



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Fernanda Silva de Oliveira

**DIAGNÓSTICO DE ENFERMIDADES VIRAIS EM CAMARÕES DE CULTIVO
LITOPENAEUS VANNAMEI (CRUSTACEA: DECAPODA) UTILIZANDO
AMOSTRAS ARMAZENADAS EM CARTÕES FTA™**

Florianópolis, 2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**DIAGNÓSTICO DE ENFERMIDADES VIRAIS EM CAMARÕES DE CULTIVO
LITOPENAEUS VANNAMEI (CRUSTACEA: DECAPODA) UTILIZANDO
AMOSTRAS ARMAZENADAS EM CARTÕES FTA™**

Trabalho apresentado ao Curso
de Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Santa Catarina, como requisito
parcial para obtenção do grau de Bacharel
em Ciências Biológicas.

ACADÊMICA: Fernanda Silva de Oliveira
ORIENTADORA: Prof. Dr^a Maria Risoleta Freire Marques
CO-ORIENTADORA: MSc. Isabel Cristina Müller

Florianópolis, julho de 2008

AGRADECIMENTOS

* Primeiramente, agradeço aos meus pais, por fornecerem as bases da minha educação e por estarem sempre presentes em minha vida. Em especial, à minha mãe, sempre preocupada comigo e preparando vários “lanchinhos” e xícaras de café enquanto eu escrevia o trabalho.

* À minha irmã, futura bióloga também, uma das pessoas que me influenciou a cursar Biologia e alguém com quem eu posso conversar sobre “assuntos biológicos” em casa.

* Aos meus irmãos, que sempre me ajudaram quando eu precisei, pelas várias caronas dadas a universidade, que me poupavam de pegar dois ônibus e levar uma hora até chegar à UFSC.

* À professora Dra. Maria Risoleta Freire Marques, pela oportunidade oferecida em estagiar no laboratório e pelos conhecimentos transmitidos.

* À professora Dra. Maria Cecília Menks Ribeiro, por ter aceitado o convite em participar da banca.

* À Isabel Cristina Müller, minha co-orientadora. A pessoa que me ajudou desde o primeiro dia no laboratório, ensinando muitas coisas, sempre disposta a ajudar quando eu tinha alguma dúvida, que contribuiu bastante para o desenvolvimento deste trabalho (tanto orientando na parte prática quanto na escrita) e por poder contar com sua ajuda em todos os momentos.

* À Juliana Moser, por me ajudar quando surgia alguma dúvida em experimentos no laboratório e por ter aceitado o convite em participar da banca.

* Aos demais colegas do laboratório: Ana (sempre a primeira a chegar ao lab e que me fazia companhia quando eu também precisava chegar cedo), Gui, Janice, Jacó, Lila, Karim (pelos conhecimentos passados, principalmente quando eu comecei a estagiar no lab), Pedro (pela ajuda nas coletas), Talita (pelas dúvidas esclarecidas e conversas) e ao prof. Afonso.

- * Aos colegas que passaram pelo lab, Gabriel (com seu bom-humor contagiante) e Juliano, que ficava até altas horas trabalhando e assim, quando eu tinha que fazer experimentos até tarde, não precisava ficar sozinha no lab.
- * À Cris, Gábi e Maíra, amigas desde a primeira fase do curso. Obrigada pela amizade, por me aturarem nesses 4 anos, pelos vários trabalhos que fizemos juntas ao longo da faculdade e que apesar de algum “stress” sempre terminavam bem e por tornarem esses anos de curso mais divertidos.
- * As demais amigadas feitas ao longo do curso, da Fran, Gabi, Cintia e Lari.
- * A todos os demais professores do curso de Biologia, que contribuíram para a minha formação acadêmica.
- * Ao professor Paulo Macedo, do basquete, devido ao seu empenho em fazer com que aprendêssemos tudo que era ensinado, a sua dedicação nas aulas, sua atenção com cada aluno, aos vários momentos de descontração. É um exemplo a ser seguido por profissionais de todas as áreas da educação.
- * À Dani, do LCM, pela ajuda nas coletas realizadas em Araquari.
- * A toda a minha família, que contribui de alguma forma para a realização desse trabalho.
- * Em especial ao Anderson, por escutar minhas reclamações quando algo não dava certo no trabalho, por estar sempre perto, me ajudar com dúvidas no computador, pelo carinho, por tentar me acalmar quando eu me estressava com alguma coisa e por ter se tornado uma das pessoas mais importantes na minha vida.
- * Enfim, obrigada a todos aqueles que foram meus alicerces para que mais uma etapa da minha formação pudesse ser concretizada.

SUMÁRIO

	páginas
Lista de Figuras	vii
Lista de Tabelas	ix
Resumo	xii
Abstract	xiii
1. Introdução	1
2. Objetivos	9
3. Material e Métodos	10
Coleta de animais	10
Obtenção dos tecidos	11
Extração de DNA	11
Extração de DNA a partir de hemolinfa e pleópodes congelados	11
Extração de DNA das amostras de hemolinfa armazenadas no cartão	12
Quantificação e determinação da integridade do DNA	13
Eletroforese em gel de agarose	13
Quantificação das amostras	13
Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	14
Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) - Controle positivo das reações de PCR	14
Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV)	15
Vírus da necrose hematopoiética e hipodermal infecciosa (IHHNV)	16
Comparação dos resultados de PCR entre as amostras de tecido congelado e as amostras imobilizadas em cartão FTA	16
Testes de estocagem das amostras armazenadas sobre o cartão FTA	17
Teste das amostras de hemolinfa aplicadas em <i>pool</i> sobre o cartão FTA	17

4. Resultados	18
PCR- Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GADPH)	20
PCR- Vírus da necrose hematopoiética e hipodermal infecciosa (IHHNV)	24
PCR- Vírus da síndrome da mancha branca (WSSV)	28
Teste com <i>pool</i> de amostras de hemolinfa aplicadas em cada cartão FTA	30
Comparação dos locais de coleta em relação à presença de IHHNV e WSSV	31
5. Discussão	33
6. Conclusões e Considerações Finais	41
7. Referências Bibliográficas	43
8. Apêndices	51

LISTA DE FIGURAS

	páginas
Figura 1: Aspecto externo do camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> (foto: Talita M. de Souza, 2008).	10
Figura 2: Eletroforese em gel de agarose 1% (gel representativo) para avaliação da integridade do DNA genômico obtido das amostras de pleópodes. Os números de 1 a 10 correspondem aos 10 espécimes de <i>Litopenaeus vannamei</i> provenientes da Fazenda 1.	19
Figura 3: Eletroforese em gel de agarose 1% (gel representativo) para avaliação da integridade do DNA genômico obtido das amostras de hemolinfa. Os números de 1 a 10 correspondem aos 10 espécimes de <i>L. vannamei</i> provenientes do Lab 1.	19
Figura 4: Visualização das bandas de 298 pb correspondentes à amplificação do gene da GAPDH. M- marcador de peso molecular; H- Controle negativo; 1 a 10- amostras de hemolinfa mantidas congeladas provenientes da Fazenda 1.	21
Figura 5: Visualização das bandas de 512 pb, através de gel de agarose, correspondentes às amostras positivas para o IHHNV. M- marcador de peso molecular; H- Controle negativo; 1-10- amostras de hemolinfa armazenadas no cartão FTA provenientes do Lab 1; C- controle positivo da reação de PCR.	25

Figura 6: Visualização das bandas de 941 pb, através de gel de agarose, correspondentes às amostras positivas para o WSSV. M- marcador de peso molecular; H- Controle negativo; 1-10- amostras de hemolinfa armazenadas no cartão FTA provenientes da Fazenda 2; C1 e C2 - controles positivos da PCR.

29

Figura 7: Visualização das bandas de 512 pb, através de gel de agarose, correspondentes às amostras positivas para o IHHNV. M- marcador de peso molecular; H-Controle negativo; 1-16- amostras de hemolinfa armazenadas em *pool* de 5 animais sobre cada cartão FTA, provenientes do Lab 2; C- controle positivo da reação de PCR.

31

LISTA DE TABELAS

páginas

- Tabela 1: Resultados obtidos a partir da comparação de dois métodos de extração de DNA, utilizado na detecção do gene que codifica a GAPDH, com uso de amostras de hemolinfa e pleópodes de camarões da espécie *L. vannamei* provenientes do Lab 1 e da Fazenda 1 e 2. 20
- Tabela 2: Resultados referentes à detecção do gene que codifica a GAPDH a partir de amostras de hemolinfa e pleópodes de *L. vannamei* provenientes da Fazenda 1 e 2. 20
- Tabela 3: Teste de estocagem do cartão FTA através de técnica de PCR para a detecção do gene da GAPDH utilizando-se amostras de hemolinfa de *L. vannamei* coletadas no Lab 1 e na Fazenda 1. As amostras foram avaliadas durante um período de 5 meses. 22
- Tabela 4: Análise da repetibilidade dos resultados com as amostras armazenadas no cartão FTA, usando a amplificação do gene que codifica a GAPDH, através de técnica de PCR: amostras de hemolinfa de *L. vannamei* immobilizadas sobre o cartão FTA, provenientes do Lab 1 e da Fazenda 1. As amostras foram avaliadas durante um período de 5 meses. CV: coeficiente de variação expresso em porcentagem. 22
- Tabela 5: Resultados obtidos a partir da comparação de dois métodos de extração de DNA utilizado na detecção de amostras positivas para o

IHHNV com uso de amostras de hemolinfa e pleópodes de camarões da espécie *L. vannamei* provenientes do Lab 1 e da Fazenda 2. 24

Tabela 6: Resultados referentes à detecção do IHHNV a partir de amostras de hemolinfa e pleópodes de *L. vannamei* provenientes da Fazenda 2. 24

Tabela 7: Teste de estocagem do cartão FTA, através de técnica de PCR, para a detecção do IHHNV utilizando-se amostras de hemolinfa de *L. vannamei* coletadas no Lab 1. As amostras foram avaliadas durante um período de 5 meses. 26

Tabela 8: Análise da repetibilidade dos resultados com as amostras armazenadas no cartão FTA, na detecção do IHHNV, através de técnica de PCR: amostras de hemolinfa de *L. vannamei* imobilizadas sobre o cartão provenientes do Lab 1. As amostras foram avaliadas durante um período de 5 meses. CV: coeficiente de variação expresso em porcentagem. 26

Tabela 9: Resultados obtidos a partir da comparação de dois métodos de extração de DNA utilizado no diagnóstico do WSSV, com uso de amostras de hemolinfa e pleópodes de camarões da espécie *L. vannamei* provenientes da Fazenda 2. 28

Tabela 10: Comparação entre os locais de coleta avaliados em relação ao diagnóstico do IHHNV e WSSV. 31

RESUMO

A carnicultura representa um importante papel na economia mundial, devido à quantidade de empregos gerada e ao volume de animais comercializados. Entretanto, este setor produtivo tem sofrido grandes perdas econômicas, ocasionadas principalmente pelas doenças infecciosas que atacam os camarões de cultivo. Assim, é fundamental que sejam aplicadas técnicas rápidas e eficientes na detecção de patógenos para que se possa controlar ou minimizar os efeitos negativos advindos de enfermidades. No presente trabalho, foram coletados espécimes do camarão de cultivo *Litopenaeus vannamei* provenientes de um laboratório de cultivo de pós-larvas, localizado em Florianópolis, e de uma fazenda situada em Araquari, nordeste catarinense. Amostras de hemolinfa imobilizadas em cartões FTA foram comparadas com amostras de tecidos congelados, pleópodes e hemolinfa, que tiveram a extração de DNA realizada segundo um protocolo habitual de extração. A partir destas amostras, foi realizada a reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção do gene da gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH) e de dois patógenos virais, o vírus da necrose hematopoiética e hipodermal infecciosa (IHHNV) e o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV). Foi realizado ainda um teste de estocagem das amostras de hemolinfa armazenadas no cartão FTA, para avaliar a estabilidade das amostras e a repetibilidade deste método. Foram encontrados camarões infectados tanto pelo IHHNV quanto pelo WSSV. Com base no diagnóstico destas enfermidades virais, a tecnologia FTA mostrou-se prática e rápida, sendo mais eficiente do que a extração de DNA das amostras de pleópodes e hemolinfa congeladas, obtida de acordo com o protocolo habitual de extração. Entretanto, a precisão do método do cartão necessita ser melhor avaliada, pois os resultados obtidos apresentaram uma baixa repetibilidade. Com a realização de novos experimentos a partir de amostras imobilizadas em cartões FTA, é esperado que a precisão do método seja aumentada e que esta metodologia possa ser utilizada como uma ferramenta rápida e confiável no diagnóstico de enfermidades virais em camarões.

