produção de linhagens de camarões resistentes ao IHHNV também tem sido utilizada com algum sucesso em fazendas de cultivo (WEPPE, 1992; ZARANHERSZBERG; ASCENCIO-VALLE, 2001). Essa metodologia apresenta a limitação de que linhagens resistentes ao IHHNV não sejam resistentes também para outros vírus como por exemplo o WSSV (TANG et al., 2000; ALCIVAR-WARREN et al., 1997). O repovoamento de fazendas com o *L. vannamei*, que possui relativa resistência natural ao IHHNV, tornou essa espécie de camarão a principal espécie cultivada no hemisfério oeste e a partir de 2004, em todo o mundo (ROSENBERRY, 2004; LIGHTNER, 2005; LIGHTNER et al., 2009).

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS VIRAIS EM CAMARÕES

A utilização da PCR, associada às outras metodologias de diagnóstico, pode contribuir para o monitoramento de rotina em reprodutores, larvicultura, nos cultivos e em populações de invertebrados que compartilham o mesmo habitat (HOUSSAIN et al., 2001; LO et al., 1997). A PCR tem sido a técnica mais utilizada devido à sua sensibilidade quando comparada a outros métodos moleculares, sendo a principal metodologia para o monitoramento de enfermidades em camarões, especialmente em casos de infecção assintomática (LO et al., 1997).

Diagnóstico em situação de doença

Na ocorrência de doença clínica devem ser coletados animais vivos e moribundos com lesões significativas e também amostras de todas as espécies susceptíveis, evitando-se espécimes mortos. Quando os sinais clínicos são compatíveis com os das doenças relacionadas como de notificação obrigatória pela OIE deve-se colher amostras de todas as espécies para garantir a antecipação do diagnóstico e a adoção de ações de controle. Para a realização dos exames laboratoriais com o objetivo de diagnóstico recomenda-se a coleta de um número mínimo de espécimes: 100 ou mais para estádios larvais, 50 para estádios de pós-larvas e 10 se forem juvenis ou adultos. O número de amostras de espécimes com a doença clínica deve ser o maior possível, não sendo recomendado um número mínimo, mas sim que seja observada a cuidadosa seleção dos pontos de coleta e a qualidade dos espécimes (OIE, 2009).

Diagnóstico em crustáceos assintomáticos

Quando as amostras são coletadas para vigilância sanitária são testados animais assintomáticos para a prevenção de doenças ou para a certificação de “livre de patógenos específicos” (SPF). O tamanho da amostra a ser coletada é determinado por uma tabela estatística. O tamanho mínimo da amostra para a realização do teste deve prever o intervalo de confiança de 95% assumindo a prevalência da infecção mínima igual ou superior a 2%.

A tabela 1 apresenta a distribuição do tamanho da amostra de acordo com a população a ser avaliada (OIE, 2003).

Tabela 1 – Número de indivíduos para coleta de tecidos utilizados em testes laboratoriais com base na prevalência esperada dos patógenos WSSV e IHHNV em uma população de camarões cultivados

Tamanho da população	Tamanho da amostra necessária para a prevalência esperada em número de indivíduos						
	2%	5%	10%	20%	30%	40%	50%
50	50	35	20	10	7	5	2
100	75	45	23	10	9	7	6
250	110	50	25	10	9	8	7
500	130	55	26	10	9	8	7
1000	140	55	27	10	9	9	8
1500	140	55	27	10	9	9	8
2000	145	60	27	10	9	9	8
4000	145	60	27	10	9	9	8
10000	145	60	27	10	9	9	8
≥ 100.000	150	60	30	10	9	9	8

Fonte: modificado a partir de Amos (1985) e Oie (2003).

O planejamento da amostragem deve ser realizado por região, fazenda, idade do cultivo ou estação do ano, de forma que a época de amostragem seja a mais favorável para a identificação do patógeno (OIE, 2009).

Conservação das amostras para análises moleculares

As amostras devem ser embaladas em sacos plásticos ou frascos de primeiro uso com a intenção de minimizar o risco potencial de contaminação cruzada com outras amostras de locais diferentes, viveiros ou lotes. As amostras devem ser identificadas por local e data da coleta. Os procedimentos para preservação e transporte de amostras são:

1. Tecidos conservados em etanol 95°GL na proporção 1:9 (p/v) estocados à temperatura ambiente.
2. Espécimes inteiros congelados: devem ser rapidamente congelados, ainda no campo, utilizando gelo seco triturado ou em

freezer à temperatura de -18 a -20°C . As amostras devem ser transportadas em caixas isotérmicas contendo gelo.

3. Tecidos refrigerados: os espécimes devem ser transportados para o laboratório em no máximo 24 h. Os sacos plásticos devem ser acondicionados em caixas de material isotérmico com gelo em quantidade suficiente para manter a temperatura.
4. Tecidos em solução de lise preconizada pela OIE (2009): as amostras são mantidas preservadas por até um ano à temperatura ambiente.
5. A partir de animais vivos transportados ao laboratório pode ser coletada a hemolinfa, que é o tecido de eleição para as técnicas moleculares. As amostras devem ser coletadas com agulha e seringa puncionando o *sinus* ventral ou a parede lateral do corpo do animal. A hemolinfa deve ser coletada com o anticoagulante citrato de sódio na proporção de 10% (v/v) e preservada a -20°C até o processamento (Figura 23).



Figura 23 – Coleta de hemolinfa do *sinus* ventral de camarão da espécie *L. vannamei*. Foto do autor.

Seleção de tecidos para análises laboratoriais

Vários tecidos podem ser coletados para a detecção de partículas virais. A escolha dos tecidos a serem coletados depende da idade dos animais, dos materiais disponíveis para a coleta, da habilidade da pessoa que irá fazer a coleta, do tempo necessário para a sua conservação e da distância do laboratório. Segundo Lightner e Tang-Nelson (2001), os resultados na quantificação de partículas virais do WSSV mostraram que a hemolinfa contém o título mais alto, quando comparada com outros tecidos (Tabela 2).

Tabela 2 – Número médio de cópias do genoma do WSSV presentes em hemolinfa, pleópodos, brânquias, musculatura e hepatopâncreas de camarão *L. vannamei*, determinada por *real time*-PCR (LIGHTNER; TANG-NELSON, 2001).

Tipo de Amostra	Número médio de cópias do genoma
Hemolinfa	$2,55 \times 10^9$
Pleópodos	$1,6 \times 10^9$
Brânquias	$1,2 \times 10^9$
Músculo	$1,9 \times 10^8$
Hepatopâncreas	$9,0 \times 10^7$

Com a expansão da aquicultura em todas as regiões do mundo as doenças infecciosas tem sido o principal fator limitante para o desenvolvimento da atividade. Todos os países produtores, sem exceção, já registraram perdas econômicas consideráveis decorrentes do ingresso de doenças infecto-contagiosas (LIGHTNER; VANPATTEN, 2001, SEIFERT et al., 2006). Estima-se que os prejuízos causados pelo WSSV desde a sua descoberta até o presente chegam a US\$ 10 bilhões (OIE, 2009).

Em 2005, com o ingresso do WSSV no Brasil, ocorreram prejuízos consideráveis na produção catarinense de camarões de cultivo, levando a retração deste importante segmento do agronegócio (SEIFFERT et al., 2006). O diagnóstico

das condições sanitárias dos camarões cultivados é usado para a identificação precoce dos problemas no sistema de cultivo, como a presença de enfermidades em condições ambientais adversas. Isto permite que as ações sejam tomadas rapidamente para controlar, minimizar ou excluir os efeitos negativos de condições desfavoráveis sobre a produção, reduzindo os prejuízos financeiros resultantes das mortalidades ou do mau desempenho dos animais. O monitoramento e avaliação do estado de saúde devem ser constantes a fim de garantir um status sanitário mínimo que possa garantir a produção.

Países que estiveram sob o impacto do WSSV desenvolveram um sistema de apoio laboratorial para as decisões sanitárias o que permitiu a retomada da produção. No Brasil, a falta de laboratórios para a realização de diagnóstico etiológico próximo às áreas de cultivo foi um dos principais motivos do agravamento dos problemas sanitários (ANDRADE et al., 2006).

Compreender como reage o hospedeiro diante da infecção viral contribui para o planejamento de medidas profiláticas que possam minimizar os efeitos devastadores destas doenças nos cultivos. A adoção de novas medidas de controle e de educação sanitária continuada pode levar ao sucesso no controle destas enfermidades a exemplo de outros países (MACIEL, 2002).

Também deve ser considerado o potencial brasileiro para a carcinicultura que é de tal magnitude que, se for eficientemente explorada, pode colocar o Brasil na liderança da produção mundial desse setor. O país dispõe de cerca de 600.000 ha de áreas apropriadas para o desenvolvimento dessa atividade, com destaque para os estados do Maranhão (150.000 ha), Bahia (100.000 ha), Rio Grande do Norte (60.000 ha), Ceará (50.000 ha) e Sergipe (20.000 ha). As regiões sul e sudeste, com potencial para 100.000 ha exploram apenas 1.550 ha (ROCHA; ROCHA, 2010).

As oportunidades que o Brasil oferece para a exploração da atividade de camarão cultivado (600.000 ha) são excepcionais. A utilização de apenas 1/3 dessa área (200.000 ha), que representa um pouco mais do que a área explorada atualmente pelo Equador (180.000 ha), menos de 25% da área utilizada pela carcinicultura do Vietnã (850.000 ha) e 1/3 da área explorada pela China (600.000 ha), poderia elevar a produção de camarão cultivado no Brasil das atuais 70.000 t em 2008 para 1 milhão de toneladas/ano (ROCHA; ROCHA, 2010). A viabilização desse desenvolvimento poderia gerar 750.000 empregos, beneficiando

cerca de 4.000.000 de pessoas, além de contribuir com uma receita de R\$ 10 bilhões ou US\$ 2,5 bilhões de divisas/ano. Esses números seriam suficientes para transformar a sócio-economia rural litorânea, principalmente da região nordeste brasileira, que se defronta atualmente com sérios problemas de falta de oportunidades e emprego produtivo para seus trabalhadores rurais e pescadores artesanais, o que vem contribuindo para o aumento do êxodo rural (ROCHA; ROCHA, 2010).

Estas condições reunidas demonstram a necessidade de ações para o controle das doenças que impedem o bom desenvolvimento da atividade e, conseqüentemente, impedem o desenvolvimento do potencial pleno da carcinicultura no Brasil.

REFERÊNCIAS

ABCC. Associação Brasileira dos Criadores de Camarão Marinho. A Carcinicultura Brasileira em 2003. *Revista da ABCC*, Recife, ano 7, nº 1, 2004.

ABCC. Associação Brasileira dos Criadores de Camarão Marinho. Estimativas de produção para a carcinicultura Brasileira em 2004. *Revista da ABCC*, Recife, ano 8, nº 1, 2005.

ALCIVAR-WARREN, A.; OVERSTREET, R.M.; DHAR A.K.; ASTROFSKY, K.; CARR, W.H.; SWEENEY, J.; LOTZ, J. Genetic susceptibility of cultured shrimp (*Penaeus vannamei*) to infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus and *Baculovirus penaei*: possible relationship with growth status and metabolic gene expression. *Journal Invertebrate Pathology*, v.70, p.190-197, 1997.

ALDAY DE GRAINDORGE, V.; FLEGEL, T.W. Diagnosis of shrimp diseases with emphasis on the Black Tiger Prawn *Penaeus monodon*. Interactive CD ROM. Multimedia Asia. Bangkok. 1999.

AMOS, K.H. Procedures for the Detection and Identification of Certain Fish Pathogens. 3rd. Fish Health Section, American Fisheries Society. Corvallis, OR. Bell, T.A. and D.V. Lightner 1987. And outline of penaeid shrimp culture methods including infectious disease problems and priority drug treatments. *Veterinary and Human Toxicology*, v.29, p.37-43, 1985.

ANDRADE, T.P.; LIGHTNER, D.V.; ROCHA, I.P. Enfermidades da Carcinicultura Brasileira: métodos de diagnóstico e prevenção. *Revista Panorama da Aquicultura*, p.25-33, janeiro-fevereiro, 2006.

BACHÈRE, E. Shrimp immunity and diseases control. *Aquaculture*, v.191, p.3-11, 2000.

BARBIERI JUNIOR, R.C.; OSTRENSKY NETO, A. *Camarões Marinhos: reprodução, maturação e larvicultura*, vol. 1. Aprenda Fácil Editora, Viçosa, MG. 2001.

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

BORGHETTI, N.R.B.; OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J.R. *AQUICULTURA: uma visão geral sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no mundo*. Curitiba: Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais, 128 p. 2003.

BRAY, W.A.; LAWRENCE, A.L; LEUNG-TRUJILLO, J.R. The effect of salinity on growth and survival of *Penaeus vannamei*, with observations on the interaction of IHHN virus and salinity. *Aquaculture*, v.122, p.133-146, 1994.

BROCK, J.A.; LIGHTNER, D.V. Disease of crustácea. Disease caused by microorganisms. In: *Disease of marine animals*, vol III, Kinne O., ed. Biologische Anstalt Hamburg, Germany, p. 245-349, 1990.

BROWDY, C.L.; HOLLOWAY, J.D.; KING, C.O.; STOKES, A.D.; HOPKINS, J.S.; SANDIFER, P.A. IHVN virus and intensive culture of *Penaeus vannamei*: effects of stocking density and water exchange rates. *Journal Crustacean Biology*, v.13, p.87-94, 1993.

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

CHAYABURAKUL, K.; NASH, G.; PRATANPIPAT, P.; SRIURARAIATANA, S.; WITHYACHUMNARNKUL. Multiple pathogens found in growth-retarded black tiger shrimp *Penaeus monodon* cultivated in Thailand. *Diseases Aquatic Organisms*, v.60, p.89-96, 2004.

CHANG, Y.S.; LO, C.F.; PENG, S.E.; LIU, K.F.; WANG, C.H.; KOU, G.H. White spot syndrome virus (WSSV) PCR-positive Artemis cysts yield PCR-negative nauplii that fail to transmit WSSV when fed to shrimp postlarvae. *Diseases Aquatic Organisms*, v.49, p.1-10, 2002.

CHEN, L.L.; WANG, H.C.; HUANG, C.L.; PENG, S.E.; CHEN, Y.G.; LIN, S.J.; CHEN, W.Y.; DAI, C.F.; YU, H.T.; WANG, C.H.; LO, C.F.; KOU, G.H. Transcriptional analysis of DNA polymerase gene of shrimp white spot syndrome virus. *Virology*, v.301, p.136-147, 2002.

CHOU, H.Y.; HUANG, C.Y.; WANG, C.H.; CHIANG, H.C.; LO, C.F. Patogenicity of baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Disease Aquatic Organisms*, v.23, p.165-173, 1995.

FALQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALI, L.A. Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses. Eight Report of the International Committes on Taxonomy of Viruses. *Elsevier Academic Press*, p.1259, 2005.

FAO. The State of World's Fisheries and Aquaculture 2002. FAO Information Division. Rome, Italy, 2003. Disponível em <http://www.fao.org/sof/sofia/index_em.htm>. Acesso em 13 mar. 2005.

FAO. Fisheries Department, Fishery Information Data and Statistic Unit. Fishstat plus: universal software for fishery statistical times series. Aquaculture production: quantities 1950-2005, Aquaculture production: values 1984-2005, capture production: 1950-2005, Version 2.30. Romes: FAO, 2007, disponível em <<http://www.fao.org>>. Acesso em: ago. 2009.

