

**UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAI – UNIVALI
CENTRO DE CIÊNCIAS TECNOLÓGICAS DA TERRA E DO MAR –
CTTMar
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA AMBIENTAL
PROGRAMA DE MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA AMBIENTAL**

**AVALIAÇÃO DO RISCO EPIDEMIOLÓGICO DA CARCINOCULTURA
CATARINENSE USANDO COMO MODELO A SÍNDROME DE
TAURA E A DOENÇA DA MANCHA BRANCA**

ROBERT LENOCH

Itajaí (SC), agosto de 2004

**UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAI – UNIVALI
CENTRO DE CIÊNCIAS TECNOLÓGICAS DA TERRA E DO MAR –
CTTMar
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA AMBIENTAL
PROGRAMA DE MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA AMBIENTAL**

**AVALIAÇÃO DO RISCO EPIDEMIOLÓGICO DA CARCINICULTURA
CATARINENSE USANDO COMO MODELO A SÍNDROME DE
TAURA E A DOENÇA DA MANCHA BRANCA**

ROBERT LENOCH

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade do Vale do Itajaí, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Bacellar Barreiros

Itajaí (SC), agosto de 2004

“Avaliação do risco epidemiológico da carcinicultura catarinense usando como modelo a Síndrome de Taura e a Doença da Mancha Branca”

ROBERT LENOCH

Esta Dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental, Área de Concentração em Tecnologia e Gestão Ambiental, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Mestrado Acadêmico em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade do Vale do Itajaí.

Prof. Paulo Ricardo Schwingel, Doutor
Coordenador do Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciência e Tecnologia Ambiental

E foi apresentada perante a Banca Examinadora composta pelos Professores:

Prof. Marco Antonio Bacellar Barreiros, Doutor (UNIVALI)
Presidente / Orientador

Prof. Mauricio Laterça Martins, Doutor (Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC) Convidado

Profª . Aime Rachel Magenta Magalhães, Doutora (Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC)
Convidada

Itajaí (SC), 12 de agosto de 2004

AGRADECIMENTOS

A Deus

À minha família que sempre me incentivou a seguir em frente, não deixando que esmorecesse

Ao Prof Marco Antonio que sempre soube ser amigo e que sempre acreditou em nossas idéias.

Aos colegas da 2ª turma do mestrado que marcaram uma importante fase da vida de cada um.

À Profª . Laura Weber e Prof. Moises do Laboratório de Biologia Molecular que sempre ajudaram.

Aos colegas dos laboratórios, nosso colega de turma, o Luciano Lacava, ao Tiago e a Bel que sempre foram gentis e prestativos em nossas necessidades.

Aos amigos do Colégio Agrícola de Araquari
Mauricio Lehmann
Rodrigo Otávio de Macedo Gomes
Roberto Hoppe
Que sempre incentivaram as idéias.

Ao colega de turma, Jonas Cunha Espindola, companheiro de longa jornada no mestrado e em nosso local de trabalho.

À Coordenação do curso de Mestrado, nas pessoas do Prof. Schwingel e Secretário Evandro, sempre solícitos e prestativos.

Ao Programa de Incentivo a Pós-Graduação – PIPG que proporcionou os recursos necessários para o trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1 – INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Aquicultura Mundial.....	1
1.1.1 Produção e valores totais da aquicultura mundial.....	1
1.2 Aquicultura nas Américas.....	3
1.3 Aquicultura no Brasil.....	4
1.3.1 História da carcinicultura no Brasil.....	5
1.3.2 A carcinicultura no Brasil.....	7
1.4 O camarão branco do Pacífico – <i>Litopenaeus vannamei</i>	9
1.5 Técnicas de detecção de partículas virais.....	11
1.5.1 Relação da virulência e dose infecciosa.....	13
1.6 Doenças na carcinicultura.....	16
1.6.1 Doenças virais na carcinicultura.....	19
1.6.1.1 A Síndrome de Taura	20
1.6.1.2 A Síndrome da Mancha Branca	23
1.7 Amostragem.....	25
1.7.1 Diagnóstico em situação de doença.....	25
1.7.2 Diagnóstico em crustáceos assintomáticos.....	25
1.7.3 Conservação das amostras para testes moleculares.....	27
1.7.3.1 Tipos de amostras.....	27
1.7.3.2 Seleção de tecidos para as amostras.....	28
2 – JUSTIFICATIVA.....	29
3 – OBJETIVOS.....	33
3.1 Objetivo geral	33
3.2 Objetivos específicos.....	33
4 – MATERIAL E MÉTODO.....	34
4.1 Estabelecimentos avaliados.....	34
4.2 Coleta das amostras.....	35
4.3 Extração do RNA.....	37
4.3.1 Extração de RNA viral nos tecidos do <i>L. vannamei</i> com o protocolo comercial TRIZOL® Reagent, GibcoBRL	37
4.3.2 Extração de RNA viral nos tecidos do <i>L. vannamei</i> com o protocolo fenol/clorofórmio – álcool isoamílico e sílica/tiocianato de guanidina e método sílica/tiocianato de guanidina.....	37
4.3 Extração do DNA.....	37
4.4.1 Extração de DNA genômico nos tecido do <i>L. vannamei</i> com o protocolo comercial DNAzol® Reagent, GibcoBRL.....	37
4.4.2 Extração de DNA viral e de DNA genômico do <i>L. vannamei</i> com o protocolo fenol/clorofórmio – álcool isoamílico e sílica/tiocianato de guanidina e método sílica/tiocianato de guanidina.....	38
4.4.3 Extração de DNA genômico nos tecido do <i>L. vannamei</i> com o protocolo recomendado pelo OIE, 2003.....	38
4.5 RT-PCR.....	38

4.6	Condições da PCR para teste do (TSV).....	39
4.7	Condições da PCR para detecção do DNA genômico do <i>L. vannamei</i> e do WSSV.....	39
4.8	Eletroforese em gel de agarose.....	41
5	– RESULTADOS.....	42
5.1	Extração e amplificação de RNA viral do TSV nos tecidos do <i>L. vannamei</i> com o protocolo comercial TRIZOL® Reagent, GibcoBRL.....	42
5.2	Extração e amplificação de RNA viral do TSV nos tecidos do <i>L. vannamei</i> com o protocolo fenol/clorofórmio – álcool isoamílico e sílica/tiocianato de guanidina e método sílica/tiocianato de guanidina.....	42
5.3	Extração e amplificação de DNA genômico dos tecidos de <i>L. vannamei</i> com o protocolo comercial DNazol® Reagent, GibcoBRL.....	42
5.4	Extração e amplificação de DNA viral do WSSV e dos tecidos de <i>L. vannamei</i> com o protocolo fenol/clorofórmio – álcool isoamílico e sílica/tiocianato de guanidina e método sílica/tiocianato de guanidina.....	43
5.5	Extração e amplificação de DNA genômico dos tecidos de <i>L. vannamei</i> com o protocolo recomendado pela OIE (2003).....	43
5.6	Laboratórios de pós-larvas.....	51
5.6.1	Laboratório um.....	51
5.6.2	Laboratório dois.....	52
5.6.3	Laboratório três.....	52
5.7	Fazendas de cultivo.....	53
6	– DISCUSSÃO.....	57
6.1	Das técnicas moleculares.....	57
6.2	Do sistema produtivo.....	60
6.3	Do Programa de Sanidade para Crustáceos.....	61
7	– CONCLUSÕES.....	65
8	– REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
9	– ANEXO.....	77
	Anexo 1. Procedimentos para extração do RNA com Trizol® Reagent, Gibcobl.	77
	Anexo 2. Protocolo de extração do RNA e DNA, protocolo fenol/clorofórmio – álcool isoamílico e sílica/tiocianato de guanidina e método sílica/tiocianato de guanidina.....	79
	Anexo 3. Protocolo extração do DNA com Dnazol® Reagent, Gibcobl.....	81
	Anexo 4. Protocolo extração de DNA – OIE.....	83
	Anexo 5. Gel de agarose 1,5%.....	84
	Anexo 6. Preparo de soluções.....	85

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Participação relativa dos crustáceos cultivados na Aqüicultura mundial nos continentes, 2001.....	2
Figura 2	Participação relativa dos crustáceos cultivados na aqüicultura mundial, excluindo-se a Ásia,2001.....	2
Figura 3	Evolução da produção brasileira de camarão cultivado.....	8
Figura 4	Anatomia externa do camarão.....	10
Figura 5	Anatomia interna do camarão.....	10
Figura 6 A	A intersecção das esferas ilustram o conceito de hospedeiro, patógeno e meio ambiente.....	14
Figura 6 B	Ilustra o efeito de um patógeno altamente virulento.....	14
Figura 7 C	Ilustra o efeito de um patógeno com baixa virulência.....	15
Figura 7 D	Ilustra o conceito de SPF.....	15
Figura 8	Classificação dos tipos de patógenos que afetam a indústria de cultivo do camarão marinho.....	19
Figura 9	Expansão dos cromatóforos na região do telso.....	21
Figura 10	Coloração mais avermelhada do camarão B.....	21
Figura 11	Melanizações no exoesqueleto.....	22
Figura 12	Lesões características do WSSV em camarão.....	24
Figura 13	Lesões características do WSSV em camarão.....	24
Figura 14	Coleta de hemolinfa no sinus ventral de <i>Litopenaeus vannamei</i>	36
Figura 15	Produtos da reação da RT-PCR para detecção do TSV com protocolo de extração TRIZOL® Reagent, GibcoBRL.....	44
Figura 16	Produtos da reação da RT-PCR para detecção do TSV e extração com protocolo TRIZOL® Reagent, GibcoBRL.....	45
Figura 17	Produtos da reação da RT-PCR para detecção do TSV com protocolo de extração fenol/clorofórmio – álcool isoamílico e sílica/tiocianato de guanidina e método sílica/tiocianato de guanidina.....	46
Figura 18	Produtos de amplificação por PCR e extração de DNA genômico do camarão com protocolo comercial DNAzol® Reagent, GibcoBRL.....	47
Figura 19	Produtos da reação da PCR para detecção do DNA genômico do camarão <i>L. vannamei</i> , extração com protocolo fenol/clorofórmio – álcool isoamílico e sílica/tiocianato de guanidina e método sílica/tiocianato de guanidina.....	48
Figura 20	Produtos da reação da PCR para detecção do WSSV – 1º passo, extração com protocolo fenol/clorofórmio – álcool isoamílico e sílica/tiocianato de guanidina e método sílica/tiocianato de guanidina.....	49
Figura 21	Produtos da reação Nested PCR para detecção do WSSV.....	50
Figura 22	Camarões <i>L. vannamei</i> com deformações no rostro.....	54
Figura 23	Camarão <i>L. vannamei</i> com deformações no exoesqueleto.....	54
Figura 24	Camarões <i>L. vannamei</i> com deformações no corpo e grande diferença de tamanho.....	54
Figura 25	Camarões <i>L. vannamei</i> com deformações no corpo e grande diferença de tamanho.....	55
Figura 26	Camarões <i>L. vannamei</i> com deformações no corpo e exoesqueleto incompleto.....	55
Figura 27	Camarões <i>L. vannamei</i> com deformações no rostro.....	56
Figura 28	Camarões <i>L. vannamei</i> com deformações no rostro.....	56
Figura 29	Camarões <i>L. vannamei</i> com deformações no rostro.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Produção, receitas geradas dos principais crustáceos cultivados mundialmente, 2001.....	3
Tabela 2	Evolução brasileira de pescado (aquicultura e captura) por categorias, em 1000 toneladas.....	4
Tabela 3	Evolução da área, produção e produtividade dos cultivos de camarões marinhos no Brasil, 1996/2001.....	7
Tabela 4	Estágios larvais do camarão.....	11
Tabela 5	Doenças em crustáceos de notificação obrigatório para OIE.....	18
Tabela 6	Doenças em crustáceos importantes para OIE.....	18
Tabela 7	Tamanho das amostras baseadas na prevalência do patógeno em uma população.....	26
Tabela 8	Número médio do genoma do WSSV presentes em hemolinfa, pleópodos, brânquias, musculatura e hepatopâncreas.....	28
Tabela 9	Prejuízos estimados da indústria de cultivo de camarões marinhos causados por enfermidades virais desde sua primeira detecção.....	29
Tabela 10	Vantagens de desvantagens das técnicas moleculares.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS

BP – *Baculovirus penaei*

BMN – Baculoviral midgut gland necrosis

°C – graus Celsius

cDNA ou DNA complementar – funciona como uma cópia do DNA, gerada a partir do RNA mensageiro.

µg – micrograma

µl – microlitro

Dnase – deoxiribonuclease ou desoxiribonuclease

dNTPs – deoxinucleotídeos trifosfatados

dATP – 2'-deoxiadenosina 5' - trifosfato

dCTP – 2' – deoxicitidina 5' - trifosfato

dGTP – 2' – deoxiguanosina 5' – trifosfato

dTTP – 2' – deoxitimidina 5' – trifosfato

DTT – ditioneitol

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

FAO – Food and Agriculture Organization

IHHNV – Infectious hypodermal hematopoietic necrosis virus

LCM – Laboratório de Camarões Marinhos

m – metros

M – molar

MBV – *Monodon baculovirus*

mg – miligrama

ml – mililitro

mM – milimolar

ng – nanograma

OIE – Office International des Epizooties

p/v – peso volume

pb – pares de base

PCR – reação em cadeia pela polimerase

pH – potencial hidrogeniônico

pmoles – picomoles

RNA – ácido ribonucléico

RNase – ribonuclease

RT – transcrição reversa

SDS – dodecil sulfato de sódio

Taq – *Thermus aquaticus*

TBE – tampão tris-borato/EDTA

TS – Taura Syndrome

TSV – Taura Syndrome Virus

V – volts

v/v – relação volume/volume

WSSV – White Spot Syndrome Vírus

WSSD – White Spot Syndrome Disease

WTO – World Trade Organization

YHV – Yellow head virus

RESUMO

A carcinicultura brasileira vem apresentando produtividade crescente nos últimos anos, sendo a recordista mundial, com uma projeção de 8000 kg/ha/ano em 2005. O incremento no cultivo e o impacto potencial negativo das enfermidades não podem ser negligenciados. As doenças importantes de crustáceos são infecciosas. A presença de um agente infeccioso não implica na presença da enfermidade clínica, mas a detecção da infecção na ausência da enfermidade clínica é suficiente para o caso ser declarado. Em animais aquáticos o hospedeiro e o meio ambiente influenciam de maneira significativa o grau em que uma infecção subclínica poderá tornar-se clínica, ou os animais que sobrevivem a infecção poderão tornar-se veículos do agente por toda a sua vida. A reação em cadeia da polimerase (PCR) pode ser utilizada para a amplificação enzimática de seqüências de ácidos nucléicos que estão presentes em pequeno número, como em amostras ambientais. Permitindo ações de controle e reduzindo seus efeitos negativos. Neste trabalho foram avaliados os potenciais riscos epidemiológicos advindos de falhas estruturais, barreiras e certificação sanitária. Os estabelecimentos avaliados foram os laboratórios produtores de náuplios e pós-larvas e 07 fazendas de camarões no nordeste catarinense na safra compreendida nos meses de outubro de 2002 a julho de 2003. Os modelos utilizados são as duas principais doenças de notificação obrigatória e de maior impacto econômico para o continente americano: a Síndrome de Taura (TSV) e a Doença da Mancha Branca (WSSV). Os protocolos testados para extração de RNA e DNA com resultados eficazes foram: fenol/clorofórmio – álcool isoamílico e sílica/tiocianato de guanidina e método sílica/tiocianato de guanidina e TRIZOL Reagent®, GibcoBRL; resultado negativo foi com o protocolo DNAzol Reagent®, GibcoBRL Para os testes de detecção do vírus TSV e WSSV foram utilizadas técnicas de biologia molecular nas metodologias descritas na literatura. Não foi detectada reação positiva em nenhuma das amostras analisadas, o que não exclui a possibilidade da ocorrência dos vírus uma vez que são necessários 2 anos de testes consecutivos para ser considerada área livre.

Palavras chaves: **CAMARÕES MARINHOS, EPIDEMIOLOGIA, TSV, WSSV, PCR.**

ABSTRACT

The Brazilian shrimp production had been introducing increasing productivity during the last years, being the world record, with a projection of 8000 kg/ha/year in 2005. The increment of the cultivation and the negative potential impact of the illnesses can't be neglected. The important diseases of crustaceans are infectious. The presence of an infectious agent doesn't imply in the presence of the clinical illness, but the detection of the infection in the absence of the clinical illness is enough for the case to be found. In aquatic animals the host and the environmental influence in a significant way the degree in which an infection subclinical will be able to become clinical, or the survive animals to an infection will be able to become agent's vehicles for all their life. The polymerase chain reaction (PCR) can be used to the enzymatic amplification of nucleic acid sequences that are present in a little number, as in environmental samples. Allowing control actions and reducing your negative effects. In this work were evaluated the potentials epidemic risk proceeding the structural failures, barriers and sanitary certification. The establishments evaluated are laboratories producers from larvae and post-larvae and 07 shrimps farms in the northeast region of Santa Catarina State in the crop comprehended from October/2002 to July/2003. The models used are both compulsory notification main diseases and of larger economic impact for the American continent: Taura's Syndrome (TSV) and White Spot Disease (WSSV). The protocols tried for RNA and DNA extraction with effective results were: phenol/chloroform – isoamyl alcohol and sílic/tiocianate of guanidine and method sílic/tiocianate of guanidine and TRIZOL Reagent®, GibcoBRL; negative result was with the protocol DNazol Reagent®, GibcoBRL For the detection test of the TSV and WSSV virus were used techniques of molecular biology in the methodologies described in the literature. It wasn't detected positive reaction in none of the analyzed samples, but it doesn't exclude the possibility of the occurrence of virus once that are necessary 2 years of consecutive tests to be considered free area.

key words: **MARINE SHRIMPS, EPIDEMIOLOGY, TSV, WSSV, PCR.**

1 INTRODUÇÃO

1.1 AQUICULTURA MUNDIAL

1.1.1. PRODUÇÃO E VALORES TOTAIS DA AQUICULTURA MUNDIAL

Segundo dados publicados pela FAO (2003), no ano de 2001 foram produzidas 142,1 milhões de toneladas de pescados, oriundas tanto da pesca como da aquicultura. A aquicultura contribuiu com mais de 48,4 milhões de toneladas, ou o equivalente a US\$ 61,4 bilhões em receitas geradas. Entre 2000 e 2001, a produção aquícola mundial cresceu cerca de 6,0% ou o equivalente 6,3% em receitas geradas. A aquicultura mundial teve crescimento médio de 9,2% / ano desde 1970, enquanto que a pesca (captura) apresentou taxa de incremento de apenas 1,4%. De 1990 a 2001, o grupo que apresentou a maior taxa de variação relativa de incremento foi o de moluscos (212,1%), seguido pelos peixes (181,8%), plantas aquáticas (181,5%) e crustáceos (161,7%). Em relação às receitas geradas, os moluscos apresentaram taxa de incremento de 170,5%, seguido pelos crustáceos com 153,1%, peixes com 110,8% e plantas aquáticas com 96,3% (BORGHETTI et al., 2003).

A produção de crustáceos passou de 758 mil toneladas (US\$ 4,5 bilhões), em 1990, para 1,9 milhões de toneladas (US\$ 11,5 bilhões), em 2001. Sendo o quarto lugar em termos de produção, porém em terceiro lugar em relação às receitas geradas. A atividade experimentou crescimento de mais de 20% nos últimos 5 anos da década de 80, mas sofreu uma retração de cerca de 10% entre 1990-1996, devido principalmente às doenças virais e a uma série de problemas ambientais. As perspectivas para os crustáceos, do qual o *Penaeus monodon* FABRICIUS, 1798 responde sozinho por 50% da produção mundial, não são das mais otimistas. Já está havendo dificuldades para expansão das áreas cultiváveis por problemas sociais, poluição costeira e enfermidades. Na Ásia, há tendência de valorização dos cultivos semi-intensivos, em detrimento dos cultivos intensivos e, conseqüentemente de retração na produção de crustáceos nos próximos anos. Aproximadamente 1,7 milhões de toneladas foram produzidas na Ásia (Figura 1).

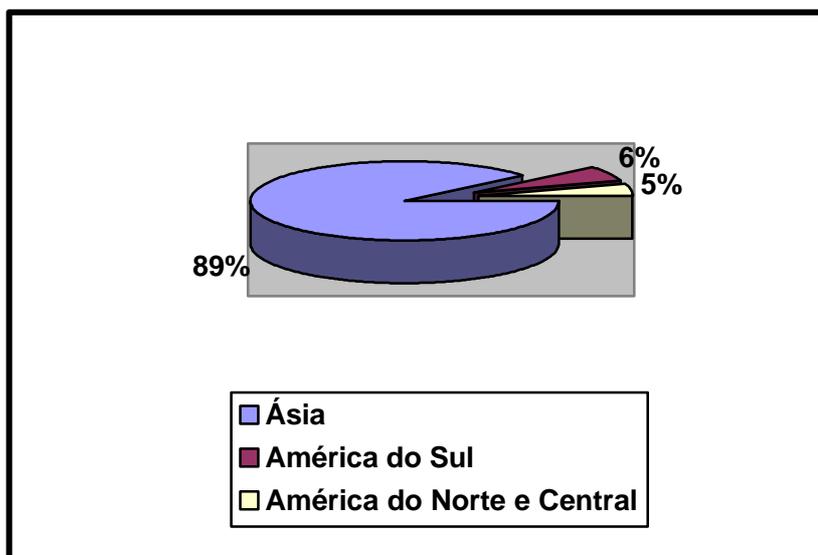


Figura 1. Participação relativa dos crustáceos cultivados na Aqüicultura mundial nos continentes, 2001 (FAO, 2003).

Quando para efeitos de comparação, a produção asiática é excluída das estatísticas, a América do Sul aparece como líder, com 120,4 mil toneladas, seguida da América do Norte e Central com 91,4 mil toneladas, a África com 5,8 mil toneladas e a Oceania com 5,1 mil toneladas (Figura 2).

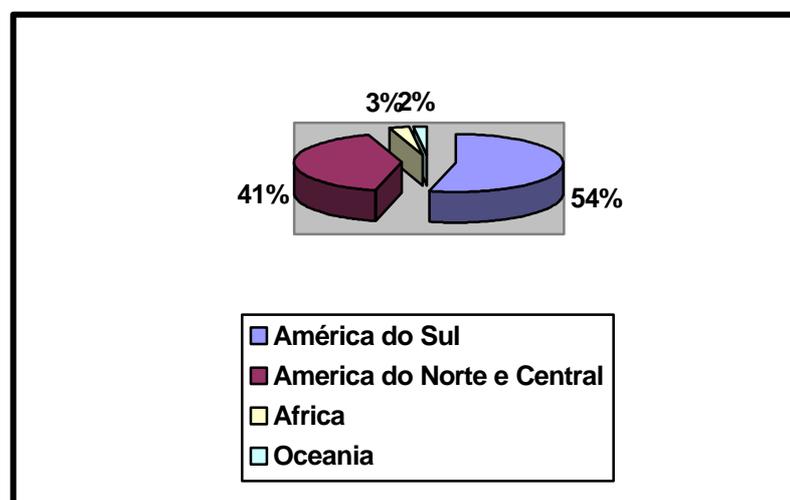


Figura 2. Participação relativa dos crustáceos cultivados na aqüicultura mundial, excluindo-se a Ásia – 2001 (FAO, 2003).

Dentre os crustáceos, o predomínio absoluto recaiu sobre os camarões marinhos, com 64,0% (1,2 milhões de toneladas) da produção. Em uma escala bem menor estão os crustáceos de água doce (lagostins e camarões) com 25,9% (514,4 mil toneladas) e os

caranguejos, que representam 8,3% (164,2 mil toneladas) da produção total de crustáceos (Tabela 1).