1. INTRODUÇÃO

A aqüicultura é o setor produtor de alimentos que mais cresce no mundo e cerca de 90% desta produção é proveniente de países em desenvolvimento. Mais de 230 diferentes espécies aqüícolas são cultivadas, o que reflete a diversidade deste setor produtivo (SUBASINGHE, 2005). A aqüicultura de camarões peneídeos vem crescendo consideravelmente há mais de três décadas, em diversos países litorâneos do Ocidente e Oriente, com o desenvolvimento de novas tecnologias para a produção de camarões de alta qualidade (LEU *et al.*, 2007; LIGHTNER e REDMAN, 1998; SEIFFERT *et al.*, 2005).

A rápida expansão mundial do cultivo de camarões foi acompanhada pela ocorrência de doenças que prejudicaram o ritmo do desenvolvimento desta atividade (HOSSAIN *et al.*, 2001; LIGHTNER e REDMAN, 1998). O problema se intensificou devido ao crescimento dos cultivos, baseado em progressos zootécnicos, mas com pouco conhecimento da fisiologia dos peneídeos e geralmente sem considerar aspectos ecológicos (BACHÈRE, 2000). As espécies aquáticas estão em contato direto com o ambiente e mudanças neste meio, como variação de temperatura, salinidade e oxigênio dissolvido na água, podem levar a um desequilíbrio da interação entre os camarões e o ambiente aquático, tornando-os mais suscetíveis às doenças (SNIESZKO, 1973).

No Brasil, foram produzidas 90.180 t de camarão cultivado em 2003, o que representou um aumento de 50% em relação ao ano anterior. Mas, em 2004 a produção caiu para 76.000 t e de 2005 até 2007 manteve-se em torno de 65.000 t por ano (ROCHA, 2007). Esta redução na produção de camarões entre 2004-2007 ocorreu principalmente devido à incidência de enfermidades que afetaram os cultivos.

As doenças virais são o principal problema enfrentado pelas fazendas de cultivo de camarões ao redor do mundo e certos vírus provocam catastróficas perdas para a carcinicultura (LIGHTNER *et al.*, 1996). Entre estes, cinco destacam-se por seu alto poder de infecção: vírus da necrose hematopoiética e hipodermal infecciosa (IHHNV); vírus *Baculovirus penaei* (BP); vírus da síndrome de Taura (TSV); vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) e vírus da cabeça amarela (YHV) (JSA, 1997).

O primeiro caso diagnosticado de camarões infectados pelo IHHNV ocorreu em 1981, no Havaí, em um cultivo de *Litopenaeus stylirostris*, causando a morte de mais de 90% dos indivíduos (BROCK *et al.*, 1983). O agente etiológico causador da necrose hematopoiética e hipodermal infecciosa (IHHN) é um vírus de DNA fita simples, não-envelopado, apresenta entre 20-22nm de diâmetro e é considerado o menor de todos os vírus de peneídeos (OIE, 2006). Segundo FAUQUET *et al.* (2005), este vírus pertence ao gênero *Brevdensovirus* e à família Parvoviridae. As espécies de camarões respondem de modo diferente a esta infecção viral. Nas Américas, as duas espécies de camarões mais comercializadas são *Litopenaeus stylirostris* e *L. vannamei*. Os espécimes de *L. stylirostris* são altamente suscetíveis ao IHHNV. Porém, o IHHNV não provoca uma infecção letal em *L. vannamei*, apesar de poder causar redução no crescimento dos camarões infectados e uma variedade de deformações cuticulares no rosto, antenas e nas regiões torácicas e abdominais (DHAR *et al.*, 2001).

No Brasil, o primeiro registro de camarões infectados pelo IHHNV ocorreu em 1991, na Bahia, em camarões *Penaeus monodon* e *L. vannamei*. Estes indivíduos apresentaram uma redução expressiva na taxa de crescimento e deformações externas (BUENO, 1991).

Os sintomas dos camarões com IHHNV variam dependendo do grau de severidade da doença. Os peneídeos infectados podem apresentar, entre outros sinais clínicos, mudança de coloração; antenas e cutícula enrugadas e movimentos anormais, como por exemplo, nadar em direção à superfície da água do viveiro e em seguida afundar com a região ventral para

cima (BROCK *et al.*, 1983). Os camarões infectados pelo IHHNV podem ainda desenvolver a “síndrome da deformidade e do nanismo”, que provoca um crescimento reduzido e irregular dos animais resultando em baixos rendimentos de cultivo nas fazendas infectadas (CASTILLE *et al.*, 1993).

Já o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) é, até o momento, a enfermidade mais devastadora para os camarões de cultivo. O WSSV foi detectado pela primeira vez na província chinesa de Fujian, em 1992, de onde se espalhou rapidamente (CAI *et al.*, 1995; FLEGEL, 1997) para a maioria dos países produtores de camarões (INOUYE *et al.*, 1994; LO *et al.*, 1999; ROSEMBERRY, 2002). Este vírus pode infectar uma grande gama de crustáceos, como por exemplo, todas as espécies de camarões de cultivo, além de copépodos e caranguejos (NATIVIDAD *et al.*, 2008).

A síndrome é causada por um vírus envelopado, elipsóide e com DNA dupla-fita, que está classificado dentro do gênero *Whispovirus* e família Nimaviridae (MAYO, 2002). Até hoje, o WSSV é o maior vírus animal cujo genoma foi completamente seqüenciado (MARKS *et al.*, 2004). Os principais sinais clínicos desta síndrome são: presença de manchas brancas de 0,5 a 2,0 mm de diâmetro na cutícula dos animais (as quais são mais aparentes na parte interna da carapaça), rápida redução no consumo de alimento pelos camarões infectados, letargia e coloração avermelhada nos apêndices ou no corpo (DURAND *et al.*, 1997; LIGHTNER, 1996). As manchas brancas são formadas por depósitos anormais de sais de cálcio na epiderme cuticular dos animais infectados. Nas populações de camarões que apresentam estes sinais clínicos, as taxas de mortalidade são elevadas, podendo chegar a 100% dentro de 3 a 10 dias do aparecimento dos primeiros sintomas (LIGHTNER, 1996).

Em 1999, as fronteiras brasileiras foram fechadas para a entrada de crustáceos, com a finalidade de impedir a entrada do WSSV no país. Apesar disso, em novembro de 2004, sinais clínicos da doença começaram a ser detectados em fazendas de camarões de Santa Catarina. O

WSSV foi diagnosticado em janeiro de 2005, num total de 15 fazendas, compreendendo os municípios catarinenses de Imaruí e Laguna (MARQUES e MOSER, 2005; SEIFFERT *et al.*, 2005). A dispersão desta doença no estado de Santa Catarina tem acarretado grandes prejuízos, sendo necessário o desenvolvimento de medidas de diagnóstico e controle precoce desta enfermidade.

Diversos métodos de diagnóstico são adotados para a detecção de doenças virais em camarões, adaptados de métodos laboratoriais tradicionais empregados no diagnóstico de patologias humanas e veterinárias (MARQUES *et al.*, 2006). Os diagnósticos moleculares são importantes para que problemas no sistema de produção sejam detectados precocemente, como presença de patógenos e deficiências genéticas nas populações de peneídeos. Assim, é possível que sejam tomadas decisões rápidas para tentar controlar ou minimizar os efeitos negativos de condições desfavoráveis sobre a carcinicultura, reduzindo prejuízos financeiros resultantes da perda ou de falhas no desempenho do estoque cultivado (MARTINS, 2006).

Nas últimas décadas, foram desenvolvidas várias técnicas de diagnóstico rápido baseadas em métodos moleculares, entre as quais se destaca a reação em cadeia da polimerase (PCR). A técnica de PCR permite amplificar de forma seletiva fragmentos desejados de DNA situados entre duas regiões cujas seqüências são conhecidas. Estas regiões são utilizadas como iniciadores da reação de polimerização do DNA, a qual é catalisada pela enzima DNA polimerase (SAMBROOK e RUSSELL, 2001). A PCR consiste de vários ciclos de amplificação sucessivos, cada um dos ciclos inclui três fases: desnaturação do DNA, anelamento dos iniciadores na fita de DNA e a etapa de alongação (GIBELLO *et al.*, 2001). A base para a alta sensibilidade da PCR consiste no fato de serem produzidas milhões de cópias de uma determinada seqüência-alvo. Porém, podem surgir algumas dificuldades no diagnóstico com o uso desta técnica, por exemplo, em caso de contaminação. A contaminação representa um risco real na execução do ensaio, levando à possibilidade de resultado falso-

positivo, o que pode comprometer o diagnóstico. Por isso, certos cuidados devem ser tomados visando diminuir o risco de contaminação nos laboratórios, como manusear as amostras e preparar a mistura da reação de PCR em fluxo laminar, sendo que o fluxo deve ser descontaminado regularmente com o uso de luz ultravioleta. (AUSUBEL *et al.*, 1995; OIE 2006).

Além da PCR convencional, que utiliza somente um par de iniciadores, as amostras podem passar por mais outro passo de amplificação, com o uso de iniciadores internos ao produto de PCR (PCR *nested*). O uso da PCR convencional somado ao uso da PCR *nested* representa um método eficiente no diagnóstico de patógenos em crustáceos (MARQUES *et al.*, 2006).

A técnica de PCR pode apresentar problemas na realização de diagnóstico se na reação estiverem presentes inibidores da PCR. Os inibidores mais comuns incluem a proteinase K, que pode degradar a enzima DNA polimerase, e agentes quelantes, como o EDTA, que pode seqüestrar íons magnésio impedindo dessa forma a ativação da DNA polimerase, que necessita de íons divalentes livres para a sua ativação (SAMBROOK e RUSSELL, 2001). Segundo Wilson (1997), os inibidores da amplificação de ácidos nucléicos geralmente atuam em três pontos principais: interferem na lise celular, que é necessária para a extração do DNA, promovem a degradação dos ácidos nucléicos e inibem a atividade da DNA polimerase.

Com relação à etapa de extração de ácidos nucléicos de tecidos e/ou células animais, como por exemplo, brânquias e hemócitos de camarões, vários protocolos são utilizados. Estes consistem na utilização de detergentes que lisam a membrana celular e nuclear da célula para que os ácidos nucléicos possam ser liberados; do uso de certos tipos de alcoóis, que precipitam a molécula de ácido nucléico por promover a sua desidratação e o uso de sais, que se agregam aos ácidos nucléicos facilitando a sua recuperação após a precipitação alcoólica (SAMBROOK e RUSSELL, 2001). O processo de extração de DNA, em geral, é longo e

envolve várias etapas. Para diminuir o tempo de processamento das amostras, outros métodos mais rápidos e também eficazes podem ser utilizados.

Entre eles está a utilização de cartões para o armazenamento de amostras, como por exemplo, os cartões FTATM (*Flinders Technology Associates, Whatman*). Os cartões FTA possuem uma tecnologia desenvolvida para a coleta e armazenamento de ácidos nucleicos, tanto na forma purificada quanto amostras aplicadas diretamente sobre o cartão. Adsorvidas ao papel, encontram-se substâncias químicas responsáveis por lisar as membranas celulares e organelas. Com isso, os ácidos nucleicos são liberados e imobilizados nas fibras da matriz do cartão. Os cartões também contêm desnaturantes de proteínas e outros químicos responsáveis por proteger as amostras do ataque de nucleases, da oxidação e dos raios ultravioleta. Após um curto período de secagem das amostras sobre o cartão, as amostras podem ser estocadas à temperatura ambiente por longos períodos até ser realizada a extração.

A amostra é removida do cartão com o auxílio de um perfurador e em seguida o círculo do cartão que foi retirado sofrerá várias etapas de lavagem com reagentes simples, para que a extração do DNA ocorra (Whatman). Segundo Beckett *et al.* (2008), as amostras armazenadas no cartão FTA apresentam DNA de alta qualidade. Além disso, o uso da tecnologia FTA permite a realização de diagnósticos rápidos, precisos e com aplicações em diferentes áreas da ciência (SMITH e BURGOYNE, 2004).

Vários estudos já foram realizados com a utilização do método do cartão FTA para extração de DNA ou RNA. Entre os quais, podemos citar trabalhos com sangue total de suínos, para a detecção do vírus de RNA causador da síndrome respiratória e reprodutiva suína (PRRSV); de sangue de humanos, para detecção de DNA do parasito *Plasmodium falciparum*, uma das espécies causadoras da malária; amostras de DNA bucal, de crianças acometidas por leucemia linfoblástica; amostras de leveduras e bolores, para detecção de patógenos fúngais em pacientes imunodeprimidos e amostras de tecidos de plantas, para

avaliar a presença de patógenos virais. A tecnologia do cartão FTA mostrou-se prática e eficiente em todos estes experimentos (BORMAN *et al.*, 2008; CHAORATTANAKAWEE *et al.*, 2003; INOUE *et al.*, 2006; MILNE *et al.*, 2006; NDUNGURU *et al.*, 2005).