FAO. Acuaculture en Chile y Latinoamérica. FAO Information Division. Rome, Italy, 2008. Disponível em <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 08 ago. 2010.

FAO. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2008. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Rome, 2009. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/11/i2050s/>. Acesso em: 13 mar. 2010.

FAO. World review of fisheries and aquaculture, part 1. FAO Fisheries and Aquaculture Department. Rome, 2010. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 30 jan. 2011.

FAO. The state of world fisheries and aquaculture. FAO Fisheries and Aquaculture Department. Rome, 2010. ISBN 978-92-5-106665-1. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 30 jan. 2011.

FEGAN, D.F.; CLIFFORD, H.C.III. Health management for viral disease in shrimp farms. *In: The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture. Aquaculture 2001*, Browdy C.L & Jory D.E., eds. *The World Aquaculture Society*, Baton Rouge, Louisiana, USA, p.168-198, 2001.

FLEGEL, T.W. Major viral disease of black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *World Journal Biotechnology*, v.13, p.433-442, 1997.

FLEGEL, T.W. Detection of major penaeid shrimp viruses in Ásia, a historical perspective with emphasis on Thailand. *Aquaculture*, v.258, p.1-33, 2006.

HEO, M.; JU, J.; JUNG, C. Viral disease on the cultured *Penaeus chinensis* and *Penaeus japonicus*. *Journal Korean Society Microbiology*, v.23, p.381-389, 1998.

HOUSSAIN, S.; OTTA, S.K.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. Detection of white spot virus (WSSV) in wild captured shrimp and in non-cultured crustaceans from shrimp ponds in Bangladesh by Polymerase Chain Reaction. *Fish Pathology*, v.36, p.93-95, 2001.

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.

HUANG, C.; ZHANG, X.B.; LIN, Q.; XU, X.; HU, Z.; HEW, C.L. Proteomic analysis of shrimp White spot syndrome viral proteins and characterization of a novel envelope protein VP466. *Molecular & Cellular Proteomics*, v.13, p.223-231, 2002a.

HUANG, C.; ZHANG, X.B.; LIN, Q.S.; XU, X.; HEW, C.L. Characterization of a novel envelope protein (VP281) of shrimp white spot syndrome virus by mass spectrometry. *Journal of General Virology*, v.83, p.2385-2392, 2002b.

HUANG, R.; XIE, Y.; ZHANG, J.; SHI, Z. A novel envelope protein involved in White spot syndrome virus infection. *Journal of General Virology*, v.86, p.1357-1361, 2005.

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

LENOCH, R. Avaliação do risco epidemiológico da carcinicultura catarinense usando como modelo a síndrome de taura e a doença da mancha branca. 2004. 86 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental). UNIVALI, Itajai/SC.

LI, L.; SHUMEI, L.; YANG, F. Characterization of an envelope protein (VP110) of White spot syndrome virus. *Journal of General Virology*, v.87, p.1909-1915, 2006.

LIGHTNER, D.V. Epizootiology, distribution and the impact on international trade of two penaeid shrimp viruses in the Americas. *Review of Scientific Technology*, v.15, p.579-601, 1996a.

LIGHTNER, D.V. A Handbook of Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA. 304 p, 1996b.

LIGHTNER, D.V. Biosecurity in shrimp farming: pathogen exclusion through use of SPF stock and routine surveillance. *Journal World Aquaculture Society*, v.36, p.229-248, 2005.

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

LIGHTNER, D.V.; REDMAN, R.M. Strategies for the control of viral diseases of shrimp in the Americas. *Fish Pathology*, v.33 (4), p.165-180, 1998b.

LIGHTNER, D.; TANG-NELSON, K. Development of real-time PCR assays for detection of white spot syndrome virus, yellow head virus, Taura syndrome virus, and infectious hypodermal and hematopoietic virus in penaeid shrimp. Department of Veterinary Science and Microbiology, University of Arizona, AZ 85721. NA06FD0448, 2001.

LIGHTNER, D.V.; VANPATTEN, K. Laboratory Procedures and Services. Global Shrimp OP. Dep. Veterinary Sci & Microbiology. University of Arizona, Tucson, 2001.

LIGHTNER, D.V.; REDMAN, R.M.; BELL, T.A. Infectious hypodermal and haematopoietic necrosis a newly recognized virus disease of penaeid shrimp. *Journal Invertebrate Pathology*, v.42, p.62-70, 1983.

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. In: *Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and de the United States*, Fulks W. & Main K., eds. The Oceanic Institute. Makapuu Point, Honolulu, Hawaii, USA, p.233-253, 1992.

LIGHTNER, D.V.; REDMAN, R.M.; HASSON, K.W.; PANTOJA, C.R. Taura syndrome in *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda): gross signs, histopathology and ultrastructure. *Disease Aquatic Organisms*, v.21, p.53-59, 1995.

LIGHTNER, D.V.; REDMAN, R.M.; ARCE, S.; MOSS, S.M. Specific Pathogen-Free (SPF) Shrimp Stocks in Shrimp Farms Facilities as a Novel Method for Disease Control in Crustaceans, In: *Shellfish Safety and Quality*, Shumway S. & Rodrick G., eds. Woodhead Publishers, London, UK, p.384-424, 2009.

LIU, Y.; WU, J.; SONG, J.; SILVARAMAN, J.; HEW. C.L. Identification of a novel nonstructural protein, VP9, from White spot syndrome virus: its structure reveals a ferredoxin fold with specific metal binding sites. *Journal Virology*, v.80 (21), p.10419-10427, 2006.

LO, C.F.; KOU, G.H. Virus-associated white spot syndrome of shrimp in Taiwan: a review. *Fish Pathology*, v.33, p.365-371, 1998.

LO, C.F.; HO, C.H.; CHEN, C.H.; LIU, K.F.; CHIU, Y.L.; YEH, P.Y.; PENG, S.E.; HSU, H.C.; LIU, H.C.; CHANG, C.F.; SU, M.S.; WANG, C.H.; KOU, G.H. Detection and tissue tropism of white baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with a especial emphasis on reproductive organs. *Diseases Aquatic Organisms*, v.30, p.53-72, 1997.

LOTZ, J.M. Special topic review: viruses, biosecurity and specific pathogen-free stocks in shrimp aquaculture. *World Journal Microbiology Biotechnology*, v.13, p.405-413, 1997.

MAEDA, M.; ITAMI, T.; MIZUKI, E.; TANAKA, R.; YOSHIZU, Y.; DOI, K.; YASUNAGA-AOKI, C.; TAKAHASHI, Y.; KAWARABATA, T. Red swamp crawfish (*Procambarus clarkia*): an alternative experimental host in the study of white sport syndrome virus. *Acta Virology*, v.44, p.371-374, 2000.

MACIEL M.L.T. Contribuição para o desenvolvimento de uma proposta de monitoramento e certificação sanitária em cultivo de camarão marinho no estado de Santa Catarina. 2002. 43 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura). UFSC. Florianópolis/SC.

MAGBANAU, F.; NATIVIDAD, K.; MIGO, V.; ALFAFARA, C.; DE LAPENA, F.; MIRANDA, R.; ALBALADEJO, J.; NADALA, E.; LOH, P. White spot syndrome virus (WSSV) in cultured *Penaeus monodon* in the Philippines. *Disease Aquatic Organisms*, v.421, p.77-82, 2000.

MOHAN, C.; SHANKAR, K.; KULKARNI, S.; SUDHA, P. Histopathology of cultured shrimp showing gross signs of yellow head syndrome and white spot syndrome during 1994 Indian epizootics. *Disease Aquatic Organisms*, v.34, p. 9-12, 1998.

MOMOYAMA, K.; HIRAOKA, M.; NAKANO, H.; KOUBE, H.; INOUE, K.; OSEKO, N. Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993: Histopathological study. *Fish Pathology*, v.29, p.141-148, 1994.

MOMOYAMA, K.; HIRAOKA, M.; NAKANO, H.; SAMESHIMA, M. Cryopreservation of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) and its survival in sea water at different temperatures. *Fish Pathology*, v.33, p.95-96, 1998.

MOTTE, E.; YUGCHA, E.; LUZARDO, J.; CASTRO, F.; LECLERCQ, G.; RODRIGUEZ, P.; MIRANDA, P.; BORJA, O.; SERRANO, J.; TERREROS, M.; MONTALVO, K.; NARVÁEZ, A.; TENORIO, N.; CEDEÑO, V.; MIALHE, E.; BOULO, V. Prevention of IHHNV vertical transmission in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, v.219, p.57-70, 2003.

NAKANO, H.; HIRAOKA, M.; SAMESHIMA, M.; KIMURA, T.; MOMOYAMA, K. Inactivation of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV), the causative agent of penaeid acute viraemia (PAV), by chemical and physical treatments. *Fish Pathology*, v.33, p.65-71, 1998.

NUNAN, L.; POULOS, B.; LIGHTNER, D. The detection of white spot syndrome virus (WSSV) and yellow head virus (YHV) in imported commodity shrimp. *Aquaculture*, v.160, p.19-30, 1998.

NUNAN, L.M. ; ARCE, S.M. ; STAHA, R.J.; LIGHTNER, D.V. Prevalence of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) and White Spot Syndrome Virus (WSSV) in *Litopenaeus vannamei* in Pacific Ocean of the coast of Panama. *Journal World Aquaculture Society*, v.32, p.330-334, 2001.

NUNES, A.J.P.; MARTINS, P.C. Avaliando o estado de saúde de camarões marinhos na engorda – parte 2. Cedecam/Labomar/UFC Cedecam, Instituto de Ciências do Mar/ UFC, 2004. Disponível em: <<http://www.aqualider.com.br>> Acesso em: 09 fev. 08.

OIE -OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. Manual of diagnosis tests for aquatic animal diseases, Fourth edition. OIE, Paris, France, 358 pp, 2003. Disponível em: <<http://www.oie.int/eng/normes/manual>>. Acesso em: 27 fev. 2005.

OIE -OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. Manual of Diagnostic: Test for Aquatic Animals – 2009. Disponível em: <<http://www.oie.int>>. Acesso em: 21 fev. 2010.

PÁEZ-OSUNA, F. The environmental impact of shrimp aquaculture: a global perspective. *Environmental Pollution Journal*, v.112, p.229-231, 2001.

PEREZ-FARFANTE, I.; KENSLEY, B.F. Penaeoid and sergestoid shrimp and prawns of the world: key of diagnosis to the families and genera. *Museum National d'Histoire Naturelle*, v.175, p.233, 1997.

PRIMAVERA, J.H.; QUINTIO, E.T. Runt-deformity syndrome in cultured giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *Journal Crustaceans Biology*, v.20, p.796-802, 2000.

ROCHA, I.P. A carcinicultura no contexto do setor pesqueiro brasileiro. *Revista Panorama da Aquicultura*, v.13, n.80, p.49-53, 2003.

ROCHA, I.P.; ROCHA, D.M. Carcinicultura marinha: realidade mundial, perspectiva e oportunidades para o Brasil. *Revista da ABCC*, Recife, ano 13, nº1, 2010.

ROBALINO, J.; BARTLETT, T.; SHEPARD, E.; PRIOR, S.; JARAMILLO, G.; SCURA, E.; CHAPMAN, R.W.; GROSS, P.S.; BROWDY, C.L.; WARR, G.W. Double-stranded RNA induces sequence-specific antiviral silencing in addition to nonspecific immunity in a marine shrimp: convergence of RNA interference and innate immunity in the invertebrate antiviral response? *Journal Virology*, v.79, p.13561-13571, 2005.

RODRIGUEZ, J.; MOULLAC, G.L. State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. *Aquaculture*, v.191, p.109-119, 2000.

ROSENBERRY, B. World Shrimp Farming 2004. Number 17, Published by Shrimp News International, San Diego, California, USA, 276 pp. 2004.

SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, J.G.; AGUIRRE-GUZMÁN, G.; MEJÍA-RUÍZ, H. White Spot Syndrome Virus in cultured shrimp: A review. *Aquaculture Research*, v.38, p.1339-1354, 2007.

SEIFFERT, W.Q.; BELTRAME, E.; ANDREATTA, E.R.; MAGGIONI, D.S. Enfermidades, uma oportunidade para repensar o cultivo de camarões marinhos. *Revista Panorama da Aquicultura*, v.97, p.32-38, 2006.

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. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in the genome of the black tiger prawn *Penaeus monodon* from Africa e Australia. *Virus Research*, v.118, p.185-191, 2006.

TANG, K.F.J.; NAVARRO, S.A.; LIGHTNER, D.V. A PCR assay for discriminating between infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) and the virus-related sequences in the genome of *Penaeus monodon*. *Diseases Aquatic Organisms*, v.53, p.91-99, 2007.

TANG, K.F.J.; DURAND, S.V.; WHITE, B.L.; REDMAN, R.M.; PANTOJA, C.R.; LIGHTNER, D.V. Postlarvas 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.

UFSC. Problemas sanitários no cultivo de camarões no sul do Brasil. In: Seminário Internacional de Sanidade Aquícola. UFSC, Florianópolis, SC. 2006.

VAN HUELTEN, M.C.W.; WESTENBERG, M.; GOODALL, S.D.; VLAK, J.M. Identification of two major virion protein genes of white spot syndrome virus in shrimp. *Virology*, v.266, p.227-236, 2000b.

VAN HUELTEN, M.C.W.; REIJNSM M.; VEMEESCH, A.M.G.; ZANDBERGEN, F.; VLAK, J.M. Identification of VP19 and VP15 of white spot syndrome virus (WSSV) and glycosylation status of the WSSV major structural proteins. *Journal of General Virology*, v.83, p.257-265, 2002.

VIDAL, O.M.; GRANJA, C.B.; ARANGUREN, F.; BROCK, J.A.; SALAZAR, M.A. Profound effect of hyperthermia on survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles with white spot syndrome virus. *Journal World Aquaculture Society*, v.32, p.364-372, 2001.

VIJAYAN, K.K.; STALIN, RAJ V.; BALASUBRAMANIAN, C.P.; ALAVANDI, S.V.; THILLAI SEKHAR, V.; SANTIAGO, T.C. Polychaete worms – a vector for white spot syndrome virus (WSSV). *Diseases Aquatic Organisms*, v.63, p.107-111, 2005

VLAK, J.M.; BONAMI, J.R.; FLEGEL, T.W.; KOU, G.H.; LIGHTNER, D.V.; LO, C.F.; LOH, P.C.; WALKER, P.J. *Nimaviridae*. In: C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger and L.A. Ball (ed.) VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Elsevier Academic Press, São Diego, CA. 2004.

WANG, Y.G.; LEE, K.L.; NAJIAH, M.; SHARIFF, M.; HASSAN, M.D. A new bacterial white spot syndrome (BWSS) in cultured tiger shrimp *Penaeus monodon* and its comparison with white spot syndrome (WSS) caused by virus. *Disease Aquatic Organisms*, v.41, p.9-18, 2000.

WINARO, B. Shrimp aquaculture in Indonesia. In: Browdy CL. Hopkins JS (eds). Swimming through troubled water. Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming. World Aquaculture Society, Baton Rouge, p.24-28, 1995.

WEPPE, M. Demonstracion de altas cualidades de la cepa de *P. stylirostris* (AQUACOP SPR 43) resistente al virus IHHN. Proceeding of the Ecuadorian Aquaculture Congress, CENAIM, Guayaquil, Ecuador, p.226-232, 1992.

WITTEVELDT, J.; CIFUENTES, C.C.; VLAK, J.M.; VAN HULTEN, M.C. Protection of *Penaeus monodon* against White Spot Syndrome Virus by oral vaccination. *Journal of Virology*, v.78, p.2057-2061, 2004.