Tabela 1. Produção e receitas geradas dos principais crustáceos cultivados mundialmente - 2001 (FAO, 2003).

CRUSTÁCEOS	TONELADAS	US\$ MIL
Camarões	1.270.875	8.432.148,70
Crustáceos de água doce	514.451	2.324.729,00
Caranguejos	164.232	675.060,70
Diversos crustáceos marinhos	36.278	145.113,00
Lagostas	35	1.325,00
TOTAL	1.985.871	11.578.376,40

1.2 AQUÍCULTURA NAS AMÉRICAS

A produção aquícola na América do Sul apresentou taxas praticamente contínuas de crescimento. No entanto, a atividade se mostra vulnerável a problemas sanitários, como aconteceu em 1999, com uma queda de 4,3% na produção aquícola continental em função de doenças virais que comprometeram a produção equatoriana de camarões. Na América do Sul, o principal produtor foi o Chile, que dominou a produção aquícola com 62,9% (631,6 mil toneladas); o Brasil com 20,9% (210,0 mil toneladas); Equador com 6,8% (67,9 mil toneladas); Colômbia com 6,5% (65,0 mil toneladas) e Venezuela com 1,7% (16,6 mil toneladas). Estes cinco países produziram o equivalente a 98,8 % (991,2 mil toneladas) do total sul-americano produzido (1,0 milhão de toneladas) e 2,0% da produção mundial da aquíicultura (48,4 milhões de toneladas) no ano de 2001 (FAO, 2003).

Das 63 espécies de organismos aquáticos cultivados na América do Sul em 2001, as 10 primeiras responderam por cerca de 84,9% (853,3 mil toneladas) da produção total em 2001 (1,0 milhão de toneladas) (FAO, 2003). As 10 principais espécies em valor comercial contribuíram com 85,8% (US\$ 2,8 bilhões) do valor total obtido no mesmo ano (US\$ 3,3 bilhões).

1.3 AQUICULTURA NO BRASIL

O Brasil tem 8.500 km de costa marítima que abrange uma Zona Econômica Exclusiva de 4,3 milhões de km², possui 12% do total da reserva de água doce do planeta e mais 2 milhões de ha de terras alagadas além de clima favorável. O grande potencial do Brasil para a produção de pescado ainda não foi realizado, principalmente no que se refere à aquicultura marinha e de água doce. O valor gerado pelo setor pesqueiro do Brasil no seu nível primário representa apenas 0,4% do PIB nacional. A evolução dos componentes que integram a indústria do pescado no Brasil está demonstrada nos números discriminados na Tabela 2 (ROCHA, 2003).

Tabela 2. Evolução brasileira de pescado (aquicultura e captura) por categorias, em 1000 toneladas (Fonte: IBAMA, 2002, apud Rocha, 2003).

Ano	Extrativa Costeira	%	Continental	%	Oceânica	%	Aquicultura	%	TOTAL
1994	469,02	64,38	203,22	27,90	24,23	3,33	32,00	4,39	728,47
1995	391,41	59,95	193,04	29,36	22,26	3,41	46,20	7,08	652,91
1996	394,56	56,92	210,34	30,34	27,62	3,98	60,72	8,76	693,18
1997	433,09	59,14	178,87	24,43	32,63	4,46	87,67	11,97	732,26
1998	419,00	57,79	173,00	23,86	40,00	5,52	93,00	12,63	725,00
1999	403,00	54,09	158,90	21,33	44,00	5,91	139,10	18,67	745,00
2000	406,00	47,21	226,00	26,51	54,00	6,28	172,00	20,00	860,00
2001	410,00	45,61	223,00	24,81	62,00	6,90	204,00	22,69	899,00
2002	420,00	42,64	230,00	26,53	75,00	7,61	260,00	26,40	985,00

A oferta de pescados oriundos das atividades da pesca e aquicultura cresceu apenas 35,2% no período de 1994 a 2002, o que, definitivamente, não contribuiu para melhorar o consumo per capita no Brasil, que é baixo. Em termos globais, a oferta derivada da pesca extrativista (marinha e de água doce) apresentou declínio de 7,2% no período de 1900 a 2002. O volume de captura da pesca oceânica brasileira, cuja participação é de apenas 7,6% da produção total de pescados cresceu 209,53% no período de 1994 a 2002. Por sua vez a aquicultura revela crescimento extraordinário no período de 1994 a 2002 (712,5%), elevando sua participação na produção de pescados do Brasil de 4,39% para 26,4% em 2002 (ROCHA,2003).

A indústria do pescado no Brasil, se considerado o potencial do país para a pesca e para a aquicultura, tanto de água marinha como de água doce, apresenta atualmente um programa de desenvolvimento que varia apreciavelmente entre os seus dois grandes componentes: a pesca, revelando sintomas de estagnação, e a aquicultura, mostrando expansão vigorosa. Por sua vez, dentro de cada um destes componentes são encontrados segmentos produtivos específicos que registram consideráveis variações de desempenho, o que, em termos globais, cria dificuldades para que seja estabelecida uma visão global clara das reais perspectivas de médio e longo prazo da indústria de pescado nacional como um todo (ROCHA, 2003).

1.3.1 A HISTÓRIA DA CARCINICULTURA NO BRASIL

A carcinicultura teve início no Brasil entre os anos de 1972 e 1974, quando a empresa Ralston Purina, juntamente com um grupo de pesquisadores da Universidade Federal de Pernambuco desenvolveram, na Ilha de Itamaracá, estudos com diversas espécies de camarões pertencentes à família Penaeidae. A espécie que se saiu melhor nesses testes foi *Litopenaeus vannamei* (PEREZ-FARFANTE, I. & KENSLEY, B., 1997). Mas como essa era uma espécie exótica, não podendo haver captura de reprodutores na natureza, a empresa decidiu iniciar programas comerciais de produção no Panamá, onde criou a Agromarina do Panamá. Naquele país tanto em função do clima favorável, quanto da disponibilidade de pós-larvas na natureza ou produzidas em laboratórios, comprovou-se a viabilidade do cultivo comercial da espécie. A transferência das pesquisas de Pernambuco para o Panamá, somada ao sigilo que a empresa exigia em relação às informações de valor comercial, impediram que os pesquisadores e as instituições públicas e privadas brasileiras tivessem acesso aos resultados do cultivo realizado no Panamá. A manutenção desse segredo comercial acarretaria atraso de cerca de 20 anos no desenvolvimento da carcinicultura brasileira. A partir do uso de *Marsupenaeus japonicus* (BATE, 1888) na época denominada cientificamente de *Penaeus japonicus*, foi montada a primeira fazenda comercial brasileira, em 1975, a CIRNE, no Rio Grande do Norte. Optou-se, na ocasião, por um sistema de produção bastante extensivo e pouco tecnificado, com 0,5 a 1 camarão/m². Os camarões não eram alimentados com nenhum tipo de dieta artificial, dependendo unicamente da disponibilidade de alimentos naturais existentes nos viveiros de cultivo (BORGHETTI et al., 2003).

Entre 1982 e 1984, o Governo Federal, por meio da extinta Superintendência para o Desenvolvimento da Pesca (SUDEPE), em parceria com o Banco Nacional de Crédito Cooperativo (BNCC) e com o Banco Interamericano de Desenvolvimento, financiou cerca de US\$ 22 milhões em projetos de produção de camarões. Como os recursos eram financiados a custo bastante subsidiados, um grande número de pessoas e empresas manifestaram interesse em obter financiamento. Para disciplinar o processo de escolha dos beneficiários desses recursos, o Governo Federal estabeleceu uma série de requisitos técnicos para o credenciamento e seleção dos interessados. Dois desses critérios se revelaram particularmente trágicos para o sucesso do programa: a obrigatoriedade do uso da espécie *M. japonicus* nos cultivos a serem suplementados e a obrigatoriedade de instalação de um laboratório de produção de pós-larvas em cada um dos 16 projetos financiados. A espécie citada mostrou uma reduzida adaptabilidade às condições de cultivo no país. Em primeiro lugar, porque ela exige dietas ricas em proteína animal. Como não havia rações com tais características no país, as taxas de mortalidade, via de regra, foram muito elevadas em praticamente todos os cultivos realizados. O segundo problema tinha a ver com a produção de pós-larvas. As normas de financiamento exigiam a construção de laboratórios pelos tomadores de empréstimos públicos. Entretanto, as fazendas eram sempre construídas em zonas estuarinas, com elevadas concentrações de matéria orgânica particulada e baixa salinidade. A espécie *M. japonicus*, durante praticamente todo o seu ciclo de vida, mas particularmente durante a fase de reprodução, necessita de águas marinhas extremamente limpas e de elevadas salinidades para se desenvolver. Apenas um dos projetos financiados, justamente o maior deles, o da Fazenda Maricultura da Bahia, localizado no Município de Valença, obteve autorização para empregar uma outra espécie, o camarão branco do Pacífico, *L. vannamei*. A Fazenda Maricultura testou cinco espécies de camarões: *L. vannamei*, *Litopenaeus stylirostris* (STIMPSON, 1874), *Farfantepenaeus penicillatus* (ALCOCK, 1905), *Litopenaeus schmitti* (PEREZ-FARFANTE, I. & KENSLEY, B., 1997) e *P. monodon*, visando alcançar um padrão de produção constante durante o ano. Dessas, a produção logo passou a ser centrada exclusivamente em *L. vannamei*. Essa foi a fazenda brasileira mais produtiva da década de 80 sendo o único dos 16 projetos financiados que se mantém funcionando até os dias atuais. Só a partir de 1992, com a divulgação dos resultados de um longo trabalho realizado pela empresa Aquatec, do Rio Grande do Norte, é que os cultivos de *L. vannamei* começaram a se popularizar, após ficar constatado que os níveis de produtividade obtidos com essa espécie eram sistemática e

significativamente superiores aos obtidos com qualquer uma das demais espécies cultivadas até então no país (BORGHETTI et al., 2003).

A introdução e a utilização do *L. vannamei* em cultivos comerciais foi realmente um fator revolucionário para a carcinicultura brasileira. Em 2001, o contingente de mão de obra empregada na cadeia produtiva da carcinicultura brasileira chegava a quase 60.000 pessoas. A produção nacional chegou a cerca de 40.000 ton, a área cultivada a 8.500 ha e a produtividade média a mais de 4.700,00 kg/ha/ano, colocando o Brasil como líder mundial em produtividade, Tabela 3 (BORGHETTI et al., 2003).

Tabela 3. Evolução da área, produção e produtividade dos cultivos de camarões marinhos no Brasil – 1996/2001 (Fonte: ABCC, 2001 e 2002).

CAMARÕES						
MARINHOS	1996	1997	1998	1999	2000	2001
Área (ha)	3.200	3.548	4.320	5.200	6.250	8.500
Produção (t)	2.880	3.600	7.250	15.000	25.000	40.000
Produtividade (kg/ha/ano)	900	1.015	1.680	2.885	4.000	4.705

1.3.2 A CARCINICULTURA NO BRASIL

Há um consenso nacional de que o Brasil oferece amplas e variadas alternativas para o desenvolvimento vigoroso de sua aquicultura, tanto marinha quanto de água doce. Atualmente, em termos comerciais, o camarão marinho cultivado é o principal segmento da aquicultura brasileira cuja produção, em 2002, foi de 60.128 ton, em sua maior parte para exportação, seguido do cultivo da tilápia com 45.000 ton destinadas basicamente ao mercado nacional, e pela maricultura de ostras e mexilhões em Santa Catarina, com oferta anual de 1,1 milhão de dúzias de ostras e 11.000 ton de mexilhões para consumo doméstico. O desempenho do cultivo de camarão marinho no período 1998/2002 revela cifras extraordinárias de crescimento. A produtividade média nacional cresceu de 1.680 kg/ha em 1998 para 5.548 kg/ha em 2002, posicionando o Brasil em primeiro lugar entre todos os países produtores neste indicador de eficiência tecnológica (BORGHETTI et al., 2003).

A Figura 3, além das cifras de 1998/2002, mostra as projeções do agronegócio até 2005, ano em que o Brasil planeja chegar a uma produtividade de 8.000 kg/ha/ano. O

modelo brasileiro se caracteriza pelo uso de um sistema semi-intensivo de produção, com o uso limitado de recursos naturais (água e solo) e tecnologia voltada para a produtividade e a sustentabilidade ambiental (BORGHETTI et al., 2003).

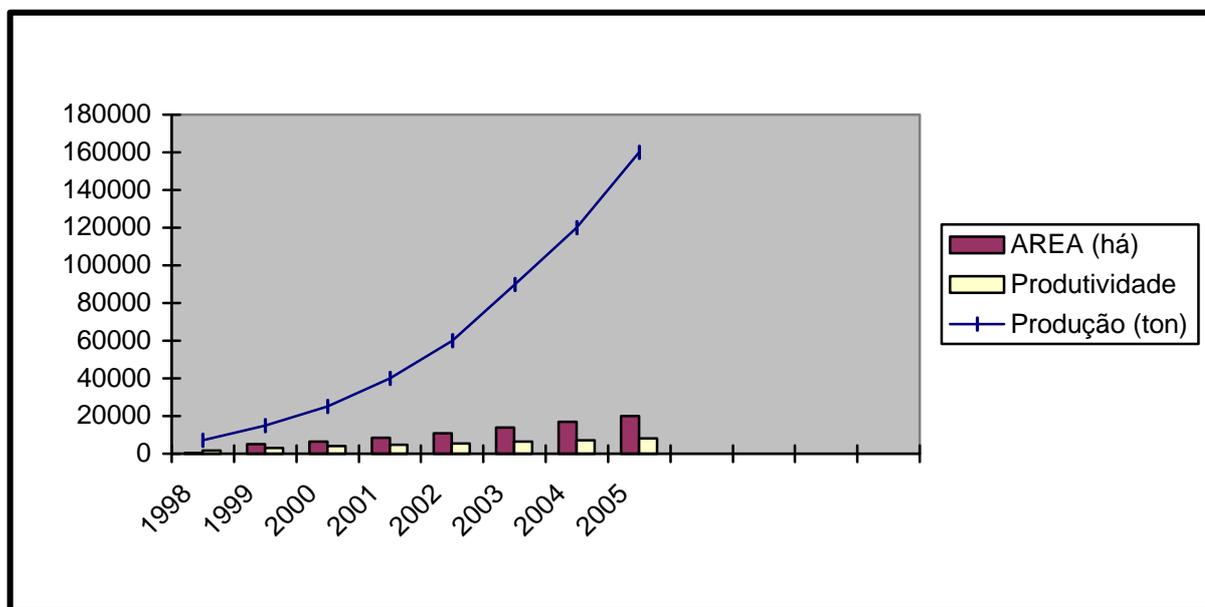


Figura 3. Evolução da produção brasileira de camarão cultivado (BORGHETTI et al., 2003).

Duas características importantes marcam ainda o crescimento do cultivo do camarão marinho no Brasil: a participação do pequeno produtor, que em número representa 75% do total, e a geração de 3,75 empregos diretos e indiretos por hectare em produção, segundo estudo do Departamento de Economia da UFPE. Esta cifra coloca o camarão como o produto mais importante do setor agropecuário da região Nordeste, já que supera a fruticultura irrigada da uva (2,14 empregos/ha), até então o segmento mais dinâmico na geração de empregos do setor primário brasileiro. Em relação à produção anual e captação de divisas, a figura 3 destaca a participação do camarão cultivado, que passou de 7.250 ton e US\$ 2,8 milhões em 1998 (primeiras exportações) para 60.128 ton e US\$ 155,0 milhões em 2002 (BORGHETTI et al., 2003).

No período de janeiro a novembro de 2003, as exportações de camarão cultivado já superaram US\$ 210,4 milhões, de um total de US\$ 228,3 milhões. O valor das divisas captadas pelo camarão cultivado, em 2002, coloca o produto em segundo lugar na pauta das exportações do setor primário da economia da região nordeste, logo depois da tradicional cana de açúcar e a frente de setores dinâmicos como a fruticultura irrigada da região. As projeções do setor para 2003 apontam cifras bastante expressivas em termos de

exportações, 60.000 ton e US\$ 220 milhões. Para 2005, as cifras projetadas para exportação são, respectivamente de 120.000 ton e US\$ 600,0 milhões (BORGHETTI et al., 2003).

As principais restrições ao desenvolvimento do cultivo de camarão marinho no Brasil são basicamente a exportação do produto matéria prima, com restrições de mercado cada vez maiores para este tipo de camarão; carência de investimentos em ciência e tecnologia nas áreas de nutrição e prevenção de doenças; falta de linhas de financiamento para o custeio da produção; restrições e deficiências de ação “antidumping”. Entretanto, no que concerne às perspectivas futuras de médio prazo para o camarão marinho cultivado, os seguintes elementos estarão em evidência mediante ações e projetos: disponibilização de linhas de crédito para investimentos e custeio; selo de qualidade para o camarão brasileiro cultivado; elaboração do produto com agregação de valor ao camarão cultivado; ênfase aos programas de sustentabilidade ambiental e compromisso social; maior apoio aos programas de ciência e tecnologias, especialmente na genética, nutrição e biossegurança e marketing, promoção e abertura de novos mercados (BORGHETTI et al., 2003).

1.4 O CAMARÃO BRANCO DO PACÍFICO (*Litopenaeus vannamei*)

De acordo com a classificação de PEREZ-FARFANTE, I.& KENSLEY, B. (1997), temos a seguinte classificação:

Filo	Arthropoda
Sub filo	Crustacea
Classe	Malacostraca
Sub classe	Eumalacostraca
Superordem	Eucarida
Ordem	Decapoda
Subordem	Dendrobranchiata
Superfamília	Penaeoidea
Família	Penaeidae
Gênero	<i>Litopenaeus</i>
Espécie	<i>Litopenaeus vannamei</i>

As figuras 4 e 5, mostram a anatomia externa e interna do camarão.

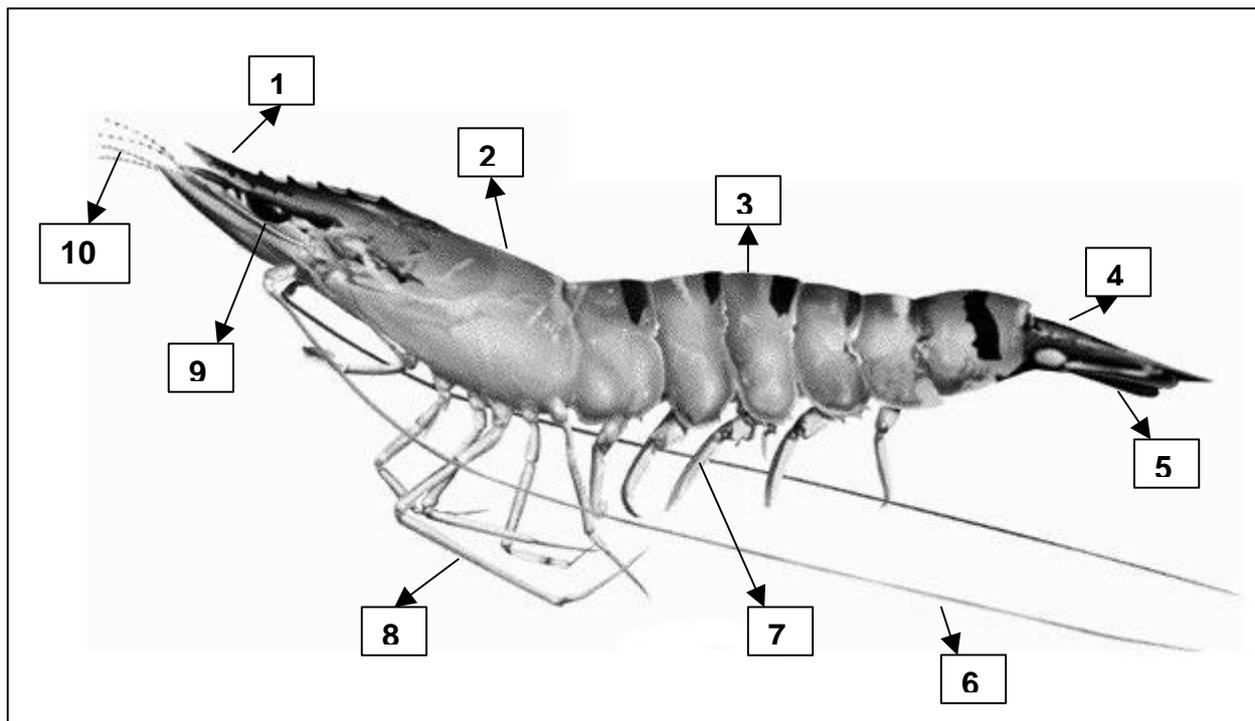


Figura 4. Anatomia externa do camarão. 1 - rostro, 2 - carapaça, 3 - segmentos abdominais, 4 - telso, 5 - urópodo, 6 - antena flagelo, 7 - pleópodos, 8 - pereópodos, 9 - olhos, 10 - antênula. (WAS 1999).

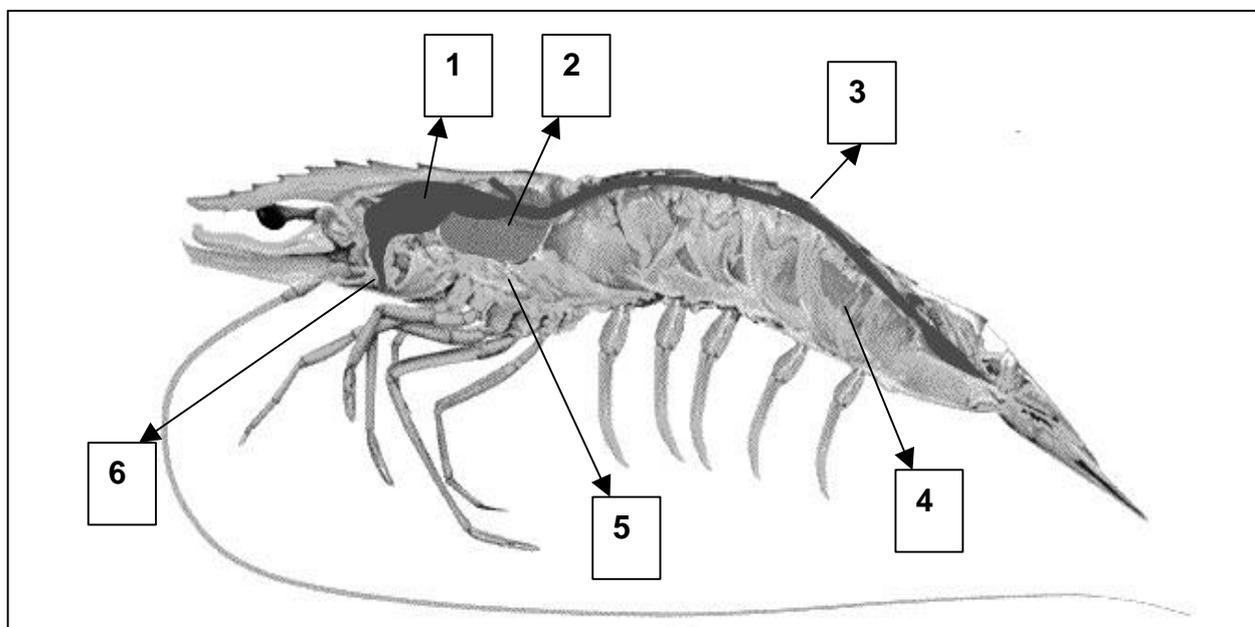


Figura 5. Anatomia interna do camarão. 1 - sistema digestivo, 2 - hepatopâncreas, 3 - intestino, 4 - musculatura abdominal, 5 - brânquias, 6 - boca. (WAS 1999).