Porém, em nem todos os experimentos o método do cartão FTA é efetivo. Em um estudo de campo realizado no Suriname, os pesquisadores constataram que os cartões FTA não protegeram o DNA da degradação. É sugerido que isso possa ter ocorrido devido à alta umidade da região e também ao tipo de tecido aplicado sobre os cartões, o qual era figado de mamíferos pequenos (BORISENKO *et al.*, 2007). Em um trabalho envolvendo estudos farmacogenéticos, os autores citam que a principal desvantagem da coleta de amostras sanguíneas em cartões FTA é a quantidade de DNA imobilizada no cartão, que pode não ser suficiente para análises moleculares (MAS *et al.*, 2007).

No caso de camarões peneídeos, apenas um estudo foi publicado envolvendo a utilização de cartões para o diagnóstico de enfermidades (KIATPATHOMCHAI *et al.*, 2004). Neste estudo, o vírus da cabeça amarela (YHV), que é um vírus de RNA, foi identificado através de RT-PCR em amostras de hemolinfa de *Penaeus monodon* armazenadas em cartões. Os autores observaram também que produtos de PCR pequenos (cerca de 200 pb) foram amplificados após períodos longos de armazenamento (9 meses), enquanto produtos maiores (500-1000 pb) não foram detectados em amostras estocadas por mais de 6 meses.

Resultados semelhantes ao relatado por Kiatpathomchai *et al.* (2004) foram encontrados na detecção do vírus da raiva, em que o produto de PCR de menor tamanho foi amplificado mesmo após a amostra ter sido estocada por mais de 222 dias (WACHARAPLUESADEE *et al.*, 2003).

A utilização do método do cartão FTA para o diagnóstico do WSSV e IHHNV em camarões de cultivo *L. vannamei*, permitirá que seja feita uma comparação dos resultados obtidos com esta tecnologia em relação a um protocolo de extração de DNA de uso habitual.

O uso de cartões FTA requer uma pequena quantidade de hemolinfa dos camarões e não há necessidade de sacrificá-los. Isto é importante principalmente no caso de coletas em plantéis de camarões reprodutores, que são geneticamente selecionados, e que não precisariam ser mortos para que se fizesse o diagnóstico viral. Além disso, o tempo de processamento das amostras é menor, permitindo que o diagnóstico seja realizado mais rapidamente.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar a imobilização de amostras de hemolinfa de camarões *L. vannamei* em cartões FTA para a detecção de enfermidades virais, utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase – PCR.

2.1- Objetivos específicos:

- Realizar PCR para detecção de seqüências gênicas dos vírus WSSV e IHNV em amostras armazenadas em cartões FTA;
- Realizar PCR para detecção da seqüência gênica codificadora da GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) em cartões FTA;
- Comparar os resultados da PCR para a detecção dos vírus WSSV e IHNV utilizando-se amostras (hemolinfa) armazenadas em cartão FTA e amostras de tecido (pleópodes e hemolinfa) congelado;
- Realizar testes de estocagem das amostras aplicadas sobre o cartão FTA, para verificar a eficiência do diagnóstico pela PCR, após períodos longos de armazenamento das amostras.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Coleta de animais

Os camarões da espécie *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) foram coletados em um laboratório de produção de pós-larvas, localizado na cidade de Florianópolis (Figura 1). Foram realizadas duas coletas neste laboratório. A primeira ocorreu em novembro de 2007 (Lab 1) e utilizou-se um número amostral igual a 10 camarões adultos, reprodutores, de ambos os sexos. A segunda coleta foi realizada em abril de 2008 (Lab 2) e foram coletados 80 camarões procedentes de um cultivo em floco. Este tipo de cultivo é efetuado com a presença de bactérias no tanque. Os microorganismos convertem o nitrogênio inorgânico presente na água e o disponibilizam na forma de proteína microbiana, que é ingerida pelos animais de cultivo (HOROWITZ E HOROWITZ, 2001).

Além das coletas no laboratório, também foram utilizados camarões *L. vannamei* provenientes de uma fazenda de cultivo, localizada na região nordeste catarinense, na cidade de Araquari. Houve duas coletas nesta fazenda, a primeira ocorreu em dezembro de 2007 (Fazenda 1) e a segunda em fevereiro de 2008 (Fazenda 2). Foram coletados 10 camarões adultos, de ambos os sexos, por coleta.



Figura 1: Aspecto externo do camarão *Litopenaeus vannamei* (foto: Talita M. de Souza, 2008)

3.2 – Obtenção dos tecidos

Os camarões foram anestesiados em gelo e em seguida foi coletada a hemolinfa. A coleta foi realizada por punção ventral direta entre o último esternito cefalotorácico e o primeiro abdominal, utilizando-se para isso uma seringa com agulha hipodérmica de 30x8 mm, contendo o anticoagulante citrato de sódio 10% (1:1), conforme descrito por Lightner (1996).

Cada amostra de hemolinfa, correspondente a somente um indivíduo, proveniente da coleta Lab 1, foi armazenada de duas formas. Cerca de 200 µl de hemolinfa foram aplicados diretamente sobre o cartão FTA (Whatman). Estas amostras foram mantidas por cerca de uma hora à temperatura ambiente para a secagem do cartão, sendo em seguida estocadas à temperatura ambiente. A outra parte da amostra de hemolinfa (o dobro do volume) foi colocada em tubos *ependorf* e mantida em gelo até a chegada ao laboratório, onde foi armazenada a -80° C.

Na coleta Lab 2, foi aplicado um *pool* de hemolinfa de 5 animais sobre cada cartão FTA e seguiu-se o mesmo procedimento de secagem e armazenamento do cartão, descrito anteriormente.

Além da hemolinfa, aplicada individualmente sobre o cartão, também foram retirados três pares de pleópodes por camarão nas coletas realizadas na fazenda. Os mesmos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados, posteriormente, a -80° C.

3.3 – Extração de DNA

3.3.1 - Extração de DNA a partir de hemolinfa e pleópodes congelados

Para a extração de DNA genômico utilizou-se o protocolo de Maciel (2002) modificado. As amostras de pleópodes e de hemolinfa que foram armazenadas a -80° C foram digeridas em solução de lise contendo TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8,0), SDS 1% e

proteínase K (1 mg/mL), sendo em seguida mantidas a 65° C durante uma hora. Após esta etapa, foram adicionados NaCl 5M e CTAB 10% e as amostras foram mantidas a 55°C por 45 minutos. Depois desse período, acrescentou-se clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm. Ao sobrenadante, foi adicionado isopropanol, sendo o DNA precipitado lavado com etanol 70%, ocorrendo em seguida outra centrifugação (2.500 rpm). Após este processo, o DNA foi ressuspendido em TE 1X e adicionou-se RNase A (1mg/mL). Em seguida, acrescentou-se clorofórmio: álcool isoamílico, as amostras foram centrifugadas (14.000 rpm), o sobrenadante foi separado, adicionou-se acetato de sódio 3M (pH 5,2) e etanol 95% e após este processo ocorreu outra centrifugação a 2.500 rpm. Em seguida, o DNA foi lavado com etanol 70%, e após uma nova centrifugação (3.500 rpm), o DNA foi colocado para secar a temperatura ambiente. Ao término do procedimento, ressuspendeu-se o sedimento em TE 1X.

3.3.2- Extração de DNA das amostras de hemolinfa armazenadas no cartão

As amostras armazenadas nos cartões FTA foram processadas de acordo com o protocolo do fabricante (FTA *Technnology*). O cartão foi cortado, com o auxílio de um perfurador, em um disco de 1,2mm e este foi colocado em um tubo de 200µl, próprio para PCR. Em seguida, foi adicionado o reagente de purificação FTA e as amostras foram incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente. Esta etapa foi repetida para um total de três lavagens. Depois da etapa de lavagem com o reagente, adicionou-se tampão TE, as amostras foram incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente, o tampão foi descartado e a aplicação do tampão foi repetida para um total de duas lavagens. Depois de removido o tampão, o disco foi aquecido a 56° C por 10 minutos. Após este processo o disco FTA pôde ser utilizado na Reação em Cadeia da Polimerase – PCR (ver item 3.5).

3.4 - Quantificação e determinação da integridade do DNA

3.4.1 - Eletroforese em gel de agarose

As amostras de DNA genômico de pleópodes e hemócitos, obtidas segundo o protocolo de extração de Maciel (2002) modificado, foram monitoradas quanto ao seu grau de integridade pelo perfil eletroforético em gel de agarose a 1% em TBE 1X (Tris 89 mM, Ácido Bórico 89 mM e EDTA 2 mM, pH 8,0) corado com brometo de etídeo. Após a polimerização do gel de agarose, as amostras foram aplicadas no gel e a corrida foi realizada com tampão TBE 1X em um sistema Hoefer HE 33. A eletroforese foi realizada a 120 V, o resultado final foi visualizado sob luz UV em transiluminador e fotografado.

Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose a 2% em TBE 1X (Tris 89 mM, Ácido Bórico 89 mM e EDTA 2 mM, pH 8,0) corado com brometo de etídeo. Após a polimerização do gel, foi aplicado um marcador de peso molecular conhecido, controles negativo e positivo da reação e os produtos de PCR. A eletroforese foi realizada a 120 V, utilizando-se tampão TBE 1X, e o resultado final foi obtido por visualização do gel sob luz UV em transiluminador.

3.4.2 - Quantificação das amostras

A quantificação do DNA das amostras foi realizada em espectrofotômetro (*Amersham Pharmacia Biotech*), através da determinação da razão entre as absorbâncias a 260 e 280 nm (*AUSUBEL et al.*, 1995).

3.5 - Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

3.5.1 - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) - Controle positivo das reações de PCR

Para verificar a qualidade do DNA extraído e a integridade das amostras, foi amplificado o gene constitutivo que codifica a enzima GAPDH, utilizando-se iniciadores descritos por Maciel (2002), desenhados a partir da seqüência deste gene em *Panaeus monodon*. A seqüência dos iniciadores está mostrada a seguir:

GAPDH- 298 F: 5' TCACCGTCTTCAACGAGATG 3'

GAPDH- 298 R: 5' ACCCTCCAGGATCTCGAAGT 3'

Cada reação de amplificação foi realizada através do uso de um disco de 1,2 mm, no caso da hemolinfa armazenada no cartão, ou 1 µL de DNA, obtido a partir da extração de pleópodes e hemolinfa congelados. Foi também necessário para a PCR o uso de água estéril e livre de nuclease (Amresco), Taq DNA Polimerase (1U) da *Biotools*, tampão de reação da enzima Taq DNA Polimerase (1X), MgCl₂ (2,5 mM), 40 mM de dNTPs e 0,3 µM de cada iniciador. As reações foram realizadas no termociclador *Mastercycler personal (Eppendorf)*, utilizando-se o programa a seguir:

Programa GAPDHS

30 s	30 s	1 min 30 s	7 min	Manter
94° C	52° C	68° C	72° C	7° C
35 X				

O produto final esperado, utilizando-se os iniciadores descritos, corresponde a um fragmento de 298 pb.

3.5.2 - Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV)

Para a detecção do WSSV, foram utilizados para a PCR iniciadores recomendados pela OIE e descritos por Lo *et al.* (1996) de acordo com as condições descritas por Marques (2008). A seqüência dos iniciadores utilizados no primeiro passo da PCR é a seguinte:

WS146F1: 5'ACTACTAACTTCAGCCTATCTAG 3'

WS146R1: 5' TAATGCGGGTGTAATGTTCTTACG 3'

Já a seqüência dos iniciadores internos, relativos ao segundo passo da PCR (PCR *Nested*), está descrita abaixo:

WS146F2: 5' GTAAGTGGCCCTTCCATCTCCA 3'

WS146R2: 5' TACGGCAGCTGCTGCACCTTGT 3'

Cada reação de amplificação ocorreu utilizando-se a mesma quantidade de amostra descrita no item 3.5.1. Os reagentes utilizados para cada reação diferem daqueles descritos no item supracitado somente em relação à concentração de MgCl₂ (3 mM) e aos iniciadores utilizados nesta PCR (140 nM de cada iniciador). As reações foram realizadas no termociclador *Biometra T GRADIENT (Uniscience)*, utilizando-se os programas a seguir:

1º passo da PCR-WSSV: Programa LONEW1

2 min	1 min	1 min 30 s	2 min	5 min	Manter
94° C	94° C	55° C	72° C	72° C	4° C
39 X					

2º passo da PCR- WSSV: Programa LONEW2

3 min	1 min	2 min	1 min	1 min	1 min	5 min	Manter
94° C	55° C	72° C	94° C	55° C	72° C	72° C	4° C
35 X							

A banda esperada para as amostras positivas para o WSSV é correspondente a um fragmento de 941 pb.

