

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AQUICULTURA**

Seleção de reprodutores de *Litopenaeus vannamei* livres da Síndrome da Mancha Branca (WSSV), da Necrose Infecciosa Hipodermal e Hematopoiética (IHHNV) para produção de pós-larvas livres destes patógenos virais

Carlos Cesar de Mello Junior

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Aqüicultura, da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de mestre em aqüicultura.

Orientador: Dr. Mauricio Laterça Martins
Co-orientador: Dr. Luis Vinatea Arana

FLORIANÓPOLIS
2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Mello Junior, Carlos Cesar de

Seleção de reprodutores *de Litopenaeus vannamei* livres da Síndrome da Mancha Branca (WSSV), da Necrose Infecciosa Hipodermal e Hematopoiética (IHHNV) para produção de pós-larvas livres destes patógenos virais/Carlos Cesar de Mello Junior – 2010

50 f: 7 fig. 4 tab.

Orientador: Maurício Laterça Martins

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura.

1.*Litopenaeus vannamei*, 2.Reprodução, 3.Epidemiologia, 4.WSSV, 5.IHHNV, 6.Nested-PCR

Seleção de reprodutores de *Litopenaeus vannamei* livres da Síndrome da Mancha Branca (WSSV), da Necrose Infecciosa Iipodermal e Hematopoiética (IHNV) para produção de larvas livres destes patógenos virais.

Por

CARLOS CESAR DE MELLO JÚNIOR

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM AQUICULTURA

e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.

Prof. Cláudio Manoel Rodrigues de Melo, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Dr. Maurício Laterça Martins – *Orientador*

Dr. Afonso Celso Dias Bainy

Dra. Alitiene Moura Lemos Pereira

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a minha família pela dedicação em minha educação e formação como ser humano.

A minha esposa Silvana por todo amor e carinho.

Ao amigo Gael Leclercq pela paciência e contribuição durante minha formação pessoal, profissional e acadêmica.

A equipe da Concepto Azul pela confiança depositada e por todo o empenho que tornou possível a realização deste trabalho.

Aos amigos e colegas de mestrado Pedro Rey e José Roberto Argento Neto pela convivência, paciência e contribuição durante a realização do experimento e minha residência no Estado.

Aos amigos e colegas de pós-graduação Mauricio Lehman, Robert Lenocho e Delano Schleder por todo apoio durante minha jornada em Santa Catarina.

A Associação Catarinense dos Criadores de Camarão, em especial o Sr. Pedro Constantino pela credibilidade.

Aos colegas de trabalho Giovanni Mello e Álvaro Farias por terem acreditado na importância e viabilidade deste projeto.

Ao professor Luis Alejandro Vinatea Arana pelos preciosos ensinamentos durante o mestrado.

A Professora Célia Barardi pela gentileza, atenção e incentivo ao projeto.

Ao professor Maurício Laterça Martins pela dedicação durante a conclusão deste trabalho.

Aos colegas de mestrado Felipe Vieira do Nascimento, Celso Buglione Neto e Janice Marques pelo incentivo e amizade demonstrada durante esta etapa de minha vida.

Aos colegas de trabalho do Laboratório Estaleirinho, Jefferson Mazotto e Rodolfo Petersen pelo apoio para a execução deste trabalho.

Aos meus cachorros Ben Hur e Shiva pela lealdade, sempre ao meu lado.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma colaboraram durante esta etapa de minha vida.

RESUMO

Este estudo teve como objetivo principal selecionar individualmente por Nested-PCR reprodutores de *L. vannamei* livres de WSSV e de IHHNV e a partir destes produzir pós-larvas livres destes patógenos virais por meio da prevenção da sua transmissão vertical. A partir de 2.650 camarões, foram selecionados fenotipicamente 1.600, destes 800 machos e 800 fêmeas. Os camarões foram marcados individualmente com anel numerado (487 fêmeas e 231 machos). As análises por Nested-PCR mostraram que 307 fêmeas (63%) e 127 machos (55%) estavam infectados com IHHNV. Os animais livres de IHHNV foram analisados para WSSV, os animais livres dos dois vírus, foram destinados a reprodução. As pós-larvas produzidas foram estocadas em 9 tanques berçário, para análise. Das 45 replicas analisadas apenas 2 estavam positivas para IHHNV e nenhuma positiva para WSSV, e os animais foram encaminhados posteriormente para fazendas. Ainda foi realizada uma análise comparativa em viveiros de engorda entre pós-larvas livres, produzidas localmente e pós-larvas do Nordeste provenientes da região de Canguaretama (RN) Os juvenis analisados, de pós-larvas locais, em fazenda apresentaram 1,25% de WSSV e IHHNV em 80 animais examinados. Por outro lado, as análises de juvenis do Nordeste revelaram que 10% dos examinados estavam infectados com WSSV e IHHNV. Além de juvenis de *L. vannamei*, foram examinados caranguejos (*Chasmagnathus granulata*), aplísias (*Aplysia brasiliana*) e siris (*Callinectes sapidus*) sendo 50% das aplísias e 67% dos siris infectados por WSSV. A comparação de sobrevivências em 3 fazendas mostrou sobrevivência média de 55% para pós-larvas locais contra 23,4% e para pós-larvas do Nordeste.

Palavras-chave: *Litopenaeus vannamei*, Reprodução, Epidemiologia, WSSV, IHHNV, Nested-PCR

ABSTRACT

This work aimed to select individually by nested PCR *L. vannamei* broodstock and to produce post-larvae free of WSSV and IHHNV by preventing its transmission. From 2650 shrimps, 1600 were phenotypically selected, (800 males and 800 females). Shrimp were individually marked with numbered ring (487 females and 231 males). Analysis by nested-PCR showed that 307 females (63%) and 127 males (55%) were infected with IHHNV. Animals free of IHHNV were tested for WSSV, and the animals free of viruses used for breeding. The post-larvae produced were stocked in 9 nursery tanks for analysis. From 45 replicates examined only 2 were positive for IHHNV and none for WSSV. After that they were sent to the farms. A comparative analysis in growth ponds between post-larvae-free, locally produced, and post-larvae from the Northeast region Canguaretama (RN) was performed. Juveniles of local post-larvae analyzed showed 1.25% WSSV and IHHNV, in 80 animals examined. Furthermore, the analysis of juvenile from Northeast revealed that 10% of the shrimps were infected with WSSV and IHHNV. Not only *L. vannamei*, but also crabs (*Chasmagnathus granulata*) aplisias (*Aplysia brasiliiana*) and siris (*Callinectes sapidus*) were examined. Fifty percent of aplisias and 67% of crabs were infected by WSSV. The comparison of survival in 3 farms showed median survival of 55% for local post-larvae against 23.4% for post-larvae from the Northeast.

Key words: *Litopenaeus vannamei*, breeding, Epidemiology, WSSV, IHHNV, Nested-PCR

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Seleção natural em viveiros de camarões sobreviventes ao vírus..... 21

Figura 2: Seleção fenotípica individual de reprodutores (A), aclimatação (B), marcação com anel numerado (C) e coleta de pleópodos dos reprodutores para seleção de um plantel livre de patógenos virais (D)..... 50

Ilustrações do Artigo

Figura 1: Estratégia de produção de larvas livres de patógenos..... 28

Figura 2: Análise comparativa na fazenda 3 da taxa de sobrevivência em viveiros entre as pós-larvas que foram submetidas ao procedimento de prevenção da transmissão vertical (pós-larvas livres) e pós-larvas do Nordeste. ($P < 0.05$) e $P = 0,0278^*$ 42

Figura 3: Análise comparativa na fazenda 5 da taxa de sobrevivência em viveiros entre as pós-larvas que foram submetidas ao procedimento de prevenção da transmissão vertical (pós-larvas livres) e pós-larvas do Nordeste. ($P < 0.05$) e $P = 0.0001^{***}$ 42

Figura 4: Análise comparativa na fazenda 6 da taxa de sobrevivência em viveiros entre as pós-larvas que foram submetidas ao procedimento de prevenção da transmissão vertical (pós-larvas livres) e pós-larvas do Nordeste. ($P < 0.05$) e $P = 0.0007^{***}$ 43

Figura 5: Análise comparativa nas fazendas 3, 5 e 6 da taxa de sobrevivência em viveiros entre as pós-larvas que foram submetidas ao procedimento de prevenção da transmissão vertical (pós-larvas livres) e pós-larvas do Nordeste. ($P < 0.05$) e $P = 0,0002^{***}$ 42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Acompanhamento em fazendas de engorda do Estado de Santa Catarina..... 40

Tabela 2: Número de reprodutores de *Litopenaeus vannamei* examinados (AE), infectados (AI) e porcentagem de animais positivos (%) para vírus da mancha branca (WSSV) e necrose infecciosa hipodermal e hematopoiética (IHHNV) no Estado de Santa Catarina.....40

Tabela 3: Número de animais examinados (AE), número de animais infectados (AI) e taxa de prevalência (%) do vírus da mancha branca (WSSV) e da necrose infecciosa hipodermal e hematopoiética (IHHNV) nas respectivas fazendas analisadas no Estado de Santa Catarina..... 40

Tabela 4: Análise Comparativa da taxa de sobrevivência em viveiros entre as larvas que foram submetidas ao procedimento de prevenção da transmissão vertical e larvas do Nordeste..... 41

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	17
OBJETIVOS	22
Geral	22
Específicos.....	22
Seleção de reprodutores de <i>Litopenaeus vannamei</i> livres da Síndrome da Mancha Branca (WSSV), da Necrose Infecciosa Hipodermal e Hematopoiética (IHNNV) para produção de pós-larvas livres destes patógenos virais.....	23
RESUMO.....	24
ABSTRACT	25
Introdução	26
Material e Métodos.....	27
Resultados.....	32
Discussão	34
Agradecimentos	36
Referências	37
REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO.....	43
ANEXO.....	50

INTRODUÇÃO

Enfermidades infecciosas afetam significativamente os cultivos de *Litopenaeus vannamei* em todas as suas fases, causando mortalidade e reduzindo as taxas de crescimento (LIGHTNER, 1998). No Brasil, os principais agentes patogênicos encontrados são os Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV) no Nordeste (SENAPIN et al., 2007), o vírus da Necrose Infecciosa Hipodermal e Hematopoiética (IHHNV), encontrado em todo país (informação pessoal), e por último o Vírus da Mancha Branca (WSSV), identificado em Santa Catarina (SEIFFERT, 2005).