As fases e estágios de desenvolvimento do camarão estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Estágios larvais do camarão compreende as fases de (BARBIERI JUNIOR e OSTRENSKY NETO, 2001)

Estágio	Nº de sub estágios	Identificação
Naúplio	5 a 6	N _I , N _{II} , N _{III} , N _{IV} , N _V
Protozoa	3	Z _I , Z _{II} e Z _{III}
Misis	3	M _I , M _{II} e M _{III}
Pós-larva	Indefinido	PL ₁ , PL ₂ , PL ₃ ... PL ₂₅

Seu habitat natural compreende a região do leste do Pacífico, de Sonora no México até Tumbes, Norte do Peru. Seu cultivo responde por 20% da produção mundial, cerca de 140.000 toneladas anuais (BARBIERI JUNIOR e OSTRENSKY NETO, 2001)

1.5 TÉCNICAS DE DETECÇÃO DE PARTÍCULAS VIRAIS

Por muitos anos a microscopia eletrônica foi a única técnica disponível para estudo dos vírus não-cultiváveis e hoje permanece como opção técnica para exame de amostras clínicas. Contudo a microscopia eletrônica é relativamente insensível, requerendo na ordem de um milhão de partículas para visualização dos vírus. Este número pode ser obtido em amostras clínicas como fezes, mas raramente estará presente em alimentos contaminados. Além disso este método não é prático para ser aplicado em análises de rotina (LEES, 2000).

As metodologias desenvolvidas para a detecção viral refletem a evolução do conhecimento nesta área, que começou com o isolamento de vírus por indução da doença em animais de laboratório, detecção do efeito citopático viral *in vitro* nas culturas celulares, passando por metodologias imunológicas e moleculares para a detecção de material genético viral (METCALF et al., 1995). Durante os últimos 20 anos, vem sendo desenvolvidos vários métodos de concentração e de extração viral a partir de águas e de tecidos contaminados, muitos deles sujeitos a modificações, com o objetivo de aumentar a eficácia da recuperação viral e da detecção de quantidades mínimas virais, além de minimizar o efeito citotóxico e eliminar os inibidores das reações de amplificação gênica (SOBSEY, 1987; LEWIS and METCALF, 1988; SCHWAB et al., 1995; TRAORE et al., 1998).

A detecção de vírus envolve a extração viral dos tecidos do animal hospedeiro e a concentração viral (TRAORE et al. 1998). Métodos convencionais para isolamento e identificação de vírus por ensaios de cultura celular são bastante limitados, principalmente devido a falta de sensibilidade na detecção de baixa quantidade de vírus normalmente encontrados em amostras ambientais. Além disso exige um tempo prolongado de análise, alto custo, ocorrendo ainda a falta de linhagens de células ao cultivo *in vitro* de vários vírus de interesse (SUÑEN & SOBSEY, 1999).

A técnica de quantificação de partículas virais por formação de placas de lise (*plaque assay*) ainda é um método extremamente utilizado na quantificação de vírus que podem ser replicados *in vitro*. Experimentos que utilizam a semeadura experimental de amostras de água ou frutos do mar para posterior detecção por métodos moleculares utilizam esta técnica para determinar a porcentagem de recuperação das partículas virais ao longo do processo de concentração (GAJARDO et al., 1995; GRINDE et al., 1995). Este método, apesar de ser sensível e detectar partículas virais viáveis, requer de 3 a mais de 6 semanas dependendo da linhagem viral e da célula hospedeira utilizada (SOBSEY, 1982 e 1989) necessitando que os vírus já estejam adaptados ao cultivo *in vitro* para dar bons resultados (IJZERMANN et al., 1997).

A PCR oferece a melhor alternativa para o desenvolvimento de testes sensíveis e específicos para a detecção de vírus rotineiramente difíceis de identificar. A carne dos crustáceos representa uma matriz muito complexa quimicamente, contendo muitos compostos que podem interferir na eficiência da PCR, como carboidratos complexos (particularmente glicogênio sendo o principal interferente) (HURST et al., 1997). Solutos orgânicos e inorgânicos podem inibir as enzimas polimerases (transcriptase reversa e *Taq* polimerase). Nucleases e proteases podem também degradar o genoma do vírus antes que ele seja amplificado. Além disso, várias proteínas, carboidratos e outros compostos orgânicos podem se ligar aos íons magnésio e nucleotídeos requeridos pelas polimerases e alguns solutos podem ser tóxicos para estas polimerases (KOPECKA et al., 1993; WILSON, 1997). Os autores também destacam que uma revisão das metodologias existentes demonstrou que nenhuma delas é igualmente efetiva para produtos marinhos de diferentes lugares geográficos, sugerindo que os ensaios devem ser previamente realizados em condições laboratoriais, antes de serem aplicados para amostras de campo. O tipo de inibidores enzimáticos pode diferir com a espécie de animal, potencialmente restringindo o uso de alguns métodos para uma única espécie. O tipo e concentração de inibidores

enzimáticos também podem diferir de acordo com a estação de coleta e localização geográfica (HURST et al., 1997).

Apesar da extração direta de ácidos nucléicos ser geralmente um procedimento mais simples, ocorre destruição da integridade das partículas virais durante este processo, deixando o ácido nucléico viral desprotegido e exposto à potencial degradação, além de destruir a infectividade viral, impedindo a comparação com experimentos de infectividade em culturas celulares (HURST et al., 1997).

Um método alternativo para a extração de RNA tem sido proposto e envolve o isolamento dos vírus direto de amostras ambientais e extratos de tecidos pela técnica de imuno-captura dos vírus, desprendimento do RNA por aquecimento e subsequente RT-PCR (JANSEN et al., 1990; JOTHIKUMAR et al., 1998). Uma dificuldade encontrada na RT-PCR é que a maioria dos métodos limitam a sensibilidade da análise desde o início porque mesmo que seja utilizada uma grande quantidade de amostra, equivalente a 50g, é necessário extrair alíquotas de pequenos volumes e produzir um concentrado que tenha simultaneamente pequeno volume e baixa concentração de inibidores enzimáticos.

1.5.1 RELAÇÃO DA VIRULÊNCIA E DOSE INFECCIOSA

Refere-se a capacidade de um vírus de causar a doença em um hospedeiro infectado e depende de fatores relacionados ao vírus, ao hospedeiro e ao ambiente. Somente quando todos estes fatores relacionados forem favoráveis, ocorrerá infecção e doença, sendo que cerca de um terço (1/3) dos indivíduos que entrarem em contato com uma cepa viral patogênica vão adquirir a doença (SNIESZKO, 1973). A virulência de uma única cepa viral pode variar dramaticamente dependendo da dose e rota de infecção, viabilidade das partículas virais e fase infectiva do vírus, bem como sobre aspectos relacionados ao hospedeiro, tais como espécie, idade, susceptibilidade, imunidade. Fatores relacionados ao ambiente referem-se as condições ambientais que influenciam na estabilidade do vírus, ou na sua capacidade de virulência e também a fatores que possam predispor o hospedeiro e torná-lo mais susceptível ao vírus, Figura 6 e 7 (SNIESZKO, 1973). A susceptibilidade do hospedeiro a doença viral depende de fatores genéticos (receptores das células para o vírus, fatores hormonais) e não-genéticos (estresse, produção de radicais livres, dano celular que causa maior susceptibilidade) (FLINT et al., 2000).

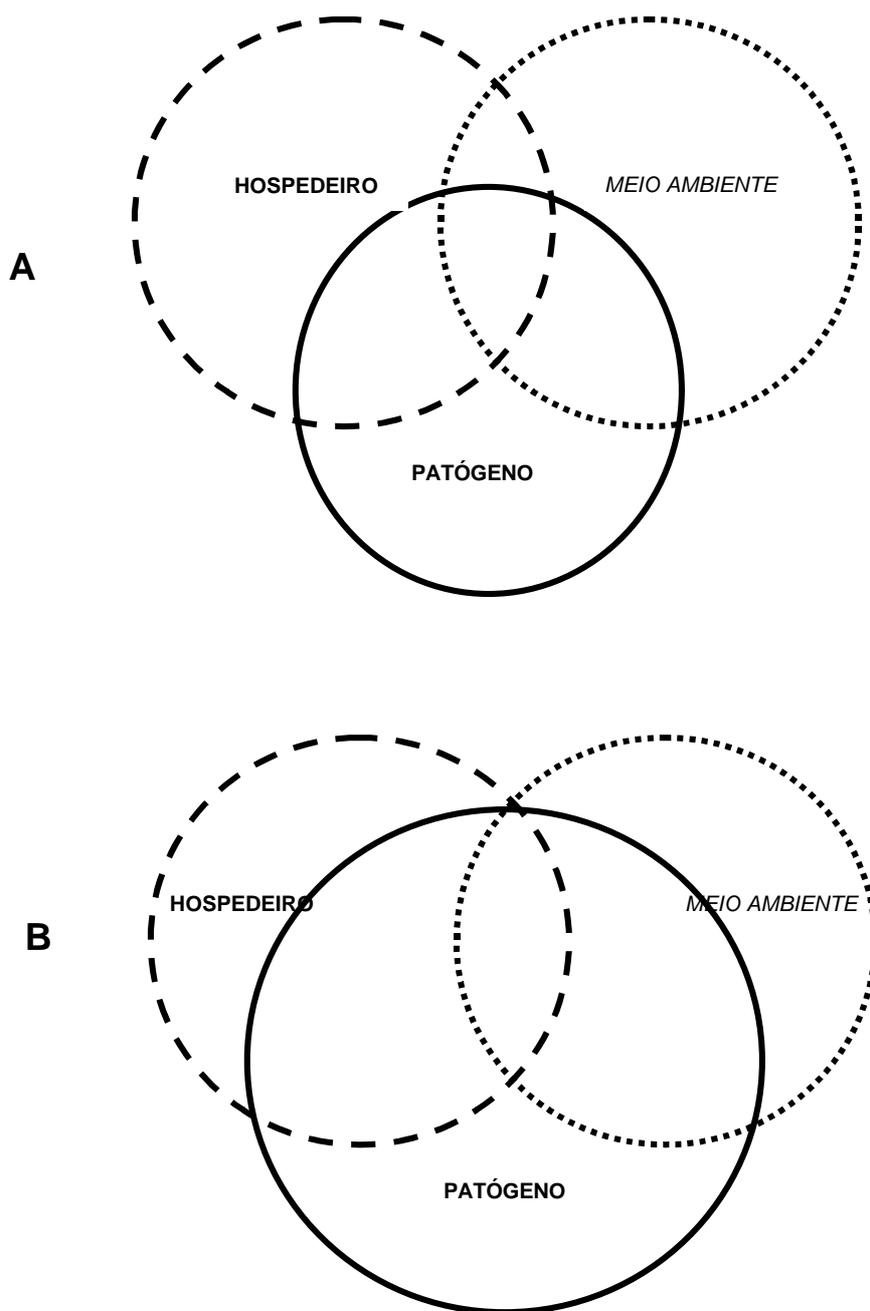


Figura 6

A. A intersecção das esferas ilustra o conceito de hospedeiro, patógeno e meio ambiente; a interação destes fatores determinam a doença na sobreposição das áreas das figuras correspondentes a cada um destes fatores. Quando o tamanho da área ou efeito de um destes fatores é aumentado como a virulência do patógeno, presença de múltiplos patógenos, perturbações ambientais, ou desequilíbrio nutricional, ocorre a manifestação da doença na sua forma clínica (SNIESZKO, 1973).

B. Ilustra o efeito de um patógeno altamente virulento (SNIESZKO, 1973).

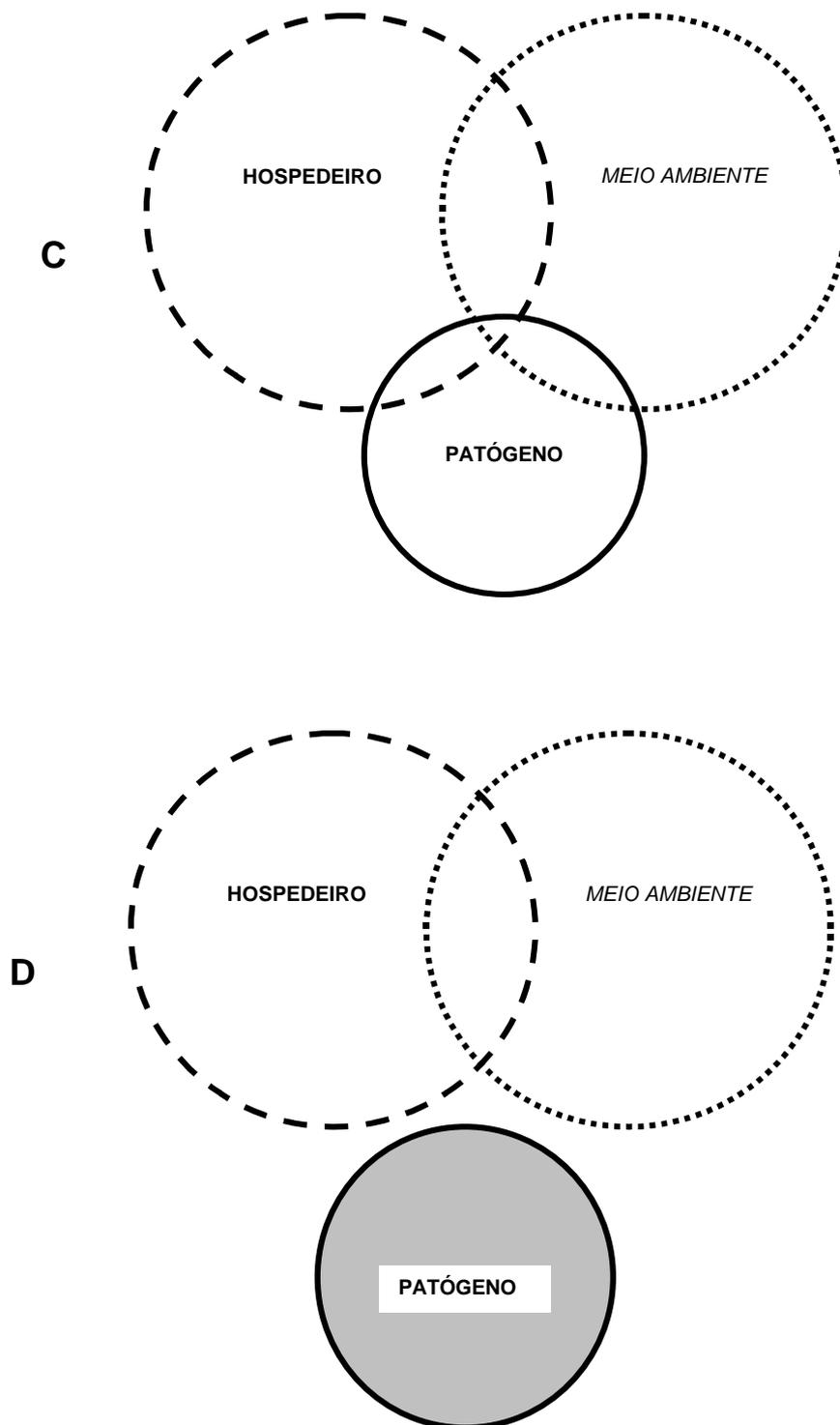


Figura 7

C. Ilustra o efeito de um patógeno com baixa virulência (SNIESZKO, 1973).

D. Ilustra o conceito de SPF (*specific pathogen free*) quando não está presente o patógeno (SNIESZKO, 1973).

1.6 DOENÇAS NA CARCINICULTURA

Na carcinicultura, enfermidade significa qualquer alteração adversa na saúde ou no desempenho de camarões ou populações de camarões cultivados. No cultivo, as enfermidades são desencadeadas quando ocorre desequilíbrio entre as condições ambientais do viveiro, o estado de saúde dos camarões cultivados e os agentes potencialmente patogênicos. As enfermidades infecciosas são causadas por patógenos transmissíveis (vírus, bactérias, protozoários e fungos), enquanto as não infecciosas são resultantes de agentes abióticos (efeitos nutricionais, genéticos, ambientais e físicos). Sob uma situação de desequilíbrio no ambiente de cultivo, os camarões são submetidos a uma condição de estresse, gerando uma alteração em seu estado imunológico. Nessas circunstâncias, a população cultivada pode sofrer um ataque de patógenos levando os indivíduos à debilitação ou a morte (NUNES e MARTINS, 2004).

Inúmeros fatores ambientais podem desencadear o processo infeccioso nos camarões marinhos. Temperaturas e pH extremos, baixas concentrações de oxigênio dissolvido, mudanças abruptas na salinidade e presença de substâncias tóxicas são elementos associados a um desequilíbrio no ambiente. A propagação de bactérias patogênicas oportunistas (*Vibrio* sp., *Aeromonas* spp.), a proliferação de protozoários (*Zoothamnium* spp. e gregarinas), a captação de água contaminada, a aquisição de pós-larvas com alta carga viral e a presença excessiva de microalgas (dinoflagelados e cianofíceas) também geram efeitos deletérios na saúde dos camarões.

Segundo Maciel (2002) o incremento no cultivo de camarão marinho e o impacto negativo potencial das enfermidades não podem ser subestimados ou simplesmente negligenciados. O ingresso de uma enfermidade representa perdas inestimáveis, desde o ponto de vista do produtor que perde sua renda até as campanhas de controle e erradicação que oneram os cofres públicos. Qualquer enfermidade representa aumento no custo de produção e decréscimo em produtividade.

Como exemplo atual entre os animais terrestres pode-se citar a febre aftosa, que teve seu ingresso no Brasil em 1879, isto é, antes da abolição da escravatura. Portanto, há mais de um século esta enfermidade assola o rebanho susceptível e reflete em outros setores da economia. A prevenção e o controle das enfermidades representam importantes recursos com que os Serviços Veterinários da Defesa Sanitária fazem uso no propósito de reduzir os danos sócio-econômicos resultantes de desastres sanitários, devendo ser salientado que o

custo da prevenção é muito inferior ao custo do controle e da erradicação das enfermidades (MACIEL, 2002).

Diferente das espécies terrestres, o conhecimento relativo às enfermidades de animais aquáticos é ainda limitado. Além disso, a sensibilidade dos diferentes métodos de diagnóstico não foi ainda suficientemente estudada e há pouca capacidade de erradicação das enfermidades, uma vez tenham sido as mesmas estabelecidas em áreas de cultivo. Conseqüentemente, programas de prevenção e controle de enfermidades tornam-se de fundamental importância a nível mundial, de modo a manter o cultivo de camarão marinho como uma atividade ecológica e economicamente sustentável (KESTEMONT, 1995; BACHÈRE, 2000; RODRIGUEZ & MOULLAC, 2000; PÁEZ-OSUNA, 2001).

Com a finalidade de se evitar o ingresso de enfermidades que cursam em países latino-americanos e outros, o Ministério da Agricultura, através da Instrução Normativa nº 39, da Secretaria de Defesa Agropecuária, publicada no Diário Oficial da União em 8 de novembro de 1999, suspende temporariamente o ingresso, em todo o território nacional, de todas as espécies de crustáceos de água doce ou salgada, em qualquer estágio biológico, tanto frescos como congelados. Os laboratórios de produção de pós larvas e as fazendas são susceptíveis à doenças de diversas etiologias como protozoários, fungos, bactérias e substâncias tóxicas, mas as enfermidades causadas por vírus são aquelas que provocam atualmente as maiores perdas e prejuízos (PÁEZ-OSUNA, 2001).

Os crustáceos são afetados por grande número de doenças. Estas são especialmente evidentes em camarões peneídeos de cultivo. Todas as doenças de crustáceos que tem significância social e econômica são doenças infecciosas. As doenças de crustáceos e seus agentes etiológicos que estão listadas no *International Aquatic Animal Health Code* (the *Code*) tem restrição de áreas geográficas, não há terapias curativas, são potencialmente excludentes e são de grande impacto social e econômico. A lista das doenças de crustáceos para notificação e certificação sanitária são três, as Doenças de Notificação Obrigatória para a OIE (Tabela 05), e cinco Outras Doenças Importantes (Tabela 06). Sete destas oito doenças são listadas pela OIE por causa da importância no setor da indústria do cultivo de camarões (OIE, 2003).

Tabela 5. Doenças em crustáceos de notificação obrigatória para OIE.

Doença	Agente etiológico	Principal hospedeiro
“ Taura syndrome ”	Viral	Camarões peneídeos
“ White spot disease ”	Viral	Camarões peneídeos e outros crustáceos decápodos
“Yellowhead disease”	Viral	Camarões peneídeos

Tabela 6. Doenças em crustáceos importantes para OIE.

Doença	Agente etiológico	Principal hospedeiro
“Baculoviral midgut gland necrosis”	Viral	Camarões peneídeos
“Nuclear polyhedrosis baculoviroses” (<i>Baculovirus penaei</i> e <i>Penaeus monodon</i> -type baculovirus)	Viral	Camarões peneídeos
“Infectious hypodermal and haematopoietic necrosis” – IHHN	Viral	Camarões peneídeos
“Crayfish plague” (<i>Aphanomyces astaci</i>)	Fungo	Freshwater crayfish
“Spawner – isolated mortality virus disease”	Viral	Camarões peneídeos

As enfermidades na carcinicultura são categorizadas sob três níveis, baseando-se no seu nível de patogenicidade e perigo para a indústria do camarão (Figura 8). A categoria 3 envolve os patógenos que causam um mínimo impacto à produção, contudo podem gerar deformidades e alterações na aparência física dos camarões. Na categoria 2 estão os patógenos que causam ameaça a produção, podendo afetar a produtividade dos cultivos e o crescimento e sobrevivência dos camarões. A categoria 1 inclui os patógenos que causam mortalidade em massa em populações cultivadas de camarões, representando uma ameaça a sobrevivência da indústria em uma determinada área geográfica. É nesta categoria onde está inclusa a maioria das doenças dos camarões marinhos (NUNES e MARTINS, 2004).

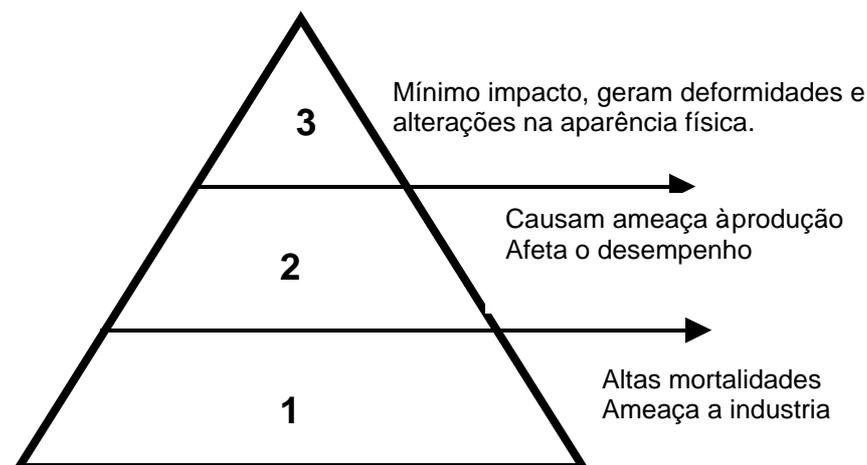


Figura 8. Classificação dos tipos de patógenos que afeta a indústria de cultivo de camarão marinho (NUNES e MARTINS, 2004).