WONGTEERASUPAYA, C.; VICKERS, J.E.; SRIURAIRATANA, S.; NASH, G.L.; AKARAJAMORN, A.; BOONSAENG, V.; PANYIM, S.; TASSANAKAJON, A.; WITHYACHUMNARNKUL, B.; FLEGEL, T.W. A non-occluded systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Diseases Aquatic Organisms*, v.21, p.69-77, 1995.

WU, C.; YANG, F. Localization studies of two white spot syndrome virus structural proteins VP51 and VP76. *Virology Journal*, v.3, p.76-83, 2006.

YAN, D.C.; DONG, S.L.; HUANG, J.; YU, X.M.; FENG, M.Y.; LIU, X.Y. White spot syndrome virus (WSSV) detected by PCR in rotifera and rotifer resting eggs from shrimp pond sediments. *Diseases Aquatic Organisms*, v.59, p.69-73, 2004.

ZARAIN-HERZBERG, M.; ASCENCIO-VALLE, F. Taura syndrome in Mexico: follow-up study in shrimp farms of Sinaloa. *Aquaculture*, v.103, p.1-9, 2001.

ZHANG, X.; HUANG, C.; XU, X.; HEW, C.L. Transcriptional and identification of an envelope protein gene (p22) from shrimp white spot syndrome virus. *Journal of General Virology*, v.83, p.471-477, 2002.

ZHU, Y.; XIE, X.; YANG, F. Transcription and identification of a novel envelope protein (VP124) gene of shrimp white spot syndrome virus. *Virus Research*, v.113, p.100-106, 2005.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar a presença do WSSV e do IHNV em fazendas de camarões marinhos cultivados na região norte catarinense.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Realizar o diagnóstico molecular do WSSV e do IHNV por meio da PCR.
2. Avaliar a taxa de infecção pelo WSSV e IHNV nos vários estádios de criação do camarão *Litopenaues vannamei* e em potenciais hospedeiros naturais.
3. Avaliar comparativamente as taxas de infecção pelo WSSV e IHNV em camarões marinhos cultivados sintomáticos e assintomáticos.
4. Realizar um estudo longitudinal do perfil da infecção pelo WSSV e IHNV em camarões marinhos cultivados.

3 ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO

3.1 ARTIGO A

INFECÇÃO PELO VÍRUS DA MANCHA BRANCA EM CAMARÕES MARINHOS CULTIVADOS NO ESTADO DE SANTA CATARINA, BRASIL INFECÇÃO PELO VÍRUS DA MANCHA BRANCA EM CAMARÕES MARINHOS CULTIVADOS NO ESTADO DE SANTA CATARINA, BRASIL.

Resumo

A Doença da Mancha Branca é uma infecção viral responsável por consideráveis prejuízos econômicos à carcinicultura mundial. No início, a infecção manifesta-se de forma epidêmica, com altas taxas de mortalidade. Posteriormente, a infecção mantém-se de forma endêmica interferindo com a produtividade dos lotes. Na região sul do Brasil a infecção foi identificada pela primeira vez em 2005 e ocasionou grande impacto na produção de camarão marinho cultivado. O presente estudo foi delineado com o objetivo de avaliar a presença do vírus da mancha branca (WSSV) tanto em camarões marinhos (*Litopenaeus vannamei*) cultivados quanto em hospedeiros naturais da região norte do litoral catarinense. No período de 2005 a 2008 foram regularmente monitoradas 12 fazendas de criação de camarão onde foram colhidas 440 amostras de diferentes tecidos de *L. vannamei*. A amostragem foi estratificada por faixa etária tendo sido colhidas amostras representativas de pós-larvas, na chegada à fazenda, e de animais com 30, 60 e 90 dias de cultivo e durante a despesca. Colheitas adicionais, independentes das colheitas regulares, eram realizadas naqueles lotes que apresentavam taxas elevadas de mortalidade. Foram também incluídas na amostragem 210 amostras provenientes de tecidos de animais nativos tais como caranguejos (*Aratus pisoni* e *Uca thayeri*), siri (*Callinectes sapidus*), zooplâncton, peixes e camarões nativos (*Penaeus schimitti*) presentes nos reservatórios e canais de despesca das fazendas. A identificação do WSSV foi realizada pela técnica de PCR conduzida de acordo com a metodologia descrita pela OIE. Entre as 12 fazendas avaliadas, o WSSV foi identificado em 9 (75,0%) sendo que em 1 (11,1%) a infecção foi assintomática e nas 8 (88,9%) fazendas restantes foram observados animais com sinais clínicos e taxas de mortalidade entre 75 a 100%. Das 440 amostras obtidas de camarão *L. vannamei*, 93 (21,13%) amostras foram positivas para o WSSV. O vírus foi também identificado em 22 (10,47%) amostras de tecidos obtidas de organismos nativos como os caranguejos, siris, zooplâncton e camarão nativo, sugerindo o papel destes animais como hospedeiros naturais. Os resultados demonstraram a ampla distribuição do WSSV em camarões marinhos cultivados e em hospedeiros naturais na região e período estudados.

Palavras-chave: Doença da mancha branca. WSSV. PCR. *Litopenaeus vannamei*. Hospedeiros naturais.

WHITE SPOT SYNDROME VIRUS INFECTION IN CULTIVATED MARINE SHRIMPS IN THE STATE OF SANTA CATARINA, BRAZIL.

Abstract

The White Spot Syndrome Disease (WSSD) is a viral infection responsible for considerable economic losses to shrimp cultivation worldwide. In the beginning, the infection occur in epidemic form with high mortality rates. Later, the infection remains in endemic form interfering with the productivity of the farm. In southern Brazil, the WSSD was first identified in 2005 and caused great impact in the farmed shrimp production. This study was designed to evaluate the presence of white spot syndrome virus (WSSV) in both marine shrimp (*Litopenaeus vannamei*) cultivation and in natural hosts of the northern coast of Santa Catarina, Brazilian South region. In the period from 2005 to 2008, 12 farms were regularly monitored, where were collected 440 samples from different tissues of *L. vannamei*. The sampling was stratified by age and representative samples were taken of post-larvae, on arrival at the farm, and animals with 30, 60, and 90 days of cultivation and in the finish of the production cycle. Additional harvests, independent of regular harvests, were done in those lots that have higher mortality rates. Were also included in the sampling 210 samples collected of native animals such as crabs (*Aratus pisoni*, *Uca thayeri*, and *Callinectes sapidus*), zooplankton, fish, and native shrimp (*Penaeus schmitti*) presents in the farm reservoirs. The identification of WSSV was carried out by polymerase chain reaction, according the OIE methodology. Among the 12 farms evaluated, the WSSV was identified in 9 (75.0%). In 1 (11.1%) farm the infection was asymptomatic and in 8 (88.9%) remaining farms were observed animals with clinical signs and mortality rates between 75 to 100%. Of the 440 samples of *L. vannamei* shrimp, 93 (21.13%) samples were WSSV positive. The virus was also identified in 22 (10.47%) tissue samples obtained from native organisms such as crabs, shrimp, and zooplankton, suggesting the role of these animals as natural hosts. The results demonstrated the wide distribution of WSSV in cultured marine shrimps and natural hosts in the region and period studied.

Keywords: White spot disease. WSSV. PCR. *Litopenaeus vannamei*. Natural hosts.

INTRODUÇÃO

A carcinicultura no Brasil, assim como em outros países produtores de camarão marinho em cativeiro, tem enfrentado muitos prejuízos econômicos devido à presença de doenças infecciosas de etiologia viral (ANDRADE et al., 2006). A notificação no Brasil em janeiro de 2005 do vírus da doença da mancha branca (WSSV - *white spot syndrome virus*) em camarões marinhos de cultivo tem causado

queda nas taxas de desenvolvimento dessa atividade no estado de Santa Catarina, localizado na região sul do Brasil (SEIFFERT et al., 2006).

O WSSV, classificado no gênero *Whispovirus*, família *Nimaviridae*, é um vírus envelopado de formato ovóide ou elipsóide com 120-150 nm de diâmetro e 170-290 nm de comprimento e genoma constituído por DNA fita dupla (dsDNA) (MAYO, 2002). A transmissão do vírus pode ocorrer tanto de forma horizontal quanto vertical e a infecção pode se manifestar nas formas endêmica ou epidêmica (OIE, 2009). O WSSV possui mais de 50 hospedeiros naturais, entre os quais muitos são frequentemente identificados nas fazendas de cultivo, representando vetores potenciais (OIE, 2009).

Em 2005, um surto de Doença da Mancha Branca nos cultivos do estado de Santa Catarina determinou taxa de mortalidade próxima a 100% (SEIFFERT et al., 2006). O conhecimento da epidemiologia da doença em uma região é de fundamental importância para o seu controle e profilaxia, uma vez que inúmeros fatores podem estar envolvidos na manutenção da infecção. As medidas de vigilância epidemiológica para a infecção pelo WSSV devem ser embasadas na determinação do perfil sanitário dos animais nas áreas de cultivo. A padronização de procedimentos de amostragens e de diagnóstico laboratorial, conduzidos de acordo com as normas internacionais, e a realização de inspeções sanitárias rotineiras é uma das metas a ser alcançada (MACIEL, 2002). O objetivo desse trabalho foi realizar um estudo longitudinal da infecção pelo WSSV em fazendas de camarões marinhos cultivados e em hospedeiros naturais na região do litoral norte do estado de Santa Catarina, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Região do estudo

O estudo foi realizado em 12 fazendas de cultivo de camarão marinho da espécie *L. vannamei*, que representavam a totalidade das fazendas localizadas no litoral norte de Santa

Catarina, Brasil. A região abrange os municípios de Araquari, Balneário Barra do Sul e São Francisco do Sul, entre as coordenadas 26°33'41"S

48°39'24"W e 26°12'31"S 48°44'23"W, como pode ser visualizado na figura 1. Foram avaliados quatro ciclos de produção, iniciando no primeiro semestre de 2005 e finalizando no primeiro semestre de 2008. O número de fazendas em operação e de viveiros povoados variou de acordo com os períodos de produção.



Figura 1 – Localização das fazendas de camarões marinhos cultivados na região norte catarinense, sinalizadas por círculos brancos. Foto Google Earth, 2011.

Amostragem

Para a coleta das amostras de camarão, com a finalidade de monitoramento sanitário, foram realizados dois procedimentos distintos em relação aos animais assintomáticos e aos com sinais clínicos. Para os animais assintomáticos utilizou-se os procedimentos recomendados pela OIE (2003) para a obtenção do intervalo de confiança de 95% e a prevalência de $\geq 2,0\%$. As amostras

de camarões *L. vannamei* cultivados foram provenientes de pós-larvas (PLs) na chegada à fazenda (1000 PLs por amostra) e com 30, 60 e 90 dias de cultivo e na despesca (150 animais por amostra) em caso da não ocorrência de mortalidade. Na presença de animais com sinais clínicos da doença foram coletados os moribundos de cada viveiro acometido, evitando-se a coleta de animais mortos. Em todas as coletas de tecidos de camarão cultivado também foram coletados tecidos de animais susceptíveis, possíveis hospedeiros naturais presentes nas áreas das fazendas.

As amostras foram colhidas em 4 ciclos de produção que compreenderam os períodos 2005/1 (ciclo 1), 2005/2 e 2006/1 (ciclo 2), 2006/2 e 2007/1 (ciclo 3) e 2007/2 e 2008/1 (ciclo 4). A distribuição do número de amostras avaliadas de acordo com o tipo (camarão assintomático, camarão sintomático e hospedeiros naturais) e de acordo com o período de cultivo (PL, 30, 60, 90 dias e despesca) está apresentada nas tabelas 1 e 2, respectivamente.

O total de amostras colhidas para os testes laboratoriais no período do estudo foi de 440 amostras de tecidos provenientes de camarões *L. vannamei* cultivados e 210 amostras de tecidos de diversas espécies de hospedeiros naturais. Para cada espécie animal eram elaborados pool de amostras biológicas provenientes de, no máximo, cinco animais por amostra. Os hospedeiros naturais analisados foram caranguejos, siris, zooplâncton, peixes, moluscos e camarões nativos. Os tecidos colhidos foram, preferencialmente, hemolinfa, pleópodos e brânquias (LIGHTNER; TANG-NELSON, 2001). Os pools das amostras foram homogeneizados e estocados a -20°C, ou em etanol 95%, até o processamento.

Tabela 1 – Distribuição das amostras biológicas avaliadas para a identificação do vírus da mancha branca por PCR, de acordo com os ciclos de produção.

Ciclo	Amostras avaliadas			Total
	Amostras de camarão		Hospedeiros naturais	
	assintomático	sintomático		
1	48	12	72	132
2	128	30	74	232
3	135	21	56	212
4	53	13	8	74
Total	364	76	210	650

Tabela 2 – Distribuição das amostras biológicas de camarão avaliadas para a identificação do vírus da mancha branca por PCR, de acordo com o período de cultivo

Período	Ciclo				Total
	1	2	3	4	
Pós-larva	ND	36	35	8	79
30 dias	ND	35	32	24	91
60 dias	ND	36	43	17	96
90 dias	30	28	24	12	94
Despesca	30	23	22	5	80
Total	60	158	156	66	440

Extração do Ácido Nucléico

Os fragmentos de tecidos foram triturados em solução PBS pH 7,2 (137 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 15 mM KH₂PO₄) e a suspensão (20% p/v) foi centrifugada por 15 min a 3000 x g a 4°C. Alíquotas de 500 µL dos sobrenadantes foram utilizadas para a extração do DNA por meio de uma combinação das técnicas fenol/clorofórmio/álcool isoamílico e sílica/tiocianato de guanidina, descrita por Alfieri et al. (2006). O DNA extraído foi eluído em 50 µL de água ultrapura estéril e mantido a -20°C até a sua utilização. Para o controle de eventuais contaminações, uma alíquota de água ultrapura estéril foi incluída em todos os procedimentos de extração do DNA.

Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

A PCR utilizada para a detecção do WSSV nas amostras biológicas foi realizada de acordo com a metodologia recomendada pela OIE descrita por LO et al. (1997), disponível em (http://www.oie.int/eng/normes/fmanual/A_00049.htm). Para as amostras provenientes de camarões cultivados sintomáticos a amplificação parcial da ORF 167 do WSSV foi realizada por meio de uma única etapa de amplificação com os oligonucleotídeos iniciadores 146F1 (5' ACT ACT AAC TTC

AGC CTA TCT AG 3') e 146R1 (5' TAA TGC GGG TGT AAT GTT CTT ACG A 3'), resultando em um fragmento de 1447 pb. Para descartar a presença de inibidores da PCR, os oligonucleotídeos iniciadores 143F (5' TGC CTT ATC AGC TNT CGA TTG TAG 3') e 145R (5' TTC AGN TTT GCA ACC ATA CTT CCC 3'), desenhados a partir de uma região conservada da subunidade 18s do RNA ribossômico decápoda, foram utilizados como controle interno de cada reação, resultando na amplificação de um produto específico de 848pb (KIM; ABELE, 1990; LO et al., 1996b). Para a amplificação parcial da ORF 167 do WSSV em material biológico proveniente de animais assintomáticos e hospedeiros naturais foi realizado o mesmo procedimento da PCR seguida de uma segunda etapa de amplificação (*nested-PCR*), com o emprego dos oligonucleotídeos iniciadores 146F2 (5' GTA ACT GCC CCT TCC ATC TCC A 3') e 146R2 (5' TAC GGC AGC TGC TGC ACC TTG T 3') resultando na amplificação de um produto com 941 pb. Em todas as reações foi adicionado 1 µL do DNA extraído, 20 pM de cada primer, 1,5 unidade de *Taq DNA polymerase* (Invitrogen® Life Technologies, EUA), 200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 mM de cada dNTP e água ultrapura estéril para o volume final de 25 µL. A amplificação foi realizado em termociclador nas seguintes condições de tempo e temperatura: uma etapa de 4 min a 94°C, seguida de 40 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 55°C, 2 min a 72°C e uma etapa final de 5 min a 72°C.