A Síndrome da Mancha Branca foi registrada pela primeira vez em cultivos de *Penaeus japonicus*, no Japão, em 1993 (NAKANO et al, 1994). Em 1993, a China registrou perdas de 1 bilhão, e a Tailândia de 500 milhões de dólares. Trata-se de uma doença letal (90 a 100% de mortalidade) com potencial para infectar outras espécies de crustáceos. Em 1999, A Síndrome da Mancha Branca foi notificada nos Estados Unidos e na costa americana do Pacífico. Em janeiro do mesmo ano, o vírus foi encontrado em amostras provenientes da Nicarágua, Guatemala e Honduras (JORY e DIXON, 1999).

A enfermidade é extremamente virulenta causando alta mortalidade nas populações de camarões infectados. Trata-se de um vírus grande e envelopado de forma arredondada que contém um DNA de dupla-fita circular de 305 Kb (WANG et al., 1995; WONGTEERASUPAYA et al., 1995; VAN HULTEN et al., 2001; YANG et al., 2001).

A infecção foi observada em várias espécies comerciais de peneídeos, incluindo *Penaeus monodon*, *P. japonicus*, *P. chinensis*, *P. indicus*, *P. merguensis*, *L. vannamei*, *P. stylirostris*, *P. penicillatus* e *P. setiferus*. A doença ocorre tipicamente em juvenis, entretanto, pode se manifestar apenas em estágios mais avançados (adulto). Os sinais clínicos observados em camarões infectados incluem carapaça manchada por uma deposição anormal de sais de cálcio com alguns milímetros de diâmetro.

Segundo Karunasasagas et al. (1997), os animais afetados apresentam coloração que varia de um tom rosado ao vermelho escuro, devido à expansão de seus cromatóforos circulares, letargia e rápida redução no consumo de alimento. O camarão infectado nada lentamente próximo à superfície do viveiro e, eventualmente, enterra-se no fundo do viveiro e morre. Altas taxas de mortalidade (100%) ocorrem entre 03 e 10 dias após os primeiros sinais da doença. Alguns estudos sugerem que as manchas brancas na carapaça são produzidas devido à alta

alcalinidade e outras condições do ambiente, como relatado por Chang et al. (1996, 1998), Durand et al. (1997), Sudna et al. (1997), Nunan et al. (1998), Graindange (1999) e Jory e Dixon (1999).

A rápida transmissão do WSSV em sistemas de cultivo pode ocorrer por meio de camarões infectados, pela água ou canibalismo de camarões moribundos (Chang et al. 1996), além de outros vetores como zooplâncton, crustáceos e até mesmo microalgas, segundo a OIE (2006). Entretanto, as principais fontes de infecção para as fazendas de camarão são os reprodutores e as pós-larvas contaminados (SANCHEZ-MARTINEZ et al., 2007).

A presença do vírus no Brasil foi identificada no fim de 2004, quando foi registrada a mortalidade dos camarões nas fazendas de criação em Santa Catarina. O Estado possuía na época aproximadamente 180 produtores e 1.600 hectares povoados. Entretanto, destes 1.600 hectares, apenas 200 hectares não foram afetados pelo vírus. Em 2004, a produção catarinense foi de 4.200 toneladas e, em função da doença, houve uma queda significativa de 33% na produção (SEIFFERT, 2005). Desta forma, torna-se evidente que a prevenção de doenças é a atual prioridade da carcinicultura mundial (RODRIGUES e LE MOULLAC, 2000).

O vírus da Necrose Infecciosa Hipodermal e Hematopoiética (IHHNV) é o menor dos vírus de camarões peneídeos que se conhece. Trata-se de um vírus com 22 nm de diâmetro, não envelopado de formato icosaedral com densidade de 1.40 g/ml em CsCl. Seu genoma apresenta DNA linear, fita simples e seu capsídeo é constituído por 4 polipeptídios com pesos moleculares de 74, 47, 39 e 37.5 kD. Por causa de suas características, o IHHNV tem sido classificado como membro da família *Parvoviridae* (BONAMI et al. 1990; BONAMI e LIGHTNER 1991; MARI et al. 1993; NUNAN et al. 2000; SHIKE et al. 2000).

Os vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV), da Síndrome de Taura (TSV) e da Cabeça Amarela (YHV) são conhecidos por causar perdas catastróficas em uma ou mais espécies de camarões peneídeos (*P. vannamei* e *P. monodon* principalmente). No caso do IHHNV em particular, somente na espécie *L. stylirostris*, este vírus pode causar mortalidade de até 90%. Entretanto, na espécie cultivada no Estado de Santa Catarina, o *L. vannamei*, o vírus não causa mortalidade, porém é responsável por outros efeitos. Em *L. vannamei*, o patógeno causa uma enfermidade crônica conhecida como “síndrome da deformidade e do nanismo” (RDS), caracterizada por baixa produtividade e aumento do coeficiente de variação no tamanho dos camarões. Os índices de

crescimento reduzidos e deformações cuticulares nos camarões resultam em perdas econômicas de 10% a 50% quando comparados a um ciclo livre deste patógeno (LIGHTNER e REDMAN, 1998).

O IHHNV é um vírus presente nas espécies silvestres tendo sido reportadas infecções naturais em *P. stylirostris*, *L. vannamei*, *P. occidentalis*, *P. schmitti* e *P. californiensis* no ocidente (OIE, 2006)

Em regiões onde o vírus é endêmico nas populações selvagens, a prevalência do IHHNV é encontrada em taxas que variam entre 0 e 100%, entre os sobreviventes. A prevalência reportada para IHHNV nas populações selvagens de *L. stylirostris* no alto e no baixo Golfo da Califórnia são de 26% e 46%, respectivamente (PANTOJA et al., 1999). Já na região média do Golfo da Califórnia, a prevalência em fêmeas e machos adultos de *L. stylirostris* é de 100% e 57%, respectivamente (MORALES-COVARRUBIAS et al., 1999). Já em *L. vannamei* selvagens coletados da costa do Pacífico do Panamá, a prevalência é de 28% (NUNAN et al., 2001), enquanto que em *L. vannamei* coletados da costa do Pacífico no Equador, Colômbia e Panamá a prevalência varia de 51 a 63% (MOTTE et al., 2003). Outros peneídeos coletados entre os sobreviventes foram diagnosticados como positivos para IHHNV, incluindo o camarão *Farfantepenaeus californiensis* e o “Western white shrimp” *L. occidentalis*. Em fazendas onde o IHHNV está presente, a prevalência pode ser muito inferior a 100%, porém a alta prevalência é mais comum (LIGHTNER et al., 1983, LIGHTNER, 1988, 1996;, 1992, MARTINEZ-CORDOVA, 1992, CHAYABURAKUL et al., 2004).

Lightner (1988), em seu estudo sobre os hospedeiros conhecidos para o vírus o IHHNV e suas distribuições geográficas, identificou, através das práticas utilizadas na época para diagnóstico de patógenos virais no cultivo de camarão, a presença do vírus IHHNV no Brasil.

Assim como nas mais importantes viroses de camarão, a transmissão de IHHNV é conhecida por ser rápida e eficiente devido ao canibalismo de animais moribundos, embora a transmissão por coabitação seja significativamente menor. A transmissão vertical por meio de um plantel de reprodutores para as larvas é comum (OIE, 2006), tendo como origem o ovário de fêmeas infectadas, enquanto o esperma de machos infectados se apresenta geralmente livre do vírus. Embora os embriões de fêmeas altamente infectadas possam ser abortados, isso nem sempre ocorre e a seleção de um plantel livre de IHHNV (por Nested-PCR) e desinfecção dos ovos e náuplios deve ajudar na produção de pós-larvas livres sadias (MOTTE et al., 2003) entretanto

não preveniria a transmissão vertical do vírus, uma vez que o mesmo se encontra dentro do ovócito.

A transmissão vertical tem sido sugerida desde que o vírus foi detectado em tecidos do ovário e em ovócitos (LOTZ, 1997).

Segundo Motte et al. (2003) a transmissão vertical deve ser o fator crucial para o aumento da prevalência, geração a geração, de IHHNV em camarões de cultivo. Como fator principal, os plantéis de reprodutores originam animais infectados por transmissão vertical, com conseqüente aumento da transmissão horizontal, em viveiros. A partir do momento em que a maioria dos animais infectados sobrevive sem sinais clínicos, muitos são selecionados para a formação de novos plantéis aparentemente saudáveis, porém fortemente infectados por IHHNV. Esses animais oferecem alto risco de transmissão vertical do patógeno para seus descendentes.

Nas fazendas, a infecção dos camarões pode ser resultado da transmissão horizontal decorrente da ingestão de indivíduos mortos.