3.5.3 - Vírus da necrose hematopoiética e hipodermal infecciosa (IHHNV)

A detecção do IHHNV foi realizada por PCR, utilizando-se iniciadores desenhados a partir de seqüências específicas do genoma viral, conforme descrito por Moser (2005). Os iniciadores utilizados estão descritos abaixo:

IHHNV-F: 5' TCGGAAACTGAACACTGGCCT 3'

IHHNV-R: 5' CGGCGTGTTCCTTCGTCTTCATT 3'

A reação de amplificação ocorreu com o uso dos reagentes citados no item 3.5.1, com modificação dos iniciadores utilizados na reação. Nesta PCR foram utilizados 1 μ M do iniciador IHHNV-F e 1 μ M do iniciador IHHNV-R. As reações ocorreram no termociclador *Mastercycler personal (Eppendorf)*, conforme programa apresentado abaixo:

Programa IHHNV

3 min	30 s	45 s	45 s	10 min	Manter
94° C	94° C	55° C	72° C	72° C	4° C
30X					

As amostras positivas para o IHHNV devem apresentar um fragmento de 512 pb.

3.6- Comparação dos resultados de PCR entre as amostras de tecido congelado e as amostras imobilizadas em cartão FTA

Os resultados das PCRs obtidos a partir das amostras de hemolinfa, mantidas congeladas, foram comparados com as amostras de hemolinfa imobilizadas no cartão FTA, para avaliar a eficiência de cada método. Estes resultados foram ainda avaliados com base nos resultados obtidos a partir das amostras de pleópodes, no caso das duas coletas realizadas na fazenda.

3.7- Testes de estocagem das amostras armazenadas sobre o cartão FTA

Para estudar a estabilidade do DNA depois de longo tempo de estocagem à temperatura ambiente, foram realizadas análises mensais para GAPDH, WSSV e IHHNV utilizando-se as amostras de hemolinfa que foram aplicadas sobre o cartão FTA. As amostras de hemolinfa provenientes da coleta Lab 1 e da Fazenda 1 foram avaliadas durante um período de 5 meses (dezembro de 2007 a abril de 2008). Em relação às amostras da 2ª coleta no laboratório e na Fazenda, não foi realizado teste de estocagem, pois elas foram avaliadas somente em um e dois meses, respectivamente.

3.8- Teste das amostras de hemolinfa aplicadas em *pool* sobre o cartão FTA

Com base na coleta Lab 2, foram efetuadas PCRs para detecção da GAPDH, IHHNV e WSSV, a partir de amostras de hemolinfa coletadas em *pool* de 5 animais e aplicadas sobre o cartão FTA. Assim, foi avaliado se com essa maior quantidade de hemolinfa presente no cartão, a eficiência do método aumentaria.

4. RESULTADOS

Foi realizada a extração de DNA genômico dos espécimes de *L. vannamei* a partir das amostras de hemolinfa e pleópodes mantidas congeladas a -80° C. A eficiência e o rendimento do protocolo de extração utilizado, modificado de Maciel (2002), foram determinados pela determinação da razão da absorbância das amostras a 260/280 nm e através do perfil eletroforético em gel de agarose.

Comparando as extrações de DNA genômico de pleópodes e hemolinfa em relação à concentração de DNA obtida, através da leitura das amostras em espectrofotômetro, observou-se que as amostras de pleópodes apresentaram maior quantidade de DNA do que as amostras de hemolinfa (dados não mostrados).

Nenhuma amostra de DNA, extraída de hemolinfa proveniente da Fazenda 1, foi visualizada em gel de agarose. Em contrapartida, a extração de DNA de todos os pleópodes desta mesma coleta revelou a presença de DNA de boa qualidade em todas as amostras (Figura 2). Já das amostras procedentes da Fazenda 2, enquanto o DNA extraído de todos os pleópodes estava íntegro, somente o DNA obtido de três amostras de hemolinfa foi visualizado em gel de agarose (dados não mostrados). Com relação à extração das amostras de hemolinfa provenientes do Lab 1, somente metade apresentou banda no gel, correspondente ao DNA íntegro, sem rastro de degradação (Figura 3).

As amostras de DNA genômico dos espécimes coletados foram submetidas à PCR para a amplificação do gene constitutivo da GAPDH e de seqüências genômicas do vírus da necrose hematopoiética e hipodermal infecciosa (IHHNV) e da síndrome da mancha branca (WSSV).

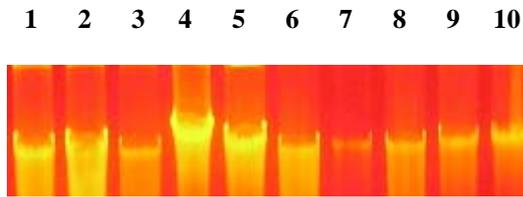


Figura 2- Eletroforese em gel de agarose 1% (gel representativo) para avaliação da integridade do DNA genômico obtido das amostras de pleópodes. Os números de 1 a 10 correspondem aos 10 espécimes de *Litopenaeus vannamei* provenientes da Fazenda 1

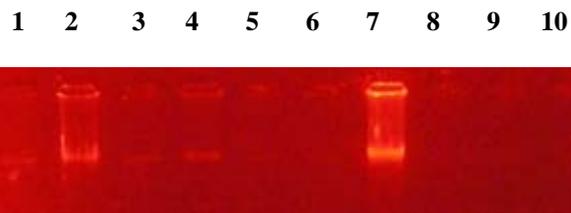


Figura 3- Eletroforese em gel de agarose 1% (gel representativo) para avaliação da integridade do DNA genômico obtido das amostras de hemolinfa. Os números de 1 a 10 correspondem aos 10 espécimes de *L. vannamei* provenientes do Lab 1

4.1- PCR- Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GADPH)

A reação de amplificação do gene constitutivo (GAPDH) dos espécimes de *L. vannamei* foi realizada a partir do DNA genômico extraído da hemolinfa e pleópodes congelados e de DNA extraído das amostras de hemolinfa armazenadas individualmente sobre cada cartão, para avaliar a eficiência de cada método de extração. O produto da amplificação do gene da GAPDH resultou em uma única banda em gel de agarose, correspondente a um fragmento de 298 pb, que é o esperado de acordo com os iniciadores descritos por Maciel (2002). Pela análise dos resultados obtidos, percebe-se que para a detecção do gene da GAPDH o método do cartão FTA foi o mais eficiente, com amplificação de 76,67% das amostras (Tabela 1). Cabe salientar que, para efeito de comparação, foi utilizado o período em que as amostras aplicadas sobre o cartão, coletadas no Lab 1 e nas Fazendas 1 e 2, apresentaram seu melhor rendimento.

Considerando-se somente as coletas realizadas na Fazenda, em que foram coletados 20 espécimes de *L. vannamei* no total, foram comparados os resultados obtidos na detecção do gene constitutivo do camarão apenas entre as amostras de hemolinfa e pleópodes mantidos congelados, sendo que ambos tiveram o DNA extraído de acordo com o protocolo de Maciel (2002) modificado. Os dados obtidos estão apresentados na Tabela 2 e é possível perceber que houve uma maior amplificação das amostras de hemolinfa do que de pleópodes. Porém, estas amostras não foram consideradas eficientes na detecção, porque era esperada uma amplificação de 100% do gene que codifica a GAPDH. É interessante constatar que embora não tenha sido detectado DNA genômico das amostras de hemolinfa dos camarões provenientes da Fazenda 1, pela análise em gel de agarose, foi amplificado o gene constitutivo de 7 destas 10 amostras de hemolinfa (Figura 4).

Tabela 1- Resultados obtidos a partir da comparação de dois métodos de extração de DNA utilizado na detecção do gene que codifica a GAPDH com uso de amostras de hemolinfa e pleópodes de camarões da espécie *L. vannamei* provenientes do Lab 1 e da Fazenda 1 e 2

Comparação das Metodologias - PCR GAPDH				
Metodologia	Amostra	N ^o camarões	Resultado	TOTAL
Protocolo Modificado (Maciel,2002)	Hemolinfa congelada	30	15 positivas	50%
Protocolo Modificado (Maciel,2002)	Pleópodes congelados	20	8 positivas	40%
Tecnologia FTA	Hemolinfa no cartão FTA	30	23 positivas	76,67%

Tabela 2 – Resultados referentes à detecção do gene que codifica a GAPDH a partir de amostras de hemolinfa e pleópodes de *L. vannamei* provenientes da Fazenda 1 e 2

Comparação das Amostras - PCR GAPDH				
Metodologia	Amostra	N ^o camarões	Resultado	TOTAL
Protocolo Modificado (Maciel,2002)	Hemolinfa congelada	20	14 positivas	70%
Protocolo Modificado (Maciel,2002)	Pleópodes congelados	20	8 positivas	40%

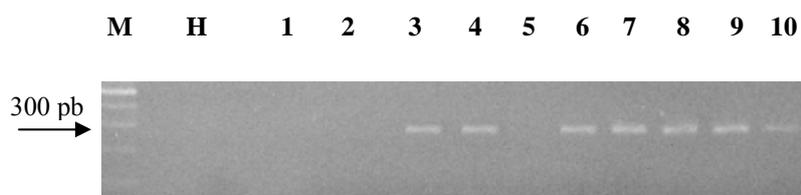


Figura 4- Visualização das bandas de 298 pb correspondentes à amplificação do gene da GAPDH. M- marcador de peso molecular; H- Controle negativo; 1 a 10- amostras de hemolinfa mantidas congeladas provenientes da Fazenda 1

Para avaliar a estabilidade do DNA imobilizado nos cartões FTA, as amostras de hemolinfa provenientes do Lab 1 e da Fazenda 1 foram estudadas durante um período de 5 meses e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3. Nos meses de janeiro e abril de 2008 a amplificação das amostras procedentes do laboratório foi muito baixa, sendo discrepante em relação aos outros períodos de análise. Portanto, estes meses foram desconsiderados na avaliação do cartão, porque provavelmente ocorreu um problema na PCR e não no método de extração de DNA a partir de cartões FTA. Por esse motivo, nos meses de janeiro e abril foram consideradas no teste de estocagem apenas as amostras procedentes da Fazenda 1. Em função do número de camarões amostrados a cada mês ter variado, para realizar o cálculo do coeficiente de variação, que indica a precisão do experimento, os dados encontrados no Lab 1 e na Fazenda 1 foram analisados separadamente. O coeficiente de variação obtido, a partir do cálculo do desvio padrão sobre a média de amostras que amplificaram o gene da GAPDH, foi de 21,63% e 34,85% para o laboratório e a Fazenda, respectivamente (Tabela 4). Com isso, é possível perceber que o experimento não apresentou uma alta repetibilidade com o uso dos cartões FTA, pois o coeficiente de variação encontrado em ambos os locais foi elevado. Segundo Andrade e Ogliari (2007), para um experimento ser considerado preciso não deve haver uma variação acima de 10% entre os elementos em questão.

Com relação à coleta na Fazenda 2, não foi realizado um teste de estocagem das amostras sobre o cartão, pois estas foram avaliadas somente nos meses de março e abril de 2008. No primeiro mês, 40% das amostras amplificaram o gene que codifica a GAPDH e no segundo mês 20% das amostras amplificaram este mesmo gene.

Tabela 3- Teste de estocagem do cartão FTA através de técnica de PCR para a detecção do gene da GAPDH utilizando-se amostras de hemolinfa de *L. vannamei* coletadas no Lab 1 e na Fazenda 1. As amostras foram avaliadas durante um período de 5 meses

Teste de estocagem do cartão FTA- PCR GAPDH			
Mês/Ano	Nº camarões	Resultado	TOTAL
Dez/07	20	11 positivos	55%
Jan/08	10	9 positivos	90%
Fev/08	20	19 positivos	95%
Mar/08	20	13 positivos	65%
Abr/08	10	5 positivos	50%

Tabela 4- Análise da repetibilidade dos resultados com as amostras armazenadas no cartão FTA, usando a amplificação do gene que codifica a GAPDH, através de técnica de PCR: amostras de hemolinfa de *L. vannamei* imobilizadas sobre o cartão FTA, provenientes do Lab 1 e da Fazenda 1. As amostras foram avaliadas durante um período de 5 meses. CV: coeficiente de variação expresso em porcentagem

Repetibilidade do método do cartão FTA- Período de 5 meses				
Local	Nº camarões	Média (amostras positivas)	Desvio padrão	CV (%)
Lab 1	10	8,0	1,73	21,63
Fazenda 1	10	6,6	2,3	34,85

4.2- PCR- Vírus da necrose hematopoiética e hipodermal infecciosa (IHHNV)

Foi realizado o diagnóstico dos camarões infectados com o IHHNV utilizando-se amostras de hemolinfa e pleópodes mantidos congelados em comparação com as amostras de hemolinfa imobilizadas sobre o cartão FTA, para avaliar a eficiência de cada método. Na coleta realizada na Fazenda 1 constatou-se que todos os animais eram negativos para este vírus, pois nenhum fragmento de DNA foi amplificado (dados não mostrados). Já dentre os camarões procedentes do Lab 1 e da Fazenda 2, havia indivíduos positivos para o IHHNV, pois foi observado um produto de 512 pb após a realização da PCR (Figura 5).

Com base nestas duas coletas em que havia camarões infectados, foi realizada uma comparação das amostras de hemolinfa e pleópodes mantidos congelados em relação às amostras de hemolinfa imobilizadas sobre o cartão e os dados obtidos estão apresentados na Tabela 5. É possível perceber que o método do cartão FTA apresentou uma melhor eficiência para detecção do IHHNV do que o método de extração a partir do protocolo de Maciel (2002) modificado.