Alíquotas de 8 µL dos produtos amplificados foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5%, contendo brometo de etídio (0,5 mg/mL), em TBE pH 8,4 (89mM Tris; 89mM ácido bórico; 2mM EDTA) sob voltagem constante (90 V) por aproximadamente 45 min. Os produtos foram visualizados sob luz UV.

RESULTADOS

Deteção do WSSV

Durante a coleta de amostras para o monitoramento sanitário o número de fazendas e de viveiros cultivados variou em cada período de produção. No período de estudo 12 fazendas estiveram em atividade, oito apresentaram altas taxas de mortalidades e encerraram a atividade, duas entraram em operação e quatro fazendas permaneceram em produção. O número de fazendas em operação

em cada período avaliado, as comprometidas com a infecção sintomática do WSSV e aquelas com diagnóstico positivo para o WSSV pela PCR sem a ocorrência de sinais clínicos está demonstrado na tabela 3.

Tabela 3 – Número de fazendas com a detecção do vírus da mancha branca no período de 2005/1 a 2008/1, com e sem a ocorrência de infecção clínica na região litoral norte do estado de Santa Catarina, Brasil.

Ciclo	Total de fazendas em operação no período	Número de fazendas com animais doentes	Nº de fazendas com diagnóstico positivo por PCR com animais assintomáticos	Total de fazendas com a presença do WSSV
2005/1	7	4	0	4/7
2005/2 a 2006/1	9	4	3	7/9
2006/2 a 2007/1	10	4	2	6/10
2007/2 a 2008/1	8	5	2	7/8

As mortalidades de camarões nas fazendas foram observadas a partir de abril de 2005. Nas anotações de campo a ocorrência de frentes frias com chuvas intensas precedia a ocorrência de mortalidade em 7 a 10 dias. As fazendas que apresentaram animais com sinais clínicos da infecção pelo WSSV repetiram a mesma situação nos períodos de produção posteriores. Nos períodos seguintes, os surtos clínicos da doença da mancha branca acometeram animais mais jovens, a partir do 30º dia de cultivo, com alta mortalidade, inviabilizando a atividade nas fazendas. Nestas fazendas as taxas de mortalidades variaram de 75 a 100%. O número de viveiros cultivados e de viveiros com animais apresentando sinais clínicos da doença em cada ciclo de produção está demonstrado na tabela 4.

Tabela 4 – Número de viveiros cultivados por fazenda, número de viveiros de camarão *L. vannamei* com animais apresentando sinais clínicos da doença da mancha branca por ciclo de produção na região litoral norte do estado de Santa Catarina, Brasil.

Ciclo	Número de viveiros cultivados	Nº de viveiros com animais com sinais clínicos	%
2005/1	48	12	25,00
2005/2 a 2006/1	39	16	41,02
2006/2 a 2007/1	41	10	24,39
2007/2 a 2008/1	37	13	35,13

Das 440 amostras de tecidos de camarão *L. vannamei* coletadas nos diferentes períodos de produção, 93 (21,13%) amostras foram positivas para o WSSV. Destas, em 76 (100%) amostras coletadas de animais com sinais clínicos foi possível a amplificação de um fragmento de 1447 pb na PCR. As 17 (3,86%) amostras restantes, colhidas de animais assintomáticos foram positivas na segunda etapa da reação (*nested*-PCR) com amplificação de um produto com 941 pb.

Das 210 amostras coletadas de diferentes organismos nativos 22 (10,47%) foram positivas em *nested*-PCR. Os animais nativos positivos para o WSSV foram os caranguejos *Aratus pisoni* e *Uca thayeri*, o siri *Callinectes sapidus*, zooplâncton coletados dos viveiros com surto clínico e camarões nativos *Penaeus schmitti*. Todos estes animais estavam presentes nos reservatórios e no canal de despesca das fazendas que apresentavam animais cultivados que apresentaram sinais clínicos da infecção pelo WSSV. A tabela 5 apresenta a distribuição dos resultados positivos para o WSSV encontrados em camarão cultivado e em hospedeiros naturais.

Tabela 5 – Distribuição dos resultados da PCR para a identificação do *white spot syndrome virus* em camarões marinhos cultivados e em hospedeiros naturais em fazendas do litoral norte do estado de Santa Catarina, Brasil, de acordo com o período de coleta das amostras

Ciclo	Amostras avaliadas					
	Camarão cultivado			Hospedeiros naturais		
	Amostras Positivas	Total	%	Amostras Positivas	Total	%
2005/1	12	60	(20,00)	12	72	(16,66)
2005/2 e 2006/1	35	158	(22,15)	6	74	(8,10)
2006/2 e 2007/1	26	156	(16,66)	-	56	-
2007/2 e 2008/1	20	66	(30,30)	4	08	(50,00)
Total	93	440	(21,13)	22	210	(10,47)

DISCUSSÃO

Após o início da mortalidade em todos os viveiros de camarão cultivado em uma fazenda, o mesmo se repetiu em outras três fazendas vizinhas em um período de 15 dias. Os sinais clínicos observados durante a ocorrência das mortalidades foram compatíveis com a infecção pelo WSSV (OIE, 2009; JORY; DIXON, 1999; WANG et al., 1999a). Todas as amostras coletadas de animais com sinais clínicos foram positivas na PCR o que significa alta taxa de infecção (OIE, 2009) e demonstra a confiabilidade da técnica para diagnóstico desta enfermidade. A estabilidade do número de fazendas com animais positivos para o WSSV em cada novo ciclo de produção demonstra a rápida propagação e persistência do patógeno no ambiente, o que resultou na alta morbidade e mortalidade encontrada em todos os períodos.

A redução na faixa etária dos animais com sinais clínicos nos períodos seguintes sugere que o vírus já estava presente no sistema de criação quando da entrada das PLs nos viveiros. Todas as amostras de PLs coletadas na chegada à fazenda foram negativas nos testes laboratoriais sugerindo que a contaminação dos animais ocorreu no sistema de cultivo das fazendas. Nas quatro propriedades onde já haviam ocorrido animais sintomáticos houve novos animais com sinais clínicos da infecção pelo WSSV a partir dos 30 dias de cultivo com os camarões pesando de 2 a 3 g. Estes achados também foram observados por

Sánchez-Martínez et al. (2007) com o aparecimento da doença e mortalidade mais comumente observadas em camarões juvenis de 1 a 5 g.

A grande maioria das fazendas que foram positivas na *nested*-PCR apresentaram animais com sinais clínicos por ocasião da ocorrência de algum fator estressante para os animais cultivados, como mudanças de salinidade e temperatura ocasionadas por chuvas. Estes fatores ambientais que induzem a presença de animais sintomáticos também foram observados por Vidal et al. (2001) na Colômbia. Durante o período do estudo, em duas fazendas os animais foram positivos na *nested*-PCR e não manifestaram a doença clínica. O aparecimento de animais sintomáticos pela infecção do WSSV está condicionado às condições imunológicas dos animais, as condições ambientais (PINHEIRO et al., 2007, SALAZAR; GRANJA, 2004) e a presença de vetores contaminados (SOTO; LOTZ, 2001). A manutenção de condições ambientais normais, sem grandes alterações de temperatura e salinidade da água e o controle da presença hospedeiros naturais nos cultivos podem levar a conclusão do ciclo de produção sem os prejuízos econômicos ocasionados por altas taxas de mortalidade.

Todas as amostras positivas encontradas em hospedeiros naturais foram obtidas somente na reação de *nested*-PCR. De acordo com a OIE (2009) resultados positivos em *nested*-PCR significam infecção latente. Nesse estudo foram identificados como hospedeiros naturais do WSSV caranguejos das espécies *Aratus pisoni* e *Uca thayeri* e o camarão nativo *Penaeus schmitti*. A presença de uma grande variedade de vetores potenciais também é relatada por Lo et al. (1996a) que, na China, encontraram o WSSV em caranguejos (*Charybdis feriatus*, *Portunus pelagicus* e *P. sanguinolentus*). Kanchanaphum et al. (1998), em trabalho realizado na Índia encontraram caranguejos *Sesarma* sp., *Scylla serrata* e *Uca pugilator* positivos na PCR. O siri *Callinectes sapidus* foi descrito como hospedeiro por Chang et al. (2001) em coletas na região do oceano Atlântico da costa norte-americana. Estes achados também são semelhantes aos resultados de Rodriguez et al. (2003) e Hammed et al. (2003) que relatam que o WSSV é altamente infecciosos para camarões marinhos peneídeos e também pode infectar outros crustáceos e caranguejos marinhos. Vários estudos relatam como vetores potenciais do WSSV a atividade humana, aves marinhas ou outros animais como insetos e peixes, alimentos congelados e animais contaminados como PLs (LIGHTNER et al., 1997; HAMEED et al., 2002). Entretanto, neste estudo, nenhuma das 46 amostras

provenientes de peixes apresentou resultado positivo. A presença de vetores potenciais significa aumento no risco de ingresso da doença no sistema de cultivo. Os resultados demonstram a ampla distribuição do WSSV em camarões marinhos cultivados e em hospedeiros naturais na região e período estudados e apontam para a necessidade da adoção de medidas de controle e profilaxia dessa importante virose para a carcinicultura catarinense.

REFERÊNCIAS

- ALFIERI, A.A.; PARAZZI, M.E.; TAKIUCHI, E.; MÉDICI, K.C.; ALFIERI, A.F. Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998-2002. *Tropical Animal Health and Production*, v.38, p.521-526, 2006.
- ANDRADE, T.P.; LIGHTNER, D.V.; ROCHA, I.P. Enfermidades da Carcinicultura Brasileira: métodos de diagnóstico e prevenção. *Panorama da Aqüicultura*, p.25-33, janeiro-fevereiro, 2006.
- CHANG, P.S.; PENG, S.E.; WANG, H.C.; HSU, H.C.; HO, C.H.; WANG, C.H.; WANG, S.Y.; LO, C.F.; KOU, G.H. Sequencing and amplified restriction fragment length polymorphism analyses of ribonucleotide reductase large subunit gene of the white spot syndrome virus in blue crab (*Callinectes sapidus*) from American coastal waters. *Marine Biotechnology*, v.3, p.163-171, 2001.
- HAMEED, A.S.S.; MURTHI, B.L.M.; RASHEED, M.; SATHISH, S.; YOGANANDHAN, K.; MURUGAN, V.; JAYARAMAN, K. An investigation of *Artemia* as a possible vector for White spot syndrome virus (WSSV) transmission to *Penaeus indicus*. *Aquaculture*, v.204, p.1-10, 2002.
- HAMEED, A.S.S.; BALASUBRAMANIAN, G.; MUSTHAQ, S.S.; YOGANANDHAN, K. Experimental infection of twenty species of Indian marine crabs with white spot syndrome virus (WSSV). *Diseases of Aquatic Organisms*, v.57, p.157-161, 2003
- JORY, D.E.; DIXON, H.M. Shrimp white spot virus in the Western Hemisphere. *Aquaculture Magazine*, v.25, p.83-91, 1999.
- KANCHANAPHUM, P.; WONGTEERASUPAYA, C.; SITIDILOKRATANA, N.; BOONSAENG, V.; PANYIM, S.; TASSANAKALON, A.; WITHYACHUMNARNKUL, B.; FLEGEL, T.W. Experimental transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from crabs to shrimp *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*, v.34, p.1-7, 1998.
- KIM, W.; ABELE, G. Molecular phylogeny of selected decapod crustaceans based on 18S rRNA nucleotide sequences. *Journal of Crustacean Biology*, v.10, p.1-13, 1990.

LIGHTNER, D.; TANG-NELSON, K. Development of real-time PCR assays for detection of white spot syndrome virus, yellow head virus, Taura syndrome virus, and infectious hypodermal and haematopoietic virus in penaeid shrimp. Department of Veterinary Science and Microbiology, University of Arizona, AZ 85721. NA06FD0448, 2001.

LIGHTNER, D.V.; REDMAN, R.M.; POULOS, B.T.; NUNAN, L.M.; MARI, J.L.; HASSON, K.W. Risk of spread of penaeid shrimp viruses in the Americas by the international movement of live and frozen shrimps. *Scientific and Technical Review*, v.16, p.146-160, 1997.

LO, C.F.; HO, C.H.; PENG, S.E.; CHEN, C.H.; HSU, H.C.; CHIU, Y.L.; CHANG, C.F.; LIU, K.F.; SU, M.S.; WANG, C.H.; KOU, G.H. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. *Diseases of Aquatic Organisms*, v.27, p.215-225, 1996a.

LO, C.F.; LEU, J.H.; HO, C.H.; PENG, S.E.; CHEN, T.T.; CHOU, C.M.; YEH, P.Y.; HUANG, C.J.; CHOU, H.Y.; WANG, C.H.; KOU, G.H. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. *Diseases of Aquatic Organisms*, v.25, p.133-141, 1996b.

LO, C.F., HO, C.H., CHEN, C.H., LIU, Y.L., YEH, P.Y., PENG, S.E., HSU, H.C., LIU, H.C., CHANG, C.F., SU, M.S., WANG, C.H., KOU, G.H. Detection and tissue tropismo of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs. *Disease of Aquatic Organisms*, v.30, p.53-72, 1997.

MACIEL, M.L.T. Contribuição para o desenvolvimento de uma proposta de monitoramento e certificação sanitária em cultivo de camarão marinho no estado de Santa Catarina. 2002.43 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura). UFSC. Florianópolis/SC.

MAYO, M.A. (International Committee on Taxonomy of Viruses [ICTV] Secretary), virology division news: ICTV at the Paris ICV: Results of the Plenary Session and the Binomial Ballot. *Archives of Virology*, v.147 (11), p.2254-2260, 2002.

OIE -OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases – 2003. Disponível em <http://www.oie.int/eng/normes/fmanual/A_00049.htm>. Acesso em: 27 set. 2005.

OIE -OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. Manual of Diagnostic: Test for Aquatic Animals – 2009. Disponível na internet em <<http://www.oie.int>>. Acesso em: 21 fev. 2010.

PINHEIRO, A.C.A.S.; LIMA, A.P.S.; SOUZA, M.E.; NETO, E.C.L.; ADRIÃO, M.; GONÇALVES, V.S.P.; COIMBRA, M.R.M. Epidemiological status of Taura Syndrome and Infectious myonecrosis viruses in *Penaeus vannamei* reared in Pernambuco (Brazil). *Aquaculture*, v.262, p.17-22, 2007.

RODRIGUEZ, J.; BAYOT, B.; AMANO, Y.; PANCHANA, F.B.I.; ALDAY, V.; CALDERON, J. White Spot Syndrome Virus infection in cultured *Penaeus vannamei* (Boone) in Ecuador with emphasis on histopathology and ultrastructure. *Journal of Fish Diseases*, v.26, p.439-450, 2003.

SALAZAR, M.; GRANJA, C.B. Hyperthermia reduces viral load of white spot syndrome virus in infected *Litopenaeus vannamei*. *World Aquaculture Society Conference Book of Abstracts*, p. 236. World Aquaculture Society, Honolulu, Hawaii. 2004.

SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, J.G.; AGUIRRE-GUZMÁN, G.; MEJÍA-RUÍZ, H. White Spot Syndrome Virus in cultured shrimp: a review. *Aquaculture Research*, v.38, p.1339-1354, 2007.

SEIFFERT, W.Q.; BELTRAME, E.; ANDREATTA, E.R.; MAGGIONI, D.S. Enfermidades, uma oportunidade para repensar o cultivo de camarões marinhos. *Revista Panorama da Aquicultura*, v.97, p.32-38, 2006.

SOTO, M.A.; LOTZ, J.M. Epidemiological parameters of White Spot Syndrome Virus infections in *Litopenaeus vannamei* and *L. setiferus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.78, p.9-15, 2001

VIDAL, O.M.; GRANJA, C.B.; ARANGUREN, F.; BROCK, J.A.; SALAZAR, M.A. Profound effect of hyperthermia on survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles with white spot syndrome virus. *Journal World Aquaculture Society*, v.32, p.364-372, 2001.

WANG, Q.; WHITE, B.L.; REDMAN, R.M.; LIGHTNER, D.V. Per os challenge of *Litopenaeus vannamei* postlarvae and *Farfantepenaeus duorarum* juveniles with six geographic isolates of white spot syndrome virus. *Aquaculture*, v.170, p.179-194, 1999.

3.2 ARTIGO B

**DETECÇÃO DO VÍRUS DA INFECÇÃO HIPODERMAL E NECROSE
HEMATOPOIÉTICA (IHHNV) EM CAMARÕES CULTIVADOS E HOSPEDEIROS
NATURAIS NA REGIÃO NORTE CATARINENSE, BRASIL
DETECÇÃO DO VÍRUS
DA INFECÇÃO HIPODERMAL E NECROSE HEMATOPOIÉTICA (IHHNV) EM
CAMARÕES CULTIVADOS E HOSPEDEIROS NATURAIS NA REGIÃO NORTE
CATARINENSE, BRASIL.**

Resumo

O vírus da infecção hipodermal e necrose hematopoiética (IHHNV) é uma das mais frequentes causas de doenças em camarões cultivados. Altas taxas de infecção em uma população ocasionam prejuízos econômicos consideráveis devido ao comprometimento no desenvolvimento dos animais e pela maior susceptibilidade às infecções intercorrentes. O objetivo deste estudo foi avaliar a taxa da infecção pelo IHHNV em fazendas de cultivo de camarão *L. vannamei* e em possíveis hospedeiros naturais nos vários estádios de criação, na região litoral norte catarinense em quatro ciclos de produção, que compreendeu o período de janeiro de 2005 a abril de 2008. Foram avaliadas 12 fazendas onde foram colhidas 383 amostras de tecidos de camarão *L. vannamei* assintomáticos, provenientes de diferentes fases da criação que incluiu pós-larvas (na chegada à fazenda) e de animais com 30, 60 e 90 dias de cultivo e durante a despesca. Foram também incluídas no estudo 28 amostras de camarão *L. vannamei* provenientes de lotes com sinais clínicos da infecção pelo IHHNV e 74 amostras obtidas de prováveis hospedeiros naturais presentes nos tanques de cultivo. A identificação do IHHNV nas amostras biológicas foi realizada pela técnica de PCR, de acordo com a metodologia descrita pela OIE. O IHHNV foi identificado em 173 (45,17%) das amostras provenientes de *L. vannamei* assintomáticos e em 100% ($n=28$) das amostras colhidas de animais apresentando sinais clínicos da infecção. O IHHNV também foi identificado em 8 (10,8%) amostras provenientes de caranguejo da espécie *Aratus pisoni* ($n=5$) e de camarão nativo *Penaeus schmitti* ($n=3$). A identificação do IHHNV em amostras de *L. vannamei* assintomáticos, obtidas em todos os quatro ciclos de produção e em todas as faixas etárias; a presença do vírus em 100% das amostras provenientes de camarões com sinais clínicos; e também a identificação do IHHNV em prováveis hospedeiros naturais caracteriza a presença da forma endêmica da infecção no litoral norte catarinense. Esses resultados abrem a perspectiva da adoção de medidas de controle e profilaxia da infecção pelo IHHNV com o objetivo de reduzir os prejuízos econômicos ocasionados por essa virose e, conseqüentemente, proporcionar maior rentabilidade financeira à carcinicultura local.

Palavras-chave: Camarão. *L. vannamei*. Vírus. IHHNV. PCR.

**INFECTIOUS HYPODERMAL AND HAEMATOPOIETIC NECROSIS VIRUS
(IHHNV) DETECTION IN CULTIVATED MARINE SHRIMPS AND NATURAL
HOSTS IN THE NORTHERN REGION OF SANTA CATARINA STATE, BRAZIL.**

Abstract

The infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV) is one of the most frequent causes of diseases in cultured shrimp. High rates of infection in a population cause economic losses due to involvement in the development of the animals and increased susceptibility to secondary infections. The aim of this study was to evaluate the rate of infection by IHHNV in cultivation farms of shrimp *Litopenaeus vannamei* and possible natural hosts in varying stages of cultivation in the coast region north of Santa Catarina in four production cycles, which included the period January 2005 to April 2008. Were evaluated 12 farms where were collected 383 tissue samples from asymptomatic shrimp (*L. vannamei*) from different stages of cultivation that included post-larvae (on arrival at the farm) and animals with 30, 60, and 90 days of cultivation and in the finish of the production cycle. Also were included in the study 28 samples of *L. vannamei* shrimp from lots with clinical signs of IHHNV infection and 74 samples obtained of probable natural hosts present in the cultivation reservoir. The identification of IHHNV in the biological samples was performed by polymerase chain reaction according to the methodology described by the OIE. The IHHNV was identified in 173 (45.17%) samples from asymptomatic *L. vannamei* and 100% ($n=28$) from samples taken from animals showing clinical signs of infection. The IHHNV was also identified in 8 (10.8%) samples from the species of *Aratus pisoni* crab ($n=5$) and native *Penaeus schmitti* shrimp ($n=3$). The identification of IHHNV in samples of asymptomatic *L. vannamei* obtained in all the four production cycles and in all age groups; the presence of virus in 100% of samples from shrimp with clinical signs; and the identification of the probable natural host of IHHNV characterizes the presence of the infection in the endemic form in the north coast of Santa Catarina, Brazil. These results open the perspective of the adoption of measures to control and prevent the IHHNV infection in order to reduce economic losses caused by this viruses and thus provide financial returns to local shrimp production.

Keywords: Shrimp. *Litopenaeus vannamei*. Viruses. IHHNV. PCR.

INTRODUÇÃO

As doenças virais representam um dos principais obstáculos para o desenvolvimento da carnicultura mundial pois causam consideráveis prejuízos econômicos, bem como, grande impacto social nas regiões produtoras. O vírus da infecção hipodermal e necrose hematopoiética (*infectious hypodermal and*

haematopoietic necrosis virus – IHHNV) é um dos principais agentes etiológicos de doenças em camarões cultivados. A infecção é incriminada como um dos principais aspectos relacionados com o baixo desempenho da carcinicultura mundial (MONTGOMERY-BROCK et al., 2007).

O IHHNV foi identificado pela primeira vez em 1981 no Hawaii em camarões *Penaeus stylirostris* importados do Equador e Costa Rica onde ocasionou perdas superiores a 90% (LIGHTNER et al., 1983a). Posteriormente, a infecção se disseminou para outros países americanos e, atualmente, pode ser encontrada tanto em populações de camarões de cultivo quanto em selvagens de várias regiões produtoras do mundo (PANTOJA; LIGHTNER, 1999; MORALES-COVARRUBIAS; CHAVEZ-SANCHEZ, 1999; MORALES-COVARRUBIAS et al., 1999). No Brasil, Moser (2005), Oliveira-Neto (2006) e Braz et al. (2009) relataram a ocorrência deste vírus em camarões cultivados e nativos nos estados de Santa Catarina, Ceará e Rio Grande do Norte, respectivamente.

O IHHNV está classificado no gênero *Brevidensovirus* da família *Parvoviridae*. O virion icosaédrico, não-envelopado, possui genoma composto por DNA de fita simples (ssDNA) (FAUQUET et al., 2005). Os camarões juvenis quando infectados podem apresentar mortalidade próxima a 100%. Nos animais sobreviventes o sinal clínico mais evidente da infecção com o IHHNV é a Síndrome do Rostro Deformado (RDS) que produz alterações anatômicas no rosto e no corpo de camarões juvenis de *Litopenaeus vannamei* (*L. vannamei*) e *Penaeus monodon*, culminando com grandes diferenças no tamanho entre animais de um mesmo lote (BROCK; LIGHTNER, 1991; KALAGAYAN et al., 1991; PRIMAVERA; QUINTIO, 2000).

O rendimento econômico de cultivos de *L. vannamei* infectados com o IHHNV é, em média, 10 a 50% inferior aos obtidos em cultivos livres da infecção (LIGHTNER; REDMAN, 1998). A maioria das infecções pelo IHHNV são subclínicas (LIGHTNER et al., 1983a) e a manifestação de sinais clínicos depende de inúmeros fatores relacionados ao agente etiológico, ao hospedeiro e ao meio ambiente de cultivo (FLORES, 2007).

O objetivo desse estudo foi avaliar a ocorrência da infecção pelo IHHNV em camarões de diferentes idades de cultivo e possíveis hospedeiros naturais em quatro períodos de produção na região norte do estado de Santa Catarina, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Região do estudo

O estudo foi realizado em 12 fazendas de cultivo de camarão marinho (*L. vannamei*), localizadas no litoral norte de Santa Catarina, Brasil, compreendendo os municípios de Araquari, Balneário Barra do Sul e São Francisco do Sul entre as coordenadas 26°33'41"S 48°39'24"W e 26°12'31"S 48°44'23"W. Foram avaliados quatro ciclos de produção, iniciando no primeiro semestre de 2005 e finalizando no primeiro semestre de 2008. O número de fazendas em operação e de viveiros povoados variou de acordo com os períodos de produção.

Amostragem

Nos quatro períodos de cultivo avaliados nesse estudo foram colhidas amostras de PLs ($n=50$) de *L. vannamei*, quando na chegada à fazenda, aos 30 ($n=95$), 60 ($n=86$) e 90 ($n=86$) dias de cultivo e por ocasião da despesca ($n=66$), totalizando 383 amostras. Cada amostra de PLs era constituída por um *pool* de 1000 PLs e as amostras provenientes de animais juvenis e adultos foi composta por tecidos provenientes de 150 animais. Foram também incluídas 28 amostras colhidas de animais com sinais clínicos da infecção pelo IHNV e 74 amostras colhidas de prováveis hospedeiros naturais, como caranguejos (*Aratus pisoni*, *Uca thayeri* e *Ucides cordatus*), siris (*Callinectes sapidus*) e camarões nativos (*Penaues schmitti*), presentes nos viveiros de cultivo e nas proximidades das fazendas. Cada amostra de hospedeiro natural era constituída por um *pool* de tecidos provenientes de, no máximo, cinco animais. Para o cálculo da amostragem foi utilizada a prevalência estimada de 2,0% e o intervalo de confiança de 95%, de acordo com as recomendações da OIE (2003). Dos animais amostrados foram colhidos, preferencialmente, hemolinfa, pleópodos e brânquias (LIGHTNER; TANG-NELSON, 2001). Neste estudo foram processados para os exames laboratoriais somente um tipo de tecido de cada amostra. Logo após a colheita as amostras foram homogeneizadas e mantidas a -20°C ou em etanol 95% até o processamento.

Extração do ácido nucléico

Os fragmentos de tecidos foram triturados em solução PBS pH 7,2 (137 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 15 mM KH₂PO₄) e a suspensão (20% p/v) foi centrifugada por 15 min a 3000 x g a 4°C. Aliquotas de 500 µL dos sobrenadantes foram utilizadas para a extração do DNA por meio de uma combinação das técnicas fenol/clorofórmio/álcool isoamílico e sílica/tiocianato de guanidina, descrita por Alfieri et al. (2006). O DNA extraído foi eluído em 50 µL de água ultrapura estéril e mantido a -20°C até a sua utilização. Para o controle de eventuais contaminações uma alíquota de água ultrapura estéril foi incluída em todos os procedimentos de extração do DNA.

Reação da polimerase em Cadeia (PCR)

Para a PCR foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores 389F (5' CGG AAC ACA ACC CGA CTT TA 3' nt.1400-1419) e 389R (5' GGC CAA GAC CAA AAT ACG AA 3' nt.1789-1808), que amplificam um produto com 389 pb de uma proteína não-estrutural codificada pela ORF 1 do IHHNV (GenBank accession n°. AF218266) (OIE, 2009). Como controle positivo da reação foram utilizados fragmentos de tecidos de camarão *L. vannamei* naturalmente infectados com o IHHNV e com produto o amplificado pela PCR confirmado por reação de sequenciamento. As condições da reação foram 200 mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl, dATP 200 µM, dTTP 200 µM, dCTP 200 µM, dGTP 200 µM, 1,5 mM MgCl₂, 1,5 U Taq DNA Polymerase (Invitrogen[®] Life Technologies, EUA), 20 pM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1 µL do DNA extraído e água MilliQ estéril para volume final de 25 µL. O processo de amplificação foi realizado em termociclador nas seguintes condições de tempo e temperatura: uma etapa de 5 min a 95°C, seguida de 35 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 55°C, 1 min a 72°C e uma etapa de extensão final de 7 min a 72°C. Os produtos das reações de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e visualizados sob luz UV.

Análise estatística

Para a análise dos dados entre as percentagens de amostras positivas nos diferentes ciclos de produção foi utilizado o Teste do Qui-Quadrado adotando-se o nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Detecção do IHHNV

Das 383 amostras de tecidos de camarão *L. vannamei* assintomáticos avaliadas pela PCR em 173 (45,17%) amostras foi possível a amplificação de um produto com 389 pb. As 28 (100%) amostras obtidas de animais com sinais clínicos da infecção foram positivas para o IHHNV por meio da PCR. Animais sintomáticos foram observados nas 12 fazendas incluídas no estudo e nas faixas etárias de 60 ($n=6$) e 90 ($n=10$) dias e por ocasião da despesca ($n=12$). A distribuição dos resultados positivos pela PCR para o vírus IHHNV de acordo com a idade e o ciclo de produção pode ser visualizada nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1 – Amostras de camarões *L. vannamei* positivas pela PCR para o IHHNV, distribuídas de acordo com a idade dos animais e os ciclos de produção, Santa Catarina, Brasil.

Faixa Etária	Período/Nº de amostras positivas/Nº de amostras avaliadas											
	Ciclo 1 (2005/1)			Ciclo 2 (2005/2 e 2006/1)			Ciclo 3 (2006/2 e 2007/1)			Ciclo 4 (2007/1 e 2008/1)		
	Pos	T	%	Pos	T	%	Pos	T	%	Pos	T	%
PLs chegada	-			3	14	21,43	4	12	33,33	6	24	25,0
30 dias	-			12	36	33,33	16	35	45,71	15	24	62,5
60 dias	-			9	36	25,0	18	38	47,36	13	18	72,22
90 dias	12	30	40,0	18	28	64,28	19	26	73,07	8	12	66,66
Despesca	14	30	46,66	17	22	77,27	16	22	72,27	1	4	25,0
Total	26	60	43,4	59	136	43,4	73	133	54,9	43	82	52,4

Tabela 2 – Amostras de camarões *L. vannamei* positivas para o IHHNV pela PCR, distribuídas de acordo com o ciclo de produção, Santa Catarina, Brasil.