Algumas estratégias de produção têm sido utilizadas com sucesso para a prevenção do IHHNV. Uma delas é a seleção por PCR dos reprodutores, descartando-se os que apresentam resultados positivos para este vírus (FEGAN e CLIFFORD, 2001; MOTTE et al., 2003)

Já para a prevenção da transmissão do vírus causador da Mancha Branca (WSSV) se evita estocar animais em fazendas durante as estações mais frias, além do mais, deve-se utilizar reprodutores livres de patógenos específicos (SPF) ou estocar larvas diagnosticadas por PCR como livres para este patógeno, assim como utilizar práticas de biossegurança no manejo da qualidade da água e dos sistemas de cultivo (CORSIN et al., 2003; HSU et al., 1999; MUSHIAKE et al., 1999, PENG et al., 2001; WITHYACHUMNARNKUL, 1999).

Foi demonstrado em vários países que o uso de camarões sensíveis e selecionados sem nenhum critério de resistência a patógenos, não permite obter sustentabilidade da atividade sob tais condições de cultivo (BRIGGS et al., 2004). A seleção e produção de larvas baseada em duplo critério, animais resistentes (SPR – Specific Pathogen Resistant) e livres de patógenos (SPF- Specific Pathogen Free), têm sido utilizadas com sucesso em condições de cultivo similares (CHAMORRO e MIALHE, 2004). O primeiro nível de seleção de animais SPR consiste em selecionar os indivíduos sobreviventes a infecções naturais em viveiros de cultivo como ilustrado na figura 1. Essa estratégia foi usada com sucesso na América Latina, inclusive no Brasil, para seleção de animais resistentes ao vírus TSV quando houve epidemia no Nordeste. “As linhagens SPR de *L. vannamei* possuem alta

diversidade genética, e são oriundas de múltiplas fontes (SPF e não-SPF), e têm sido selecionadas pelas sobrevivências as diversas epidemias em viveiros de engorda, em alguns casos por até cinco anos (i.e. no Panamá, Equador, Colômbia e Brasil). Ainda apresentam maior resistência (i.e. WSSV, TSV e IHHNV) do que quando são puramente SPF” (BRIGGS et al., 2004). Neste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar uma alternativa para a carcinicultura brasileira, como a formação de linhagens de *L. vannamei* locais, livres de vírus através da seleção de reprodutores sobreviventes a áreas afetadas por patógenos virais e da prevenção da transmissão vertical do WSSV e do IHHNV durante o processo de produção de pós-larvas.

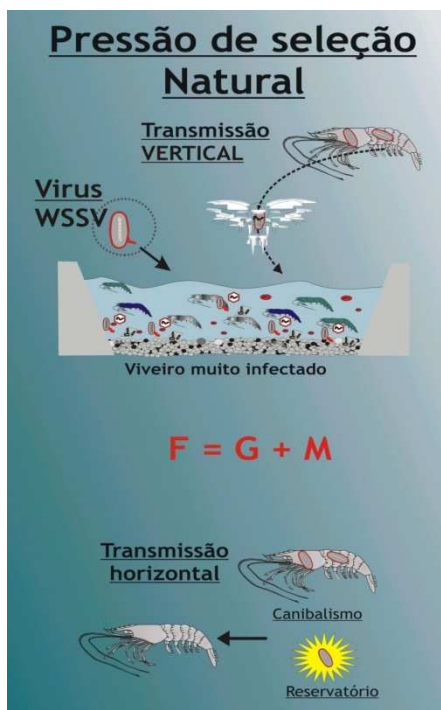


Figura 1: Seleção natural em viveiros de camarões sobreviventes ao vírus

(fonte: Concepto Azul Brasil)

OBJETIVOS

Geral

Produção de pós-larvas de *Litopenaeus vannamei* livres de WSSV e IHHNV por meio da seleção de reprodutores diagnosticados livres dos vírus da doença da mancha branca (WSSV) e da necrose infecciosa hipodermal e hematopoiética (IHHNV).

Específicos

Verificar se o povoamento de viveiros com pós-larvas originadas de um plantel sobrevivente e adaptado a uma região afetada por patógenos virais e diagnosticado livre dos vírus WSSV e IHHNV consiste em método eficiente de profilaxia quando comparado com animais que não foram submetidos a este tipo de manejo.

Seleção de reprodutores de *Litopenaeus vannamei* livres da Síndrome da Mancha Branca (WSSV), da Necrose Infecciosa Hipodermal e Hematopoiética (IHHNV) para produção de pós-larvas livres destes patógenos virais

Carlos Cesar de Mello Júnior¹, Gael Leclercq¹, Emmerik Motte¹,
Virna Cedeño¹, Maurício Laterça Martins^{2*} e Luis Alejandro
Vinatea Arana³

¹Concepto Azul, Cdla. Vernaza Norte, Mz 10, villa 34, Guayaquil, Equador. E-mail: carlosjrmello@hotmail.com.br

²Laboratório AQUOS-Sanidade de Organismos Aquáticos, Departamento de Aqüicultura, Centro de Ciências Agrárias (CCA), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Rod. Admar Gonzaga, 1346, Itacorubi, 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil. E-mail: mlaterca@cca.ufsc.br

³Laboratório de Camarões Marinhos (LCM), Departamento de Aqüicultura, CCA, UFSC, Rod. Admar Gonzaga, 1346, Itacorubi, 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil. E-mail: vinatea@mbox1.ufsc.br

*

Autor para correspondência. E-mail: mlaterca@cca.ufsc.br

RESUMO

Este estudo teve como objetivo selecionar individualmente por Nested-PCR reprodutores de *L. vannamei* livres de WSSV e de IHNV e a partir destes produzir pós-larvas livres destes patógenos virais por meio da prevenção da sua transmissão vertical. A partir de 2.650 camarões, foram selecionados fenotipicamente 1.600, destes 800 machos e 800 fêmeas. Os camarões foram marcados individualmente com anel numerado (487 fêmeas e 231 machos). As análises por Nested-PCR mostraram que 307 fêmeas (63%) e 127 machos (55%) estavam infectados com IHNV. Os animais livres de IHNV foram analisados para WSSV, os animais livres dos dois vírus, foram destinados a reprodução. As pós-larvas produzidas foram estocadas em 9 tanques berçário para análise. Das 45 replicas analisadas apenas 2 estavam positivas para IHNV e nenhuma positiva para WSSV e os animais encaminhadas posteriormente para fazendas. Ainda foi realizada uma análise comparativa em viveiros de engorda entre pós-larvas livres, produzidas localmente e pós-larvas do Nordeste provenientes da região de Canguaretama (RN). Os juvenis analisados, de pós-larvas locais, em fazenda apresentaram 1,25% de WSSV e IHNV em 80 animais examinados. Por outro lado, as análises de juvenis do Nordeste revelaram que 10% dos examinados estavam infectados com WSSV e IHNV. Além de juvenis de *L. vannamei*, foram examinados caranguejos (*Chasmagnathus granulata*), aplísias (*Aplysia brasiliana*) e siris (*Callinectes sapidus*) sendo 50% das aplísias e 67% dos siris infectados por WSSV. A comparação de sobrevivências em 3 fazendas mostrou sobrevivência média de 55% para pós-larvas locais contra 23,4% e para pós-larvas do Nordeste.

Palavras-chave: *Litopenaeus vannamei*, Reprodução, Epidemiologia, WSSV, IHNV, Nested-PCR

ABSTRACT. Selection breeding of *Litopenaeus vannamei* free of White Spot Syndrome (WSSV) and Infectious Hematopoietic and Hipodermal Necrosis (IHHNV) for production of post-larvae free of viral pathogens This work aimed to select individually by nested PCR *L. vannamei* broodstock and to produce post-larvae free of WSSV and IHHNV by preventing its transmission. From 2650 shrimps, 1600 were phenotypically selected (800 males and 800 females). Shrimp were individually marked with numbered ring (487 females and 231 males). Analysis by nested-PCR showed that 307 females (63%) and 127 males (55%) were infected with IHHNV. Animals free of IHHNV were tested for WSSV and the animals free of viruses used for breeding. The post-larvae produced were stocked in 9 nursery tanks for analysis. From 45 replicates examined only 2 were positive for IHHNV and for WSSV. After that, they were sent to the farms. A comparative analysis in growth ponds, between post-larvae-free, locally produced, and post-larvae from the Northeast region Canguaretama (RN) was performed. Juveniles of local post-larvae analyzed showed 1.25% WSSV and IHHNV, in 80 animals examined. Furthermore, the analysis of juvenile from Northeast revealed that 10% of the shrimps were infected with WSSV and IHHNV. Not only *L. vannamei*, but also crabs (*Chasmagnathus granulata*) aplisias (*Aplysia brasiliiana*) and siris (*Callinectes sapidus*) were examined. Fifty percent of aplisias and 67% of crabs were infected by WSSV. The comparison of survival in 3 farms showed median survival of 55% for local post-larvae against 23.4% for post-larvae from the Northeast.

Key words: *Litopenaeus vannamei*, breeding, Epidemiology, WSSV, IHHNV, Epidemiology, Nested-PCR

Introdução

Enfermidades infecciosas afetam significativamente os cultivos de *Litopenaeus vannamei* em todas as suas fases, causando mortalidade e reduzindo as taxas de crescimento (Lightner, 1998). No Brasil, os principais agentes patológicos encontrados são: o Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV), reportado no Nordeste (SENAPIN *et al.*, 2007), o Vírus da Necrose Infecciosa Hipodermal e Hematopoiética (IHNV), encontrado em todo país (informação pessoal), e por último o Vírus da Mancha Branca (WSSV), identificado em Santa Catarina (SEIFFERT, 2005).