Como havia camarões positivos para o IHHNV na coleta da Fazenda 2, foi realizada outra comparação levando-se em consideração somente amostras mantidas congeladas, das quais foi utilizado o protocolo de Maciel (2002) modificado na extração de DNA (Tabela 6). A diferença encontrada em relação ao tipo de amostra utilizada não foi significativa, sendo que a extração de DNA de hemolinfa mostrou-se ligeiramente mais eficiente no diagnóstico viral.

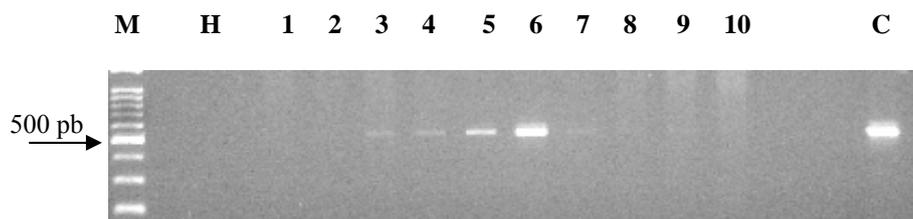


Figura 5- Visualização das bandas de 512 pb, através de gel de agarose, correspondentes às amostras positivas para o IHHNV. M- marcador de peso molecular; H- Controle negativo; 1-10- amostras de hemolinfa armazenadas no cartão FTA provenientes do Lab 1; C- controle positivo da reação de PCR.

Tabela 5- Resultados obtidos a partir da comparação de dois métodos de extração de DNA utilizado na detecção de amostras positivas para o IHHNV com uso de hemolinfa e pleópodes de camarões da espécie *L. vannamei* provenientes do Lab 1 e da Fazenda 2

Comparação das Metodologias- PCR IHHNV			
Metodologia	Amostra	Nº camarões	Resultado
Protocolo Modificado (Maciel, 2002)	Hemolinfa congelada	20	7 positivas
Protocolo Modificado (Maciel, 2002)	Pleópodes congelados	10	4 positivas
Tecnologia FTA	Hemolinfa sobre o cartão FTA	20	14 positivas

Tabela 6- Resultados referentes à detecção do IHHNV a partir de amostras de hemolinfa e pleópodes de *L. vannamei* provenientes da Fazenda 2

Comparação das amostras- PCR IHHNV			
Metodologia	Amostra	Nº camarões	Resultado
Protocolo Modificado (Maciel, 2002)	Hemolinfa congelada	10	5
Protocolo Modificado (Maciel, 2002)	Pleópodes congelados	10	4

As amostras da coleta realizada no Lab 1, imobilizadas sobre o cartão FTA, foram avaliadas durante um período de 5 meses em relação ao diagnóstico do IHHNV, para estudar a estabilidade do DNA sobre o cartão e também a repetibilidade do método. A eficiência do diagnóstico sofreu um decréscimo após o mês de fevereiro e no último mês de estudo foi detectada apenas uma amostra positiva para o IHHNV (Tabela 7).

Para avaliar a repetibilidade do método do cartão FTA foi calculado o coeficiente de variação das amostras amplificadas e encontrou-se o valor de 71,25%, que é considerado elevado e constata que o uso de cartões FTA para a técnica de PCR não apresentou repetibilidade no diagnóstico do IHHNV (Tabela 8).

Não foi realizado um teste de estocagem das amostras provenientes da Fazenda 2, pois elas foram avaliadas somente nos meses de março e abril de 2008. Em março 3 amostras foram positivas para o IHHNV e em abril 7 amostras foram positivas para este vírus (dados não mostrados).

Tabela 7- Teste de estocagem do cartão FTA, através de técnica de PCR, para a detecção do IHNV utilizando-se amostras de hemolinfa de *L. vannamei* coletadas no Lab 1. As amostras foram avaliadas durante um período de 5 meses

Teste de estocagem do cartão FTA- PCR IHNV		
Mês/Ano	Nº camarões	Amostras positivas
Dez/07	10	Cartões 5,6 e 7
Jan/08	10	Cartões 5,6 e 7
Fev/08	10	Cartões 3,4,5,6,7,8 e 9
Mar/08	10	Cartões 6 e 7
Abr/08	10	Cartão 6

Tabela 8- Análise da repetibilidade dos resultados com as amostras armazenadas no cartão FTA, na detecção do IHNV, através de técnica de PCR: amostras de hemolinfa de *L. vannamei* imobilizadas sobre o cartão provenientes do Lab 1. As amostras foram avaliadas durante um período de 5 meses. CV: coeficiente de variação expresso em porcentagem

Repetibilidade do método do cartão FTA- Período de 5 meses			
N amostral	Média (amostras positivas)	Desvio padrão	CV (%)
7	3,2	2,28	71,25

4.3- PCR- Vírus da síndrome da mancha branca (WSSV)

Foram efetuadas PCRs para a detecção do vírus da síndrome da mancha branca em camarões provenientes do Lab 1 e das Fazendas 1 e 2. Após a realização da PCR com o uso tanto de amostras de hemolinfa imobilizadas sobre o cartão FTA quanto de hemolinfa mantida congelada, coletadas no Lab 1, ambas não revelaram presença de uma banda de 941 bp, correspondente a amplificação de um fragmento específico para o WSSV (dados não mostrados). Com isso, constatou-se que todos os camarões coletados no Lab 1 eram negativos para este vírus. O mesmo ocorreu com os camarões provenientes da Fazenda 1, em que nenhum fragmento de DNA foi visualizado no gel de agarose e por isso os animais foram considerados livres desta infecção. Já na coleta realizada na Fazenda 2, algumas amostras apresentaram um produto de 941 pb, o que indica que elas eram positivas para o WSSV (Figura 6).

Como havia amostras positivas para o WSSV, foi comparado o uso das duas metodologias de extração de DNA, no mês de março de 2008, para verificar qual a mais eficiente no diagnóstico (Tabela 9). A utilização do DNA genômico extraído segundo o protocolo de Maciel (2002) modificado, não apresentou amostra alguma de hemolinfa positiva para o WSSV e somente uma positiva com uso dos pleópodes, ao contrário do que ocorreu com as amostras imobilizadas sobre o cartão FTA. Neste caso, o diagnóstico do WSSV mostrou-se mais eficiente pelo uso da tecnologia FTA.

Como o WSSV foi detectado somente na Fazenda 2, não foi possível realizar um teste de estocagem com os cartões FTA, porque o período de análise foi somente nos meses de março e abril. Em março foram detectadas seis amostras positivas para o WSSV e em abril apenas duas amostras imobilizadas sobre o cartão foram positivas para esta infecção viral (dados não mostrados).



Figura 6- Visualização das bandas de 941 pb, através de gel de agarose, correspondentes às amostras positivas para o WSSV. M- marcador de peso molecular; H- Controle negativo; 1-10- amostras de hemolinfa armazenadas no cartão FTA provenientes da Fazenda 2; C1 e C2 - controles positivos da PCR

Tabela 9- Resultados obtidos a partir da comparação de dois métodos de extração de DNA utilizado no diagnóstico do WSSV, com uso de amostras de hemolinfa e pleópodes de camarões da espécie *L. vannamei* provenientes da Fazenda 2

Comparação das Metodologias- PCR WSSV			
Metodologia	Amostra	Nº camarões avaliados	Positivos
Protocolo Modificado (Maciel,2002)	Hemolinfa congelada	10	0
Protocolo Modificado (Maciel,2002)	Pleópodes congelados	10	1
Tecnologia FTA	Hemolinfa sobre o cartão FTA	10	6

4.4- Teste com *pool* de amostras de hemolinfa aplicadas em cada cartão FTA

Nas coletas citadas anteriormente foi aplicada a hemolinfa de somente um camarão por cartão FTA e os resultados encontrados já foram mostrados. Para tentar aumentar a eficiência do método do cartão foi realizada uma coleta em abril de 2008 em que foi aplicada a hemolinfa de cinco camarões sobre cada cartão FTA. Os animais foram procedentes do Lab 2. Com base nestas amostras aplicadas sobre os cartões, foram realizadas PCRs para a detecção da GAPDH, IHHNV e WSSV.

4.4.1- PCR- Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GADPH)

Foi realizada uma PCR para a detecção do gene que codifica a GAPDH com as amostras que foram aplicadas em *pool* de 5 animais sobre cada cartão FTA. Como havia maior quantidade de hemolinfa sobre o cartão, conseqüentemente, uma maior quantidade de DNA foi imobilizada. Porém, dos 16 cartões analisados, cada qual com um *pool* de hemolinfa de 5 animais, somente metade das amostras amplificou o gene da GAPDH (dados não mostrados).

4.4.2- PCR- Vírus da necrose hematopoiética e hipodermal infecciosa (IHHNV)

A partir das amostras de hemolinfa aplicadas em *pool* de 5 animais sobre cada cartão FTA foi realizada a PCR para o diagnóstico do IHHNV. De acordo com a análise das amostras em gel de agarose, havia indivíduos infectados por este vírus, pois foi visualizado um produto de 512 pb nas amostras de hemolinfa aplicadas em 4 cartões FTA (Figura 7).

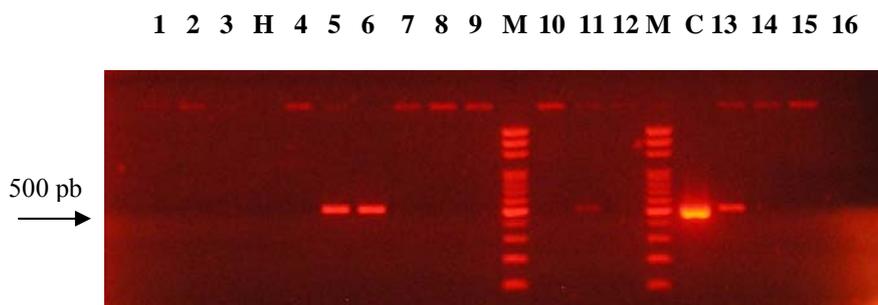


Figura 7- Visualização das bandas de 512 pb, através de gel de agarose, correspondentes às amostras positivas para o IHHNV. M- marcador de peso molecular; H- Controle negativo; 1-16- amostras de hemolinfa armazenadas em *pool* de 5 animais sobre cada cartão FTA, provenientes do Lab 2; C- controle positivo da reação de PCR

4.4.3- PCR- Vírus da síndrome da mancha branca (WSSV)

Após a realização da PCR para detecção do WSSV a partir do *pool* de hemolinfa aplicado sobre os cartões FTA, foi visualizado um produto de 941 pb em 4 *pools* de animais (dados não mostrados). Isso indica que dentre os animais coletados no laboratório em abril de 2008 havia camarões infectados pelo WSSV.

4.5- Comparação dos locais de coleta em relação à presença de IHHNV e WSSV

Apesar de o objetivo do trabalho não ter sido um monitoramento das áreas estudadas, a Tabela 10 apresenta quais os locais, dependendo do mês da coleta, apresentaram animais infectados ou não pelos vírus analisados. Com base nessa tabela, é possível perceber que no laboratório foi detectado o IHHNV em ambas as coletas, porém só havia camarões infectados pelo WSSV na coleta de abril de 2008. Em relação à Fazenda, na primeira coleta todos os animais eram livres de ambas as infecções virais, mas na segunda coleta foram encontrados camarões infectados tanto pelo IHHNV quanto pelo WSSV.

Tabela 10- Comparação entre os locais de coleta avaliados em relação ao diagnóstico do IHHNV e WSSV

Local	Mês/ano da coleta	IHHNV	WSSV
Florianópolis (Lab)	Nov/07	Presente	Ausente
Araquari (Fazenda)	Dez/07	Ausente	Ausente
Araquari (Fazenda)	Fev/08	Presente	Presente
Florianópolis (Lab)	Abr/08	Presente	Presente

5. DISCUSSÃO

Atualmente a carcinicultura representa um importante papel na economia global, devido à geração de milhões de empregos e ao volume de animais comercializados (ANDERSON, 2004). Porém, apesar do grande desenvolvimento deste setor produtivo, as doenças causadas por agentes infecciosos têm provocado graves perdas na carcinicultura mundial (GESTEIRA, 2006; LIGHTNER e REDMAN, 1998).

Tendo em vista os agentes infecciosos que podem causar sérios prejuízos no cultivo de camarões, é fundamental que haja uma melhoria nas técnicas de manejo das fazendas de cultivo e que sejam realizados métodos rápidos e precisos na detecção de patógenos (MARTINS, 2006). Além dos métodos tradicionais empregados na detecção de enfermidades, como histopatologia ou microscopia óptica, houve o desenvolvimento de métodos moleculares que atualmente são amplamente utilizados em laboratórios para a detecção de patógenos (OIE, 2003).