Ciclos de produção	Amostras avaliadas			X ² valor nível ρ
	Positivas	Total	(%)	
1 (2005/1)	26	60	43,4	1,1132
2 (2005/2 e 2006/1)	59	136	43,4	0,05
3 (2006/2 e 2007/1)	73	133	54,9	
4 (2007/2 e 2008/1)	43	82	52,4	
Total	201	411	48,9	

Foram encontrados animais positivos para o IHHNV pela PCR em diferentes idades e em todos os períodos de produção. Das 50 amostras provenientes das PLs 13 (26%) foram positivas. A tabela 3 apresenta a distribuição dos resultados positivos para o IHHNV de acordo com a faixa etária dos animais.

Tabela 3 – Amostras de camarões *L. vannamei* positivas pela PCR para o IHHNV, distribuídas de acordo com a faixa etária dos animais, Santa Catarina, Brasil.

Faixa etária	Nº de amostras avaliadas			X ² Valor nível ρ
	Positivas	Total	(%)	
PLs chegada	13	50	26,00	
30 dias	43	95	45,26	17,4118
60 dias	40	92	43,47	0,05
90 dias	57	96	59,37	
Despesca	48	78	61,53	
Total	201	411	48,90	

O aumento do número de animais infectados pelo IHHNV da fase inicial de PL até o final do ciclo de produção está demonstrado na figura 1, foram

considerados todos os animais distribuídos por faixa etária nos quatro ciclos de produção incluídos no período de estudo.

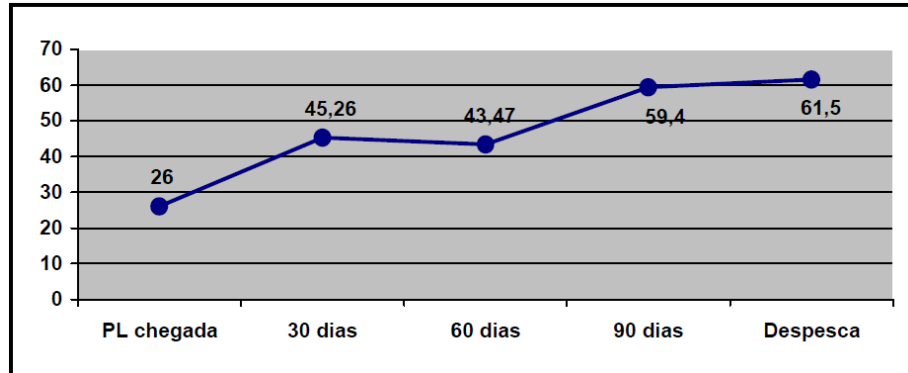


Figura 1 – Distribuição por faixa etária da média das amostras positivas por PCR para o IHHNV em amostras de camarão *L. vannamei* cultivados, durante o período 2005/1 a 2008/1 em fazendas do litoral nortecatarinense, Santa Catarina, Brasil.

Das 74 amostras de tecidos colhidas de prováveis hospedeiros naturais do IHHNV, 8 (10,8%) amostras foram positivas para o IHHNV. A tabela 4 apresenta a distribuição dos resultados positivos de acordo com a espécie de hospedeiro natural avaliado.

Tabela 4 – Amostras de possíveis hospedeiros naturais positivos para o IHHNV por PCR, durante o período 2005/1 a 2008/1, em fazendas do litoral nortecatarinense, Santa Catarina, Brasil.

Hospedeiro	N° de amostras positivas/N° de amostras avaliadas		
	Positivas	Total	%
Caranguejo <i>Aratus pisoni</i>	5	24	20,83
Caranguejo <i>Uca thayeri</i>	-	23	-
Caranguejo <i>Ucides cordatus</i>	-	8	-
Siri <i>Callinectes sapidus</i>	-	10	-
Camarões nativos <i>Penaues schimitti</i>	3	9	33,33
Total	8	74	10,80

DISCUSSÃO

O IHHNV é um vírus endêmico na carcinicultura mundial sendo encontrado em todas as regiões do mundo (LIGHTNER et al., 1992a; MARTINEZ-CORDOVA, 1992; LIGHTNER 1996b; PANTOJA; LIGHTNER, 1999; MORALES-COVARRUBIAS; CHAVEZ-SANCHEZ, 1999; MORALES-COVARRUBIAS et al., 1999). A infecção com o IHHNV também já foi relatada em populações selvagens de camarão *L. stylirostris*, coletados na região norte do Golfo da Califórnia (MORALES-COVARRUBIAS; CHAVEZ-SANCHEZ, 1999) e em populações selvagens e cultivadas de camarão *P. monodon* na região leste e sudeste da Ásia (FLEGEL, 1997; PRIMAVERA; QUINITIO, 2000; TANG et al., 2003). No Brasil há relatos da presença do vírus na região nordeste incluindo os estados do Rio Grande do Norte e do Ceará (OLIVEIRA-NETO, 2006; BRAZ et al., 2009) e no estado de Santa Catarina (MOSER, 2005).

O percentual de amostras positivas pela PCR nos diferentes ciclos de produção não teve variação significativa, indicando uma frequência de ocorrência constante na população estudada. As amostras de tecidos de camarão *L. vannamei* cultivados no estado de Santa Catarina avaliadas nesse estudo permitiram caracterizar a infecção pelo IHHNV como endêmica no período e região estudados. A frequência de resultados positivos (48,9%) foi muito similar à observada por Moser (2005) que em uma população de 124 reprodutores de *L. vannamei* no estado de Santa Catarina encontrou 54,8% de animais positivos pela técnica da PCR.

Estes dados confirmam as observações de campo durante cada ciclo de produção, quando se encontram animais com os sinais clínicos da doença a partir de 60 dias de idade, sendo observado aumento no número de animais com sinais clínicos com o aumento da idade. Nunan et al. (2001), em estudos de prevalência do IHHNV em *L. vannamei* na costa do Oceano Pacífico no Panamá, também realizados por meio da técnica de PCR, encontraram resultados similares aos obtidos no presente estudo.

A percentagem de 26% das amostras positivas para o IHHNV provenientes de PLs, quando na chegada a fazenda, indica que as PLs atuam como fator de risco da infecção para os viveiros de cultivo, populações nativas de camarão e caranguejos. Estes hospedeiros naturais podem fazer a transferência e disseminação do IHHNV para outras regiões como já demonstrado por Yang et al.

(2007). As amostras positivas de PLs confirmam a necessidade do monitoramento sanitário dos reprodutores e a importância da transmissão vertical na epidemiologia da doença. Os resultados de Moser (2005), que encontrou 54,8% de resultados positivos em um lote de reprodutores no estado de Santa Catarina, confirmam a expectativa da presença de lotes de PLs positivas. A frequência constante de lotes de PLs positivas indica que a transmissão vertical é fator importante na epidemiologia da doença. As condições de estresse, como no caso de fêmeas induzidas a maturação, induzem a replicação do vírus. Tais condições são provocadas pela ablação do olho e pela desova. Adicionalmente, em fêmeas com alta infecção viral podem ocorrer falhas no desenvolvimento e eclosão de embriões de *L. vannamei*, o que desencadeia perdas na produtividade dos laboratórios de produção de nauplios e PLs (MOTTE et al., 2003). Já os achados de amostras positivas por faixa etária, variando de 26 a 61,53%, indicam a evolução constante da infecção na população. A percentagem de amostras positivas aumentou de acordo com a idade dos animais, levando à conclusão de que a infecção horizontal também tem papel importante na disseminação da infecção. Animais infectados tem a capacidade de sobrevivência diminuída, sendo mais facilmente predados e canibalizados.

Infecções em estádios mais tardios da produção ocasionam taxas menores de mortalidade e os animais sobreviventes tornam-se portadores do vírus podendo transmiti-lo tanto de forma horizontal quanto vertical (TANG et al., 2000).

Das amostras de tecidos obtidas de animais nativos foram encontradas amostras positivas provenientes de caranguejo *A. pisoni* e de camarão *P. schmitti*. Estes resultados sugerem contaminação ambiental por meio do *L. vannamei* de cultivo infectado para o *P. schmitti* nativo e para o caranguejo *A. pisoni*. Com isso, esses hospedeiros naturais podem atuar como reservatórios do IHHNV nas fazendas em ciclos subsequentes. Yang et al. (2007), em estudo realizado na China, obtiveram a proporção de 51,5% de animais positivos para o IHHNV em camarões cultivados *Fenneropenaeus chinensis*, *Marsupenaeus japonicus*, *Litopenaeus stylirostris* e *L. vannamei* e de 8,3% de amostras provenientes de caranguejos *Hemigrapsus penicillatus*. Especificamente nos camarões *L. vannamei*, 59,5% foram positivos e os resultados indicam que o caranguejo *H. penicillatus* pode atuar como reservatório para o IHHNV. Os resultados do presente estudo, onde 48,9% das amostras de *L. vannamei* e 10,81% das amostras de hospedeiros

naturais foram positivas para o IHHNV pela PCR, ratificam os resultados anteriores que demonstram o caráter endêmico da infecção tanto em camarões cultivados quanto em hospedeiros naturais.

Embora não existam tratamentos específicos para infecções virais, estratégias de manejo para a prevenção de prejuízos econômicos ocasionados pela infecção pelo IHHNV podem ser adotadas. O uso da técnica da PCR no monitoramento sanitário dos reprodutores antes e após a desova, testes nos lotes de PLs antes da distribuição, bem como o controle da presença de hospedeiros naturais no sistema de cultivo são medidas sanitárias importantes no controle da disseminação da doença (FEGAN; CLIFFORD, 2001; MOTTE et al., 2003). O cultivo de linhagens de camarões IHHNV resistentes (TANG et al., 2000) e o cultivo em condições ambientais favoráveis (BROWDY et al., 1993) têm-se mostrado ferramentas viáveis. Montgomery-Brock et al. (2007) demonstraram que o IHHNV não replica rapidamente no *L. vannamei* em condições de águas quentes ($32,8 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$), quando comparado com a replicação viral em águas frias ($24,4 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$). As razões para a redução da replicação viral em águas com temperaturas altas ainda não estão muito claras. Granja et al. (2003) sugerem que altas temperaturas facilitam a apoptose em *L. vannamei* infectado por WSSV e pode ser um dos mecanismos responsáveis pelo aumento da sobrevivência quando os animais são mantidos em temperaturas de 32°C . Isto significa que fazendas comerciais em áreas endêmicas para o IHHNV devem manter os viveiros com águas em temperaturas superiores a 30°C , cultivando somente em épocas do ano mais favoráveis, como o verão. A prevalência do IHHNV na população avaliada está de acordo com os resultados de estudos conduzidos em outras regiões e com o fato deste vírus ser considerado cosmopolita. O seu monitoramento nos cultivos é importante como parte do controle sanitário constante e preventivo do estado de saúde dos animais.

REFERÊNCIAS

ALFIERI, A.A.; PARAZZI, M.E.; TAKIUCHI, E.; MÉDICI, K C.; ALFIERI, A.F. Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998-2002. *Tropical Animal Health and Production*, v.38, p.521-526, 2006.

BRAZ, R.F.S.; SILVA, C.P.R.O.; REIS, L.G.; MARTINS, P.C.C.; SALES, M.P.; MEISSNER, R.V. Prevalence of IHNV, in *Penaeus vannamei* cultured in northeastern Brazil. *Aquaculture*, v.288, p.143-146, 2009.

BROCK, J.R.; LIGHTNER, D.V. Chapter 24, Unclassified Viruses of Crustacea. In: Atlas of Invertebrate Viruses, Adams J.R. & Bonami J.R., eds. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 597-622, 1991.

BROWDY, C.L.; HOLLOWAY, J.D.; KING, C.O.; STOKES, A.D.; HOPKINGS, J.S.; SANDIFER, P.A. IHNV virus and intensive culture of *Penaeus vannamei*: effects of stocking density and water exchange rates. *Journal Crustacean Biology*, v.13, p.87-94, 1993.

FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L.A. Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, 1259 pp. 2005.

FEGAN, D.F.; CLIFFORD, H.C.III. Health management for viral diseases in shrimp farms. In: The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture. Aquaculture 2001, Browdy C.L. & Jory D.E., eds. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, p.188-198, 2001.

FLEGEL, T.W. Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *World Journal Microbiology Biotechnology*, v.13, p.433-442, 1997.

FLORES, E.F. Epidemiologia das infecções víricas. In: Flores, E.F. (Org). *Virologia Veterinária*. Santa Maria, 2007, p.263-294.

GRANJA, C.B.; ARANGUREN, L.F.; VIDAL, O.M.; SALAZAR, M. Does hyperthermia increase apoptosis in white spot syndrome virus (WSSV) infected *Litopenaeus vannamei*? *Disease Aquatic Organisms*, v.54, p.73-78, 2003.

KALAGAYAN, G.; GODIN, D.; KANNA, R.; HAGINO, G.; SWEENEY, J.; WYBAN, J.; BROCK, J. IHNV virus as an etiological factor in runt-deformity syndrome of juvenile *Penaeus vannamei* cultured in Hawaii. *Journal World Aquaculture Society*, v.22, p.235-23, 1991.

LIGHTNER, D.V. Epizootiology, distribution and the impact on international trade of two penaeid shrimp viruses in the Americas. *Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties*, v.15, p.579-601, 1996b.

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

LIGHTNER, D.; TANG-NELSON, K. Development of real-time PCR assays for detection of white spot syndrome virus, yellow head virus, taura syndrome virus, and infectious hypodermal and haematopoietic virus in penaeid shrimp. Department of Veterinary Science and Microbiology, University of Arizona, AZ 85721. NA06FD0448, 2001.

LIGHTNER, D.V.; REDMAN, R.M.; BELL, T.A. Infectious hypodermal and haematopoeitic necrosis, a newly recognized virus disease of penaeid shrimp. *Journal Invertebrate Pathology*, v.42, p.62-80, 1983.

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

MARTINEZ-CORDOVA, L.R. Cultured blue shrimp (*Penaeus stylirostris*) infected with Infectious Hypodermal and Hematopoeitic Necrosis Virus in northwestern Mexico. *The Progressive Fish Culturist*, v.54, p.265-266, 1992.

MONTGOMERY-BROCK, D.; TACON, A.G.J.; POULOS, B.; LIGHTNER, D.V. Reduced replication of infectious hypodermal and hematopoeitic necrosis virus (IHHNV) in *Litopenaeus vannamei* held in warm water. *Aquaculture*, v.265, p.41-48, 2007.

MORALES-COVARRUBIAS, M.S.; CHAVEZ-SANCHEZ, M.C. Histopathological studies on wild broodstock of white shrimp *Penaeus vannamei* in the Platanitos area, adjacent to San Blas, Nayarit, Mexico. *Journal World Aquaculture Society*, v.30, p.192-200, 1999.

MORALES-COVARRUBIAS, M.S.; NUNAN, L.M.; LIGHTNER, D.V.; MOTA-URBINA, J.C.; GARZA-AGUIRRE, M.C.; CHAVEZ-SANCHEZ, M.C. Prevalence of infectious hypodermal and hematopoeitic necrosis virus (IHHNV) in wild adult blue shrimp *Penaeus stylirostris* from the Northern Gulf of California, México. *Journal Aquatic Animal Health*, v.11, p.296-301, 1999.

MOSER, J.R. Respostas bioquímicas do camarão branco, *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931), exposto ao inseticida Carbofuran e determinação da prevalência natural do vírus da Necrose Hipodermal e Hematopoeitica Infeciosa – IHHNV. 2005. 76 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). UFSC, Florianópolis.