A rápida transmissão do WSSV em sistemas de cultivo pode ocorrer por meio de camarões infectados, pela água ou canibalismo de camarões moribundos (CHANG *et al.* 1996), além de outros vetores como zooplâncton, crustáceos e até mesmo microalgas, segundo a OIE (2006). Entretanto, as principais fontes de infecção para as fazendas de camarão são os reprodutores e as pós-larvas contaminados (SANCHEZ-MARTINEZ *et al.*, 2007).

Assim como nas mais importantes viroses de camarão, a transmissão de IHNV é conhecida por ser rápida e eficiente devido ao canibalismo de animais moribundos, embora a transmissão por coabitação seja significativamente menor. A transmissão vertical por meio de um plantel de reprodutores para as larvas é comum (OIE, 2006), tendo como origem o ovário de fêmeas infectadas, enquanto o esperma de machos infectados se apresenta geralmente livre do vírus.

Segundo Motte *et al.* (2003), a transmissão vertical deve ser o fator crucial para o aumento da prevalência, geração a geração, de IHNV em camarões de cultivo. Como fator principal, os plantéis de reprodutores originam animais infectados por transmissão vertical, com conseqüente aumento da transmissão horizontal, em viveiros. A partir do momento em que a maioria dos animais infectados sobrevive sem sinais clínicos, muitos são selecionados para a formação de novos plantéis aparentemente saudáveis, porém fortemente infectados por IHNV. Esses animais oferecem alto risco de transmissão vertical do patógeno para seus descendentes. Foi demonstrado em vários países que o uso de camarões sensíveis para formação de um plantel de reprodutores e selecionados sem nenhum critério de resistência à patógenos, não permite obter sustentabilidade da atividade sob tais condições de cultivo (BRIGGS *et al.*, 2004). A seleção e produção de larvas baseada em duplo critério, animais resistentes (SPR – Specific

Pathogen Resistant) e livres de patógenos (SPF- Specific Pathogen Free), têm sido utilizadas com sucesso em condições de cultivo similares (CHAMORRO e MIALHE, 2004). O primeiro nível de seleção de animais SPR consiste em selecionar os indivíduos sobreviventes a infecções naturais em viveiros de cultivo. Essa estratégia foi utilizada com sucesso na América Latina, inclusive no Brasil, para seleção de animais resistentes ao vírus TSV quando houve epidemia no Nordeste. “As linhagens SPR de *L. vannamei* possuem alta diversidade genética, e são oriundas de múltiplas fontes (SPF e não-SPF), e têm sido selecionadas pelas sobrevivências as diversas epidemias em viveiros de engorda, em alguns casos por até cinco anos (i.e. no Panamá, Equador, Colômbia e Brasil). Ainda apresentam maior resistência (i.e. WSSV, TSV e IHHNV) do que quando são puramente SPF” (BRIGGS et al., 2004).

Ainda deve-se levar em consideração a importação de linhagens SPF de outros países, pois estes animais podem conter patógenos virais ainda desconhecidos e apesar de serem SPF para um patógeno podem ser diagnosticados positivos para este mesmo patógeno dependendo da sensibilidade da metodologia de diagnóstico (MONTGOMERY *et al.*, 2007; DO *et al.*, 2006).

Material e Métodos

Inicialmente foi realizada uma seleção do lote de pré-reprodutores para avaliar sua viabilidade. Em seguida os animais foram selecionados fenotipicamente no viveiro e transferidos para o laboratório de reprodução, onde ficaram dispostos em uma sala específica, separados por sexo em tanques distintos. Depois da marcação com anel numerado e primeira desova das fêmeas, todos os reprodutores tiveram um par de pleópodos amostrados e conservados em etanol 90%. Em seguida, os animais foram analisados individualmente por Nested-PCR. Caso um animal fosse diagnosticado positivo para qualquer um dos dois patógenos estudados (WSSV ou IHHNV), este seria imediatamente descartado. Desta forma, apenas os animais livres de patógenos virais foram utilizados para a produção de náuplios e larvas.

Para a produção de pós-larvas livres de patógenos, inicialmente foi realizada a escolha de um lote de pré-reprodutores. Esta etapa foi executada com intuito de avaliar a viabilidade do lote quanto ao seu estado sanitário, caso o lote apresentasse alta prevalência de patógenos virais, não seria recomendada a transferência do mesmo para o

laboratório de reprodução. Além disso, de acordo com a prevalência dos patógenos, foi adotada a estratégia de análise do lote de reprodutores, analisando-se primeiramente o patógeno que apresentou maior prevalência nesta etapa. Neste estudo, o patógeno que apresentou maior prevalência foi o IHNV, causador da Necrose Infecciosa Hipodermal e Hematopoiética, com taxa de 13%

A Figura 1 ilustra a classificação de reprodutores (machos e fêmeas) em “0,0” que significa livres para os dois patógenos, WSSV e IHNV. Após um estresse duplo que consiste no processo de ablação e a primeira desova, os animais são analisados para os respectivos vírus e os resultados negativos são chamados de “0” e os positivos de “+”. Apenas os animais considerados “0,0” foram utilizados para a produção de náuplios e os positivos descartados.

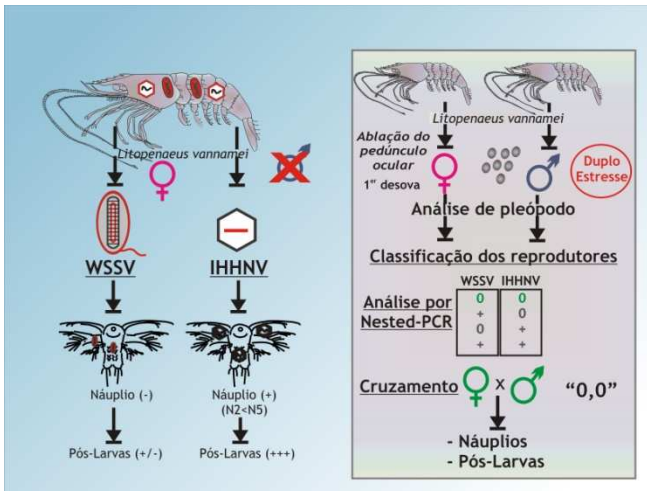


Figura 1: Estratégia de produção de larvas livres de patógenos
(fonte: Concepto Azul Brasil)

Diagnóstico

A ferramenta de diagnóstico utilizada neste estudo foi a reação em cadeia da polimerase (PCR), que consiste em um método de amplificação de DNA (ácido desoxirribonucleico), ou seja, criação de múltiplas cópias de DNA sem o uso de um organismo vivo. O Nested-PCR emprega uma segunda etapa de amplificação com um par de “primers” internos aos utilizados na primeira etapa, visando aumentar a sensibilidade e especificidade do método

O protocolo de extração de DNA foi previamente validado para estes tecidos utilizando PCR com primers correspondentes para peneidinas (Destoumieux et al., 2000). No caso dos juvenis e dos camarões adultos a extração do DNA foi realizada utilizando o mesmo protocolo. A detecção dos patógenos por Nested-PCR foi realizada no laboratório da Concepto Azul localizado em Guayaquil-equador, através de kits comerciais da própria empresa. Os fragmentos amplificados foram posteriormente observados em gel de agarose (2%).

Seleção do Lote de Pré-reprodutores

Durantes esta etapa, 30 camarões foram amostrados ao acaso e avaliados fenotipicamente para possíveis sintomas de infecção por patógenos. Neste processo selecionou-se 22 fêmeas e 08 machos.

O número de animais coletados foi estabelecido de acordo com as recomendações da Organização Internacional de Epizootias (OIE, 2006), segundo a qual, com uma amostragem de 30 animais, pressupondo-se uma prevalência de 10%, é possível estimar a prevalência do vírus em um determinado local, com um grau de confiança de 95%. Antes da coleta dos tecidos, foram realizadas a biometria e determinação do sexo. Os animais foram ainda examinados externamente quanto ao aspecto e estado geral de saúde.

Em seguida os camarões tiveram seus pleópodos e hepatopâncreas coletados e fixados individualmente em etanol 90%, para serem analisados por Nested-PCR para os vírus WSSV, IHNV além da bactéria intracelular causadora da hepatopancreatite necrosante (NHP), e RT-Nested-PCR para IMNV. Segundo estudos realizados por Lo et al. (1997), os pleópodos são considerados amostras de tecido eficientes para a realização do diagnóstico.

Seleção de Reprodutores

Após a escolha do lote, foi realizada na mesma fazenda a seleção de reprodutores fenotipicamente saudáveis. De aproximadamente 2.650 animais, apenas 1.600 camarões foram selecionados, sendo 800 machos e 800 fêmeas. Os animais foram transportados para o laboratório em tanques com oxigênio e distribuídos em casais nos tanques de maturação para acelerar este processo.

As fêmeas foram submetidas ao procedimento de ablação 10 dias após sua chegada ao laboratório.

De 800 fêmeas, 487 apresentaram sinais de maturação e foram numeradas com anel colorido individual. Dos 800 machos, 231 foram selecionados por peso e desenvolvimento do espermatóforo, estes foram

numerados para posteriormente serem amostrados e individualmente analisados para IHNV primeiro.

Biossegurança no Manejo dos Reprodutores

Quando existe um animal infectado no mesmo tanque que um animal sadio, a taxa de transmissão por coabitação do WSSV em *L. vannamei* é de 0,01%, enquanto que a taxa de transmissão por ingestão na mesma situação é de 46% (SOTO e LOTZ, 2001). Assim, sugere-se que o risco de transmissão do WSSV por coabitação entre animais vivos seja praticamente desprezível, conforme observado por Soto e Lotz (2001), permitindo, desta forma, manter os animais no mesmo tanque com risco de transmissão horizontal por coabitação desprezível. Levando em consideração que os patógenos analisados neste estudo podem ser considerados endêmicos na região, foram utilizadas “práticas de controle epidemiológico” buscando a diminuição de sua prevalência, eliminando apenas os animais diagnosticados positivos.