No presente trabalho, empregou-se a reação em cadeia da polimerase (PCR) para o diagnóstico da infecção pelo IHNV e WSSV em camarões *Litopenaeus vannamei* cultivados.

Antes de ser realizada a PCR, é necessário que seja realizada a extração de DNA das amostras que serão utilizadas no diagnóstico. Neste trabalho, de acordo com a extração de DNA dos pleópodes e hemolinfa dos espécimes de *L. vannamei*, a concentração de DNA obtida dos pleópodes foi superior àquela obtida na extração da hemolinfa. Uma possível explicação para um menor rendimento na extração de DNA da hemolinfa pode estar relacionada ao método de coleta utilizado, uma vez que a hemolinfa é diluída em anticoagulante. Assim, a quantidade de células (hemócitos) obtida pode ter sido inferior ao número de células presentes nos 3 pares de pleópodes coletados por animal. Além disso, apesar de teoricamente a hemolinfa estar diluída na proporção 1:1 (v/v) em relação ao

anticoagulante citrato de sódio, na prática nem sempre era possível coletar a mesma quantidade de hemolinfa de cada camarão. Assim, algumas ficavam mais diluídas do que outras e este fato também poderia explicar por que nem todas as amostras de DNA genômico extraído das hemolinfas foram visualizadas em gel de agarose.

Os resultados da PCR para a amplificação do gene da GAPDH mostraram que foram amplificadas mais amostras de DNA extraído da hemolinfa mantida congelada do que dos pleópodes. Porém, comparando-se as amostras de hemolinfa supracitadas com aquelas imobilizadas sobre o cartão FTA, constatou-se que as amostras armazenadas sobre o cartão, considerando-se o mês em que mais amostras do cartão amplificaram, apresentaram uma melhor eficiência na amplificação do gene que codifica a GAPDH. No entanto, era esperado que todas as amostras amplificassem igualmente o gene da GAPDH, independente do tecido e da metodologia de extração, já que este gene é expresso em nível constante em diferentes células (INFANTE *et al.*, 2008).

A sensibilidade da PCR é diminuída se houver inibidores da reação na amostra (LIMA *et al.*, 2007). Os inibidores podem levar a resultados falso-negativos, ou seja, alguns fragmentos não são amplificados devido a presença de substâncias que inibem a reação (OIE, 2003). Segundo Wilson (1997), determinados polissacarídeos presentes em tecidos animais foram identificados como substâncias inibitórias da PCR. Com base no exposto acima, a presença de inibidores de PCR nas amostras de pleópodes pode ter ocasionado uma menor eficiência na amplificação do gene constitutivo de *L. vannamei* quando comparados às amostras de hemolinfa.

Como sugerido por Milne *et al.* (2006), a distribuição da amostra de DNA sobre o cartão FTA não é uniforme. Assim, é provável que nem todos os discos de 1,2mm destacados de cada cartão apresentassem a mesma quantidade de material genético disponível. Desta forma, poderia haver discos que continham pouca hemolinfa imobilizada e estas amostras

com pouco ácido nucléico não amplificaram. Outro fator que pode ter interferido na amplificação das amostras sobre o cartão é o fato dos discos serem lavados com TE. Apesar de haver uma etapa de secagem dos discos após a lavagem com esse tampão, algum resquício de TE pode permanecer no cartão ou na parede do tubo de reação. Uma vez que este reagente apresenta EDTA, este quelante pode inibir a reação de PCR (KHOSRAVINIA e RAMESHA, 2007). Assim, em alguns trabalhos desenvolvidos com o uso destes cartões, estes foram lavados com água seguida de etanol para a remoção completa do tampão ou, como método alternativo, incubados em 150µl de água durante toda a noite para eliminar possíveis inibidores (BORINSEKO *et al.*, 2007; BORSTING e MORLING, 2006; SMITH e BURGOYNE, 2004). Estas alternativas não foram avaliadas no presente estudo. Assim sendo, não se pode descartar a possibilidade de que o cartão FTA possa ter apresentado inibidores da PCR que impediram uma melhor eficiência do método.

No que diz respeito à repetibilidade do método do cartão FTA na detecção da GAPDH, houve uma variação considerável nos resultados positivos da reação de PCR, em relação às amostras coletadas no Lab 1 e na Fazenda 1, sendo encontrados os coeficientes de variação de 21,63% e 34,85%, respectivamente. Segundo Andrade e Ogliari (2007), para um experimento ser considerado preciso não deve haver uma variação acima de 10% entre as análises em questão. Com isso, percebe-se que o método do cartão FTA apresentou uma baixa repetibilidade. As causas para esta variação podem ser atribuídas aos fatores citados anteriormente, como a não uniformidade da distribuição da hemolinfa sobre o cartão ou a presença de inibidores de PCR. Para tentar eliminar os inibidores presentes no cartão, após a lavagem com TE, poderia ser realizada uma última lavagem com água ou etanol, para remover completamente o tampão, eliminando assim o EDTA. Poderia ser usado também um disco maior que 1,2mm, que conteria uma maior quantidade de DNA imobilizada no cartão. Além disso, na realização da PCR, foi utilizado um protocolo padronizado a partir de

amostras de DNA não imobilizadas sobre cartões FTA. Por isso, sugere-se que sejam efetuadas modificações nas condições da reação de PCR visando obter um protocolo otimizado e específico para amostras que estejam armazenadas nesses cartões.

Com relação ao diagnóstico do IHHNV, os resultados indicaram que o uso de amostras de hemolinfa na realização da PCR para detecção deste vírus mostrou-se ligeiramente mais eficiente do que a utilização de amostras de pleópodes. Segundo Braz *et al.* (2007), a análise de espécimes de *L.vannamei* para detecção do IHHNV revelou que a hemolinfa é mais eficiente do que os pleópodes na pesquisa deste vírus pelo método da PCR. Assim, os resultados encontrados neste trabalho estão de acordo com a literatura.

No que se refere à comparação do método de extração utilizado na detecção do IHHNV, considerando-se o mês em que mais amostras armazenadas no cartão amplificaram, foi observado o dobro de animais positivos para esta infecção viral a partir do método do cartão FTA, em relação ao protocolo de Maciel (2002) modificado.

Apesar deste vírus não ser letal para os camarões da espécie *L. vannamei*, ele pode ocasionar deformidades cuticulares no rostro e antenas e redução do crescimento dos indivíduos infectados, levando a uma redução nos valores de mercado dos camarões acometidos por esta doença (CASTILLE *et al.*, 1993, KALAGAYAN *et al.*, 1991). Métodos de detecção precoce do vírus são necessários para o monitoramento dos cultivos, evitando assim as perdas econômicas causadas por essa infecção viral. Como os animais foram coletados no laboratório e no campo, não se tratando de animais infectados experimentalmente, não seria esperada a presença do vírus em todas as amostras, encontrando-se indivíduos negativos para esta infecção viral. Portanto, ao contrário do gene que codifica a GAPDH, uma eficiência menor que 100% é aceitável neste caso.

O teste de estocagem das amostras armazenadas sobre o cartão FTA para a detecção do IHHNV apresentou um alto coeficiente de variação, 71,25%. Segundo Andrade e Ogliari

(2007), um coeficiente de variação acima de 30% é considerado muito alto. Assim, os valores encontrados no presente trabalho entram nesta categoria, o que demonstra uma grande variação entre o número de amostras amplificadas a cada mês e isto leva a uma baixa repetibilidade do método. Segundo a OIE (2003), é muito importante que o método de diagnóstico utilizado na detecção de patógenos apresente uma alta repetibilidade e é recomendado que se uma excessiva variação for encontrada deve-se tentar corrigi-la para que se prossiga o diagnóstico. Portanto, é necessário que se façam algumas modificações no protocolo do cartão FTA ou que a reação de PCR seja padronizada novamente, para que se obtenha uma maior precisão no diagnóstico.

Outro importante vírus que afeta as fazendas de cultivo de camarão é o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV). Este patógeno é reconhecido como o maior responsável por perdas econômicas para os carcinicultores, pois a taxa de mortalidade nos camarões infectados pelo WSSV pode chegar próxima de 100% dentro de 3 a 10 dias do aparecimento dos primeiros sintomas da doença (LIGHTNER, 1996; VASEEHARAN; JAYAKUMAR; RAMASAMY, 2003). O WSSV se espalhou para muitas fazendas de camarão ao redor do mundo e provocou grandes prejuízos financeiros, com uma perda de mais de 7 bilhões de dólares americanos (ESCOBEDO-BONILLA *et al.* 2008). Portanto, é necessário que métodos diagnósticos rápidos e com alta sensibilidade sejam utilizados na detecção deste patógeno viral, para tentar minimizar ou controlar os efeitos negativos provocados pelo WSSV sobre a carcinicultura.

O método da reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido utilizado em muitos laboratórios para a detecção de patógenos virais por apresentar uma alta sensibilidade e permitir que sejam diagnosticados os animais enfermos mesmo quando estes não apresentam sintomas de doença (OIE, 2003). No presente trabalho, através da técnica de PCR, constatou-se que tanto os animais coletados no Lab 1 quanto os provenientes da Fazenda 1 foram

negativos para esta infecção viral. De acordo com a visualização em gel de agarose, nenhuma banda de 941 pb, correspondente a amplificação de um fragmento específico do WSSV, foi identificada nos camarões procedentes destas duas coletas. Porém, na 2ª coleta realizada na mesma fazenda, foi possível diagnosticar camarões positivos para esta infecção viral.

De acordo com o tipo de amostra utilizada na PCR, pleópodes ou hemolinfa mantidos congelados provenientes desta última coleta, nenhuma amostra de hemolinfa apresentou banda no gel de agarose e apenas uma amostra obtida da extração de DNA de pleópodes mostrou-se positiva para esta infecção viral. Este resultado difere daqueles encontrados na detecção do gene que codifica a GAPDH e da seqüência genômica do IHHNV, em que a extração de DNA a partir de amostras de hemolinfa mostrou-se mais eficiente. Segundo Lightner e Tang-Nelson (2001), os resultados de quantificação de partículas virais mostraram que a hemolinfa contém os níveis mais elevados do WSSV, quando comparada a outros tecidos do camarão. No presente trabalho foi observado o oposto do encontrado na literatura, o que pode ter ocorrido devido a menor concentração de DNA extraído da hemolinfa dos camarões, os quais podiam apresentar ainda uma carga viral baixa que não foi detectada através da técnica de PCR, uma vez que os animais podem apresentar diferentes graus de infecção viral (ESCOBEDO-BONILLA *et al.* 2008).

Já as amostras de hemolinfa imobilizadas sobre o cartão FTA, procedentes da Fazenda 2, apresentaram camarões positivos para o WSSV, pois foi visualizada uma banda de 941 bp no gel de agarose, correspondente a um fragmento específico do genoma do vírus. Isto indica que para a detecção deste patógeno, a tecnologia FTA mostrou-se mais eficiente do que a extração de DNA segundo o protocolo modificado de Maciel (2002). Este é um dado importante, porque a extração de DNA a partir das amostras armazenadas no cartão FTA é consideravelmente mais rápida do que a extração com o uso do protocolo citado anteriormente e o fornecimento de um diagnóstico rápido, antes que surjam os primeiros

sintomas nos indivíduos infectados, é crucial para evitar o surto da doença (GESTEIRA, 2006; VASEEHARAN; JAYAKUMAR; RAMASAMY, 2003).

Porém, algumas modificações precisam ser realizadas no protocolo do cartão FTA, pois nos dois meses (março e abril de 2008) em que foram feitos os testes para detecção do WSSV houve uma diferença no número de amostras positivas encontradas em cada um deles.

Em relação ao teste realizado em abril de 2008, com as amostras de hemolinfa coletadas em *pool* de 5 animais e aplicadas sobre o cartão FTA, a amplificação do gene que codifica a GAPDH não alcançou 100% de eficiência, da mesma forma que ocorreu quando somente a hemolinfa de um animal era aplicada sobre o cartão. Isso demonstra que mesmo com uma maior quantidade de amostra disponível para PCR, esta não atingiu o rendimento esperado. Este é mais um motivo para que novos testes sejam realizados, fazendo-se modificações nos ciclos e/ou reagentes utilizados nesta PCR, para que se alcance uma otimização dos resultados.

Já em relação ao diagnóstico do IHHNV e WSSV, a partir das amostras coletadas em *pool*, ambos os vírus foram detectados após a realização das PCRs, o que indica que este método é aplicável para o uso na detecção de enfermidades virais em peneídeos.