MOTTE, E.; YUGCHA, E.; LUZARDO, J.; CASTRO, F.; LECLERCQ, G.; RODRIGUEZ, J.; MIRANDA, P.; BORJA, O.; SERRANO, J.; TERREROS, M.; MONTALVO, K.; NARVÁEZ, A.; TENORIO, N.; CEDEÑO, V.; MIALHE, E.; BOULO, V. Prevention of IHHNV vertical transmission in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, v.219, p.57-70, 2003.

NUNAN, L.M.; ARCE, S.M.; STAHA, R.J.; LIGHTNER, D.V. Prevalence of infectious hypodermal and hematopoeitic virus (IHHNV) and white spot syndrome virus (WSSV) in *Litopenaeus vannamei* in the Pacific Ocean off the coast of Panama. *Journal World Aquaculture Society*, v.219, p.330-334, 2001.

OIE -OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases – 2003. Disponível em: <<http://www.oie.int/eng/normes/manual>>. Acesso em: 27 set. 2005.

OIE -OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. Manual of Diagnostic: Test for Aquatic Animals – 2009. Disponível em: <<http://www.oie.int>. Acesso em: 21 fev. 2010.

OLIVEIRA-NETO, J.M. Investigação da ocorrência dos vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) e da infecção hipodermal e necrose hematopoiética (IHHNV) em camarões coletados em área sob influência de efluentes da carcinicultura. LABOMAR-UFC, Fortaleza, CE. 2006.

PANTOJA, C.R.; LIGHTNER, D.V. Prevalence and geographic distribution of infectious hypodermal and hematopoeitic necrosis virus (IHHNV) in wild and blue shrimp *Penaeus stylirostris* from the Gulf of Califórnia, Mexico. *Journal Aquatic Animal Health*, v.11, p.23-34, 1999.

PRIMAVERA, J.H.; QUINTIO, E.T. Runt-deformity syndrome in cultured giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *Journal Crustacean Biology*, v.20, p.796-802, 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.; 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. *Disease Aquatic Organisms*, v.53, p.91-99, 2003.

YANG, B.; SONG, X.L.; HUANG, J.; SHI, C.Y.; LIN, L. Evidence of existence of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp cultured in China. *Veterinary Microbiology*, v.120, p.63-70, 2007.

4 CONCLUSÕES

Os sistemas de PCR utilizados nesse estudo proporcionaram a identificação do DNA do WSSV e do IHHNV tanto em amostras biológicas provenientes de camarão marinho cultivado quanto em amostras obtidas de outros organismos aquáticos encontrados em fazendas de cultivo.

A taxa de infecção do WSSV permaneceu estável nos ciclos de produção, apresentando rápida disseminação e altas taxas de morbidade e de mortalidade. A redução na faixa etária dos animais que apresentaram resultados positivos nos ciclos subsequentes indica a persistência do patógeno no ambiente.

O IHHNV está presente em pós-larvas provenientes de laboratórios de reprodução do estado de Santa Catarina e em animais adultos nas fazendas de cultivo, com taxa de infecção estável nos ciclos de produção estudados, podendo ser considerado endêmico.

A presença de sinais clínicos da infecção pelo IHHNV está diretamente relacionada com a idade dos animais, havendo aumento da taxa de infecção tanto de animais assintomáticos como sintomáticos com o aumento da faixa etária dos animais, indicando que a infecção horizontal tem importância na epidemiologia da infecção.

A presença de PLs positivas para o IHHNV quando na chegada a fazenda de cultivo indica que a transmissão vertical tem grande importância na epidemiologia da infecção.

Foram detectados novos hospedeiros naturais para o WSSV como caranguejos das espécies *Aratus pisoni* e *Uca thayeri*, siri da espécie *Callinectes sapidus* e camarão nativo da espécie *Penaeus schmitti*.

Foram detectados novos hospedeiros naturais para o IHHNV como o caranguejo da espécie *Aratus pisoni* e o camarão da espécie *Penaeus schmitti*. Estes resultados sugerem contaminação ambiental por meio do camarão *L. vannamei* cultivado e com infecção para o camarão nativo *P. schmitti* e para o caranguejo *A. pisoni*. Com isso, estes organismos podem atuar como reservatórios do IHHNV nas fazendas em ciclos subsequentes.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Soluções e Tampões

Hidratação da sílica

1. 60 g de sílica (SiO₂) P.M. 60,08 (Sigma[®])
2. Adicionar 500 mL de água ultrapura autoclavada
3. Agitar lentamente e manter em repouso durante 24 h
4. Por sucção, desprezar 430 mL do sobrenadante
5. Ressuspender a sílica em 500 mL de água bidestilada
6. Manter em repouso durante 5 h para sedimentar
7. Desprezar 440 mL do sobrenadante
8. Adicionar 600 µL de HCl (32% w/v) para ajustar o pH (pH=2,0)
9. Aliquotar e autoclavar

Solução L6

1. 120 g de tiocianato de guanidina (GUSCN)
2. 100 mL de TRIS-HCl 0,1 M pH 6,4
3. 22 mL de EDTA 0,2 M pH 8,0
4. 2,6 mL de Triton X 100

Solução L2

1. 120 g de tiocianato de guanidina (GUSCN)
2. 100 mL de TRIS-HCl 0,1 M pH 6,4

Tampão de Amostra

1. Azul de bromofenol 0,25%
2. Sacarose (C₁₂H₂₂O₁₁) 45%

Tampão fosfato salina (PBS)

1. 137 mM cloreto de sódio (NaCl)
2. 3 mM cloreto de potássio (KCl)
3. 8 mM fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄)
4. 15 mM fosfato monobásico de potássio (KH₂PO₄)
5. Água ultrapura autoclavada q.s.p. 1 litro
6. pH=7,2

Fenol / clorofórmio – álcool isoamílico (24:24:1)

1. 24 mL fenol saturado
2. 24 mL clorofórmio
3. 1 mL álcool isoamílico

10 X TBE pH 8,0

0,89 M Tris borato 0,02 M EDTA 0,89 M Ácido bórico H₂O para 1 L.

1 M Tris

121,1 g Tris base 750 mL de H₂O destilada 70 mL HCl concentrado para pH 7,4 ou 42 mL para pH 8,0 Resfriar para temperatura ambiente e fazer o ajuste final do pH desejado. H₂O q.s.p. 1 L. Esterilizar em autoclave.

0,5 M EDTA pH 8,0

186,1 g de dissodium ethylenediamine-tetraacetate 2 800 mL H₂O ± 20 g de NaOH para ajustar o pH. H₂O q.s.p. para 1 L. Esterilizar em autoclave (Obs.: EDTA não dissolve em pH < 8,0)

TBE – 1 X

100 mL de TBE 10 X 900 mL de H₂O destilada.

BROMETO DE ETÍDIO

Solução estoque : 10 mg/mL (1 g em 100 mL de H₂O)

10 x TNE Buffer pH 7,4 (solução estoque)

(100 mM Tris/ HCl; 2,0 M NaCl; 10 mM EDTA) 800 mL H₂O 12,11 g Tris base 3,72 g EDTA 116,89 g NaCl Ajustar pH com HCl para 7,4 H₂O q.s.p. para 1 L Autoclavar e aliquotar

TRITON X – 100 a 10%

1 g Triton X -100 H₂O q.s.p 10 mL

APÊNDICE B – Protocolo de Técnicas

Extração do DNA

Técnica de Boom et al. (1990) modificada por Alfieri et al. (2006).

200 mg tecido em 800 μ L de PBS

Picotar com tesoura ou triturar com pistilo em gral de porcelana Centrifugar por 15 min a 3000 x *g* a 4°C. Aliquota de 500 μ L do sobrenadante para fase 1.

Fase 1

1. 500 μ L de amostra.
2. 5 μ L SDS 10% {1% de SDS (*dodecil sulfato de sódio*)}
3. 25 μ L proteinase K 2 mg/mL {0,2 mg/mL de proteinase K (Sigma[®])}
4. Homogeinizar em vórtex / 10 s.
5. Banho-maria à 56°C / 30 min.

Fase 2

1. 500 μ L da amostra
2. 500 μ L de fenol/clorofórmio – álcool isoamilico
3. Homogeneizar em vortex.
4. Banho Maria à 56°C / 15 min.
5. Centrifugar 10.000 x *g* / 10 min.
6. Recolher 500 μ L do sobrenadante em outro tubo.

Fase 3

1. 500 μ L da amostra.
2. 10 μ L de sílica hidratada.
3. 900 μ L de solução L6.
4. Homogeneizar em vórtex.
5. Agitar por 30 min à temperatura ambiente.
6. Centrifugar a 10.000 x *g* / 30 s.
7. Desprezar o sobrenadante.
8. Adicionar 500 μ L de solução L2.
9. Homogeneizar em vortex.
10. Centrifugar a 10.000 X *g* / 30 s
11. Desprezar sobrenadante em solução contendo NaOH 10M.

12. Adicionar 500 μ L de solução L2.
13. Homogeneizar em vortex.
14. Centrifugar a 10.000 x g / 30 s
15. Desprezar sobrenadante em solução contendo NaOH 10M.
16. Adicionar 1 mL de etanol a 70%.
17. Homogeneizar em vortex.
18. Centrifugar a 10.000 x g / 30 s
19. Desprezar sobrenadante
20. Adicionar 1 mL de etanol a 70%.
21. Homogeneizar em vortex.
22. Centrifugar a 10.000 x g / 30 s
23. Desprezar sobrenadante em solução
24. Adicionar 1 mL de acetona PA
25. Homogeneizar em vortex.
26. Centrifugar a 10.000 x g / 30 s
27. Desprezar sobrenadante
28. Secar o sedimento em estufa a 37°C / 15 min com tubo aberto.
29. Adicionar 30 μ L de água ultrapura autoclavada.
30. Homogeneizar em vortex.
31. Banho-maria a 56°C / 15 min.
32. Homogeneizar em vortex.
33. Centrifugar 10.000 x g / 2 min.
34. Recolher o sobrenadante.
35. Adicionar 20 μ L de água ultrapura autoclavada.
36. Homogeinizar em vortex.
37. Banho-maria a 56°C / 15 min.
38. Homogeinizar em vortex.
39. Centrifugar 10.000 x g / 2 min.
40. Recolher o sobrenadante.

Gel de agarose 1,5%.

1. 0,75 g de agarose e 50 mL de tampão 1xTEB (Tris-Borato-EDTA).
2. Dissolver em microndas.
3. Adicionar 2,5 μ L de brometo de etídeo (0,5 μ g/mL), homogeneizar.

APÊNDICE C – Lista de Reagentes

1. 100 mM dNTP Set, 4 x 250 µL; 25µmol cada (100 mM dATP Solution, 100 mM dCTP Solution, 100 mM dGTP Solution, 100 mM dTTP Solution) (Invitrogen Life Technologies[®])
2. 10 x PCR-Buffer (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl) (Invitrogen Life Technologies[®])
3. 100 bp DNA Ladder (Invitrogen Life Technologies[®])
4. 2-Mercapto-ethanol (C₂H₆O₅) P.M. 78,13 (Fluka[®])
5. Acetona, P.A. (CH₃COCH₃) P.M. 58,08 (Dinâmica[®])
6. Ácido acético glacial, P.A. (CH₃COOH) P.M. 60,05 (Nuclear[®])
7. Ácido bórico (H₃BO₃) P.M. 61,83
8. Ácido clorídrico (HCl) P.M. 36,46 (Reagen[®])
9. Ácido etilenodiaminotetraácido Sal di-sódico – EDTA, P.A. (C₁₀H₁₄N₂O₈Na₂2H₂O) P.M. 372,24 (Reagen[®])
10. Agarose (Gibco BRL[®])
12. Álcool etílico absoluto (C₂H₂OH) P.M. 46,07 (Nuclear[®])
13. Álcool isoamílico ((CH₃)₂CHCH₂CH₂OH) P.M. 88,15 (Synth[®])
14. Proteinase K (Sigma[®])
15. Azul de bromofenol (Sigma[®])
16. Cloreto de Potássio, P.A. (KCl) P.M. 74,56 (Reagen[®])
17. Cloreto de Sódio, P.A. (NaCl) P.M. 58,45 (Reagen[®])
18. Clorofórmio, P.A. (CHCl₃) P.M. 119,38 (Dinâmica[®])
19. Dodecil Sulfato de Sódio – Lauril Sulfato de Sódio – SDS (C₁₂H₂₅NaO₄S) P.M. 288,38 (Synth[®])
20. Ethidium bromide (C₂₁H₂₀N₃Br) P.M. 394,3 (Sigma[®])
1. Guanidine isothiocyanate P.M. 118,16 (Gibco BRL[®])
2. Hidróxido de Sódio, P.A. (NaOH) P.M. 40,00 (Dinâmica[®])
3. Hidroximetil amino metano – TRIS 99% P.M. 121,14 (Inlab[®])
28. Metanol, P.A. (CH₃OH) P.M. 32,04 (Allkimia[®])
29. *Platinum* Taq DNA Polymerase recombinant 500 units (Invitrogen Life Technologies[®])
33. Silicon dioxide (SiO₂) P.M. 60,08 (Sigma[®])
35. Triton X -100

ANEXOS

ANEXO A – Termo de Ciência e Autorização

TERMO DE CIÊNCIA E AUTORIZAÇÃO

Eu, proprietário abaixo assinado autorizo a coleta dos animais de minha propriedade para os fins de pesquisa, podendo os dados obtidos ser utilizados em publicações científicas desde que não sejam divulgados meus dados pessoais e da propriedade. Os animais a serem coletados são camarões marinhos cultivados, camarões nativos e outros animais como caranguejos, siris, peixes, moluscos, zooplâncton, etc., presentes dentro do sistema de cultivo da fazenda.

Título da pesquisa: Estudo longitudinal da infecção pelo vírus da mancha branca (WSSV) e vírus da infecção hipodermal e necrose hematopoiética (IHHNV) na carcinicultura catarinense.

Local de realização: Laboratórios de Patologia de Organismos Aquáticos e Biologia Molecular do IFC – Campus Araquari, BR 280 Km 27, Araquari/SC e Laboratório de Virologia Animal, DMVP, UEL, Londrina/SC.

Objetivos são a busca dos patógenos na cadeia produtiva.

Identificação do Coordenador do projeto: Prof Dr. Amauri Alcindo Alfieri.

Fone (43) 3371-4709

Identificação dos coletores das amostras: Robert Lenoch, Médico Veterinário.