Uma série de parâmetros deve ser considerada quando o estado de saúde de camarões é avaliado na fazenda. Além da aparência física e comportamento dos animais, são também analisadas as variáveis de produção (conversão, produção/ha/ano), as características populacionais do estoque cultivado e a qualidade dos parâmetros ambientais ao longo do cultivo. As estimativas da taxa de sobrevivência ou de mortalidade, o peso corporal e sua homogeneidade e a taxa de crescimento são os índices mais sensíveis a alterações adversas na condição de saúde da população cultivada (NUNES e MARTINS, 2004).

1.6.1 DOENÇAS VIRAIS NA CARCINICULTURA

Cerca de 60% das enfermidades do homem e dos animais são atribuídas aos vírus. Os vírus são macromoléculas de forma e organização variável que se compõem de nucleoproteínas. Os componentes obrigatórios estruturais de um vírus são proteínas e um tipo de ácido nucleico, o DNA (ácido desoxirribonucléico) ou RNA (ácido ribonucleico). Muitos vírus possuem ainda outras estruturas como a membrana envolvente. O seu tamanho varia de 18 a 300 nm. As diferenças são seus formatos, que podem ser cúbicos, helicoidais, de constituição simples, encapsulados ou não. Os vírus que infectam os animais de sangue quente (homeotermos) se diferenciam dos vírus que infectam os animais aquáticos pecilotermos pela sua especificidade dos hospedeiros e pela faixa de temperatura para a sua replicação (FLINT et al., 2000).

1.6.1.1 A SÍNDROME DE TAURA

A Síndrome de Taura (TS) é causada pelo “Taura Syndrome Vírus” (TSV), agente etiológico de uma séria doença epizootica que compromete o crescimento dos camarões do hemisfério Oeste (BROCK & MAIN,1994; BROCK et al., 1995; HASSON et al., 1999; LIGHTNER, 1996b). O TSV pertence a família Picornaviridae baseado em sua morfologia (32 çm icosaedro não envelopado), replicação citoplásmica, densidade de 1.338 g/ml, seu genoma é uma fita simples de RNA sense positivo de aproximadamente 10.2 kb de comprimento, um capsídeo composto de três polipeptídeos menores (55, 40 e 24 kD) e um maior (58 kD) (BONAMI et al., 1997, HASSON et al., 1995, MARI et al., 1998). O TSV tem 3 cepas com virulência crescente denominadas de Hawaii, Sinaloa e Belize (LIGHTNER, 1996b).

O principal hospedeiro do TSV é o camarão branco do pacífico, *L. vannamei*. Mortalidades acumulativas alcançam índices de 40 a 90% em populações cultivadas de pós-larvas, juvenis e subadultos. Sobreviventes da infecção por TSV podem carrear o vírus por toda a vida. O TSV também pode infectar outras espécies de camarões do hemisfério oeste como *L. stylirostris*, *Litopenaeus setiferus* LINAEUS, 1767 e *Litopenaeus schmitti* (BURKENROAD, 1936), alguns resultados mostram a doença clínica e mortalidades em pós-larvas e juvenis e infecção assintomática persistente. Outros camarões peneídeos do hemisfério oeste (*Farfanepenaues aztecus* (IVES, 1891) e *Farfantepenaues duorarum* (BURKENROAD, 1936) e do hemisfério leste (*Fenneropenaeus chinensis* (OSBECK, 1765), *P. monodon* e *P. japonicus*) desenvolveram infecção experimental com o TSV (BROCK et al., 1997; LIGHTNER, 1996b; LIGHTNER, 1996a, OVERSTREET et al., 1997).

Desde 1992 o TSV já se manifestava em fazendas de camarões marinhos no Equador. Inicialmente, acreditava-se que os responsáveis pela doença eram fungicidas e pesticidas usados em plantações de bananas. Em 1994, um vírus foi identificado como sendo o agente causador da Síndrome de Taura. O TSV foi responsável pelo colapso da indústria Equatoriana em 1993 (WAS, 1999).

Este vírus apresenta em sua fase aguda, camarões avermelhados em função da expansão de cromatóforos (Figuras 9 e 10). Os camarões moribundos não conseguem completar o processo de muda, morrendo com o exoesqueleto ainda mole. Quando capturados vivos, os animais apresentam um comportamento letárgico, não se alimentam e estão próximos da morte. Na fase aguda, as mortalidades geralmente ocorrem entre 15 a 45

dias após a estocagem de pós-larvas no viveiro. A taxa diária de mortalidade pode alcançar 25%, restando no final entre 5 a 25% de sobreviventes. Na fase crônica da doença, os camarões conseguem sobreviver a muda, podendo apresentar comportamento ativo e alimentar-se normalmente. Neste estágio, os indivíduos infectados apresentam lesões e melanizações na cutícula, podendo sucumbir nos ciclos de mudas subseqüentes (Figura 11). Algumas vezes apresentam cutícula mole e expansão avermelhada dos cromatóforos. A transmissão pode ser vertical, durante o desenvolvimento embrionário, ou horizontal, através da ingestão de tecido contaminado com o vírus e contato com água ou equipamentos contaminados (OIE, 2003).

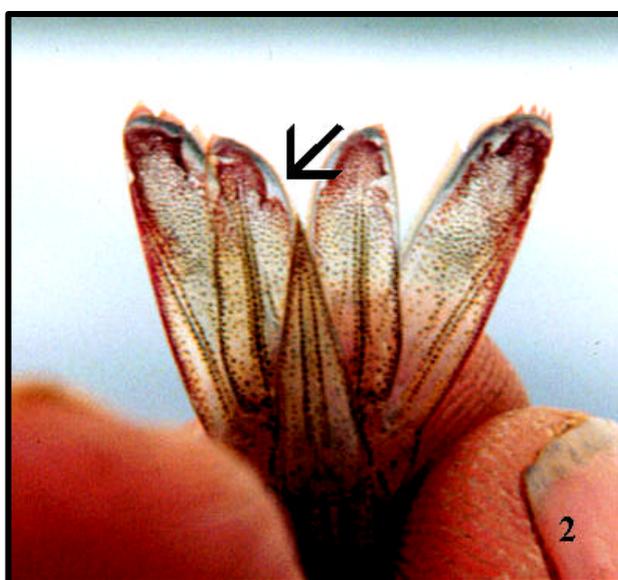


Figura 9. Expansão dos cromatóforos na região do telso (WAS 1999).



Figura 10. Coloração mais avermelhada do camarão B (Foto do autor, 2003).



Figura 11. Melanizações no exoesqueleto (WAS, 1999).

A distribuição da TS aparentemente é limitada às regiões das Américas. Foi reconhecida pela primeira vez como uma doença única nas fazendas próximas da foz do Rio Taura, em Quayaquil, no Equador em junho de 1992. Embora análises retrospectivas de amostras de camarões da região de Taura, no Equador de setembro de 1991, mostram que a doença estava presente antes de 1992. Da mesma forma, alguns fazendeiros na Região de Taura suspeitam que a doença estava presente em meados de 1990, quando inexplicavelmente perdas na fase de berçário do cultivo do *L. vannamei* forçou muitos carcinicultores a abandonar o uso de berçários em favor da prática do estoque direto das PLs com cultivos de baixas densidades em tanques de engorda externos (OIE, 2003).

Lesões semelhantes à Síndrome de Taura também foram notadas em cultivos de *L. vannamei* em fevereiro de 1990 na Colômbia. Desde 1992, a TS tem-se disseminado para muitas áreas de engorda de camarões nas Américas com observações em animais selvagens de *L. vannamei* cultivados.

As notificações de casos:

1. A região de Tumbes no Peru de 1993 até o presente.
2. Em todas áreas de engorda do Equador de 1991 até o presente.
3. Oceano Pacífico e costa do Caribe na Colômbia de 1993/94 até o presente.
4. Região do Golfo do Fonseca em Honduras e El Salvador de 1994 até o presente.
5. Guatemala em 1994.

6. Nordeste do Brasil em 1994.
7. Nicarágua em 1995.
8. Estados mexicanos de Sonora, Sinaloa, Chiapas e Guerrero em 1995.
9. USA (Texas/1995, Hawaii/1994, Florida/1994).

A TS tem sido relatada em PLs selvagens e *L. vannamei* adultos coletados desde próximos a costa e distantes da costa pesqueira do Equador, El Salvador e no sul dos estados mexicanos próximos de Chiapas na fronteira com a Guatemala. A distribuição geográfica da TS provavelmente expandiu-se por causa da indústria camaroneira que depende de PLs e náuplios de *L. vannamei* selvagens e juvenis, como são comumente transportados entre regiões e países.

1.6.1.2 A SÍNDROME DA MANCHA BRANCA (WHITE SPOT SYNDROME VIRUS – WSSV)

Dentre as diversas doenças que afetam o camarão, a “White Spot Syndrome Disease” (WSSD) foi primeiramente relatada na China em 1993, no cultivo de *Fenneropenaeus chinensis* (OSBECK, 1939) (HUANG et al., 1995). Relatos posteriores foram registrados no Japão, Korea, Tailândia, Taiwan, Indonésia e Índia em cultivo de *F. chinensis*, *Penaeus monodon*, *M. japonicus* e *Fenneropenaeus indicus* (H.MILNE-EDWARDS, 1837) (CHOU et al., 1995; HEO et al., 1998; MOHAN et al., 1998; NUMAN et al., 1998; WINARO, 1995; WONGTEERASUPAYA et al., 1995). Nos Estados Unidos, Lightner et al. 1995, registraram a ocorrência do WSSV no Texas e na Carolina do Sul, em cultivos de *L. vannamei*, *L. stylirostris* e *L. setiferus* e em 2000 Magbanua et al., registraram a ocorrência do vírus nas Filipinas. Em 1999, foi detectada a ocorrência do WSSV em diferentes países da América Central, inicialmente em Honduras e na Nicarágua e logo em seguida no Panamá e Equador.

O diagnóstico do WSSV para as espécies asiáticas baseia-se em sinais macroscópicos, com a presença de manchas brancas cuticulares sobre o exoesqueleto. Estas manchas podem ser facilmente observadas a olho nu em casos mais avançados e são mais evidentes no *P. monodon* devido a típica coloração escura. As manchas são depósitos excessivos de sais de cálcio na epiderme cutilar. Em *L. vannamei* o aparecimento de manchas brancas pode não ocorrer ou não ser facilmente vistas a olho nu. Os sintomas se

manifestam até que os camarões tenham atingido PL20 – PL21. Os principais sintomas são: camarões letárgicos, exibindo um nado lento na superfície, baixo consumo alimentar, corpo com uma coloração rosado a pardo-avermelhado, cauda vermelha associada à expansão de cromatóforos e mortalidade alta de até 100% nos primeiros 3 a 10 dias após o aparecimento dos sinais clínicos, morte de camarões no fundo dos viveiros, manchas brancas de 0,5 a 2,0 mm de diâmetro no interior da superfície do exoesqueleto (Figuras 12 e 13).



Figura 12. Lesões características do WSSV em camarão (WAS, 1999).



Figura 13. Lesões características do WSSV em camarão (WAS, 1999).

O agente causal da WSSD é o “White Spot Syndrome Vírus” (WSSV), possui uma dupla fita DNA (dsDNA), formato de barra circular à elíptica, com um envelope trilaminar com tamanho de 80-120 x 250-380 nm. Seu genoma tem aproximadamente 290 kbp. Pertence à família *Ninaviridae*, se manifesta de forma endêmica e pandêmica, com transmissão horizontal e vertical. Possui mais de 50 hospedeiros naturais, entre os quais muitos são freqüentemente identificados nos cultivos, representando vetores potenciais (OIE, 2003).

1.7 AMOSTRAGEM

As amostras podem ser coletadas de acordo com três finalidades: vigilância sanitária, certificação sanitária ou controle de reprodutores e diagnóstico da doença. O número e o tipo de amostra para análise irá variar muito de acordo com a finalidade do exame.

1.7.1. DIAGNÓSTICO EM SITUAÇÃO DE DOENÇA

Quando há ocorrência da doença clínica deve-se ter o cuidado de selecionar espécimes com lesões significativas dos animais vivos ou moribundos. Todos os esforços devem ser feitos para a coleta de amostras de todas as espécies susceptíveis a doença, tanto de indivíduos moribundos como com sintomas clínicos da doença. A coleta de espécimes mortos deve ser evitada. Quando o cultivo ou crustáceos nativos apresentam sinais clínicos de uma doença com características das listadas como de notificação obrigatória pela OIE, deve-se coletar amostras de todas as espécies para garantir ações de preservação e um diagnóstico antecipado (OIE,2003).

É recomendado um número mínimo de espécimes a serem coletados para teste de diagnóstico: 100 ou mais para estágios larvais, 50 para estágios de pós-larvas e 10 se forem juvenis ou adultos. O número de amostras de espécimes com a doença clínica deve ser grande, não se recomenda um número mínimo de amostras mas sim que seja observada a cuidadosa seleção dos pontos de coleta e a qualidade dos espécimes (OIE, 2003).

1.7.2 DIAGNÓSTICO EM CRUSTÁCEOS ASSINTOMÁTICOS

Quando amostras são coletadas para vigilância sanitária, são testados animais assintomáticos para a prevenção de doenças ou para a certificação de “livre de patógenos específicos” (SPF – “specific pathogen free”). O tamanho da amostra a ser coletada será determinado por um tabela estatística. O tamanho mínimo da amostra para teste deve prever 95% de confiança que a espécie infectada está presente na amostra, assumindo um mínimo de prevalência da infecção igual ou maior que 2, 5 ou 10%.

TABELA 7. Tamanho das amostras baseadas na prevalência do patógeno em uma população (OIE,2003).

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

Para a vigilância sanitária e certificação de doenças de notificação obrigatória, as amostras dos locais de cultivo ou de estoques selvagens, devem conter um número apropriado de espécimes a serem testados de acordo com a Tabela 7. O teste para uma prevalência mínima de 2% é recomendado.

Para a lista de doenças de notificação obrigatória da OIE é recomendável que o planejamento de amostragem deva ser bem executado (isto é, por temporada da fazenda, estação do ano, etc.) de forma que a época de amostragem de acordo com a fase de crescimento dos crustáceos e em particular quando o patógeno é mais provável para ser

descoberto. Isto é importante quando os métodos de diagnóstico dependem de simples microscópios ou de métodos histológicos e não incluem métodos moleculares. Para as baculoviruses, BP, MBV, e BMN, larvas e pós-larvas são amostras mais apropriadas, para TSV, WSSV e YHV, juvenis e subadultos são as melhores amostras, e para “crayfish plague”, juvenis e adultos são as melhores amostras. Para diagnósticos de infecções assintomáticas quando se pressupõe a presença do patógeno, o número de amostras deverá refletir que a prevalência excederá 5%.

1.7.3 CONSERVAÇÃO DAS AMOSTAS PARA TESTES MOLECULARES

Para diagnósticos de rotina por PCR, RT-PCR ou “dot-blot” com provas de DNA, as amostras devem ser preparadas para preservar os ácidos nucleicos dos patógenos.

1.7.3.1 TIPOS DE AMOSTRAS

As amostras coletadas para provas de DNA ou anticorpos devem ser empacotadas em sacos plásticos novos ou frascos com a intenção de minimizar o risco potencial de contaminação cruzada com outras amostras de locais diferentes, tanques ou lotes. Sempre usar sacos plásticos ou frascos de primeiro uso. As amostras devem ser identificadas por local e data da coleta.

Alguns dos procedimentos para preservação e transporte de amostras são:

- Espécimes vivos: as amostras podem ser processadas no campo ou enviadas para o laboratório. Este é o melhor método para processamento.
- Hemolinfa: este tecido é o preferido para os testes moleculares. As amostras devem ser coletadas com agulha e seringa puncionando o sinus ventral ou a parede lateral do corpo do animal.
- Tecidos refrigerados: os espécimes devem ser transportados para o laboratório para testes em 24 horas. Os sacos plásticos devem ser acondicionados em meio ao gelo em quantidade suficiente para manter a temperatura em caixas de material isotérmico (isopor).
- Espécimes inteiros congelados: os animais devem ser selecionados de acordo com a situação para diagnóstico, de acordo com a situação de doença ou vigilância sanitária. Devem ser rapidamente congelados no campo usando gelo seco triturado ou em freezer

a temperatura de -18 a -20°C . Na viagem ao laboratório as amostras devem ser transportadas em caixas isotérmicas contendo gelo.

- Amostras conservadas em álcool: em locais onde o uso de gelo ou freezer é problemático pode-se usar etanol 90-95% para a conservação das amostras, estocagem e transporte.

Os tecidos usados para as amostras são: hemolinfa, crustáceos inteiros menores que 2 a 3 g, os crustáceos maiores devem ter os tecidos que não irão ser usados para os testes retirados. As amostras devem ser acondicionadas em embalagens individuais para transporte.

1.7.3.2 SELEÇÃO DE TECIDOS PARA AS AMOSTRAS

Vários tecidos podem ser coletados para detecção de partículas virais. Segundo Lightner & Tang-Nelson (2001), os resultados na quantificação de partículas virais do WSSV mostrou que a hemolinfa contém o nível mais elevado, quando comparada com outros tecidos, (Tabela 8). Os tecidos de maior concentração do WSSV foram hemolinfa, brânquias, pleópodos, músculos e hepatopâncreas, respectivamente.

Tabela 8. Número médio do genoma do WSSV presentes em hemolinfa, pleópodos, brânquias, musculatura e hepatopâncreas (LIGHTNER & TANG-NELSON, 2001).

Amostras de tecidos	Número médio
Hemolinfa	2.55×10^9
Pleópodos	1.60×10^9
Brânquias	1.2×10^9
Músculo	1.9×10^8
Hepatopâncreas	9.0×10^7

2 JUSTIFICATIVA

No final dos anos 80 e na década de 90, as doenças infecciosas tiveram efeito devastador no cultivo do camarão marinho, causando colapso na produção de grandes países produtores e desencadeando perdas multimilionárias na indústria (Tabela 9). A partir de então, as enfermidades passaram a ser vistas como um obstáculo econômico e uma ameaça à viabilidade da atividade. Apesar de algumas destas doenças ocorrerem habitualmente em fazenda de cultivo no Brasil, seu impacto econômico não é considerado expressivo quando comparado a outros países. Contudo, estas infecções afetam consideravelmente o desempenho dos cultivos e causam alterações na aparência física dos camarões e conseqüentemente na qualidade do produto final.

Tabela 9. Prejuízos estimados da indústria de cultivo de camarões marinhos causados por enfermidades virais desde sua primeira detecção (LIGHTNER e VANPATTEN, 2001).

Vírus	Ano	Perda (US\$ bilhões)
WSSV – Ásia	1992	4 – 6
WSSV – Américas	1999	> 1
TSV	1991 - 1992	1 – 2
IHHNV	1981	0,1 – 0,5

A Organização Mundial do Comércio (WTO) procura ampliar as oportunidades de negócios entre países, sem, no entanto, oportunizar risco à saúde pública, animal, ambiental ou vegetal. Direitos e obrigações básicas requeridas aos países membros da WTO são regulamentadas através da aplicação de medidas sanitárias baseadas em princípios e evidências científicas descritas no Acordo de Medidas Sanitárias e Fitossanitárias (SPS Agreement), acrescidos do Acordo de Barreiras Técnicas de Comércio (TBT Agreement) e com a participação da Organização Internacional de Epizootias (OIE), no propósito de disciplinar o comércio internacional de animais e minimizar o risco de disseminação de enfermidades (THIERMANN, 1997). A OIE estabelece normas e procedimentos sanitários para animais aquáticos inspirados em textos homólogos consagrados para animais terrestres.

O Código Sanitário reconhece que a presença de um agente infeccioso não implica necessariamente na presença da enfermidade clínica, isto é, o Código Sanitário reconhece que a detecção da infecção na ausência da enfermidade clínica pode ser suficiente para

constituir um caso que necessite ser declarado. Esta situação é particularmente relevante em se tratando de animais aquáticos, onde o hospedeiro e o meio ambiente influenciam de maneira significativa o grau em que uma infecção subclínica poderá tornar-se clínica, ou, ainda onde os animais sobrevivem a uma infecção poderão tornar-se veículos do agente por toda a sua vida. Dentro deste enfoque, a Comissão Internacional propõem equiparar a identificação de fragmentos genômicos com a presença de um agente infeccioso viável no hospedeiro e com a presença de um processo infeccioso em uma determinada população (OIE, 2001).

O rápido desenvolvimento de técnicas biotecnológicas tem tornado possível a detecção de patógenos no meio ambiente de forma rápida, sensível e específica. A aplicação de técnicas de biologia molecular, tais como hibridização, utilizando sondas genéticas específicas para o agente e amplificação gênica (*polymerase chain reaction*) dos vírus, bactérias e protozoários, tornou esta detecção muito mais fácil e sensível (CHAPMANN et al., 1990; METCALF et al., 1988). A reação em cadeia da polimerase (PCR) pode ser utilizada para a amplificação enzimática de seqüências de ácidos nucleicos que estão presentes em pequeno número de cópias, tais como em amostras ambientais (KOPECKA et al., 1993; TSAI et al., 1994 e 1995; METCALF et al., 1995; ABBASZADEGAN et al., 2000). A utilização de técnicas biotecnológicas capazes de identificar rapidamente a presença de patógenos virais em amostras ambientais, através da amplificação gênica com a rapidez requerida para o monitoramento laboratorial de rotina é imprescindível para a implantação de um protocolo de monitoramento da qualidade sanitária dos produtos oriundos das áreas de cultivo. As vantagens e desvantagens das técnicas moleculares podem ser visualizadas na Tabela 10.

Tabela 10. Vantagens e desvantagens das técnicas moleculares (COELHO, 2001).

Vantagens	Desvantagens
1. Detecção mais rápida de organismos difíceis de cultivar.	1. Não permite diferenciar entre organismos viáveis e não viáveis.
2. Detecção de patógenos não-cultiváveis.	2. Amostras ambientais geralmente precisam de extensa preparação e clarificação.
3. Detecção simultânea de múltiplos patógenos.	3. Resultados são mais qualitativos.
4. Maior seletividade para detecção de grupos de organismos ou patógenos específicos dentro de um grupo.	4. Técnicas quantitativas, quando disponíveis, são geralmente muito específicas para uma sequência gênica modelo.

Na atualidade a aquicultura representa importante fonte de proteínas, e tem-se intensificado cada vez mais a criação de espécies comestíveis. Para tal finalidade faz-se melhoramentos genéticos e seleção dos animais para cultivos cada vez mais intensivos e de rápido crescimento. Como consequência da concentração de indivíduos, da endogamia da espécie e das formas de criação, as populações cultivadas são cada vez mais agredidas por agentes infecciosos, como parasitas, bactérias, fungos e vírus (PROENÇA e BITTENCOURT, 1994).

O camarão branco do Pacífico, *L. vannamei*, responde por 20% da produção mundial de camarões. Sua principal área de cultivo é o continente americano e é uma das espécies sobre as quais existe um grande conhecimento científico e tecnológico de cultivo. Com o incremento na exploração aquícola no estado da espécie *L. vannamei*, sensível as principais doenças virais, há a necessidade de monitoramento permanente para garantir a qualidade sanitária dos produtos.