No que se refere ao diagnóstico realizado na fazenda, foi constatado que na Fazenda 1 nenhum animal estava infectado pelo IHHNV e/ou WSSV. Porém, na coleta da Fazenda 2, havia camarões infectados por estes vírus. Cabe salientar que os camarões dessa coleta tinham em torno de 58 dias, segundo o proprietário, assim não eram do mesmo povoamento que os animais da Fazenda 1. Com relação à coleta na Fazenda 1, os espécimes de *L.vannamei* estavam aparentemente sadios e não apresentavam sinal clínico de infecção por IHHNV ou WSSV. Já os camarões coletados em fevereiro (Fazenda 2) estavam letárgicos e alguns que foram despescados já se encontravam mortos. Além disso, segundo o proprietário da fazenda, os camarões começaram a ficar enfermos após uma oscilação na temperatura da água em que

os animais se encontravam, ocorrendo uma queda de 29°C para 25° C. Foi constatado que a temperatura apresenta efeitos consideráveis na patogenicidade de WSSV em *L. vannamei* infectados. Um aumento da temperatura de 26° C para 33° C inibiu completamente a mortalidade de animais infectados (VIDAL *et al.*, 2001). Contudo, ainda não está esclarecido se o efeito da temperatura é devido a uma melhora na resposta imune dos camarões infectados ou se é devido a um efeito direto sobre o vírus (REYES *et al.*, 2006). Além disso, em um estudo realizado por Montgomery-Brock *et al.* (2007), foi observado que a taxa de replicação viral do IHHNV cresceu rapidamente em camarões expostos a temperatura da água entre 25-27°C, sendo claramente reduzida quando a temperatura da água estava em torno de 32°C. Com isso, é possível que a diminuição na temperatura da água em que estavam expostos os camarões tenha desencadeado o surgimento destas enfermidades.

Já em relação aos camarões procedentes do laboratório, foram diagnosticados animais positivos para o WSSV e IHHNV apenas na coleta realizada em abril de 2008. Na coleta realizada em novembro os camarões eram reprodutores, e estes ficam num setor diferente daqueles coletados em abril, que estavam no cultivo em floco. Entretanto, não há informações adicionais que possam indicar o porquê de haver indivíduos infectados somente na 2ª coleta realizada neste laboratório

Com base nos testes utilizados para a detecção de patógenos virais nos espécimes de *L. vannamei*, a tecnologia FTA mostrou-se prática e rápida para a realização de diagnóstico de enfermidades virais em camarões. Entretanto, a sua precisão necessita ainda ser melhorada através da realização de novos experimentos com os cartões, alterando-se as condições do protocolo do fabricante e/ou padronizando as reações de PCR, para que este método possa ser empregado com total confiança na detecção de camarões acometidos por enfermidades virais.

6. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho, constatou-se que a extração de DNA a partir de hemolinfa apresentou uma menor concentração de ácido nucléico quando comparada aos pleópodes (com o uso do protocolo de Maciel, 2002, modificado). Portanto, sugere-se que seja testado outro protocolo para a extração da hemolinfa ou que se utilize um *kit* comercial de extração para que o rendimento seja maior.

Amostras de hemolinfa imobilizada em cartões foram analisadas através de PCR, com o objetivo de utilizar este método para o armazenamento de amostras destinadas ao diagnóstico de vírus em camarões de cultivo. No presente trabalho, as amostras imobilizadas nos cartões apresentaram uma maior eficiência na amplificação de um gene constitutivo (GAPDH), quando comparadas às amostras extraídas de acordo com o protocolo de Maciel (2002) modificado. Entretanto, não ocorreu amplificação da GAPDH em 100% das amostras. Além disso, durante a avaliação mensal das amostras, não houve homogeneidade no resultado das PCRs.

Uma explicação para esta baixa repetibilidade seria o fato da hemolinfa não se distribuir de forma homogênea sobre o cartão FTA. Assim, novos testes devem ser realizados utilizando-se amostras em duplicata ou então se destacando um disco maior do que 1,2mm por cartão. Pode-se também avaliar a aplicação da hemolinfa diretamente sobre o cartão, sem sua diluição em anticoagulante, para constatar se a eficiência do método será maior. Além disso, deve-se fazer novos experimentos com os cartões, como efetuar lavagens com água e/ou etanol antes da etapa de secagem, para remover completamente possíveis inibidores de PCR.

Segundo estudo de Del Rio *et al.* (1996), os discos que já foram utilizados em uma PCR podem ser reutilizados, mesmo se forem utilizados iniciadores diferentes na próxima

reação, pois o DNA genômico permanece imobilizado no disco enquanto os reagentes da PCR ficam em solução. Assim, poder-se-ia realizar um teste em que o mesmo disco fosse utilizado nas PCRs para detecção da GAPDH, IHHNV e WSSV, o que tornaria o diagnóstico ainda mais rápido.

Uma outra forma de aumentar a eficiência das PCRs utilizando amostras imobilizadas no cartão seria modificar as condições da reação, padronizando-as para este tipo de amostra. Assim, serão realizadas curvas de concentração de iniciadores e de cloreto de magnésio, para determinar as concentrações ideais destes reagentes na reação.

As PCRs para a detecção de IHHNV e WSSV serão realizadas novamente com as amostras coletadas em *pool*, para constatar se serão amplificadas as mesmas amostras ou se a precisão do método não será satisfatória.

Com relação ao teste de estocagem do cartão FTA, novos experimentos devem ser efetuados, após serem feitas as modificações citadas anteriormente, para avaliar melhor a estabilidade das amostras armazenadas nos cartões.

O método do cartão FTA mostrou-se rápido e prático para utilização no diagnóstico de enfermidades virais em espécimes de *L. vannamei*. Com as modificações sugeridas em relação ao protocolo do fabricante do cartão e também nas condições das PCRs, é esperado que a precisão do método seja aumentada. Assim, será possível empregar esta tecnologia de extração com plena confiança na detecção de patógenos virais em camarões.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, J.L. Aquaculture and future: why fisheries economists should care. **FAO Fisheries Report**, 744: 55-71. 2004.

ANDRADE, D.F.; OGLIARI, P.J. **Estatística para as ciências agrárias e biológicas com noções de experimentação**. EdUFSC, Florianópolis. 432 p. 2007.

AUSUBEL, F.M.; BRENT R; KINGSTON R.E.;MOORE D.D.; SEIDMAN J.G.; SMITH J.A. & STRUHL K. **Short Protocols in Molecular Biology**. Harvard Medical School. 1995.

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

BECKETT, S. M.; LAUGHTON, S. J.; POZZA, L.D.; MCCOWAGE, G.B.; MARSHALL, G.; COHN, R.J.; MILNES, E.; ASHTON, L.J. Buccal Swabs and Treated Cards: Methodological Considerations for Molecular Epidemiologic Studies Examining Pediatric Populations. **American Journal of Epidemiology**. v. 167, p. 1260-1267. 2008.

BORISENKO, A.V.; LIM, B.K.; IVANOVA, N.V.; HANNER, R.H.; HEBERT, P.D.N. DNA barcoding in surveys of small mammal communities: a field study in Suriname. **Molecular Ecology Notes**. v. 8, p. 471-479. 2007.

BORMAN, A.M.; LINTON, C.J.; MILES, S.; JOHNSON, E.M. Molecular identification of pathogenic fungi. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 61, p. 7-12. 2008.

BORSTING, C.; MORLING, N. Multiple displacement amplification of blood and saliva samples placed on FTA cards. **International Congress Series**. p. 716-718. 2006.

BRAZ, R.F.S.; BEZERRA, F.L.; MEISSNER, R.V.; OLIVEIRA, C.P.R.; REIS, L.G.; LACERDA, A.F.; BARCA, F.E.N.V.; PAIVA, A.R.; MEDEIROS, L.C. Padronização de reação da polimerase em cadeia (PCR) para pesquisa de IHHNV e NHP em camarões de cultivo *Litopenaeus vannamei*. **Ciência Sempre. Revista da FAPERN**, p. 59-63, 2007.

BROCK, J.A.; LIGHTNER, D.V.; BELL, T.A. A review of four virus (BP, MBV, BMN, and IHHNV) diseases of penaeid shrimp with particular reference to clinical significance, diagnosis and control in shrimp aquaculture. In: INTERNATIONAL COUNCIL FOR EXPLORATION OF THE SEA, 71. Proceedings... Genebra, ICES- CM, v.10, p. 1-18. 1983.

BUENO, S.L.S. Doenças em camarões marinhos no Brasil. **Panorama da Aqüicultura**, 8: 1-8. 1991.

CAI, S.L.; HUANG, J.; WANG, C.M.; SONG, X.L.; SUN, X.; YU, J.; ZHANG, Y.; YANG, C.H. Epidemiological studies on the explosive epidemic disease of prawn in 1993-1994. **Journal of Fish China**, v. 19, p. 112-117. 1995.

CASTILLE, F.L.; SAMOCHA, T.M.; LAWRENCE, A.L.; HE, H.; FRELIER, P.; JAENIKE, F. Variability in growth and survival of early postlarval shrimp (*Penaeus vannamei* Boone 1931). **Aquaculture**, 113, 65-81. 1993.

CHAORATTANAKAWEE, S.; NATALANG, O.; HANANANTACHAI, H.; NACHER, M.; BROCKMAN, A.; KRUDSOOD, S.; LOOAREESUWAN, S. e PATARAPOTIKUL, J. Storage duration and polymerase chain reaction detection of *Plasmodium falciparum* from blood spots on filter paper. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. V. 69 (1) p. 42-44. 2003.

DEL RIO, S.A.; MARINO, M.A.; BELGRADER, P. Reusing the Same Bloodstained Punch for Sequential DNA Amplifications and Typing. **BioTechniques**, v.20, p.970-973.1996.

DEOLINDO, P. **Caracterização de uma lectina parcialmente purificada da hemolinfa do camarão *Farfantepenaeus paulensis* (CRUSTACEA: DECAPODA)**. Trabalho de conclusão de curso. Curso de graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina. 65p. 2001.

DHAR, A. K. ,ROUX, M. M. & KLIMPEL, K. R. Detection and Quantification of Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus and White Spot Virus in Shrimp Using Real-Time Quantitative PCR and SYBR Green Chemistry. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 2835- 2845. 2001.

DURAND, D.; LIGHTNER, D.V.; REDMAN, R.M.; BONAMI, J.R. Ultrastructure morphogenesis of White Spot Syndrome Baculovirus (WSS). **Diseases of Aquatic Organisms**, p. 205-211. 1997.

ESCOBEDO-BONILLA, C.M.; ALDAY-SANZ,V.; WILLE, M.; SORGELOOSL, P.; PENSAERT, M.B.; NAUWYNCK, H.J. A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. **Journal of Fish Diseases**, p. 1-18. 2008.

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.

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

FTA Technology- **Whatman FTA for blood DNA**. Disponível em: http://www.whatman.com/repository/documents/s7/WGP_1351_Blood_B.pdf. Acesso em: 10 outubro 2007.

GESTEIRA, T.C.V. **Sanidade de organismos aquáticos no Brasil**/ Ângela Teresa Silva-Souza, organizadora. Maringá, PR: Abrapoa, 2006. Vários autores.

GIBELLO, A.; BLANCO, M.M.; DOMÍNGUEZ, L.; FERNÁNDEZ-GARAYZÁBAL, J.F. Utilización de la PCR para el diagnóstico en Ictiopatología. **AQUATIC: Revista Electrónica de Acuicultura: Tecnología e Investigación en Castellano**. Nº 11, 2001.

HERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; GOLLAS-GALVÁN, T. GÓMEZ-JIMÉNEZ, S.; PORTILLO-CLARK, G.; VARGAS-ALBORES, F. In the spiny lobster (*Panulirus interruptus*) the prophenoloxidase system is located in plasma not in haemocytes. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 14, p. 105-114, 2003.

HOROWITZ, A.; HOROWITZ, S. Microorganismos e praticas de alimentação em acuicultura. **Aquan. de Latin.**, v.1, p.37-39. 2001.

HOSSAIN, M. S.; CHAKRABORTY, A.; JOSEPH, B.; OTTA, S. K.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. Detection of new hosts for white spot syndrome virus using nested polymerase chain reaction. **Aquaculture**, v. 198, p. 1-11, 2001.

INFANTE, C.; MATSUOKA, M.P.; ASENSIO, E.; CAÑAVATE, J.P.; REITH, M.; MANCHADO, M. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in larvae from flatfish using real-time PCR. **BMC Molecular Biology**, 9: 28. 2008.

INOUE, R.; TSUKAHARA, T.; SUNABA, C.; ITOH, M. E USHIDA, K. Simple and rapid detection of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus from pig whole blood using filter paper. **Journal of Virological Methods**, v 141 (1), p. 102-106. 2006.

INOUYE, K.; MIWA, S.; OSEKO, N.; NAKANO, H.; KIMURA, T.; MOMOYAMA, K.; HIRAOKA, M. Mass mortalities of cultured Kuruma shrimp *Penaeus japonicus* in Japan in

1993: electron microscope evidence of the causative virus. **Fish Pathology**, v. 29, p. 149-158.
1994.

JSA- JOINT SUBCOMMITTEE ON AQUACULTURE. An evaluation of potential shrimp virus impacts on cultured shrimp and on wild shrimp population in the Gulf of Mexico and southeastern U.S. Atlantic coastal waters. Washington, National Marine Fisheries Service, 77p. 1997.

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. **J. World Aquaculture Soc.**, v. 22, p. 235-243, 1991.