Análises dos Reprodutores

Durante a etapa de análise individual de reprodutores, as fêmeas foram analisadas após a realização de ablação e após terem realizado pelo menos uma desova, caracterizando estresse duplo. Vale ressaltar que o processo de ablação acelera a maturação das fêmeas, antecipando a desova.

Inicialmente, os reprodutores foram analisados individualmente por Nested-PCR, para identificação do IHNV. Os animais que apresentaram resultado negativo para o patógeno foram submetidos à Nested-PCR para identificação do WSSV. As análises de IMNV foram realizadas apenas por segurança, uma vez que não há notificação deste patógeno no Estado de Santa Catarina. Após este procedimento, os animais diagnosticados livres de patógenos foram encaminhados para a produção de náuplios.

Análise de pós-larvas

A larvicultura dos camarões foi realizada no Laboratório Estaleirinho. Antes de serem encaminhadas para as fazendas de engorda, as pós-larvas foram analisadas por Nested-PCR para identificação de WSSV, IHNV, *Baculovirus penaei* (BP) e NHP. Para detecção de IMNV foi utilizada a técnica de RT Nested-PCR, tendo em vista que se trata de um vírus de RNA.

Neste estudo foi analisado um lote de 4.214.000 pós-larvas 18 (PL18) divididas em 07 tanques berçários. Ainda foram amostrados 02 tanques de larvicultura com pós-larvas 08 (PL 8) utilizando o mesmo padrão de amostragem. Ao todo foram analisados 09 tanques de pós-larvas. A partir de cada um dos 09 tanques foram preparadas cinco amostras, cada amostra constituída de 150 animais. As 45 amostras preparadas foram preservadas em etanol 90%.

Acompanhamento em Fazendas de Engorda

Durante a etapa de acompanhamento em viveiros foi realizado um monitoramento epidemiológico, analisando camarões vivos e mortos, assim como também possíveis vetores ou hospedeiros, tais como caranguejos, siris e aplísias. Os possíveis vetores ou hospedeiros foram encontrados ao acaso, amostrados e analisados com o objetivo de compreender melhor sua possível interação com os vírus estudados neste trabalho

Nesta etapa realizou-se o acompanhamento de 06 fazendas comerciais de engorda, no Estado de Santa Catarina (Tabela 1), povoadas com as “larvas livres de patógenos” e larvas provenientes do Nordeste do Brasil, fornecidas pelo Laboratório Aquatec, Rio Grande do Norte.

De cada uma das fazendas do estudo epidemiológico (fazendas 1, 2, 3 e 4) foram coletados, aleatoriamente, camarões vivos e mortos. (em viveiros). Possíveis hospedeiros ou vetores, como caranguejos (*Chasmagnathus granulata*), aplísias (*Aplysia brasiliana*) e siris (*Callinectes sapidus*), também foram coletados e analisados de acordo com seu aparecimento.

Nas fazendas 3, 5 e 6 foi realizado um estudo de caso comparando a sobrevivência e produção, em quilogramas, entre as larvas que foram submetidas ao procedimento de prevenção da transmissão vertical e as larvas provenientes do Nordeste. Para realizar este estudo comparativo foram selecionados viveiros povoados em datas e condições idênticas. Da fazenda 3 foram selecionados 02 viveiros, povoados a uma densidade de 15 camarões/m², sendo 01 povoado com larvas provenientes da Região Nordeste e 01 povoado com larvas livres de vírus. Da fazenda 5 foram selecionados 11 viveiros, povoados a uma densidade de 10 camarões/m². Destes 11 viveiros, 08 eram povoados com larvas provenientes da Região Nordeste e 03 povoados com larvas livres de vírus. Da fazenda 6 foram selecionados 3 viveiros povoados a uma densidade de 05 camarões/m², sendo 02 viveiros povoados com larvas livres de vírus e 01 com larvas provenientes do Nordeste.

Análise Estatística

Para o comparativo de sobrevivência em fazendas foi utilizado o teste t de student.

Resultados

Prevalência de patógenos no lote de pré-reprodutores

Das 22 fêmeas selecionadas no lote de pré-reprodutores, quatro apresentaram resultado positivo para IHHNV, o que representa o acometimento de 18% das fêmeas. Já no grupo dos machos selecionados, nenhum indício de positividade foi observado. Assim, a taxa de prevalência do IHHNV no lote de 30 pré-reprodutores foi de 13%. Nenhum animal foi diagnosticado positivo para WSSV.

Seleção individual de reprodutores por NESTED-PCR

Para realização deste estudo, as fêmeas foram analisadas após terem realizado pelo menos uma desova. Das 487 fêmeas examinadas, 307 (63%) apresentaram resultado positivo para IHHNV, porém não foi observado resultado positivo para WSSV. Dos 231 machos examinados, 127 (55%) apresentaram resultado positivo para IHHNV. Entretanto, assim como as fêmeas, nenhum dos machos amostrados apresentou resultado positivo para WSSV. Desta forma, houve um aproveitamento de apenas 180 (37%) fêmeas e 104 (45%) machos livres de IHHNV e WSSV (Tabela 2).

Produção de pós-larvas livres

Das 45 amostras preparadas a partir dos 09 tanques de berçários, duas apresentaram resultados positivos para IHHNV apenas na segunda reação da Nested-PCR. Este resultado pode ser considerado um “leve positivo”, sendo que todas as demais amostras apresentaram resultado negativo para os vírus WSSV, IHHNV, IMNV e para *B. penaei* (BP), além da bactéria intracelular NHP.

Acompanhamento em Fazendas de Engorda

Durante a etapa realizada nos viveiros das fazendas em estudo, foram coletados e examinados camarões das fazendas 1, 2, 3 e 4 povoadas com larvas livres de vírus e/ou larvas provenientes do Nordeste. No momento da coleta, o peso médio dos animais era de 6,3 g.

A fazenda 1, organizada em sistema de monocultivo, foi povoada apenas com “larvas livres de vírus” e os animais amostrados foram coletados de quatro viveiros distintos. Dos 45 animais examinados da fazenda 1, observou-se uma taxa de prevalência de 2,2% tanto para o WSSV como para o IHHNV (Tabela 3).

Já a fazenda 2 encontrava-se organizada em sistema de policultivo com tilápia (*Oreochromis niloticus*). Desta fazenda foram amostrados 10 animais mortos em dois viveiros distintos, sendo 05 de “larvas livres de vírus” e 05 de larvas provenientes do Nordeste. Os dez animais analisados apresentaram resultado negativo para os dois vírus estudados.

A fazenda 3, a única deste estudo localizada ao norte do Estado, teve 02 viveiros analisados, sendo que ambos, haviam sido povoados com os dois tipos de larvas. A comparação entre a origem das larvas (figura 2) mostrou taxa de sobrevivência de 68% e produtividade média de 1.500 kg/hectare para as “larvas livres de vírus” e de 53% de produtividade de 1.250 kg/hectare para as larvas provenientes do Nordeste (Tabela 4). Desta fazenda foram coletados de um único viveiro e analisados 25 juvenis provenientes das larvas livres de vírus, apresentando resultados negativos para os dois patógenos estudados (Tabela 3).

Na fazenda 4, 10 camarões de larvas provenientes da Região Nordeste foram coletados de um único viveiro e examinados. Destas análises observou-se apenas um resultado positivo para os vírus WSSV e IHHNV, representando 10% de acometimento dos animais amostrados. A partir do estudo de possíveis hospedeiros ou vetores, observou-se que 50% das aplísias e 67% dos siris estavam infectados com WSSV. Entretanto, não foi detectada a presença dos vírus em estudo nos caranguejo (Tabela 3). Nas fazendas 5 e 6 (figura 4) não foi realizada amostragem de animais, apenas foi realizado o acompanhamento da sobrevivência no momento da despesca

A análise comparativa entre as fazendas mostrou menor sobrevivência de camarões, cujas larvas eram provenientes da Região Nordeste, em comparação com camarões livres de vírus. Na fazenda 5 (figura 3) foi encontrada sobrevivência de 43% para as larvas livres e 11% para as do Nordeste indicando diferença significativa ($P = 0,0001^{***}$) e na fazenda 6, 54,1% de sobrevivência para larvas livres e 5,6% para as do Nordeste (Tabela 4).

Discussão

O cultivo de *L. vannamei* no Sul do Brasil encontra desafios no que diz respeito às condições do ambiente, tais como grandes amplitudes da temperatura da água, tais condições estressam os animais favorecendo a imunossupressão e o aparecimento de patógenos oportunistas que podem causar mortalidade massiva e baixo desempenho produtivo dos camarões (LE MOULLAC e HAFFNER, 2000, CHENG et al., 2005).

O IHHNV não causa mortalidade massiva em *L. vannamei*, favorecendo sua rápida disseminação ao longo das gerações (OIE, 2006). Neste trabalho, observou-se a incidência do vírus em 60% do lote de reprodutores utilizado. Em contrapartida, nenhum reprodutor foi diagnosticado positivo para WSSV, o que indicou que os sobreviventes do viveiro estariam livres deste patógeno, ou com uma carga viral a níveis não detectáveis por Nested-PCR. No caso de um programa de estabelecimento de um plantel resistente e livre de patógenos por eliminação dos indivíduos infectados, a estratégia de analisar os reprodutores por PCR tem mostrado sua eficiência para o IHHNV e WSSV em *L. vannamei* (CHAMORRO e MIALHE, 2004) e WSSV em *P. monodon* (HSU et al., 1999).