A implementação de procedimentos para diagnosticar o estado de saúde de camarões cultivados serve para detectar precocemente problemas no sistema de cultivo, como a presença de enfermidades, condições ambientais adversas ou ainda deficiências nutricionais e/ou genéticas da população. Isto permite que ações sejam tomadas rapidamente para controlar, minimizar ou excluir os efeitos negativos de condições

desfavoráveis sobre a produção de camarão, reduzindo os prejuízos financeiros resultantes da perda ou mau desempenho do estoque cultivado.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o risco epidemiológico, fornecendo subsídios para o estabelecimento de um Programa de Sanidade para a carcinicultura no Estado de Santa Catarina.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar os fatores de risco associados à atividade de cultivo de camarão marinho na região.
2. Pesquisar a presença do TSV (Taura Syndrome Vírus) e do WSSV (White Spot Syndrome Vírus) no estado de Santa Catarina através de métodos moleculares.
3. Avaliar o método de detecção do TSV através de reações de RT-PCR, nas condições locais.
4. Avaliar a sensibilidade e especificidade da reação RT-PCR para a detecção do TSV em amostras de campo.
5. Avaliar o método de detecção do WSSV através da PCR nas condições locais.
6. Avaliar a sensibilidade e especificidade da PCR para a detecção do WSSV em amostras de campo.
7. Testar a eficiência dos diferentes métodos de preparação dos extratos tissulares para extração de RNA e DNA.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 ESTABELECIMENTOS AVALIADOS

Foram avaliados os empreendimentos de carcinicultura através de visitas técnicas e entrevistas estruturadas e não estruturadas para observação dos processos produtivos executados em cada uma das unidades. As unidades avaliadas foram: um laboratório de produção de náuplios e pós-larvas (LCM – UFSC) localizado na Barra da Lagoa, no município de Florianópolis e pertencente ao Departamento de Aquicultura da UFSC, a seguir denominado de laboratório um. Dois naupliários: Laboratório Larvisul, localizado na Vila Bamerindus, município de Itapoá/SC, a seguir denominado laboratório dois e Laboratório de Estaleirinho, localizado no município de Itapema/SC, a seguir denominado laboratório três. Uma fazenda de reprodutores, a Fazenda Experimental Yakult, localizada na localidade de Salinas, no município de Balneário Barra do Sul/SC, onde estão alojados os reprodutores utilizados durante os períodos de reprodução e 07 fazendas instaladas na região do litoral norte do estado de Santa Catarina. O estudo foi realizado na safra compreendida nos meses de outubro de 2002 a julho de 2003.

Os aspectos avaliados foram a origem dos insumos em relação aos reprodutores, náuplios, PLs, rações, etc; ao trânsito na propriedade em relação às visitas de técnicos, intercâmbio de visitas entre produtores, caminhões de insumos e saída de produtos; a captação de água em relação a proximidade das fazendas e fatores de risco no estuário de captação; lançamento de efluentes em relação ao ponto de lançamento, tratamento dos efluentes, controle da qualidade dos efluentes e existência de tanque de recirculação de água; controle sanitário em relação a biometria, deformações observadas e mortalidade; uso e destino de animais mortos quanto a presença de fosso de putrefação e enterro de animais mortos; fauna hospedeira de patógenos importantes presentes no cultivo e presença de aves como gaivotas, biguás e urubus; fatores de risco como zonificação em relação ao isolamento e tráfego como fatores predisponentes a riscos sanitários. O objetivo principal foi identificar os fatores de risco sanitário associados à atividade de cultivo de camarão marinho na região.

4.2 COLETA DAS AMOSTRAS

Foram utilizadas pós-larvas e adultos de camarão marinho *L. vannamei*, procedentes dos seguintes locais:

1. Laboratório de Camarões Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), localizado na Rua dos Coroas, Lagoa da Conceição, Florianópolis/SC. As pós-larvas (PL17) foram coletadas no momento do embarque para distribuição aos produtores, tendo sido realizadas 2 coletas distintas cada uma contendo aproximadamente 1.500 PLs, totalizando 3000 PLs como amostra.
2. Laboratório LARVISUL, localizado na Vila Bamerindus, município de Itapoá/SC. Uma amostra de pós-larvas (PL50) totalizando cerca de 1000 PLs.
3. Laboratório de Estaleirinho, localizado no município de Itapema/SC. Uma amostra de pós-larvas (PL23) totalizando cerca de 1500 PLs.
4. Fazenda Ilha das Palmas, localidade de Miranda, município de São Francisco do Sul/SC. As amostras são:
 - 4.1 Vinte e cinco (25) camarões com idade de 90 dias com peso médio aproximado de 8 g/indivíduo com sintomas de deformações e telso com hipertrofia dos cromatóforos, coletados no momento da biometria.
 - 4.2 Quinze (15) camarões com idade de 110 dias com peso médio aproximado de 10g/indivíduo, aparentemente sadios e sem deformações, coletados no momento da realização da biometria.
 - 4.3 Onze (11) camarões com idade de 205 dias com peso médio aproximado de 17g/indivíduo, clinicamente sadios e sem deformações coletados no momento da despesca.
5. Vinte (20) camarões com idade de 120 dias com peso médio aproximado de 11 g/indivíduo, clinicamente sadios e sem deformações, adquiridos em supermercado na cidade de Joinville, oriundos do município de Laguna/SC.

As amostras foram coletadas em situação de animais assintomáticos prevendo-se uma prevalência mínima de 2%.

Todas as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos identificados, transportados até o local de congelamento em caixa isotérmica contendo gelo. A conservação até seu processamento foi a -18°C . A amostra 4.3 foi transportada até o laboratório de Tecnologia de Pescados do CTTMAR, Univali, Itajaí/SC, em água do viveiro

sob aeração constante; os camarões foram insensibilizados em água com gelo para a extração de hemolinfa com seringa hipodérmica no sinus ventral e da parede lateral do corpo (Figura 14). Uma amostra foi coletada com anticoagulante Citrato de Sódio a 10% em um volume de 1:1; as demais amostras foram coletadas sem anticoagulante. Os volumes obtidos variaram de 0,5 a 1,2 ml por animal. Os tecidos de eleição para a extração de RNA e DNA são, por ordem de prioridade: a hemolinfa, pleópodos e brânquias; em algumas amostras também foi coletada a musculatura para extração de DNA. Das amostras de PLs foram extraídas as cabeças e em seguida feito um pool homogeneizado por amostra. Das PLs 50 foram coletadas as brânquias, pleópodos e musculatura. Das amostras de animais adultos mantidos congelados, foram coletadas amostras de brânquias, pleópodos e músculo.



Figura 14. Coleta de hemolinfa no sinus ventral do *L. vannamei* (Foto do autor, 2003).

O processamento do material biológico foi em triplicata para cada amostra. As amostras de PLs foram retiradas as cabeças, conforme recomendação da OIE para diminuição de inibidores presentes principalmente nos olhos. As amostras de PLs foram homogeneizadas em aparelho Stomacher resultando em um pool fluído por propriedade. Neste trabalho foram usados os mesmos parâmetros para coleta dos tecidos preconizados por Lightner & Tang-Nelson, 2001.

4.3 EXTRAÇÃO DE RNA

4.3.1 EXTRAÇÃO DE RNA VIRAL NOS TECIDOS DO *L. VANNAMEI* COM O PROTOCOLO COMERCIAL TRIZOLÂ REAGENT, GIBCOBRL

Na coleta dos órgãos, os mesmos foram separados em placas de Petri esterilizadas, fazendo pool de órgãos por propriedade. Foram coletados 100 µl ou 0,1 ml equivalente a 50 a 100 mg de tecido, colocados em tubo de Eppendorf 1,5 ml e macerados os tecidos com bastão de vidro. Os procedimentos executados seguiram o protocolo recomendado pelo fabricante, descrito em anexo na página 78.

4.3.2 EXTRAÇÃO DE RNA VIRAL NOS TECIDOS DO *L. VANNAMEI* COM O PROTOCOLO FENOL/CLOROFÓRMIO – ÁLCOOL ISOAMILICO E SÍLICA/TIOCIANATO DE GUANIDINA E MÉTODO SÍLICA/TIOCIANATO DE GUANIDINA.

Para a extração do RNA também foi utilizado o protocolo de extração usando a metodologia previamente descrita por Alfieri, 1999, o qual é uma combinação do fenol/clorofórmio e sílica/isotiocianato de guanidina (BOOM et al., 1990), como descrito em anexo na página 80.

4.4 EXTRAÇÃO DO DNA

Na extração do DNA foram utilizados três protocolos distintos que são descritos nos itens que se seguem.

4.4.1 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO NOS TECIDO DO *L. VANNAMEI* COM O PROTOCOLO COMERCIAL DNAZOLÂ REAGENT, GIBCOBRL.

Foram coletados os órgãos: hemolinfa, brânquias, pleópodos, musculatura e feito pool de PLs. A metodologia de extração utilizada foi o protocolo recomendado pelo fabricante descrito em anexo na página 82.

4.4.2 EXTRAÇÃO DE DNA VIRAL E DE DNA GENÔMICO DO *L. VANNAMEI* COM O PROTOCOLO FENOL/CLOROFÓRMIO – ÁLCOOL ISOAMILICO E SÍLICA/TIOCIANATO DE GUANIDINA E MÉTODO SÍLICA/TIOCIANATO DE GUANIDINA.

Foram coletados 50 a 100 mg de tecido de camarão de cada tipo de amostra e homogeneizados em 500 µL de água ultrapura em um tubo de Eppendorf 1,5 ml. A metodologia utilizada está descrita em anexo na página 80.

4.4.3 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO NOS TECIDO DO *L. VANNAMEI* COM O PROTOCOLO RECOMENDADO PELA OIE (2003).

Foram homogeneizados 100 mg de cada tipo de tecido. As PLs maiores de 11 dias tiveram as cabeças retiradas. O protocolo utilizado é o recomendado pela OIE e está descrito em anexo na página 84.

4.5 RT-PCR

Em seguida foi feita a Transcrição Reversa para obtenção do cDNA sob as seguintes condições:

1. Adicionou-se 16 µl de Transcript 1 em cada amostra. O Transcript 1 é composto por 20 pmoles do Primer 9195, 20 pmoles do Primer 9992, 8 µl de dNTPs 100mM e 6 µl de água MilliQ autoclavada.
2. Aquecidos os tubos Eppendorf a 65°C por 5 min, após resfriar em gelo moído imediatamente.
3. Adicionou-se 7 µl de Transcript 2 em cada amostra. O Transcript 2 é composto por 4 µl de 5 X First-Strand Buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 2 µl de 0,1 M DTT e 1 µl (200U/µl) de Super Script II.
4. Após, incubou-se a 42°C por 50 min e 70°C por 15 min.

4.6 CONDIÇÕES DA PCR PARA TESTE DO TSV

Foi feito o Mix 1 adicionando-se 30 pmoles do Primer 9195 e 30 pmoles do Primer 9992, mais 5 U da *Taq* Polymerase e 8 µl de cada amostra, colocadas as amostras no Termociclador para programa de desnaturação a 94°C por 3 min, retiradas e colocadas as amostras no gelo moído. Em seguida foi feito o Mix 2 adicionando-se 5µl 10 X Buffer (200 mM Tris-HCL, pH 8,4, 500 mM KCl), 8 µl dNTP 100 mM, 2,5 mM de MgCl₂ e 22,5 µl de água MilliQ autoclavada. Adicionados 38 µl do Mix 2 em cada amostra e em seguida foi feita a PCR.

Primers usados:

Primer	Seqüência	G:C ratio	Temperatura
9195	5'- TCA ATG AGA GCT TGG TCC – 3'	50	63°C
9992	5' – AAG TAG ACA GCC GCG CTT – 3'	55	69°C

Amplificação específica 231 pb.

Programa da PCR: 1 ciclo de 94° C por 3 min e 40 ciclos de 94°C por 45 seg, 60°C por 45 seg, seguido do passo de extensão a 60°C por 7 min.

4.7 CONDIÇÕES DA PCR PARA DETECÇÃO DO DNA GENÔMICO DO *L. VANNAMEI* E DO WSSV

Foi feito o Mix 1 adicionando-se 30 pmoles do primer 146 F1, 30 pmoles do primer 146 R1, 5 U da *Taq* Polymerase e 8 µl de cada amostra, colocadas as amostras no Termociclador programa de desnaturação a 94°C por 3 min, retiradas e colocadas as amostras em gelo moído. Em seguida foi feito o Mix 2 adicionando-se 5µl 10 X Buffer (200 mM Tris-HCL, pH 8,4, 500 mM KCl), 8 µl dNTP 100 mM, 1,5 mM MgCl₂ e 23,5 µl de água MilliQ autoclavada. Adicionados 38 µl do Mix 2 em cada amostra e em seguida foi feita a PCR.

Primeiro Passo da PCR

Primers WSSV

146F1	5'-ACT-ACT-AAC-TTC-AGC-CTA-TCT-AG-3'
146R1	5'-TAA-TGC-GGG-TGT-AAT-GTT-CTT-ACG-A-3'

Amplificação específica 1447 pb.

DNA GENÔMICO DO *L. VANNAMEI*

Foi feito o Mix 1 adicionando-se 30 pmoles do primer 143 F, 30 pmoles do primer 145 R, 5 U da *Taq* Polymerase e 8 µl de cada amostra, colocadas as amostras no Termociclador programa de desnaturação a 94°C por 3 min, retiradas e colocadas as amostras em gelo moído. Em seguida foi feito o Mix 2 adicionando-se 5µl 10 X Buffer (200 mM Tris-HCL, pH 8,4, 500 mM KCl), 8 µl dNTP 100 mM, 1,5 mM MgCl₂ e 23,5 µl de água MilliQ autoclavada. Adicionados 38 µl do Mix 2 em cada amostra e em seguida foi feita a PCR.

Primers decápoda específico

143F	5'-TGC-CTT-ATC-AGC-TNT-CGA-TTG-TAG-3'
145R	5'-TTC-AGN-TTT-GCA-ACC-ATA-CTT-CCC-3'

Amplificação específica 848 pb.

Programa da PCR: 1 ciclo de 94° C por 4 min, 55°C por 1 min, 72°C por 2 min e 39 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 1 min e 72°C por 2 min, seguido do passo de extensão a 72°C por 5 min.

Nested PCR

Foi feito o Mix 1 adicionando-se 30 pmoles do primer 146 F2, 30 pmoles do primer 146 R2, 5 U da *Taq* Polymerase e 8 µl de cada amostra, colocadas as amostras no Termociclador programa de desnaturação a 94°C por 3 min, retiradas e colocadas as amostras em gelo moído. Em seguida foi feito o Mix 2 adicionando-se 5µl 10 X Buffer (200 mM Tris-HCL, pH 8,4, 500 mM KCl), 8 µl dNTP 100 mM, 1,5 mM de MgCl₂ e 23,5 µl de água MilliQ autoclavada. Adicionados 38 µl do Mix 2 em cada amostra e em seguida foi feita a PCR.

Primers WSSV para nested PCR

146F2	5'-GTA-ACT-GCC-CCT-TCC-ATC-TCC-A-3'
146R2	5' – TAC-GGC-AGC-TGC-TGC-ACC-TTG-T-3'

Amplificação específica 941 pb.

Programa da PCR: 1 ciclo de 94° C por 4 min, 55°C por 1 min, 72°C por 2 min e 39 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 1 min e 72°C por 2 min, seguido do passo de extensão a 72°C por 5 min.

4.8 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

A corrida foi feita em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídeo a 0,5ug/ml. Marcador de peso molecular padrão de 100 pb. Corrida em cuba eletroforética a 60 V, 60 mA, por 1 h e 30 min.

5 RESULTADOS

5.1 EXTRAÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DE RNA VIRAL DO TSV NOS TECIDOS DE *L. VANNAMEI* COM O PROTOCOLO COMERCIAL TRIZOLÂ REAGENT, GIBCOBRL

O protocolo de extração de acordo com o item 4.3.1 produziu material com a qualidade esperada para a RT-PCR. Houve poucas amostras com cDNA degradado, de um total de 66 amostras analisadas, 04 apresentaram cDNA degradado.

A análise das reações de PCR por eletroforese em gel de agarose não revelou a presença de uma banda equivalente a 231 pb, correspondente a amplificação de um fragmento específico do TSV, utilizando-se os iniciadores descritos. A ausência deste fragmento foi observada em todas as amostras analisadas (PLs, brânquias, pleópodos e hemolinfa) (Figuras 15 e 16). Em 03 amostras ocorreu a formação de uma banda inespecífica em 700 pb que pode ser por anelamento dos iniciadores com o DNA genômico do *L. vannamei*.

5.2 EXTRAÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DE RNA VIRAL DO TSV NOS TECIDOS DO *L. VANNAMEI* COM O PROTOCOLO FENOL/CLOROFÓRMIO – ÁLCOOL ISOAMILICO E SÍLICA/TIOCIANATO DE GUANIDINA E MÉTODO SÍLICA/TIOCIANATO DE GUANIDINA.

O protocolo da extração de acordo com o item 4.3.2 produziu material com a qualidade esperada para a RT-PCR. Houve poucas amostras com produto degradado (Figura 17).

5.3 EXTRAÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DE DNA GENÔMICO DOS TECIDOS DE *L. VANNAMEI* COM O PROTOCOLO COMERCIAL DNAZOLÂ REAGENT, GIBCOBRL

O protocolo da extração de acordo com o item 4.4.1 não produziu nenhum material de extração, em 22 amostras analisadas de diferentes tecidos (hemolinfa, brânquias,

pleópodos, musculatura e pós-larvas extraíndo-se as cabeças). Impossibilitando seu uso para a PCR na detecção do WSSV e controle positivo da PCR com o DNA genômico do *L. vannamei* (Figuras 18 A e B).

5.4 EXTRAÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DE DNA VIRAL DO WSSV E DOS TECIDOS DE *L. VANNAMEI* COM O PROTOCOLO FENOL/CLOROFÓRMIO – ÁLCOOL ISOAMILICO E SÍLICA/TIOCIANATO DE GUANIDINA E MÉTODO SÍLICA/TIOCIANATO DE GUANIDINA.

O protocolo da extração de acordo com o item 4.4.2 produziu material de boa qualidade. A extração do DNA genômico do *L. vannamei* produziu resultados satisfatórios com resultados positivos, sendo indicado seu uso neste tipo de tecido (Figura 19). Também não foi observada a presença de uma banda equivalente a 1447 pb e 941 pb, correspondente a amplificação de um fragmento específico do WSSV, PCR 1º passo e nested PCR (Figuras 20 e 21), respectivamente .

Foi observada a presença de bandas equivalentes a 848 pb nas amostras de extração do DNA genômico de *L. vannamei* e do caranguejo *Ucides cordatus cordatus* (LINNAEUS, 1763), indicando que a extração e os iniciadores detectam o DNA do animal em estudo. O tamanho deste fragmento está de acordo com aquele esperado para a seqüência correspondente (Figura 19).

5.5 EXTRAÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DE DNA GENÔMICO DOS TECIDOS DE *L. VANNAMEI* COM O PROTOCOLO RECOMENDADO PELA OIE (2003).

O protocolo da extração de acordo com o item 4.3.3 não produziu nenhum material de extração, em 10 amostras analisadas de diferentes tecidos (brânquias, pleópodos, musculatura e pós-larvas extraíndo-se as cabeças). Impossibilitando seu uso para a PCR na detecção do WSSV e controle positivo da PCR com o DNA genômico do *L. vannamei*.

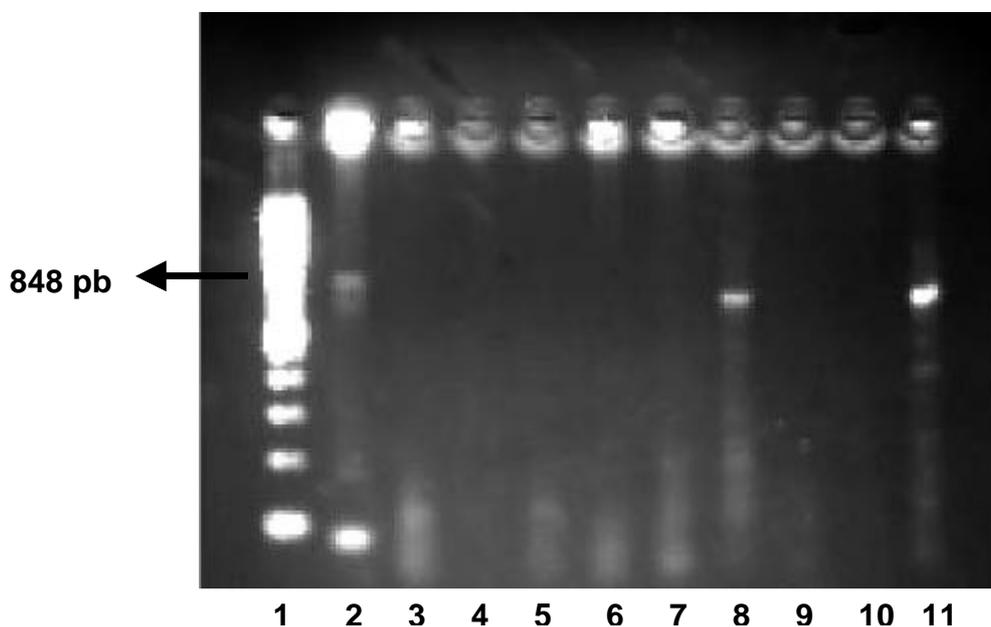


Figura 15. Produtos da reação da RT-PCR para detecção do TSV com protocolo de extração TRIZOL® Reagent, GibcoBRL.

Linha 1 - padrão 100 pb ladder; Linha 2 - DNA genômico do camarão, Linha 3 - Pleópodo, Linha 4 - Brânquias, Linha 5 - Hemolinfa, Linha 6 - Hemolinfa, Linha 7 - Brânquias, Linha 9 - Pleópodo, Linha 10 - Pleópodo e Linha 11 - Hemolinfa. Observa-se nas linhas 8 e 11 a ocorrência de uma banda inespecífica em aproximadamente 700 pb.

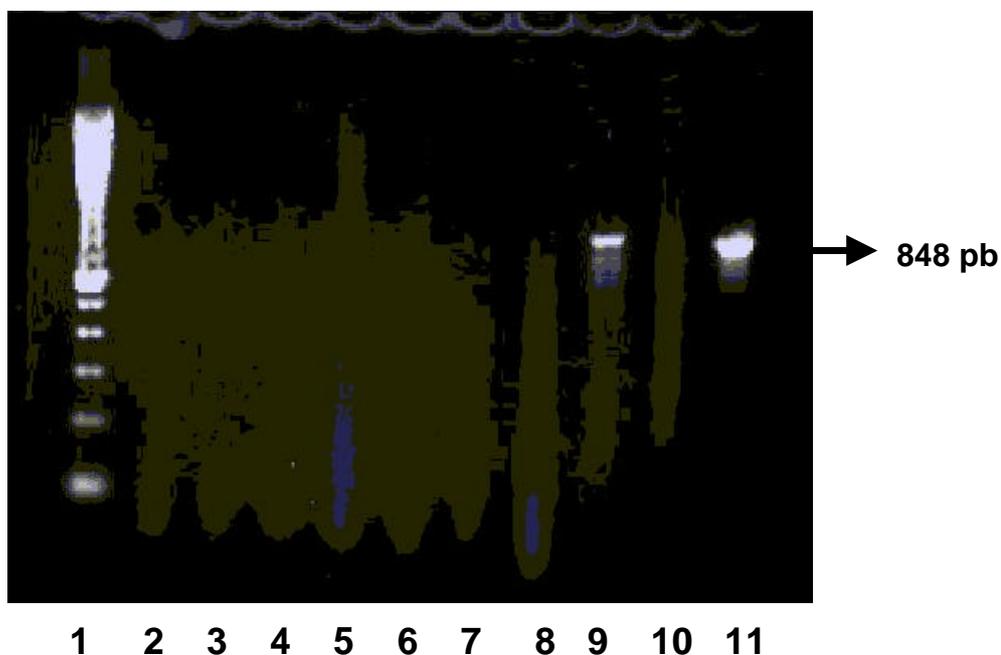


Figura 16. Produtos da reação da RT-PCR para detecção do TSV e extração com protocolo TRIZOL® Reagent, GibcoBRL.