KHOSRAVINIA, H.; RAMESHA, K.P. Influence of EDTA and magnesium on DNA extraction from blood samples and specificity of polymerase chain reaction. **African Journal of Biotechnology**. v. 6, p. 184-187. 2007.

KIATPATHOMCHAI, W; JITRAPAKDEE, S.; PANYIM, S. e BOONSAENG, V. RT-PCR detection of yellow head virus (YHV) infection in *Penaeus monodon* using dried haemolymph spots. **Journal of Virological Methods**. v. 119 (1), p 1-5. 2004.

LEU, J.H.; CHANG, C.C.; WU, J.L.; HSU, C.W.; HIRONO, I.; AOKI, T.; JUAN. H.F.; LO, C.F.; KOU, G.H.; HUANG, H.C. Comparative analysis of differentially expressed genes in normal and white spot syndrome virus infected *Penaeus monodon*. **BioMed Central Genomics**, v.8, 2007.

LIGHTNER, D.V. (ed.) **A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedure for disease of cultured penaeid shrimp**. World Aquaculture Society. Baton Rouge, Louisiana, USA, 1996.

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

LIGHTNER, D. V., R. M. REDMAN, B. T. POULOS, L. M. NUNAN, J. L. MARI & K. W. HASSON. Risk of spread of penaeid shrimp viruses in the Americas by the international movement of live and frozen shrimp. **Rev. Sci.Tech. Off. Int. Epizoot.** 16:146–160. 1996.

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**. p. 1-19. 2001.

LIMA, K.V.; LOPES, M.L.; LOUREIRO, E.C.; COSTA, M.M.; CARDOSO, N.C.; LIMA, G.F.F.; SOUSA, M.S. *Nested-PCR* do gene que codifica o antígeno b aplicada ao diagnóstico da tuberculose pulmonar. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 40, p. 212-215. 2007.

LO, C.F.; LEU, J.H.; HO, C.H.; CHEN, C.H.; PENG, S. E.; CHEN, Y.T.; CHOU, C.M.; YEH, P.Y.; HUANG, C.J.; CHOU, H.Y.; WANG, C.H.; OU, 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. 1996.

LO, C. F.; HSU, H. C.; TSAI, M. F.; HO, C. H.; PENG, S. E.; KOU, G. H.; LIGHTNER, D. V. Specific genomic DNA fragment analysis of different geographical clinical samples of shrimp white spot syndrome virus. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 35, p. 175-185. 1999.

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**. Dissertação de mestrado. Curso de pós-graduação em Aqüicultura. Universidade Federal de Santa Catarina. 38p. 2002.

MARKS, H.; GOLDBACH, R.W.; VLAK, J.M.; VAN HULTEN, M.C.W. Genetic variation among isolates of White spot syndrome virus. **Archives of Virology**, v. 149, p. 673–697. 2004.

MARQUES, J.S. **Contribuição para o monitoramento do vírus da Síndrome da Mancha Branca na carcinicultura de Santa Catarina**. 51 f. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) – Curso de Pós-Graduação em Aqüicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC. 2008.

MARQUES, M.R.F.; MOSER, J.R. Comunicação pessoal. 2005.

MARQUES, M.R.F.; MOSER, J.R.; MULLER, I.C. **Sanidade de organismos aquáticos no Brasil**/ Ângela Teresa Silva-Souza, organizadora. Maringá, PR: Abrapoa, 2006. Vários autores.

MARTINS, P.C.C. **Sanidade de organismos aquáticos no Brasil**/ Ângela Teresa Silva-Souza, organizadora. Maringá, PR: Abrapoa, 2006. Vários autores.

MAS, S.; CRESCENTI, A.; GASSO, P.; VIDAL-TABOADA, J.M. LAFUENTE, A. DNA Cards: Determinants of DNA Yield and Quality in Collecting Genetic Samples for Pharmacogenetic Studies. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.101, p. 132-137. 2007.

MAYO, M.A. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. **Archives of Virology**.V. 147, nº 8, p. 1655–1656. 2002.

MILNE, E.; BOCKXMEER, F. M. V.; ROBERTSON, L.; BRISBANE, J.M.; ASHTON, L. J.; SCOTT, R.J. e ARMSTRONG, B.K. Buccal DNA Collection: Comparison of Buccal Swabs with FTA Cards. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 15, p. 816-819. 2006.

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

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 hematopoiética – IHHNV**. 78f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC. 2005.

NATIVIDAD, K.D.; NOMURA, N.; MATSUMURA, M. Detection of White spot syndrome virus DNA in pond soil using a 2-step nested PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 149, p. 28-34. 2008.

NDUNGURU, J.; TAYLOR, N.J.; YADAV, J.; ALY, H.; LEGG, J.P.; AVELING, T.; THOMPSON, G. e FAUQUET, C.M. Application of FTA technology for sampling, recovery and molecular characterization of viral pathogens and virus-derived transgenes from plant tissues. **Virology Journal**, 2:45.2005.

OIE- OFFICE INTERNATIONAL DES ÉPIZOOTIES. Manual of diagnostic test for aquatic animals, 2003. Disponível em <http://www.oie.int/eng/normes/fmanual/A_summry.htm>. Acesso em 30 outubro 2007.

OIE- OFFICE INTERNATIONAL DES ÉPIZOOTIES. Manual of diagnostic test for aquatic animals, 2006. Disponível em <http://www.oie.int/eng/normes/en_amanual.htm?e1d10>. Acesso em 25 maio 2008.

REYES, A.; SALAZAR M.; GRANJA C. Temperature modifies gene expression in subcuticular epithelial cells of white spot syndrome virus-infected *Litopenaeus vannamei*. **Developmental & Comparative Immunology**. 2006.

ROCHA, I.P. Panorama da carcinicultura brasileira em 2007. **Panorama da Aqüicultura**, 104: 26-31. 2007.

ROSEMBERRY, B. World shrimp farming, **Anual Report. Aquaculture Digest**, San Diego, California. 2002.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular Cloning. A laboratory manual**. Third Edition. Chapter 8. Vol. 2. Cold Spring Harbor Lab. Press. Cold Spring Harbor, New York. 2001.

SEIFFERT, W.D.; WINCLER, S.; MAGGIONI, D. A mancha branca em Santa Catarina. **Panorama da Aqüicultura**, 87: 51-53. 2005.

SMITH, L.M. e BURGOYNE, L.A. Collecting, archiving and processing DNA from wildlife samples using FTA databasing paper. **BioMed Central Ecology**, 4:4, 2004.

SNIESZKO, S.F. Diseases of fishes and their control in the U.S. In: The Two Lakes Fifth Fishery Management Training Course Report. Jansen, London, p. 55-66. 1973.

SUBASINGHE, R. P. Epidemiological approach to aquatic animals health management: opportunities and challenges for developing countries to increase aquatic production through aquaculture. **Preventive Veterinary Medicine**, v.67, p. 117-124, 2005.

VASEEHARAN, B.; JAYAKUMAR, R.; RAMASAMY, P. PCR-based detection of white spot syndrome virus in cultured and captured crustaceans in India. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, p. 443-447, 2003.

VIDAL O.; GRANJA C.; ARANGUREN F.; BROCK J.; SALAZAR M. A profound effect of hyperthermia on survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles infected with White Spot Syndrome Virus. **World Aquaculture Society**, p. 364-372. 2001.

WACHARAPLUESADEE, S.; PHUMESIN, P.; LUMLERTDAECHA, B.; HEMACHUDHA, T. Diagnosis of rabies by uses of brain tissue dried on filter paper. **Clin. Infect. Dis.** V. 36, p. 674-675. 2003.

WILSON, I.G. Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 3741-3751. 1997.

8. APÊNDICES

APÊNDICE A: Resultado detalhado de todas as PCRs realizadas a partir de amostras de hemolinfa e pleópodes mantidas congeladas e amostras de hemolinfa aplicadas diretamente sobre o cartão FTA, de camarões da espécie *L. vannamei*, procedentes do Lab 1

Mês/Ano	PCR	Local	Amostras	Seqüência gênica amplificada
Dez/07	GAPDH	Lab 1	Cartões e Hemolinfas Congeladas	Cartões: 1,3,4,5,6,7 e 10. Hemolinfas: 7
Dez/07	IHHNV	Lab 1	Cartões e Hemolinfas Congeladas	Cartões: 5, 6 e 7. Hemolinfas: 6 e 7
Dez/07	WSSV	Lab 1	Cartões e Hemolinfas Congeladas	Nenhuma amplificação
Jan/08	GAPDH	Lab 1	Cartões	Cartões: 6 e 7
Jan/08	IHHNV	Lab 1	Cartões	Cartões: 5, 6 e 7
Jan/08	WSSV	Lab 1	Cartões	Nenhuma amplificação
Fev/08	GAPDH	Lab 1	Cartões	Cartões: 1 ao 10
Fev/08	IHHNV	Lab 1	Cartões	Cartões: 3 ao 9
Mar/08	GAPDH	Lab 1	Cartões	Cartões: 3,4,5,6,7,8 e 10
Mar/08	IHHNV	Lab 1	Cartões	Cartões: 6 e 7
Abr/08	GAPDH	Lab 1	Cartões	Cartão: 7
Abr/08	IHHNV	Lab 1	Cartões	Cartão: 6

APÊNDICE B: Resultado detalhado de todas as PCRs realizadas a partir de amostras de hemolinfa e pleópodes mantidas congeladas e amostras de hemolinfa aplicadas diretamente sobre o cartão FTA, de camarões da espécie *L. vannamei*, procedentes da Fazenda 1

Mês/Ano	PCR	Local	Amostras	Seqüência gênica amplificada
Dez/07	GAPDH	Fazenda 1	Cartões, hemolinfas e pleópodes congelados	Cartões: 1,2,4 e 5. Hemolinfas 3, 4, 6, 7, 8, 9 e 10. Pleópodes 9 e 10.
Dez/07	IHHNV	Fazenda 1	Cartões, hemolinfas e pleópodes congelados	Nenhuma amplificação.
Dez/07	WSSV	Fazenda 1	Cartões, hemolinfas e pleópodes congelados	Nenhuma amplificação.
Jan/08	GAPDH	Fazenda 1	Cartões	Cartões: 1,3,4,5,6,7,8,9 e 10.
Jan/08	IHHNV	Fazenda 1	Cartões	Nenhuma amplificação.
Jan/08	WSSV	Fazenda 1	Cartões	Nenhuma amplificação.
Fev/08	GAPDH	Fazenda 1	Cartões	Cartões: 1,2,3,4,6,7,8,9 e 10.
Mar/08	GAPDH	Fazenda 1	Cartões	Cartões: 1,4,7,8,9 e 10.
Abr/08	GAPDH	Fazenda 1	Cartões	Cartões: 1,2,7,8 e 9.

APÊNDICE C: Resultado detalhado de todas as PCRs realizadas a partir de amostras de hemolinfa e pleópodes mantidas congeladas e amostras de hemolinfa aplicadas diretamente sobre o cartão FTA, de camarões da espécie *L. vannamei*, procedentes da Fazenda 2

Mês/Ano	PCR	Local	Amostras	Seqüência gênica amplificada
Mar/08	GAPDH	Fazenda 2	Hemolinfas e pleópodes congelados	Hemolinfas: 3,4,5,6,7,8 e 10. Pleópodes: 1,2,3,4,6 e 7.
Mar/08	GAPDH	Fazenda 2	Cartões	Cartões: 1,2,3 e 4.
Mar/08	IHHNV	Fazenda 2	Cartões	Cartões: 7, 9 e 10.
Mar/08	IHHNV	Fazenda 2	Hemolinfas e pleópodes congelados	Hemolinfas: 3,5,6,7 e 9. Pleópodes: 8 e 9.
Mar/08	WSSV	Fazenda 2	Cartões	Cartões: 2,3,7,8,9 e 10
Mar/08	WSSV	Fazenda 2	Hemolinfas e pleópodes congelados	Hemolinfas: Sem amplificação. Pleópodes: 4
Abr/08	GAPDH	Fazenda 2	Cartões	Cartões: 7 e 9.
Abr/08	IHHNV	Fazenda 2	Cartões	Cartões: 1,4,6,7,8,9 e 10.
Abr/08	WSSV	Fazenda 2	Cartões	Cartões: 7 e 10.

APÊNDICE D: Resultado detalhado de todas as PCRs realizadas a partir de amostras de hemolinfa e pleópodes mantidas congeladas e amostras de hemolinfa aplicadas diretamente sobre o cartão FTA, de camarões da espécie *L. vannamei*, procedentes do Lab 2

Mês/Ano	PCR	Local	Amostras	Seqüência gênica amplificada
Abr/08	GAPDH	Lab 2	Cartões	Cartões: 2,5,8,9,12,13,14 e 16.
Abr/08	IHHNV	Lab 2	Cartões	Cartões: 5,6,11 e 13.
Abr/08	WSSV	Lab 2	Cartões	Cartões: 1,5,6 e 11.