Peng et al. (2001), demonstraram em seus estudos que a desova induz a replicação do WSSV em *P. monodon*. Em sua pesquisa, Motte et. al. (2003) utilizaram a técnica do Nested-PCR para avaliar a prevalência do IHHNV nas fêmeas de *L. vannamei*, antes e depois da desova. Analisando 109 fêmeas. Estes autores identificaram prevalência de 19% do IHHNV nos animais amostrados, antes da primeira desova. Em outra etapa de sua pesquisa, Motte et. al. (2003) analisaram 1.608 fêmeas após a primeira desova, observando prevalência de 31% de IHHNV nos animais amostrados. Com base nestes resultados, admite-se que a desova induz a replicação viral, o que, conseqüentemente, leva ao aumento da proporção de indivíduos IHHNV-positivos. Hsu et al., (1999) demonstraram que fêmeas analisadas por Nested-PCR, antes de pelo menos uma desova, podem ser diagnosticadas negativas para WSSV e, logo após sua primeira desova, serem reanalisadas e diagnosticadas positivas para o vírus.

No presente estudo foi observada que a prevalência do IHHNV nas fêmeas era de 18% antes de serem submetidas a uma transferência, ao procedimento de ablação e a sua primeira desova e, após estes manejos dentro do laboratório, este índice subiu para 63%. Estes

resultados corroboram as observações de Motte et al. (2003) e Hsu et al. (1999) quanto às conseqüências do manejo sobre a replicação viral. Com base nestas informações pode-se indicar o momento mais adequado para realizar análises em reprodutores com maior grau de confiabilidade

Prevenindo a transmissão vertical do IHNV é possível aumentar gradualmente a produtividade dos animais em viveiros a cada geração e chegar próximo da erradicação deste patógeno em duas ou três gerações (MOTTE et al., 2003).

Durante o estudo, nenhum reprodutor foi diagnosticado positivo para WSSV o que nos sugere que animais sobreviventes a eventos em fazendas, contando com a pressão de seleção natural apresentariam maior resistência ao vírus (GITLERLE, 1999). No caso específico do Vírus da Mancha Branca seria improvável erradicar este patógeno, uma vez que já foi encontrado no ambiente natural no Estado de Santa Catarina (MARQUES, 2007). Além disso, existem diversos reservatórios dentro dos viveiros escavados como siris, microalgas, ovos de copépodes, zooplâncton e no próprio solo do viveiro (OIE, 2006).

Ao final da larvicultura, das 45 amostras em pós-larvas analisadas apenas duas foram diagnosticadas levemente positivas para o IHNV, sugerindo, assim, a possível eficiência da prevenção vertical por meio da análise individual de reprodutores. O fato de enviar pós-larvas apenas livres de WSSV e IHNV para os viveiros de engorda não garante uma sobrevivência final elevada. Ainda deve-se levar em consideração que os animais que são encaminhados para as fazendas já portadores dos vírus seriam os primeiros a morrer e colaborariam com a transmissão horizontal intra-específica por canibalismo, reforçando assim a necessidade da produção de larvas além de livres, resistentes, nas larviculturas comerciais.

Neste estudo observou-se 50% das aplísias positivas para WSSV. Até o presente momento ainda não há registros na literatura sobre um diagnóstico semelhante.

Como observado nas fazendas 3, 5 e 6, os animais desenvolvidos com a linhagem adaptada ao clima da região tiveram um resultado superior de sobrevivência, com uma diferença significativa (Figura 5), provavelmente por já se encontrarem adaptados às constantes variações de temperatura. Este processo adaptativo provavelmente retarda o desenvolvimento da imunossupressão (COCK et al., 2009), o que diminuiria o acometimento destes animais pelo vírus WSSV, principal causador de mortalidade em viveiros. No caso da fazenda 3, a sobrevivência foi semelhante para os animais das duas

origens, provavelmente porque a região onde se localiza a fazenda não é afetada pelo WSSV, mesmo assim a pós-larva livre apresentou uma sobrevivência superior com diferença significativa.

Independente da origem e qualidade, as pós-larvas estarão sujeitas aos vírus onde estes patógenos forem endêmicos. Dessa maneira, o uso e desenvolvimento de linhagens livres de patógenos, tomando como base a linhagem já cultivada na região, devem ser incentivados. É importante ressaltar que, linhagens importadas SPF, consideradas livres de patógenos específicos, quando introduzidas no Estado, serão automaticamente desafiadas no ambiente de cultivo pela amplitude de temperatura, podendo sucumbir rapidamente ao patógeno já instalado no meio. (FAO, 2005). No que diz respeito às larvas oriundas do Nordeste do País, estas não são de má procedência ou de qualidade inferior, apenas são animais adaptados a outro tipo de clima, o que poderia justificar o seu desempenho mediante ao desafio viral em viveiros escavados no Sul do Brasil.

Além disso, deve-se levar em consideração que a importação de linhagens SPF de outros países ou regiões do Brasil pode trazer patógenos virais ainda desconhecidos (MONTGOMERY-BROCK et al., 2007) e, apesar de serem classificados SPF para um determinado patógeno, podem ser diagnosticados positivos para este mesmo dependendo da metodologia de diagnóstico (DO et al., 2006).

Torna-se clara a necessidade de preservar e melhorar o patrimônio genético local, já adaptado às condições ambientais e submetido à pressão de seleção, mesmo que natural, para o desenvolvimento de linhagens locais. Por outro lado, deve-se manter e melhorar ainda o padrão de sanidade baseando-se em um protocolo eficiente de exclusão de animais portadores de agentes patógenos.

Agradecimentos

Os autores agradecem a colaboração da Associação Catarinense dos Criadores de Camarão (ACCC), da Concepto Azul, da Aquaconsult e do Laboratório Estaleirinho que tornaram possível a execução deste estudo.

Referências

- BRIGGS, M.; FUNGE-SMITH, S.; SUBASINGHE, R.; PHILLIPS, M. Introductions and movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Asia and the Pacific. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Bangkok, 2004, 99 p.
- CHAMORRO, R.; MIALHE, E. Programa de prevención de enfermedades y mejoramiento genético del camarón *Litopenaeus vannamei* en Panamá. *Panorama Acuícola*, Mexico, maio-junho, 2004.
- CHANG, P.S.; LO, C.F., WANG, Y.C.; KOU, G.H. Identification of white spot syndrome associated baculovirus WSBV target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by in situ hybridization. *Dis. Aquat. Organ.* Oldendorf, V. 7, p. 131-139, 1996.
- CHENG, W., WANG, L.-U., CHEN, J.-C. Effect of water temperature on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* to *Vibrio alginolyticus*. *Aquaculture* V.250, 592–601, 2005.
- COCK, J., GITTERLE, T., SALAZAR, M., RYE, M., Breeding for Disease Resistance of Penaeid Shrimps, *Aquaculture* V.286, 1-11, 2009
- DESTOUMIEUX, D., MUNÕS, M., COSSEAU, C., RODRIGUEZ, J., BULET, P., COMPS, M., BACHERE, E. Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. *J. Cell Sci.* V.113, 461–469, 2000.
- DO, J.W.; CHA, S.J.; LEE, N.S.; KIM, Y.C.; KIM, J.W.; KIM, J.D.; PARK, J.W. Taura Syndrome Virus from *Penaeus vannamei* shrimp cultured in Korea. *Dis. Aquat. Organ.* Oldendorf, V. 70, n. 1-2, p. 171-174, 2006
- FAO Introductions and movement of two penaeid shrimp species in Asia and the Pacific. FAO Fisheries Technical Paper, N 476, PP 17, 2005.
- GITTERLE, T. Evaluacion de la resistencia de diferentes poblaciones del camaron marino *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931) al Virus del

Síndrome del Taura (TSV) bajo condiciones controladas. Thesis. Universidad Jorge Tadeo Lozano, Bogotá, Colombia, 74 pp, 1999.

HSU, H.C.; LO, C.F.; LIN, S.C.; LIU, K.F.; PENG, S.E.; CHANG, Y.S.; CHEN, L.L.; LIU, W.J.; KOU, G.H. Studies on effective PCR screening strategies for white spot syndrome virus (WSSV) detection in *Penaeus monodon* brooders. *Dis. Aquat. ORGAN.* Oldendorff, V. 39, n. 1, p. 13-19, 1999.

LE MOULLAC, G., HAFFNER, P. Environmental factors affecting immune responses in crustacea. *Aquaculture* V.191, 121–131. 2000

LIGHTNER, D.V. The penaeid shrimp viruses TSV, IHNV, WSSV, and YHV: current status in the Americas, available diagnostic methods, and management strategies. *J. APPL. AQUAC.*, Binghamtonv. 9, p. 27–52, 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 spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs. *Dis. Aquat. Organ.*, Oldendorf, V. 30, p. 53-72, 1997.

MARQUES, J. Contribuição para o monitoramento do vírus da Síndrome da Mancha Branca na carcinicultura de Santa Catarina 2007. 51 f. DISSERTAÇÃO (MESTRADO EM ENGENHARIA DE AQUICULTURA) – Universidade Federal de Santa Catarina – Florianópolis.

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

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

OIE (Office International des Epizooties) *Diagnostic manual for aquatic animal diseases*. Paris, France, 2006.

SANCHEZ-MARTINEZ, J.G.; AGUIRRE-GUZMAN, G.; HUMBERTO M.R. White Spot Syndrome Virus in cultured shrimp: A review. *Aquac. Res.*, Oxford, V. 38, n. 13, p. 1339-1354, 2007.