Linha 1 - padrão 100 pb ladder, linha 2 - Branco, linha 3 - amostra 211 (pool de camarões), linha 4 - amostra 212 (pool de camarões), linha 5 - amostra 214 (pleópodos de camarões com deformações), linha 6 - amostras 207 (PLs Lab. Estaleirinho), linha 7 - amostra 208 (PLs Lab. Estaleirinho), linha 8 - amostra 201 (PLs Lab. LCM), linha 9 - amostra 217 (pleópodo de camarão sadio), linha 10 - amostra 225 (hemolinfa de camarão adulto), linha 11 - amostra de músculo do camarão para extração do DNA genômico.

Observou-se a formação de banda inespecífica na amostra 217, tecido de pleópodo de *Litopenaeus vannamei*.

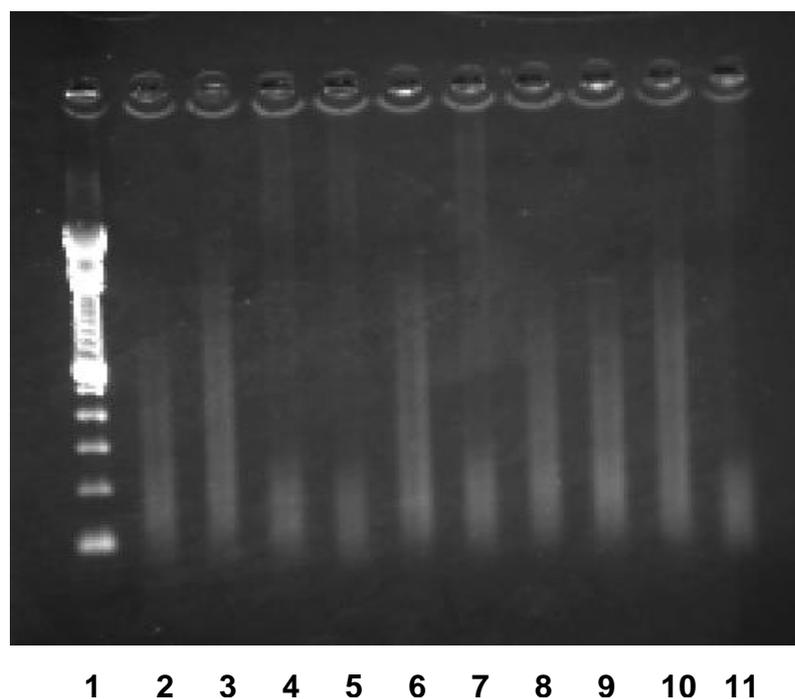


Figura 17. Produtos da reação da RT-PCR para detecção do TSV com protocolo de extração fenol/clorofórmio – álcool isoamílico e sílica/tiocianato de guanidina e método sílica/tiocianato de guanidina.

Linha 1 – padrão 100 pb ladder; linha 2 – PLs UFSC; linha 3 – PLs UFSC; linha 4 – PLs Larvisul; linha 5 – PLs Larvisul; linha 6 – PLs Estaleirinho; linha 7 – PLs Estaleirinho; linha 8 – Pool de camarões; linha 9 – Branquias de camarões com deformações; linha 10 – Pleópodo de camarões com deformações; linha 11 – Pleópodo de camarão da região de Laguna/SC.

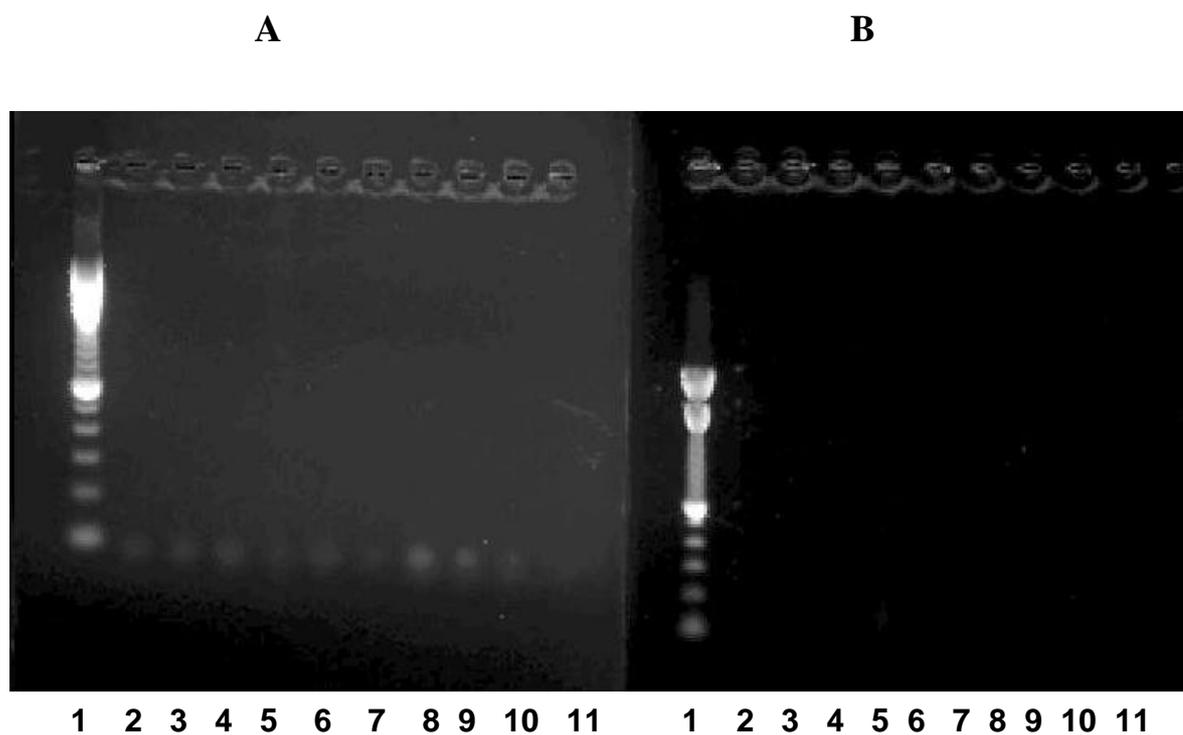


Figura 18 . Produtos de amplificação por PCR e extração de DNA genômico do camarão com protocolo comercial DNAzol® Reagent, GibcoBRL (A) Gel de agarose 1,5% com produto da PCR para amplificação do DNA genômico do camarão, linha 1 = padrão 100 pb ladder; linhas 2 a 11 = amostras de tecidos de camarão *L. vannamei*. (B) Gel de agarose 0,8%, com DNA genômico do camarão, linha 1= padrão 100 pb ladder; linhas 2 a 11 = amostras de tecidos de camarão *L. vannamei*.

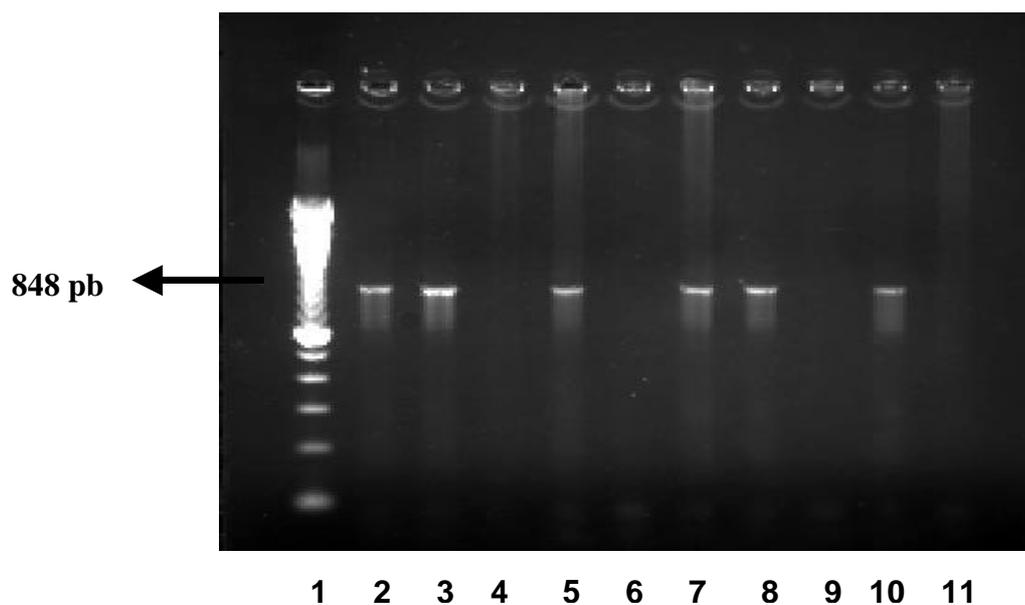


Figura 19. Produtos da reação da PCR para detecção do DNA genômico do camarão *L. vannamei*, extração com protocolo fenol/clorofórmio – álcool isoamílico e sílica/tiocianato de guanidina e método sílica/tiocianato de guanidina.

Linha 1 – padrão 100 pb ladder; linha 2 – PLs UFSC; linha 3 – PLs UFSC; linha 4 – PLs Larvisul; linha 5 – PLs Larvisul; linha 6 – PLs Estaleirinho; linha 7 – PLs Estaleirinho; linha 8 – Pool de camarões; linha 9 – Branquias de camarões com deformações; linha 10 – Pleópodo de camarões com deformações; linha 11 – Pleópodo de camarão da região de Laguna/SC.

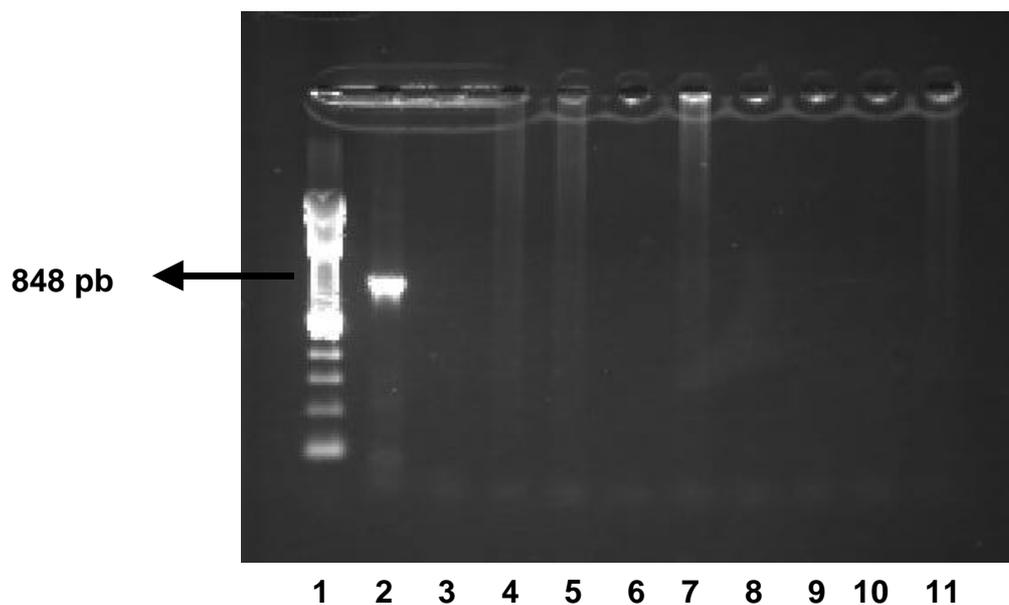


Figura 20. Produtos da reação da PCR para detecção do WSSV – 1º passo, extração com protocolo fenol/clorofórmio – álcool isoamílico e sílica/tiocianato de guanidina e método sílica/tiocianato de guanidina.

Linha 1 – padrão 100 pb ladder; linha 2 – Controle POS (DNA genômico do *Litopenaues vannamei*); linha 3 – Branco; linha 4 – PLs LCM -UFSC; linha 5 – PLs Larvisul; linha 6 – PLs Estaleirinho; linha 7 – PLs Estaleirinho; linha 8 – Pool de camarões; linha 9 – Branquias de camarões com deformações; linha 10 – Pleópodo de camarões com deformações; linha 11 – Pleópodo de camarões da região de Laguna/SC.

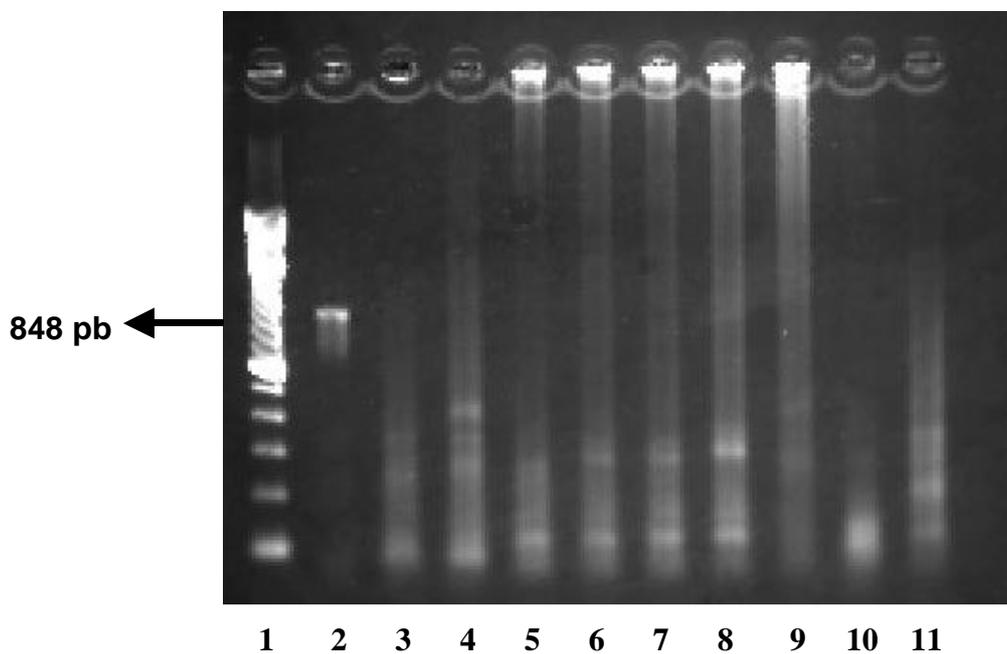


Figura 21. Produtos da reação Nested PCR para detecção do WSSV.

Linha 1 – padrão 100 pb ladder; linha 2 – Controle POS (DNA genômico do *L. vannamei*); linha 3 – PLs LCM - UFSC; linha 4 – PLs LCM -UFSC; linha 5 – PLs Larvisul; linha 6 – PLs Estaleirinho; linha 7 – PLs Estaleirinho; linha 8 – Pool de camarões; linha 9 – Branquias de camarões com deformações; linha 10 – Pleópodo de camarões com deformações; linha 11 – Pleópodo de camarões da região de Laguna/SC.

5.6 LABORATÓRIOS DE PÓS-LARVAS

5.6.1 LABORATÓRIO UM

O estabelecimento apresenta uma unidade de larvicultura e uma unidade pré-berçário ou setor de recria com capacidade para produção de 40 milhões de indivíduos por mês em sete ciclos anuais. O setor de maturação tem capacidade de carga para 1200 reprodutores para uma produção mensal de cerca 100 milhões de indivíduos.

Os registros de importações de náuplios datam de 1998 com a introdução de camarões procedentes da Venezuela e, nos anos seguintes, procedentes da região nordeste do Brasil. Atualmente o Laboratório de Camarões Marinhos - LCM é responsável pelo abastecimento de náuplios, larvas e pós-larvas de camarão marinho para todos os estabelecimentos de cultivo do estado, incluindo o fornecimento de náuplios para os Laboratórios de Larvisul e Estaleirinho.

As medidas profiláticas e de controle de agentes etiológicos para os setores de maturação, microalgas, larvicultura, pré-berçário e na despesca e embalagem, compreende procedimentos de vazios sanitários, filtração diária da água, limpeza e cloração de tubulações e reservatórios, bem como a higienização do pessoal, materiais e equipamentos. Na maturação é realizada a desinfecção de ovos e dos náuplios. Na larvicultura são realizadas análises microscópicas da qualidade dos animais, efetuada duas vezes ao dia, com observações predominantes quanto à presença de necroses, visualização do trato intestinal, formação branquial, pesquisa de protozoários epicomensais, formação dos apêndices e evolução dos tipos larvais.

O estabelecimento apresenta instalações independentes e adequadas ao embarque de animais com piso e paredes resistentes a desinfecções e mantém ações de pulverização dos veículos utilizados para o transporte dos animais, bem como restrição na movimentação de veículos e de pessoas estranhas ao serviço. Nas demais instalações o uso de pedilúvios é constante, havendo, igualmente restrições quanto à movimentação de pessoas estranhas. No ano de 2003 o LCM obteve a certificação ISO 14001.

Os reprodutores do LCM ficam sediados na Fazenda Experimental Yakult, na localidade de Salinas, Município de Balneário Barra do Sul/SC, com uma área alagada de 23 ha, distribuída em 17 viveiros e com capacidade de produção de 30 toneladas por ciclo. Como medida profilática no controle de agentes etiológicos são realizados vazios sanitários e os manejos usuais de uma fazenda de produção. A fazenda também gera

produção de camarões vendidos para empresas de processamento utilizando PLs do LCM. Como controle são realizadas biometrias mensais em amostras colhidas em três pontos equidistantes de cada viveiro. Os camarões são observados macroscopicamente com especial atenção para a uniformidade de tamanho dos indivíduos, aspectos do trato intestinal, brânquias, coloração, aspecto dos urópodos, presença de necroses no cefalotórax, abdômen e apêndices.

5.6.2 LABORATÓRIO DOIS

Com sede em Itapoá/SC é empreendimento da iniciativa privada. Recebe os náuplios do LCM e fornece PLs para as fazendas de camarão do Estado de Santa Catarina e Paraná. Suas instalações são bem planejadas, novas e isoladas de outras fazendas. Os procedimentos de limpeza e cloração de tubulações e reservatórios são realizados semanalmente no setor de maturação e produção de microalgas; nos setores de larvicultura e berçário ocorrem nos intervalos dos ciclos de produção. Os materiais de construção das diferentes instalações e tubulações permitem desinfecção sempre que necessário. A única observação importante anotada foi a taxa de sobrevivência da fase de náuplio até PLs é de 45 a 55% enquanto o esperado seria de 60 a 70% e grande falta de uniformidade de tamanhos PLs de um mesmo lote.

5.6.3 LABORATÓRIO TRÊS

Com sede em Itapema/SC é empreendimento da iniciativa privada. Também recebe náuplios do LCM e fornece PLs para as fazendas de camarão do estado. São instalações novas e bem planejadas com bom isolamento das fazendas de produção. Em futuro próximo está planejado o ciclo completo com estoque de reprodutores no próprio laboratório.

Em todos os três laboratórios foi observado um elevado grau de conscientização sobre potenciais fontes de contaminação e cuidados quanto à preservação e higienização das instalações e dos equipamentos, com procedimentos de pulverização e desinfecção diária dos materiais no transporte de PLs.

Nenhum dos laboratórios faz qualquer exame de certificação sanitária das doenças de notificação obrigatória e das doenças importantes para a carcinicultura recomendadas pela OIE.

5.7 FAZENDAS DE CULTIVO

Em nenhuma das fazendas foi observado o uso de pedilúvios e rodolúvios, nem mesmo a pulverização dos veículos de entrada e saída da propriedade com produtos desinfetantes. Em uma fazenda de camarões os veículos que necessariamente transitam em um ciclo de produção são: o que transporta as PLs dos laboratórios, o caminhão que traz os insumos à propriedade (rações e equipamentos), pessoal e transporte das empresas que realizam a despesca, bem como a assistência técnica que transita com veículos e pessoal em várias propriedades diferentes, às vezes várias em um mesmo dia. Também há movimentação de pessoas e veículos estranhos aos serviços próximos às áreas de cultivo. A captação de água de abastecimento dos viveiros é feita diretamente da natureza, devido à dificuldade desta operação em oceano aberto, bem como as áreas de instalação das fazendas serem em estuários, a captação normalmente é realizada em locais de águas calmas que sofrem influência de aglomerados urbanos e industriais. Outro fator importante é que o camarão cultivado tem melhor desempenho em salinidades entre 15 a 20, típicas de estuários enquanto no oceano é cerca de 35. Em algumas fazendas foi observada também a grande influência da maré na captação e do regime de chuvas, impossibilitando a captação em marés baixas ou quando ocorrem grandes precipitações pluviométricas.

Nas fazendas já em operação os efluentes são lançados em um canal coletivo com vazão a jusante dos cultivos, quando possível. Nos projetos mais atualizados, os efluentes são lançados em um tanque de recirculação para decantação e reuso da água. Todas as fazendas de cultivo fazem exames da qualidade da água diariamente, com medições de oxigênio dissolvido duas vezes ao dia. Estas medidas são para um bom desempenho do cultivo e para atender a legislação CONAMA vigente. Os resultados dos testes devem ser confrontados com laudos emitidos por laboratórios credenciados e servem para avaliar a qualidade e sensibilidade dos métodos usados pelas fazendas, bem como garantir que os lançamentos dos efluentes não comprometam o meio natural. As amostras devem ser analisadas no início do cultivo, em sua fase intermediária e no momento da despesca.

Em nenhuma das fazendas de cultivo há locais adequados para a destruição de animais enfermos ou mortos, ficando os mesmos expostos ao solo ou consumidos por predadores, como as aves marinhas.

Por ocasião das biometrias semanais e despesca são encontrados animais com lesões e deformações. As lesões encontradas neste trabalho estão mostradas nas Figuras 22 a 29.



Figura 22. Camarões *L. vannamei* com deformações no rostro (Foto do autor, 2003).

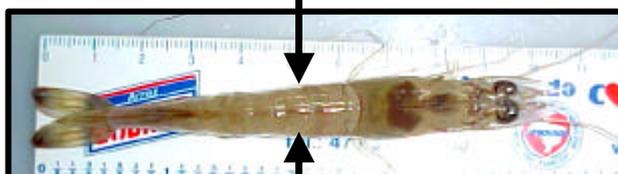


Figura 23. Camarão *L. vannamei* com deformações no exoesqueleto. (Foto do autor, 2003).



Figura 24. Camarões *L. vannamei* com deformações no corpo e grande diferenças de tamanho, também se pode observar a coloração avermelhada (Foto do autor, 2003).

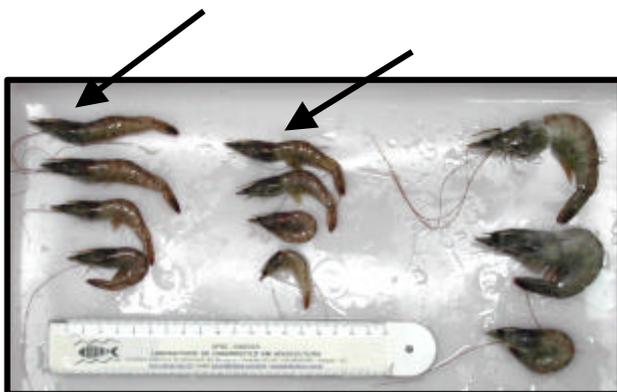


Figura 25. Camarões *L. vannamei* com deformações no corpo e grande diferenças de tamanho. Também se pode observar a coloração avermelhada (Foto do autor, 2003).



Figura 26. Camarões *L. vannamei* com deformações no corpo e exoesqueleto incompleto (Foto do autor, 2003).



Figura 27. Camarões *L. vannamei* com deformações no rostro (Foto do autor, 2003).



Figura 28. Camarões *L. vannamei* com deformações no rostro (Foto do autor, 2003).