Fone (47) 3803-7200, email: rlenoch@gmail.com

Nº FORMULARIO	MÊS	ANO	Nº REG AQUICULTOR	SUSPEITA
NOME DO PRODUTOR				
RG ou CPF				
NOME DO EMPREENDIMENTO				
LOCALIDADE		MUNICIPIO		FONE/FAX
FINALIDADE DO EMPREENDIMENTO				
ALEVINO I	ALEVINO II	ALEVINO III	ENGORDA	PL CAMARÃO
CULTIVO DE CAMARÃO	MOLUSCO SEMENTE		CULTIVO DE MOLUSCO	
TIPO DE EXPLORAÇÃO				
INTENSIVO	SEMI-INTENSIVO	POLICULTIVO	VIVEIROS	BALSA
BANDEJA	LONG LINE	TANQUE REDE	OUTRO. Qual?	
OBTENÇÃO DAS SEMENTES/ALEVINOS/ PLs				
PRODUÇÃO PRÓPRIA	COLHEITA NA NATUREZA	UNIVERSIDADE	TERCEIROS.	
Qual?.....				
CRIAÇÃO TECNIFICADA?		É ATIVIDADE PRINCIPAL DO PRODUTOR?		
SIM	NÃO	SIM	NÃO. Citar qual:.....	
ORIGEM DA NOTIFICAÇÃO				
PESQUISA DE CAMPO		PROPRIETÁRIO	VIGILÂNCIA	TERCEIROS

DADOS POPULACIONAIS

ESPÉCIE	FAIXA ETÁRIA	POPULAÇÃO	DOENTES	MORTOS
CAMARÃO MARINHO CULTIVADO NOME CIENTIFICO: <i>Litopennaeus vannamei</i>	NÁUPLIO			
	LARVA			
	POS LARVA			
	JUVENIL			
	ADULTO			
CAMARÃO NATIVO NOME CIENTIFICO:	NÁUPLIO			
	LARVA			
	POS LARVA			
	JUVENIL			
	ADULTO			
CARANGUEIJO NOME CIENTIFICO:	NÁUPLIO			
	LARVA			
	POS LARVA			
	JUVENIL			
	ADULTO			
SIRIS NOME CIENTIFICO:	NÁUPLIO			
	LARVA			
	POS LARVA			
	JUVENIL			
	ADULTO			
MOLUSCO NOME CIENTIFICO:	LARVA			
	SEMENTE			
	JUVENIL			
	ADULTO			
MEXILHÃO NOME CIENTIFICO:	LARVA			
	SEMENTE			
	JUVENIL			
	ADULTO			
PEIXE NATIVO= NOME CIENTIFICO:	LARVA			
	SEMENTE			
	JUVENIL			
	ADULTO			
ZOOPLANCTON				
OUTROS				

MOVIMENTAÇÃO DOS ANIMAIS NOS ULTIMOS 30 DIAS

TIPO (ingresso/saída)	DATA	ESPECIE	NºANIMAIS	Nº ENFERMOS	MEDICADOS (sim/não)	PROCEDENCIA /DESTINO	Nº da GTA
--------------------------	------	---------	-----------	----------------	------------------------	-------------------------	-----------

TIPO DE MEDICAMENTO OU DROGA UTILIZADA:.....

REGISTRO DA(S) ULTIMA(S) MEDICAÇÃO (ÕES)

NOME COMERCIAL	Nº DA PARTIDA	LABORATORIO	DATA DA MEDICAÇÃO	DOSE
----------------	---------------	-------------	----------------------	------

PROVAVEL ORIGEM DA ENFERMIDADE

PROPRIEDADE VIZINHA	ANIMAIS ADQUIRIDOS DE TERCEIROS
AGUAS COMUNS	ANIMAIS INTRODUZIDOS TEMPORARIAMENTE
VEICULO TRANSPORTADOR	ALIMENTO VIVO

ANIMAIS SILVESTRES (citar quais) RAÇÃO

OUTRAS. Citar:

BREVE HISTORICO DOS ACONTECIMENTOS E DO NIVEL TECNOLOGICO DA PROPRIEDADE (condições de manejo, densidade populacional, origem da água, etc).

--

MATERIAL PARA LABORATÓRIO

TIPO DE MATERIAL	ESPÉCIE DE ANIMAL	Nº DE AMOSTRAS	CONSERVANTE	LABORATÓRIO DESTINO

RESPONSÁVEL PELAS INFORMAÇÕES

NOME

IDENTIDADE

ENDEREÇO

FONE/FAX

LOCAL E DATA

NOME DO COLETOR DAS AMOSTRAS

Robert Lench

Araquari,

Assinatura do Proprietário

Assinatura do Coletor das Amostras

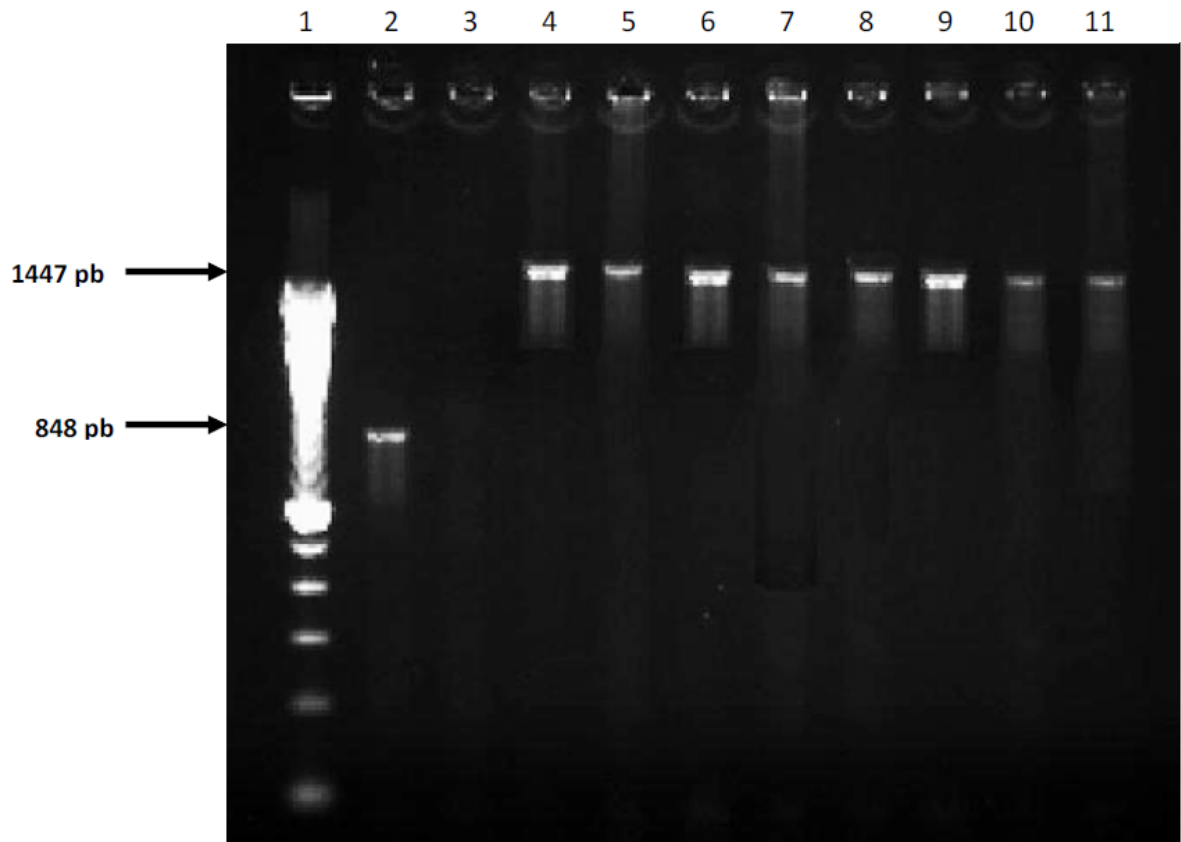
ANEXO B – Figuras de Géis de Eletroforese

Figura 1 – Produtos da reação PCR para a detecção do WSSV. Canaletas: 1 – padrão de tamanho molecular 100 pb; 2 – Controle Positivo 848 pb (DNA genômico do *L. vannamei*); 3 – controle negativo; 4 – Fazenda Ilha das Palmas (viveiro 1); 5 –Fazenda Ilha das Palmas (viveiro 2); 6 – Fazenda Miranda (viveiro 1); 7 – Fazenda Miranda (viveiro 2); 8 – Fazenda Tambaqui (viveiro 1); 9 – Fazenda Tambaqui (viveiro 2); 10 – Fazenda Cezar Prates (viveiro 1); 11 – Fazenda Cezar Prates (viveiro 2).

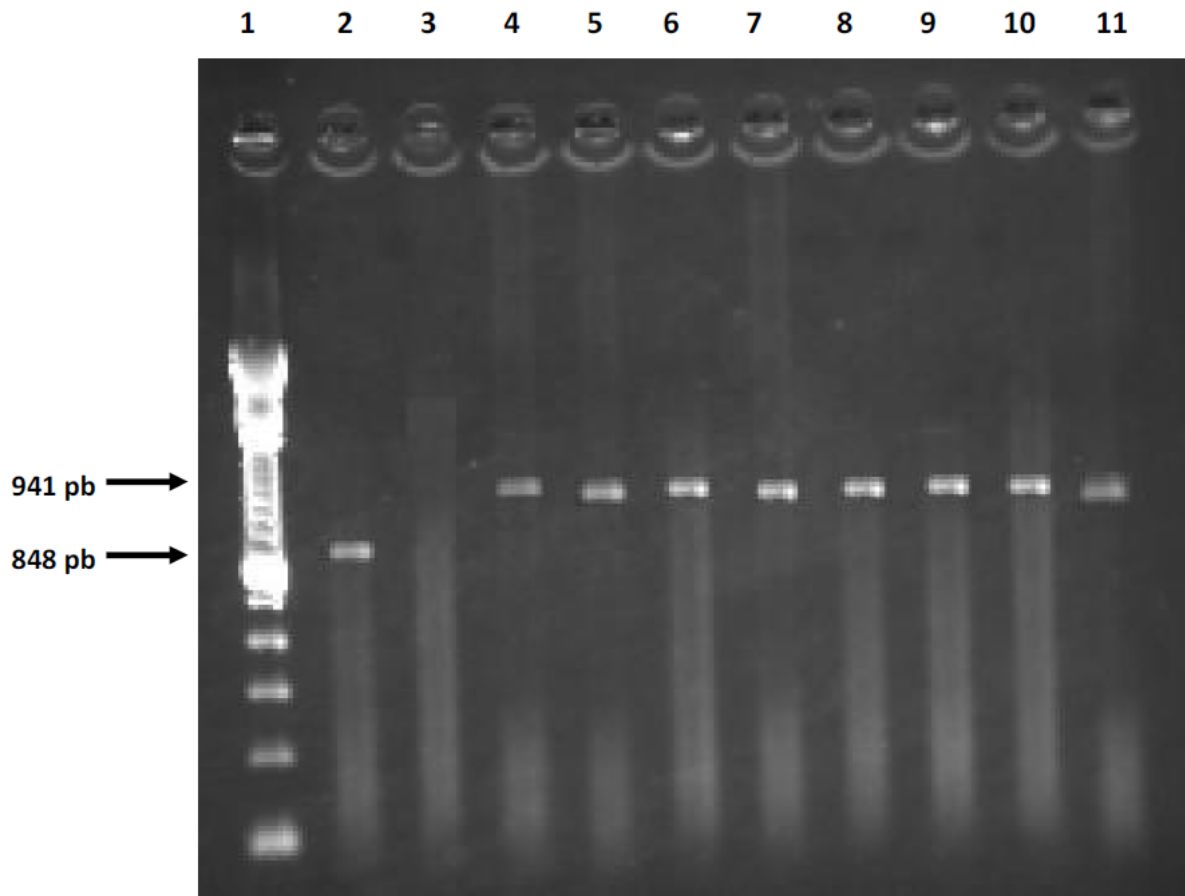


Figura 2 – Produtos da reação *nested* PCR para a detecção do WSSV. Canaletas: 1 – padrão de tamanho molecular 100 pb; 2 – Controle positivo 848 pb (DNA genômico do *L. vannamei*); 3 – controle negativo; 4 – Fazenda Ilha das Palmas (viveiro 1); 5 – Fazenda Ilha das Palmas (viveiro 2); 6 – Fazenda Miranda (viveiro 1); 7 – Fazenda Miranda (viveiro 2); 8 – Fazenda Tambaqui (viveiro 1); 9 – Fazenda Tambaqui (viveiro 2); 10 – Fazenda Cezar Prates (viveiro 1); 11 – Fazenda Cezar Prates (viveiro 2).

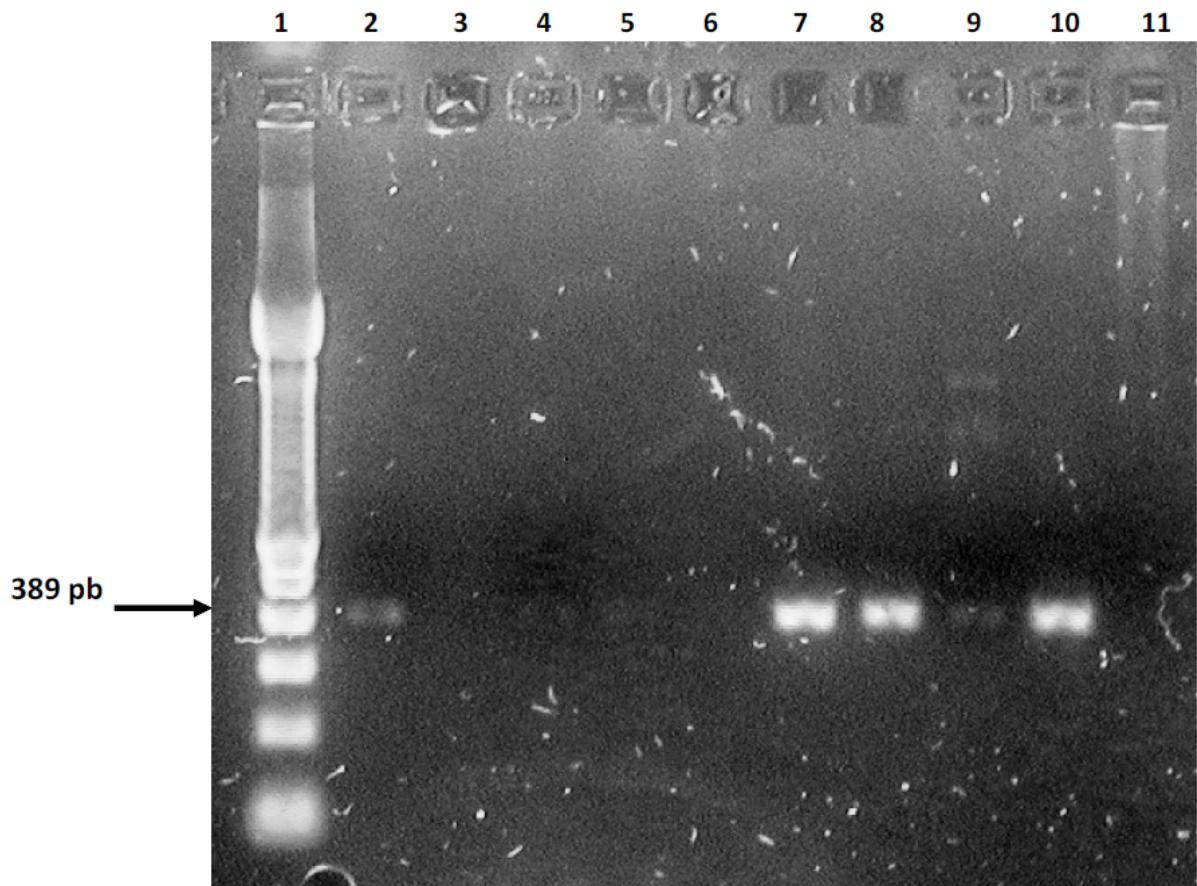


Figura 3 – Produtos da reação PCR para a detecção do IHHNV. Canaletas: 1 – padrão de tamanho molecular 100 pb; 2 – Controle positivo 389 pb (tecido positivo *L. vannamei*); 3 – controle negativo; 4 – Fazenda Ilha das Palmas (PL chegada viveiro 1); 5 –Fazenda Ilha das Palmas (PL chegada viveiro 2); 6 – Fazenda Miranda (PL chegada viveiro 1); 7 – Fazenda Miranda (PL chegada viveiro 2); 8 – Fazenda Tambaqui (PL chegada viveiro 1); 9 – Fazenda Tambaqui (viveiro 2); 10 – Fazenda Cezar Prates (PL chegada viveiro 1); 11 – Fazenda Cezar Prates (PL chegada viveiro 2).