SEIFFERT, W.Q. A mancha branca em Santa Catarina. *Panorama da Aqüicultura*, Rio de Janeiro, V. 87, p. 51-53, 2005.

SENAPIN, S.; PHEWSAIYA, K.; BRIGGS, M.; FLEGEL, T.W. Outbreaks of infectious myonecrosis virus (IMNV) in Indonesia confirmed by genome sequencing and use of an alternative RT-PCR detection method. *Aquaculture*, Amsterdam, V. 266, p. 32-38, 2007.

SOTO, M.A.; LOTZ, J.M., Epidemiological Parameters of White Spot Syndrome virus Infections in *Litopenaeus vannamei* and *L. setiferus*. *J. Inv. Pathol.*, San Diego, V. 78, p. 9-15, 2001.

Tabela 1: Acompanhamento em fazendas de engorda do Estado de Santa Catarina.

Fazenda	Localização	Tipo de Acompanhamento
1	Sul de Santa Catarina	Epidemiológico
2	Sul de Santa Catarina	Epidemiológico
3	Norte de Santa Catarina	Epidemiológico/Sobrevivência
4	Sul de Santa Catarina	Epidemiológico
5	Sul de Santa Catarina	Sobrevivência
6	Sul de Santa Catarina	Sobrevivência

Tabela 2: Número de reprodutores de *Litopenaeus vannamei* examinados (AE), infectados (AI) e porcentagem de animais positivos (%) para vírus da mancha branca (WSSV) e da necrose infecciosa hipodermal e hematopoiética (IHHNV) no Estado de Santa Catarina.

Sexo	WSSV (AE/AI) (%)	IHHNV (AE/AI) (%)	Aproveitamento de reprodutores
Fêmeas	487/0	487/307 (63)	180
Machos	231/0	231/127 (55)	104
Total	718/0	718/434 (60%)	284

Tabela 3: Número de animais examinados (AE), número de animais infectados (AI) e taxa de prevalência (%) dos vírus da mancha branca (WSSV) e da necrose infecciosa hipodermal e hematopoiética (IHHNV) nas respectivas fazendas analisadas no Estado de Santa Catarina.

Fazendas	<i>L. vannamei</i>		Caranguejo		Aplúsia		Siri	
	WSSV	IHHNV	WSSV	IHHNV	WSSV	IHHNV	WSSV	IHHNV
	AE/AI	AE/AI	AE/AI	AE/AI	AE/AI	AE/AI	AE/AI	AE/AI
1	45/1 (2,2%)	45/1 (2,2%)	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
2	10/0	10/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
3	25/0	25/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
4	10/1 (10)	10/1 (10%)	3/0	3/0	6/3 (50%)	6/0	3/2 (67%)	3/0
Total	90/2 (2,2%)	90/2 (2,2%)	3/0	3/0	6/3 (50%)	6/0	3/2 (67%)	3/0

Tabela 4: Análise comparativa da taxa de sobrevivência em viveiros entre as pós-larvas que foram submetidas ao procedimento de prevenção da transmissão vertical (pós-larvas livres) e larvas do Nordeste.

Fazenda	Origem	Viveiros	Densidade (camarões/m ²)	Taxa média de sobrevivência (%)
3	Livres	2	15	68,0
3	Nordeste	3	15	53,0
5	Livres	3	10	43,0
5	Nordeste	8	10	11,8
6	Livres	2	5	54,1
6	Nordeste	1	5	5,6

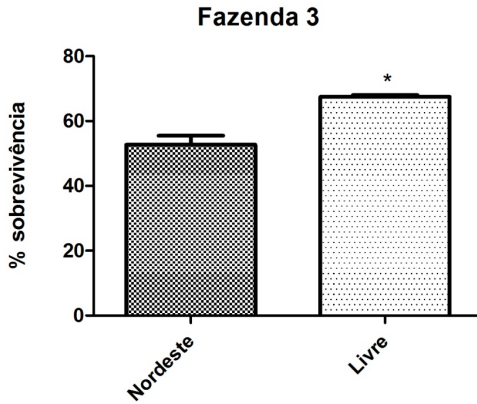


Figura 2: Análise comparativa na fazenda 3 da taxa de sobrevivência em viveiros entre as pós-larvas que foram submetidas ao procedimento de prevenção da transmissão vertical (pós-larvas livres) e pós-larvas do Nordeste. ($P < 0,05$) e $P = 0,0278^*$

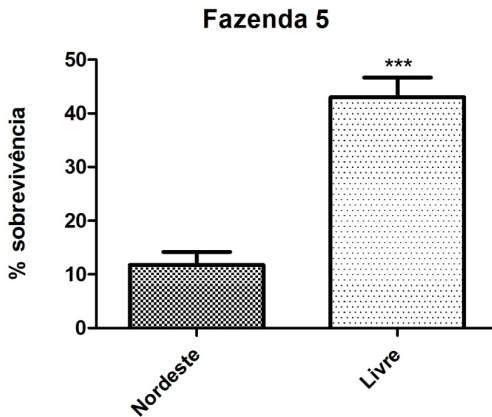


Figura 3: Análise comparativa na fazenda 5 da taxa de sobrevivência em viveiros entre as pós-larvas que foram submetidas ao procedimento de prevenção da transmissão vertical (pós-larvas livres) e pós-larvas do Nordeste. ($P < 0,05$) e $P = 0,0001^{***}$

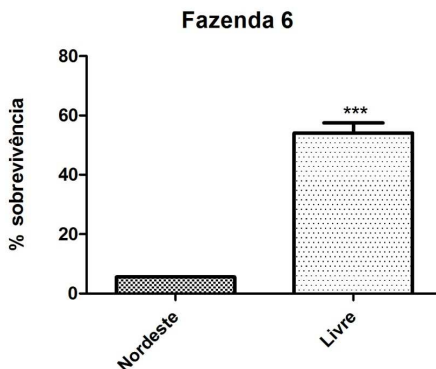


Figura 4: Análise comparativa na fazenda 6 da taxa de sobrevivência em viveiros entre as pós-larvas que foram submetidas ao procedimento de prevenção da transmissão vertical (pós-larvas livres) e pós-larvas do Nordeste. ($P < 0,05$) e $P = 0,0007^{***}$

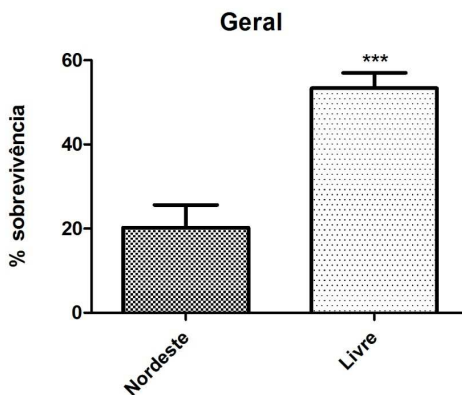


Figura 5: Análise comparativa nas fazendas 3, 5 e 6 da taxa de sobrevivência em viveiros entre as pós-larvas que foram submetidas ao procedimento de prevenção da transmissão vertical (pós-larvas livres) e pós-larvas do Nordeste. ($P < 0,05$) e $P = 0,0002^{***}$

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

BONAMI, 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, 1991, p. 97-622.

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

BRIGGS, M.; FUNGE-SMITH, S.; SUBASINGHE, R.; PHILLIPS, M. Introductions and movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Asia and the Pacific. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2004, 99 p.

CHAMORRO, R.; MIALHE, E. Programa de prevención de enfermedades y mejoramiento genético del camarón *Litopenaeus vannamei* en Panamá. *Panorama Acuícola*, Mexico, maio-junho, 2004.

CHANG, P.S.; CHEN, H.C.; WANG, Y.C. Detection of white spot syndrome associated baculovirus in experimentally infected wildshrimp, crab, and lobsters by in situ hybridization. *Aquaculture*, Amsterdam, V. 164, p. 233-242, 1998.

CHANG, P.S.; LO, C.F.; WANG, Y.C.; KOU, G.H. Identification of white spot syndrome associated baculovirus WSBV target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by in situ hybridization. *Dis. Aquat. Organ.*, Oldendorf, V. 7, p. 131-139, 1996.

CHAYABURAKUL, K.; NASH, G.; PRATANPIPAT, P.; SRIURARAIATANA, S.; WITHYACHUMNARNKUL, B. Multiple pathogens found in growth-retarded black tiger shrimp *Penaeus monodon* cultivated in Thailand. *Dis. Aquat. Organ.*, Oldendorf, V. 60, n. 2, p. 89-96, 2004.

CORSIN, F.; THAKUR, P.C.; PADIYAR, P.A.; MADHUSUDHAN, M.; TURNBULL, J.F.; MOHAN, C.V.; HAO, N.V.; MORGAN, K.L. Relationship between white spot syndrome virus and indicators of quality in *Penaeus monodon* postlarvae in Karnataka, India. *Dis. Aquat. Organ.*, Oldendorf, V. 54, n. 2, p. 97-104, 2003.

DURAND, S.; LIGHTNER, D.V.; REDMAN, R.M.; BONAMI, J.R. Ultrastructure and morphogenesis of White Spot Syndrome Baculovirus WSSV. *Dis. Aquat. Organ.*, Oldendorf, V. 9, p. 5-11, 1997

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, 2001, p. 168-198.

GRAIDANGE, V.A. Diagnóstico y prevención de la enfermedad de punto blanco. *Panorama Acuicola*, V. 4: p. 27-29, 1999.