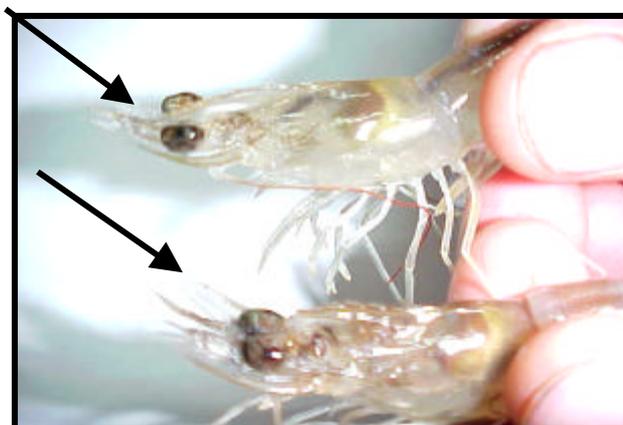


Figura 29. Camarões *L. vannamei* com deformações no rostro (Foto do autor, 2003).

6 DISCUSSÃO

6.1 DAS TÉCNICAS MOLECULARES

No final da década de 70, com o advento das técnicas de biologia molecular, foram desenvolvidas metodologias alternativas visando aumentar a sensibilidade de detecção de vírus a partir de amostras ambientais. O desenvolvimento da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), que permite a detecção de seqüências gênicas de microrganismos, aprimorou a possibilidade de avaliação da presença de vírus patogênicos em animais de cultivo. Entretanto, a sensibilidade da reação de PCR é diminuída para amostras de composição complexa, tais como os tecidos dos crustáceos, que podem apresentar substâncias capazes de interferir no sistema enzimático utilizado na reação, inibindo o processo de amplificação ou promovendo toxicidade às polimerases (WILDE et al., 1990; JIANG et al., 1992). Os inibidores da reação da PCR são substâncias de natureza diversa, incluindo proteínas (GOUVEA et al., 1990), sais, traços de detergentes como SDS ou fenol (BEUTLER et al., 1990) e resíduos do processo de extração. Outras substâncias mais específicas, tais como polissacarídeos presente nos tecidos de crustáceos tem sido identificadas como inibitórias para a reação de PCR (WILSON, 1997). Desta forma, torna-se necessária a utilização de protocolos que visem eliminar ou minimizar a interferência desses inibidores.

Outra limitação da reação de PCR é a falta de diferenciação entre as partículas virais amplificadas, em suas formas viáveis e não viáveis (REYNOLDS et al., 1995). Assim, a melhor alternativa para a detecção de vírus em amostras ambientais seria um método combinado de cultura celular, a partir da qual seria definida a concentração de partículas virais viáveis e de técnicas moleculares que aumentem a sensibilidade da detecção viral.

Torna-se importante ressaltar a influência da concentração dos íons Mg^{+2} em diversas etapas da reação de PCR, tais como anelamento dos iniciadores, especificidade do produto, temperatura de dissociação das fitas, formação de dímeros de iniciadores e atividade e especificidade das enzimas, que requerem cátions equivalentes. Altas concentrações desse íon podem promover ampliações inespecíficas, resultando numa baixa especificidade da reação, enquanto que pequenas concentrações podem resultar em pouca eficiência (SAMBROCK et al, 1989; INNIS & GELFAND, 1990; PERSING, 1993; SIMMONDS, 1995).

A concentração ideal dos iniciadores foi definida para a reação da PCR, pois quando presentes em concentrações excessivas, os iniciadores podem favorecer anelamentos inespecíficos e promover interações entre si, formando “dímeros”, que competem pela amplificação do produto desejado, resultando numa baixa eficiência de reação (SAMBROCK et al., 1989; INNIS & GELFAND, 1990; PERSING, 1993; SIMMONDS, 1995).

A presença de vírus pode ser detectada com o emprego da PCR na fase pré-patente da infecção, referida como fase latente, persistente ou assintomática. Da mesma forma, pode detectar a presença do vírus na fase de transição e na fase patente da infecção. Indivíduos na fase latente da infecção com WSSV, somente apresentam resultado positivo em PCR nested e podem ou não apresentar sinais clínicos da infecção. Indivíduos no estágio de transmissão da enfermidade apresentam PCR positivo e podem apresentar discretos pontos brancos no exoesqueleto, porém sem sinais clínicos mais evidentes. Enquanto a fase latente da infecção pode persistir durante vários meses, a fase de transmissão dura apenas algumas horas, seguida da caracterização da infecção. Uma vez que o indivíduo apresente PCR positivo, a morte certamente ocorrerá dentro de poucas horas (CHANRATCHAKOOL, 2001).

A utilização da técnica de PCR, associada a outras metodologias de diagnóstico, pode contribuir para o monitoramento de rotina dos cultivos dentro de uma perspectiva mais eficiente. Além disso, é indicada para monitorar também a larvicultura, reprodutores e população de invertebrados que compartilham o mesmo habitat (HOUSSAIN et al., 2001; LO et al., 1997). No entanto, a técnica deixa de ser efetiva em populações muito grandes ou quando apenas um pequeno número de indivíduos da população está infectado (NUMAN et al., 1998).

A metodologia da PCR tem sido a mais utilizada devido à sua sensibilidade quando comparada a outros métodos moleculares, sendo a amplificação do número de cópias do genoma viral em animais infectados, o principal meio de monitorar enfermidades em camarões, especialmente em casos de infecção assintomática (LO et al., 1997).

Projetos pilotos para testar os protocolos das técnicas moleculares oferecidos pelos fabricantes são necessários, pois por se tratar de uma espécie exótica com diferenças substanciais em seus tecidos no que se refere à estrutura e inibidores, nem sempre os protocolos comerciais são eficazes. O método ideal deve ser rápido, simples e que permita uma recuperação viral alta e eficiente. Diversos autores também destacam que uma revisão das metodologias existentes demonstrou que nenhuma delas é igualmente efetiva para

produtos marinhos de diferentes lugares geográficos (BOUCHRITI & GOYAL, 1993). A concentração de inibidores enzimáticos pode diferir de acordo com a estação do ano e localização geográfica em que foi realizada a coleta (HURST et al, 1997).

Neste estudo o produto DNAzol® Reagent, GibcoBRL não foi eficaz na extração do DNA genômico do camarão, provavelmente por não ser capaz de eliminar todos os inibidores ou ainda que o DNA fica aderido a um elemento que foi retirado durante a extração, como proteínas, lipídeos ou carboidratos.

O produto comercial TRIZOL® Reagent, GibcoBRL, foi eficaz nos resultados utilizando-se o protocolo recomendado pelo fabricante. O TRIZOL® é um reagente comercial pronto que consiste de uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina para o uso no isolamento de RNA total de amostras de origem humana, animal, vegetal, bacteriana e viral.

O protocolo de extração do método de associação das técnicas fenol/clorofórmio – álcool isoamílico e sílica/tiocianato de guanidina (ALFIERI, 1999) e método sílica/tiocianato de guanidina (BOOM et al., 1990) permite a extração de RNA e DNA possibilitando prova da PCR para RNA e DNA vírus. Seus procedimentos são de fácil execução, não exigindo equipamentos sofisticados. Seu único inconveniente é o tempo necessário para a conclusão de todos seus passos. Os resultados alcançados na detecção do DNA genômico de *L. vannamei* foi de 67% o que corresponde a resultados obtidos em trabalhos semelhantes como em Coelho (2001), onde os melhores resultados foram de 75,7% com PCR usando kit Platinum Super Mix®.

O protocolo de extração recomendado pela OIE para extração de DNA, deve ser objeto de melhor avaliação para as condições e estádios culturais das amostras locais. Diversos fatores podem influenciar nos resultados, devido a simplicidade do protocolo o mesmo também é mais sujeito a falhas.

A não detecção do TSV e do WSSV não garante a inexistência deste vírus no Estado. O período de amostragem de 8 meses e o número de estabelecimentos coletados apenas indicam a inexistência destes patógenos nesta estação do ano e nestes lotes de produção.

Há um grande número de animais com sintomas semelhantes aos listados para as doenças de notificação obrigatória e outras doenças importantes. Isto gera a necessidade de um monitoramento por um período mínimo de 2 anos da espécie cultivada e dos hospedeiros selvagens, para a certificação sanitária com status SPF.

Assim sendo, esta etapa preliminar do nosso estudo deve ser complementada com a análise de um número maior de indivíduos e locais de amostragem, tanto adultos como pós-larvas.

6.2 DO SISTEMA PRODUTIVO

A atividade da carcinicultura vem experimentando rápida evolução, no sentido de intensificação dos sistemas e das técnicas de produção, com conseqüente aumento da lucratividade e de eficiência. No entanto, esse processo implica também na utilização mais intensiva dos recursos naturais e um maior aporte de efluentes aos ecossistemas vizinhos às fazendas. Outra conseqüência desse processo é a possibilidade de surgimento e de disseminação de enfermidades. O camarão é a exemplo de outros animais, susceptível a diversas patologias, e a manutenção do setor sob cuidadosa vigilância sanitária representa um constante desafio, que deve ser encarado para que seja possível a adoção de medidas oportunas de combate, controle e prevenção de doenças (BORGHETTI et al., 2003).

O risco sanitário vai aumentando na medida que novas tecnologias para melhorar o resultado econômico vão sendo implementadas. As inovações que oferecem risco epidemiológico são correlacionadas a melhoramentos genéticos que induzem a endogamia da população, aumento da densidade de 30 camarões/m² atualmente em uso para 90 a 120 camarões/m² que é comumente praticada no nordeste brasileiro; fatores econômicos como melhor preço do produto induzem aos proprietários a intensificação das atividades como diminuição do vazio sanitário, aquisição de PLs com origem em outras regiões, aumento da oferta de alimentos diminuindo a qualidade da água, renovação mais constante da água aumentando a emissão de efluentes.

O Programa de Cultivo de Camarões Marinhos para o Estado de Santa Catarina tem como meta a implantação de 2.500 ha de cultivo, com a geração de 3000 empregos e de recursos equivalentes a R\$ 50 milhões/ano. Contudo, sua rápida expansão e os riscos inerentes ao aparecimento de enfermidades devido ao cultivo intensivo e a movimentação animal não devem ser negligenciados. O desenvolvimento da carcinicultura, como atividade econômica, exerce outra importante função no contexto social, ao contribuir para a fixação do homem na sua região de origem. Desta maneira, a carcinicultura, além de gerar empregos, proporciona alta rentabilidade como atividade comercial e pode gerar receitas significativas de exportação para o país.

A carcinicultura é a mais sensível a impactos externos oriundos do resultado da ação do homem e da natureza, do que outras atividades produtivas, e quando desenvolvida próxima a áreas de maior ocupação humana, como rios, estuários e regiões costeiras, a atividade se torna mais vulnerável (MUIR, 1995). Com a intensificação dos cultivos, implantação da monocultura, manipulação genética, uso de produtos químicos e hormonais, intensificando os cultivos, aumento da dependência do alimento artificial balanceado e modernização da mecanização, os pacotes tecnológicos e as relações sociais, a aquicultura necessita de monitoramento dos potenciais riscos que possam afetar a atividade constantemente (VALENTI, 2000).

Nos canais de adução e tanques de cultivos das fazendas estão sempre presentes várias espécies da fauna e flora naturais do ambiente, como peixes, camarões brancos nativos (*F. paulensis* e *L. schmitti*), siris e caranguejos. Muitos deles são hospedeiros naturais de diversos patógenos importantes, principalmente vírus de notificação obrigatória e de doenças importantes para a carcinicultura, o que também pode levar a uma adaptação de patógenos importantes do *L. vannamei* aos camarões nativos.

A construção de tanques de recirculação para decantação e reuso da água diminui sensivelmente os gastos com o tratamento da água para o próximo cultivo, pois a mesma tem grandes quantidades de algas planctônicas desejáveis, bem como diminui os riscos do lançamento de patógenos em ambiente natural. Os tanques de recirculação também podem fornecer uma renda adicional à fazenda com o cultivo de outras espécies em estudo, como ostras *Crassostrea rhizophorae* e tilápias vermelhas (Saint Peters). Outro inconveniente do lançamento da água de cultivo diretamente na natureza é grande quantidade de nutrientes carregado ao ambiente natural podendo ocorrer “bloom” de algas nocivas, como as marés vermelhas.

6.3 DO PROGRAMA DE SANIDADE PARA CRUSTÁCEOS

Outro fator preocupante é o comércio ilegal de camarões de cultivo como iscas para pesca esportiva. Este ato é previsto em lei e sujeito a multas emitidas pelo IBAMA, mas é fato corriqueiro entre pescadores amadores. A introdução de espécies exóticas em meio natural pode trazer conseqüências irreparáveis.

Na ocasião da despesca são aferidos vários índices indicadores de saúde, como conversão, taxa de crescimento, mortalidade, percentagem de animais com deformações e manchas cutilares. Em se tratando dos aspectos sanitários, são considerados índices ótimos

quando a percentagem de animais com cascas moles, melanização, manchas pretas e deformidades são menores que 5%. Em diversas ocasiões podem ser observados índices iguais ou superiores, suas causas são atribuídas a problemas de qualidade de água como alcalinidade e amônia, parasitas como gregarinas, bacterioses oportunistas e problemas genéticos. Sem um histórico mais apurado das causas como sua origem, a ocorrência de “blooms” planctônicos, de mortes, fatores de stresse, sinais clínicos como intestinos vazios, apêndices vermelhos, paralisia de cauda e musculatura degenerada, incorre-se na pressuposição da simplificação do problema podendo ser omitida uma importante informação de doenças importantes para a carcinicultura.

O que pode impedir um nível de competitividade internacional para a produção brasileira de camarão marinho está relacionado com a incipiente estrutura das instituições setoriais de pesquisa, o escasso conhecimento que se tem da cadeia de comercialização nos mercados internos e externos e a falta de informações que fomentem o controle sanitário da atividade.

A criação intensiva de organismos aquáticos, onde um grande número de animais é mantido em um espaço limitado, associado às condições das instalações, manejo e abastecimento de água, entre outros fatores, favorece o aparecimento de enfermidades. Bactérias, vírus, fungos e parasitos podem ter origem em animais de vida livre introduzidos através da água de abastecimento, podem ser provenientes de outra propriedade através da aquisição de náuplios, larvas e pós-larvas, juvenis e mesmo animais adultos podem, ainda, ser transportados de um cultivo para outro através da movimentação de homens e veículos.

O planejamento de qualquer atividade sanitária requer necessariamente o conhecimento dos resultados que ela representa, isto é, um perfil de seu histórico, situação atual e perspectivas. Para o desenvolvimento de um programa de defesa sanitária para o cultivo de camarões é necessário conhecer a situação sócio-econômica e cultural dos produtores e investigar os sistemas de produção, as práticas de manejo e a ocorrência de enfermidades, considerando fatores biológicos e econômicos com vistas a minimizar problemas sanitários.

Todo controle sanitário está alicerçado no conhecimento do estado de saúde dos animais na área de cultivo, baseado em inspeções e padronização de procedimentos de amostragem, seguidas de diagnóstico laboratorial conduzido de acordo com as normas internacionais. Deve ainda promover ações preventivas visando impedir o ingresso de agentes patogênicos nos cultivos ou promover ações para a erradicação de enfermidades, sempre que possível.

Um programa de sanidade para crustáceos somente poderá lograr êxito em situações onde o esforço do controle oficial esteja associado à educação sanitária, esclarecendo a população sobre os riscos inerentes e as maneiras de evitar transtornos e perdas econômicas. Muitas das ameaças estão associadas a procedimentos que ocorrem fora do controle legal, tais como cultivos não licenciados, movimentação não autorizada, ingressos clandestinos, entre outros. A educação é um processo participativo não é um conteúdo que se possa transmitir, mas uma mentalidade e um comportamento com ela coerente (MACIEL, 2002).

Nenhum estabelecimento possui a certificação zoonosológica e o Serviço Oficial de Defesa Sanitária Animal, no que se refere aos crustáceos, teve seu primeiro envolvimento em junho de 2000 e, portanto, ainda não existe um banco de dados com a identificação e o histórico da real situação sanitária dos cultivos. A EPAGRI mantém o cadastro dos estabelecimentos de reprodução e cultivos.

Os programas de sanidade são alicerçados em fundamentos que dizem respeito à vigilância e ao monitoramento sanitário permanente, atendendo às exigências constantes do Regulamento de Defesa Sanitária Animal. Entretanto, observamos que mesmo com a existência do Decreto nº 24.548, datado de 1934, no que se refere à obrigatoriedade de notificar o Serviço Veterinário Oficial da ocorrência de enfermidades em animais isto não constitui uma realidade entre os produtores de camarões.

O princípio básico da biossegurança é o de prevenir a introdução e a disseminação de enfermidades nos cultivos. Neste contexto estão envolvidos procedimentos como minimizar as trocas de água dos viveiros, minimizar o risco de contaminação causado pelo uso de alimentos vivos. A introdução de novos indivíduos ao cultivo, deve sempre ser acompanhada de certificação zoonosológica do estabelecimento de origem, emitido pelo Serviço Oficial de Defesa Sanitária Animal e manter os indivíduos recém adquiridos sob observação em viveiros isolados, evitando assim qualquer procedimento que envolva risco real ou potencial de causar enfermidade nos animais (MACIEL, 2002).

Embora não tenha sido observada a prática da adoção de um local adequado para eliminação de animais mortos, a simples remoção dos enfermos ou mortos para locais onde possam ser cremados ou enterrados auxilia na redução do número de agentes patogênicos existentes no ambiente. Esta prática é válida, principalmente em se tratando de espécies que praticam o canibalismo e cuja via de transmissão ocorre através da ingestão do agente patogênico. Por outro lado, a exposição de animais mortos representa importante fonte de disseminação de agentes patogênicos através de aves, que podem percorrer vários

estabelecimentos. Vários vírus podem sobreviver no intestino de pássaros e estes pássaros podem defecar em viveiros de outros estabelecimentos ou de qualquer maneira, movimentar o material infectado de um local para outro.

A melhor maneira de evitar perdas na produção e nos lucros da atividade é implementar medidas preventivas para deixar os agentes patogênicos fora do sistema de produção. Estas medidas incluem a desinfecção dos viveiros e a eliminação de fontes potenciais de contaminação, o uso de telas e filtros para a água de abastecimento, objetivando remover a possibilidade de ingresso do agente ou de seus vetores, remover o excesso da matéria orgânica nos viveiros, utilizar apenas alimentos processados, que sofram aquecimento no seu preparo, com temperatura e tempo suficiente para a destruição ou inativação do agente etiológico.

Santa Catarina apresenta no cultivo de camarões marinhos o privilégio de não possuir registro de ocorrência de enfermidades de notificação obrigatória. Esta condição confere maiores vantagens na exploração da atividade e na conquista de mercados. Isto se deve, principalmente porque as pós-larvas adquiridas pelos estabelecimentos de produção são quase que exclusivamente procedentes do LCM e os estabelecimentos contam com o serviço de extensão rural para as orientações e assistência técnica.

Deve ser desencadeada uma campanha educativo-sanitária visando minimizar fatores de riscos externos e ambientais e implantar a certificação zoosanitária, visando garantias sanitárias aos plantéis. Deve-se desenvolver junto aos produtores e a população atividade de orientação quanto à prevenção e o controle de enfermidades, objetivando diminuir os possíveis danos sócio-econômicos resultantes do aparecimento das mesmas. A estratégia da seleção e produção de reprodutores de alta qualidade genética, suficiente para suprir a demanda do Estado, deve ser incentivada como forma de reduzir o trânsito de animais procedentes de outras regiões ou países, minimizando os riscos da introdução de enfermidades.

É imperiosa a necessidade da implantação de um laboratório de diagnóstico de enfermidades, a partir das interações entre as diversas entidades, tanto públicas como privadas, que permitirá o monitoramento dos estabelecimentos e das populações existentes no Estado, representando para os produtores um diferencial qualitativo de seu produto através da certificação sanitária dos mesmos.

7. CONCLUSÕES

O protocolo comercial DNazol® Reagent, GibcoBRL para a extração de DNA genômico não foi eficaz neste trabalho.

O protocolo de extração para o DNA genômico recomendado pela OIE não foi eficaz neste trabalho.

O protocolo de extração do método de associação das técnicas fenol/clorofórmio – álcool isoamílico e sílica/tiocianato de guanidina e método sílica/tiocianato de guanidina que permite a extração de RNA e DNA foi eficaz neste trabalho.

O protocolo comercial TRIZOL® Reagent, GibcoBRL para a extração de RNA foi eficaz neste trabalho.

A não detecção do fragmento de 231 pb nas amostras analisadas indica a ausência do TSV.

A ausência na detecção do fragmento 1447 pb e 941 pb indica a ausência do WSSV no período de tempo das coletas das amostras. A detecção do fragmento de 848 pb nas amostras analisadas indica a qualidade do DNA utilizado.

A legislação CONAMA vigente sobre os exames de qualidade de água das fazendas de cultivo de camarão marinho ainda não está sendo atendida na região nordeste catarinense, uma vez que não existem laboratórios credenciados para os exames.

Em nenhuma das fazendas avaliadas existem quaisquer métodos de controle sanitário como rodolúvios ou arcos de desinfecção, ações como enterro de animais mortos e controle de fauna vetora de enfermidades.

Não há controle sobre a sanidade quanto a presença de doenças virais das pós larvas de camarões marinhos fornecidas às fazendas de cultivo no Estado de Santa Catarina.

Não há laboratório de referência para Certificação Sanitária quanto às doenças de Notificação Obrigatória e Doenças de Crustáceos Importantes para a OIE no Estado de Santa Catarina.

A falta de laboratórios de referência para estudos de problemas sanitários ocorridos nas fazendas de cultivo de camarões marinhos como determinação do agente, o conhecimento das causas e origens destes problemas pode levar ao aparecimento de graves problemas, a exemplo do que já ocorreu em outros países.

A movimentação de crustáceos em ausência de sólidas garantias sanitárias sobre as doenças de Notificação Obrigatória e Doenças de Crustáceos Importantes para a OIE apresenta grande risco de disseminação de enfermidades entre países, estados e regiões. Experiências de outras regiões têm mostrado que a negligência em relação às garantias sanitárias está associada a perdas financeiras substanciais.

Não há um plano de delimitação e barreiras geográficas para a contenção de um foco inicial de doença de etiologia viral em carcinicultura.

O risco epidemiológico de ingresso de novas doenças tem limitado a iniciativa de aquisição de novos reprodutores.

Durante o estudo foi observado que o Estado não registrou até o momento a ocorrência de qualquer das enfermidades consideradas de notificação obrigatória. No entanto, foram citados alguns casos de mortalidade de camarões cultivados, contudo sem identificação laboratorial do provável agente etiológico e sem a devida comunicação dos fatos ao Serviço Oficial de Defesa Sanitária Animal.

Este trabalho demonstrou através dos resultados que as metodologias moleculares podem ser aplicadas com sucesso na análise de amostras de campo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASZADEGAN, M.; STEWART, P.; LECHEVALLIER, M.; YATES, M.; GERBA, C. **Occurrence of enteroviruses in groundwater and correlation with water quality parameters.** Water Quality Technology Conference, New Orleans, La. American Water Works Association, Washington, D.C. 2000.

ABCC. **As estatísticas da carcinicultura brasileira em 2001.** Associação Brasileira de Cultivo de Camarões, 2002. Disponível em <http://www.abccam.com.br/Estatisticas/htm>. Acesso em 11 de nov de 2001 e 05 out de 2003.

ALFIERI, A.F. **Caracterização dos genótipos G e P de Rotavirus grupo A de origem animal (bovina e suína) e de origem humana pela Reação da Polimerase em Cadeia.** 1999. 134 p. Teses (Doutorado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP, São Paulo. 1999.