HSU, H.C.; LO, C.F.; LIN, S.C.; LIU, K.F.; PENG, S.E.; CHANG, Y.S.; CHEN, L.L.; LIU, W.J.; KOU, G.H. Studies on effective PCR screening strategies for white spot syndrome virus (WSSV) detection in *Penaeus monodon* brooders. *Dis. Aquat. Organ.*, Oldendorf, V. 39, n. 1, p. 13-19, 1999.

JORY, D.E.; DIXON, H.M. Shrimp white spot virus in the Western Hemisphere. *Aquac. Mag.*, Asheville, V. 25, p. 83-91, 1999.

KARUNASASAGAS, I.; OTTA, S.K.; SAGAR, I.K. Histopathological and bacteriological study of white spot syndrome of *Penaeus monodon* along the west coast of India. *Aquaculture*, Amsterdam, V. 153, p. 9-13, 1997.

LIGHTNER, D.V. Diseases of cultured penaeid shrimp and prawns. *In: Disease diagnosis and control in North American marine aquaculture*, Sindermann C.J.; Lightner D.V., eds. Elsevier, Amsterdam, the Netherlands, 1988, p. 8-127.

LIGHTNER, D.V. The penaeid shrimp viruses IHHNV and TSV: epizootiology, production impacts and role of international trade in their distribution in the Americas. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, V. 15, p. 579-601, 1996.

LIGHTNER, D.V. The penaeid shrimp viruses TSV, IHHNV, WSSV, and YHV: current status in the Americas, available diagnostic methods, and management strategies. *J. Appl. Aquac.*, Binghamton, V. 9, p. 27-52, 1998.

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

LIGHTNER, D.V.; REDMAN, R.M.; BELL, T.A. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis a newly recognized virus disease of penaeid shrimp. *J. Inv. Pathol.*, San Diego, V. 42, p. 62-70, 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, 1992.

LOTZ, J.M. Special topic review: viruses, biosecurity and specific pathogen-free stocks in shrimp aquaculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, Oxford, V. 13, p. 405– 413, 1997.

MARTINEZ-CORDOVA, L.R. Cultured blue shrimp (*Penaeus stylirostris*) infected with infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in Northwestern Mexico. *Prog. Fish Cult.*, Bethesda, V. 54, p. 265-266, 1992.

MARI, J.; BONAMI, J.R.; LIGHTNER, D.V. Partial cloning of the genome of Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus, an unusual parvovirus pathogenic for penaeid shrimps; diagnosis of the disease using a specific probe. *J. Gen. Virol.* London, V. 74, n. 12, p. 2637-2643, 1993.

MORALES-COVARRUBIAS, M.S.; NUNAN, L.M.; LIGHTNER, D.V.; MOTA-URBINA, J.C.; GARZA-AGUIRRE, M.C.; CHAVEZ-SANCHEZ, M.C. Prevalence of IHHNV in wild broodstock of *Penaeus stylirostris* from the upper Gulf of California, Mexico. *J. Aquat. Anim. Health*, Bethesda, V. 11, n. 296-301, 1999.

MUSHIAKE, K.; SHIMIZU, K.; SATOH, J.; MORI, K.; ARIMOTO, M.; OHSUMI, S.; IMAIZUMI, K. Control of penaeid acute viremia (PAV) in *Penaeus japonicus*: selection of eggs based on the PCR detection of the causative virus (PRDV) from *Receptaculum seminis* of spawned broodstock. *Fish Pathol.*, Akasaka V. 34, n. 4, p. 203-207, 1999.

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

NAKANO H., KOUBE H., UMEZAWA S., MOMOYAMA K., HIRAOKA M., INOUE K. & OSEKO N. 1994. Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993: Epizootiological survey and infection trails. *Fish Pathol.*, Akasaka, V. 29, 135-139, 1994.

NUNAN, L.M.; POULOS, B.T.; LIGHTNER, D.V. The detection of white spot syndrome virus (WSSV) and yellow head virus (YHV) in imported commodity shrimp. *Aquaculture*, Amsterdam, V. 160, p. 13-90, 1998.

NUNAN, L.M.; POULOS, B.T.; LIGHTNER, D.V. Use of polymerase chain reaction (PCR) for the detection of Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHNV) in penaeid shrimp. *Mar. Biotechnol.* New York, V. 2, p. 319-328, 2000.

NUNAN, L.M.; ARCE, S.M.; STAHA, R.J.; LIGHTNER, D.V. Prevalence of Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) and White spot syndrome virus (WSSV) in *Litopenaeus vannamei* in the Pacific Ocean off the coast of Panama. *J. World Aquaculture Soc.*, Baton Rouge, V. 32, p. 330-334, 2001.

OIE (Office International des Epizooties) *Diagnostic manual for aquatic animal diseases*. Paris, France, 2006.

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

PENG, S.E.; LO, C.F.; LIN, S.C.; CHEN, L.L.; CHANG, Y.S.; LIU, K.F.; SU, M.S.; KOU, G.H. Performance of WSSV-infected and

WSSV-negative *Penaeus monodon* postlarvae in culture ponds. *Dis. Aquat. Organ.*, Oldendorf, V. 46, p. 165-172, 2001.

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

SANCHEZ-MARTINEZ, J.G.; AGUIRRE-GUZMAN, G.; HUMBERTO M.-R. White Spot Syndrome Virus in cultured shrimp: A review. *Aquac. Res.*, Oxford, V. 38, n. 13, p. 1339-1354, 2007.

SEIFFERT, W.Q. A mancha branca em Santa Catarina. Panorama da Aqüicultura, Rio de Janeiro, V.87, p. 51-53, 2005.

SENAPIN, S.; PHEWSAIYA, K.; BRIGGS, M.; FLEGEL, T.W. Outbreaks of infectious myonecrosis virus (IMNV) in Indonesia confirmed by genome sequencing and use of an alternative RT-PCR detection method. *Aquaculture*, amsterdam, V. 266, p. 32-38, 2007.

SHIKE, H.; DHAR, A.K.; BURNS, J.C.; SHIMIZU, CH.; JOUSSET, F.X.; KLIMPEL, K.R.; BERGOIN, M. Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus of shrimp is related to mosquito Brevdensovirus. *Virology*, New York, V. 277, n. 1, p. 167-177, 2000.

SUDNA, P.M.; MOHAN, C.V.; SHANKAR, K.M.; HAGDE, A. Relation between white spot syndrome virus infection and clinical manifestation in Indian cultured penaeid shrimp. *Aquaculture*, Amsterdam, V. 167, p. 95-101, 1997.

VAN HULTEN, M.C.W.; WITTEVELDT, J.; PETERS, S.; KLOOSTERBOER, N.; TARCHINI, R.; FIERS, M.; SANDBRINK, H.; LANKHORST, R.K.; VLARK, J.M. The white spot syndrome virus DNA genome sequence. *Virology*, New York, V. 286, p. 7-22, 2001.

WANG, C.H.; LO, C.F.; LEU, J.H.; CHOU, C.M.; YEH, P.Y.; CHOU, H.Y.; TUNG, M.C.; CHANG, C.F.; SU, M.S.; KOU, G.H. Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBS) of *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Organ.*, Oldendorf, V. 23, p. 239-242, 1995.

WITHYACHUMNARNKUL, B. Results from black tiger shrimp *Penaeus monodon* culture ponds stocked with postlarvae PCR-positive or -negative for white-spot syndrome virus (WSSV). *Dis. Aquat. Organ.*, Oldendorf, V. 39, n. 1, p. 21-27, 1999.

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*. *Dis. Aquat. Organ.*, Oldendorf, V. 21, p. 69-77, 1995.

YANG, F.; HE, J.; LIN, X.; LI, Q.; PAN, D.; ZHANG, X.; XU, X. Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus. *J. Virol.*, Washington, V. 75, p. 11811– 11820, 2001.

ANEXO

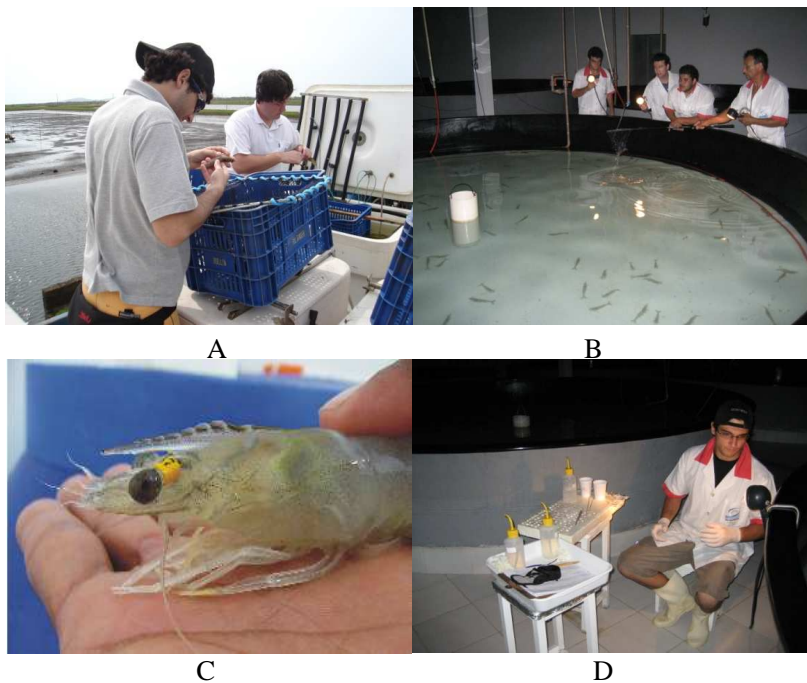


Figura 2: Seleção fenotípica individual de reprodutores (A), aclimação (B), marcação com anel numerado (C) e coleta de pleópodos dos reprodutores para seleção de um plantel livre de patógenos virais (D).