BACHÉRE, E. Shrimp immunity and disease control. **Aquaculture**, **191**, 3-11, 2000.

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

BEUTLER, E.; GELBART, J.; KULH, W. Interference of heparine with polymerase chain reaction. **Biotechniques** **9**: 166-166, 1990.

BONAMI J.R., HASSON K.W., MARI J., POULOS B.T.; LIGHTNER D.V. Taura syndrome of marine penaeid shrimp: characterization of the viral agent. **J. Gen. Virol.**, **78**, 313-319. 1997.

BOOM R.; SOL C.J.A. SALIMANS M.M.M.; JANSEN C.L.; WERTHEIM-VAN DILLEN P.M.E.; NOORDAA-VAN DER J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **J. Clin. Microbiol.**, **28**:843-850, 1990.

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

BOUCHRITI, N.; GOYAL, S.M. Methods for the concentration and detection of human enteric viruses in shellfish: a review. **Microbiologica**, **16**: 105-113, 1993.

BROCK J.A. & MAIN K. A guide to the common problems and diseases of cultured *Penaeus vannamei*. The Oceanic Institute, Makapuu Point, P.O. Box 25280, Honolulu, Hawaii, USA, 241p. 1994.

BROCK J.A.; GOSE R., LIGHTNER D.V.; HASSON K.W. An overview on Taura syndrome, an important disease of farmed *Penaeus vannamei*. In: Swimming Through Trobled Water, Browdy C.L. & Hopkins J.S., ed. Proceedings of the special session on shrimp farming, Aquaculture'95. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, 84-94. 1995.

BROCK J.A., GOSE R.B., LIGHTNER D.V.; HASSON K.W. Recent developments and an overview of Taura Syndrome of farmed shrimp in the Americas. In: Diseases in Asian Aquaculture III, Flegel T.W. & MacRae I.H., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, the Philippines, 275-283. 1997.

CHANRATCHAKOOL, P. Management of white spot disease in Thailand. **Aquat. Ani. Health Res.** Inst., Thailand, 2001.

CHAPMANN, N.M.; TRACY S.; GAUNTT, C.J.; FORTMUELLER, V. Molecular detection and identification of enteroviruses using enzymatic amplification and nucleic acid hybridization. **J. Clin. Microbiol.**, **28**:843-850, 1990.

CHOU, H.Y.; HUANG, C.Y.; WANG, C.H.; CHIANG, H.C.; LO, C.F. Pathogenicity of baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. **Dis. Aquat. Org.**, **23**:165-173, 1995.

COELHO, C. **Padronização de métodos moleculares para a detecção do vírus da hepatite A em ostras *Crassostrea gigas* experimentalmente inoculadas.** 2001. 151 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

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

FLINT, S.J.; ENQUIST, L.W.; KRUG, R.M.; RACANIELLO, V.R.; SKALKA, A.M. – Viral Pathogenesis. IN: **Principles of Virology: molecular biology, pathogenesis and control.** Washington, DC, ASM Press, 595-627. 2000.

GAJARDO, R.; BOURICHRITI, N.; PINTÓ, R.M.; BOSCH, A. Genotyping of rotaviruses isolated from sewage. **Appl. Environm. Microbiol.** **61:** 3460-3462, 1995.

GOUVEA, V.; GLASS, R.I.; WOODS, P.; TANIGUCHI, K.; CLARK, H.F.; FORRESTER, B.; FANG, Z. Polymerase chain reaction and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. **J. Clin. Microbiol.**, **28(2):**276-282, 1990.

GRINDE, B., JONASSEN, T. O, USHIJIMA, H. Sensitive detection of group A rotaviruses by immunomagnetic separation and reverse transcription-polymerase chain reaction. **J. Virol. Meth.** **55:**327-338, 1995.

HASSON K.W.; LIGHTNER D.V.; POULOS B.T.; REDMAN R.M.; WHITE B.L.; BROCK J.A.; BONAMI J.R. Taura syndrome in *Penaeus vannamei*: demonstration of a viral etiology. **Dis. Aquat. Org.**, **23:** 115-126. 1995.

HASSON K.W.; LIGHTNER D.V.; MOHNEY L.L.; REDMAN R.M.; POULOS B.T.; WHITE B.L. Taura syndrome virus (TSV) lesion development and the disease cycle in the Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. **Dis. Aquat. Org.**, **36,** 81-93.1999.

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

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

HUANG, J.; SONG, X.L.; YU, J.; YANG, C.H. Baculoviral hypodermal and hematopoietic necrosis study on the pathogen and pathology of the shrimp explosive epidemic disease of shrimp. **Mar. Fisch. Res.**, **16(1)**:1-10, 1995.

HURST, C.J.; KNUDSEN, G.R.; McINERNEY, M.J.; STETSENBACH, L.D.; WALTER, M.V. **Manual of Environmental Microbiology**. American Society for Microbiology, Washington, DC. ASM Press 1997. p. 168-175, 203-212.

IJZERMAN, M.M.; DHALING, D.R.; SHAY FONT, G. A method to remove environmental inhibitors prior to the detection of waterborne enteric viruses by reverse transcription-polymerase chain reaction. **J. Virol. Meth.** **63**:145-153, 1997.

INNIS, M.A.; GELFAND, D.H. Optimization of PCRs. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J., ed. – **PCR protocols: a guide to method and applications**. San Diego, Academic Press, 1990. p. 3-12.

JANSEN, R.W.; SIEGL, G.; LEMON, S.M. Molecular epidemiology of human hepatitis A virus defined by an antigen-capture polymerase chain reaction method. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, **87**:2867-2871, 1990.

JIANG, X.; WANG, J.; GRAHAM, D.Y.; ESTES, M.K. Detection of Norwalk virus in stool by polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, **30**: 2529-2534, 1992.

JOTHIKUMAR, N.; DENA, O.; MARIAM T.W. Immunomagnetic capture PCR for rapid concentration and detection of hepatitis A virus from environmental samples. **Appl. And Enviro. Microbiol.**, **64(2)**: 504-508, 1997.

KESTEMONT, P. Different systems of carp production and their impacts on the environment. **Aquaculture**, **129**:347-372, 1995.

KOPECKA H.; DUBROU S.; PREVOT, J.; MARSHALL J.; LOPES-PILA, J. M. Detection of naturally occurring enteroviruses in waters by reverse transcription, polymerase chain reaction and hybridization. **Appl. Environ. Microbiol.**, **59**:489-522, 1993.

LEES, D. – Viruses and bivalve shellfish – **Intern. J. of Food. Microb.** **59**:81-116, 2000.

LEWIS, G.D.; METCALF, T.G. Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A virus and human rotavirus, from oyster, water and sediment samples. **Appl. Environ. Microbiol.** **54**: 1983-1988, 1988.

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

LIGHTNER D.V. Epizootiology, distribution and the impact on international trade of two penaeid shrimp viruses in the Americas. **Rev. sci. tech. Office int. Epiz.**, **15**:579-601. 1996a.

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

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

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

LO, C.; HO, C.; CHEN, C.; LIU, K.; CHIU, Y.; YEH, P.; PENG, S.; HSU, H.; LIU, H.; CHANG, C.; SU, M.; WANG, C.; KOU, G. Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with special emphasis on reproductive organs. **Dis. Aquat. Org.**, **30**:53-72, 1997.

LO, C.; HSU, H.; HO, C.; TSAI, M.; KOU, G.; LIGHTNER, D. Specific genomic DNA fragment analysis of different geographical isolates of shrimp white spot syndrome associated virus. **Dis. Aquat. Org.** 1998.

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

MAGBANAU, F.; NATIVIDAD, K.; MIGO, V.; ALFAFARA, C.; DE LAPENA, F.; MIRANDA, R.; ALBALADEJO, J.; NADALA, E.; LOH, P. White spot syndrome vírus (WSSV) in cultured *Penaeus monodon* in the Philippines. **Dis. Aquat. Org.**, **421**: 77-82, 2000.

MARI J., BONAMI J.R.; LIGHTNER D.V. Taura syndrome of Penaeid shrimp: cloning of viral genome fragments and development of specific gene probes. **Dis. Aquat. Org.**, **33**: 11-17. 1998.

METCALF, T.G., JIANG, X., ESTES, M.K., MELNIOCK, J.L. Nucleic acid probes and molecular hybridization for detection of viruses in environmental samples. **Prog. Med. Virol.**, **35**:186-214, 1988.

METCALF, T.G.; MELNICK, J.L.; ESTES, M.K. Environmental Virology: From detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology – A Trip of Over 50 Years. **Annu. Rev. Microbiol.**, **49**:461-487, 1995.

MOHAN, C.; SHANKAR, K.; KULKARNI, S.; SUDHA, P. Histopathology of cultured shrimp showing gross signs of yellow head syndrome and white spot syndrome during 1994 Indian epizootics. **Dis. Aquat. Org.**, **34**:9-12, 1998.

MUIR, J. Aquaculture and the environment: challenges for the milenum. In: - **Eurofish Report Trade Conference**. Agra Europe, London, 7p, 1995.

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

NUNES, A.J.P.; MARTINS, P.C. Avaliando o estado de saúde de camarões marinhos na engorda – parte 2. Cedecam/labomar/UFCedecam, Instituto de Ciências do Mar/ UFC. Disponível na internet <http://www.aqualider.com.br> acesso em 09/02/04.

OIE - OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. **Informe de la Reunión de la Comisión de la OIE para las Enfermedades de los Peces**, Septiembre, Paris, 2001.

OIE - OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases – 2003. Disponível na internet em <http://www.oie.int/eng/normes/manual>>. Acesso em 27/02/2004.

OVERSTREET R.M.; LIGHTNER D.V.; HASSON K.W.; McILAWAIN S.; LOTZ J. Susceptibility to TSV of some penaeid shrimp native to the Gulf of Mexico and southeast Atlantic Ocean. **J. Invertebr. Pathol.**, **69**, 165-176. 1997.

PÁEZ-OSUNA, F. The enviromental impact of shrimp aquaculture: a global perspective. **Env. Poll.**, v.112, p. 229-231, 2001.

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

PERSING, D.H. Target selection and otimization of amplification reactions. In: PERSING, D.H.; SMITH, T.F.; TENOVER, F.C.; WHITE, T.J., ed. – **Diagnostic molecular microbiology: principles and applications**, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, Washington, DC, 1993. p.88-104.

PROENÇA, C.E.M.; BITTENCOURT, P.R.L. **Manual de piscicultura Tropical**. Brasília: Ibama, Ministério do Meio Ambiente e da Amazônia Legal, 1994. 196p. ISBN 85-7300-007-4.

REYNOLDS, K.A.; GERBA, C.P.; PEPPER, I.L. Detection of enterovirus in marine waters by direct RT-PCR and cell culture. **Wat. Sci Tech.**, **31(5-6)**: 323-328, 1995.

ROCHA, I.P. A carcinicultura no contexto do setor pesqueiro brasileiro. **Panorama da Aqüicultura**, vol 13. n° 80, nov/dez/2003, pg 49-53 ISSN 1519-1141.

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

SAMBROCK, J.; FRITCH, E.F.; MANIATIS, T. Gel electrophoresis of DNA. In: _____ - **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2.ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 3v. 1989.

SCHWAB, K.J., DE LEON R. & SOBSEY M.D. Concentration and purification of beef extracts mock eluates from water samples for the detection of enteroviruses, hepatitis A virus and Norwalk virus by reverse-transcription-PCR. **Appl. Environ. Microbiol.** **61**:531-537, 1995.

SIMMONDS, P. Polymerase chain reaction. In: DESSELBERGER, U., ed. – **Medical virology: a practical approach**, Oxford, 1995. p. 107-145.

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

SOBSEY, M.D. Detection of viruses in shellfish. In: GERBA, C.P.; GOYAL, S.M. (ed.) **Methods in Environmental Virology**. New York, Marcel Dekker, p. 243-259. 1982.

SOBSEY, M.D. methods for recovering viruses from shellfish, seawater and sediments. In: BERG, G.(ed.) – **Methods for Recovering Viruses from the Environment**. Boca Raton, CRC Press, p. 77-108. 1987.

SOBSEY, M.D. Inactivation of health-related microorganism in water by disinfection processes. **Water. Sci. Tech.** **21**:179-195, 1989.

SUÑÉN, E.; SOBSEY M.D. Recovery and detection of enterovirus, hepatitis A virus and Norwalk virus in hardshell clams (*Mercanaria mercenaria*) by RT-PCR Methods. **J. Viral Meth.** **77**: 179-187, 1999.

THEIL K.W. Group A rotaviruses. In: SAIF, L.J. & THEIL K.W. (eds) – **Viral diarrheas of man and animals**. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla, 1990. p. 35-72.

THIERMANN, A.B. The relationship between the World Trade Organization and the Office International des Epizooties. **Rev. Sci. Tech.** OIE, 16(1):13-16, 1997.

TRAORE, O.; ARNAL, C.; MIGNOTTE, B.; MAUL, A; LAVERAN, H.; BILLAUDEL, S.; SCHWARTZBROD, L; Reverse Transcriptase PCR detection of Astrovirus, Hepatitis A virus and Poliovirus in Experimentally Contaminated Mussels: comparison of several extraction and concentration methods. **Appl. Environm. Microbiol.** **64**:3118-3122, 1998.

TSAI, Y., TRAN, B.; SANGERMANO, L.R.; PALMER, C.J. Detection of Poliovirus, Hepatitis A virus, and Rotavirus from Sewage and Ocean Water by Triplex Reverse Transcriptase PCR. **Appl. Environ. Microbiol.** **60**: 2400-2407, 1994.

TSAI, Y.; TRAN, B.; PALMER, C.J. Analysis of viral RNA persistence in seawater by reverse transcriptase-PCR. **Appl. Environ. Microbiol.**, **61**: 363-366, 1995.

WAS - WORLD AQUACULTURE SOCIETY. **Diagnosis of shrimp disease**. Baton Rouge, 1999. ISSN 974.662.093-2. 1999. CD-ROM.

WILDE, J.; EIDEN, J.; YOLKEN, R. Removal of inhibitory substances from human fecal specimens for detection of group A rotavirus by reverse transcriptase and polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, **28**: 1300-1307, 1990.

WILSON, J.L. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. **Appl.; Environ. Microbiol.**, **63**(10):3741-3752. 1997.

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

WONGTEERASUPAYA, C.; VICKERS, J.; SRIURAIRATANA, S.; NASH, G.L.; AKARAJAMORN, A.; BOONSAENG, V.; PANYIM, S.; TASSANAKAJON, A.; WITHYACHUMNARNKUL, B.; FLEGEL, T. A monoccluded systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn, *Penaeus monodon*. **Dis. Aquat. Org.**, **21**:69-77, 1995.

VALENTI, W.C. **Aquicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável**. Editor Wagner Coltroni Valenti. Brasilia: CNPq / Ministério da Ciência e Tecnologia. Editores adjuntos: Carlos Rogério Poli, José Arlindo Pereira, Jose Roberto Borghetti. 2000. 399 p.

9 ANEXO

Anexo 1. PROCEDIMENTOS PARA EXTRAÇÃO DO RNA COM TRIZOLÂ REAGENT, GIBCOBRL

1. Coleta dos órgãos. Separar em placas de Petri esterilizadas fazendo pool de órgãos por propriedade.
2. Coletar 100 ul ou 0,1 ml (50 a 100 mg) de tecido, colocar em tubo de Eppendorf 1,5 ml e macerar o tecido com bastão de vidro. Homogeneizar as amostras de tecidos adicionando 1000 ul (1 ml) de Trizol. O volume da amostra não deve exceder a 10% do volume de Trizol.
3. Após a homogeneização remover os materiais insolúveis por centrifugação (12.000 Xg / 10 min a 2° a 8°C). Transferir o sobrenadante para novo tubo de Eppendorf .
4. Separação de fase: Incubar a amostra homogeneizada por 5 min a 15 a 30°C para permitir a completa dissociação das nucleoproteínas complexas.
5. Adicionar 200 ul (0,2 ml) de clorofórmio para cada 1 ml de Trizol. Fechar o tubo, misturar vigorosamente por 15 seg com as mãos e incubar por 2 a 3 min a 15 a 30 °C.
6. Centrifugar as amostras a 12.000 Xg / 15 min a 2 a 8°C. Após a centrifugação a mistura separa-se em, fase de fenol-clorofórmio (lower red), uma interfase e uma fase aquosa incolor por cima. O RNA remanescente está exclusivamente na fase aquosa. O volume da fase aquosa é cerca de 60% do volume de Trizol usada para homogeneização.
7. Precipitação do RNA: transferir a fase aquosa a um, novo tubo e guarde a fase orgânica para isolamento de DNA ou proteínas.

8. Precipitação do RNA a fase aquosa com mistura de álcool isopropílico: use 0,5 ml de álcool isopropílico para cada 1 ml de Trizol inicial.
9. Incubar a 15 a 30°C / 10 min, centrifugar 12.000 Xg / 10 min a 2 a 8°C. O RNA precipitado será visível na forma de gel semelhante a um pellet sobre um dos lados do fundo do tubo.
10. Lavar o RNA: remover o sobrenadante, lavar o pellet com etanol 75%, adicionando 1 ml de etanol 75% para cada 1 ml de Trizol inicial. Misturar em vortex e centrifugar a 7.500 Xg / 5 min a 2 a 8°C.
11. Re-dissolvendo o RNA: secar o RNA (air-dry ou vacum-dry) / 5 a 10 min. Importante: não secar completamente.
12. Dissolver o RNA em 50 ul de água livre de RNAase ou 0,5% de solução SDS. Misturar a solução com micropipeta a incubar por 10 min a 55/60°C.

Anexo 2. PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DO RNA E DNA, PROTOCOLO FENOL/CLOROFÓRMIO – ÁLCOOL ISOAMILICO E SÍLICA/TIOCIANATO DE GUANIDINA E MÉTODO SÍLICA/TIOCIANATO DE GUANIDINA.

Fase 1

1. 500 uL de amostra.
2. 1% de SDS (*dodecil sulfato de sódio*) – 5 uL
3. 0,2 mg/mL de proteinase K (0,1 mg – 5 uL)
4. Homogeneizar em vórtex – 10 seg.
5. Banho Maria à 56°C - 30 min.

Fase 2

Método de associação das técnicas fenol/clorofórmio – álcool isoamilico e sílica/tiocianato de guanidina (Alfieri, 1999)

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

Fase 3

Método sílica/tiocianato de guanidina (Boom et al., 1990)

1. 500 uL da amostra.
2. 10 uL de sílica hidratada.
3. 900 uL de solução L6.
4. Homogeneizar em vórtex.
5. Agitar durante 30 min em temperatura ambiente.
6. Centrifugar a 10.000 Xg – 30 seg.
7. Desprezar o sobrenadante.
8. Adicionar 500 uL de solução L2.

9. Homogeinizar em vortex.
10. Centrifugar a 10.000 Xg – 30 seg.
11. Desprezar sobrenadante em solução contendo NaOH 10M.
12. Adicionar 500 uL de solução L2.
13. Homogeinizar em vortex.
14. Centrifugar a 10.000 Xg – 30 seg.
15. Desprezar sobrenadante em solução contendo NaOH 10M.
16. Adicionar 1 ml de etanol a 70%.
17. Homogeinizar em vortex.
18. Centrifugar a 10.000 Xg – 30 seg.
19. Desprezar sobrenadante em solução contendo NaOH 10M.
20. Adicionar 1 ml de etanol a 70%.
21. Homogeinizar em vortex.
22. Centrifugar a 10.000 Xg – 30 seg.
23. Desprezar sobrenadante em solução contendo NaOH 10M.
24. Adicionar 1 ml de acetona PA
25. Homogeinizar em vortex.
26. Centrifugar a 10.000 Xg – 30 seg.
27. Desprezar sobrenadante em solução contendo NaOH 10M.
28. Secar o pellet em estufa a 37°C – 15 min com tubo aberto.
29. Adicionar 30 uL de água MilliQ autoclavada.
30. Homogeinizar em vortex.
31. Banho Maria a 56°C – 15 min.
32. Homogeinizar em vortex.
33. Centrifugar 10.000 Xg – 2 min.
34. Recolher o sobrenadante.
35. Adicionar 20 uL de água MilliQ autoclavada.
36. Homogeinizar em vortex.
37. Banho Maria a 56°C – 15 min.
38. Homogeinizar em vortex.
39. Centrifugar 10.000 Xg – 2 min.
40. Recolher o sobrenadante.

Anexo 3. PROTOCOLO EXTRAÇÃO DO DNA COM DNAZOLÂ REAGENT, GIBCOBRL

1. HOMOGEINIZAÇÃO DOS TECIDOS

25 a 50 mg de tecido em 1 ml de DNAzol. Colocar em tubo Eppendorf de 1,5 ml, macerar com bastão de vidro.

2. CENTRIFUGAÇÃO (opcional)

Centrifugar 10.000 Xg/ 10 min a 4°C ou ambiente. Transferir o sobrenadante viscoso para um novo tubo.

3. PRECIPATAÇÃO DO DNA.

A precipitação de DNA com lise/homogeinização com adição de 0,5 ml de etanol 100% para cada 1 ml de DNAzol usado no isolamento.

Misturar as amostras por inversão e incubar a temperatura ambiente por 1 a 3 min.

O DNA precipitado será visível rapidamente.

Remover o DNA precipitado por aspiração com pipeta.

4. LAVAR O DNA

Lavar o DNA precipitado com 0,8 a 1,0 ml de etanol 75% por 2 X.

Após lavar, suspender o DNA em etanol por inversão dos tubos 3 a 6 vezes.

Estocar os tubos verticalmente por 0,5 a 1 min para permitir ao DNA assentar no tubo e remover o etanol por pipetagem ou decantação.

Estocagem= em etanol 95% por 1 semana a 15 a 30°C.

2 a 8°C por 3 meses.

5. SOLUBILIZAÇÃO DO DNA

Secar o DNA em tubo aberto em tubo aberto por 5 a 15 seg após a remoção do etanol. (Se o DNA for exposto por muito tempo será muito difícil redissolver).

Dissolver o DNA em 8mM NaOH, misturando com pipeta vagarosamente.

Estocagem = 4°C alguns meses

-20°C por 1 ano.

Para DNA isolado de tecidos (baço, músculos, etc) podem conter alguns materiais insolúveis, para remoção centrifugar a 12.000 Xg / 10 min.

Após a solubilização, ajustar a solução de DNA para pH com a adição de HEPES.

Usar 0,1 M ou 1M HEPES para 1 ml de 8 mM NaOH:

PH final	0,1 M HEPES (ul)	pH final	1M HEPES (ul)
8,4	86	7,2	23
8,2	93	7,0	32
8,0	101		
7,8	117		
7,5	159		

Anexo 4. PROTOCOLO EXTRAÇÃO DE DNA - OIE

1. Homogeneizar 100 mg de tecido. Camarões e PLs maiores que 11 devem ser retiradas as cabeças.
2. Adicionar 600 ul de solução de lise (50 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl, pH 9, 100 mM EDTA [ethylene diamine tetra-acetic acid], 2% SDS [sodium dodecyl sulfate] e 1 ug/ml proteinase K).
3. Após homogeneização incubar a 75°C / 5 min. Resfriar a temperatura ambiente.
4. Centrifugar a 12.000 g / 2 min, transferir o sobrenadante para um novo tubo de 2 ml.
5. Adicionar igual volume de fenol, misturar por inversão, centrifugar a 12.000 g / 5 min.
6. Remover o upper layer para um novo tubo.
7. Misturar por inversão com 2 volumes de clorofórmio/álcool isoamilico (24:1) e centrifugar a 12.000 g / 5 min.
8. Remover o upper layer para um novo tubo e precipitar o DNA adicionando 2 volumes de 95% EtOH em seguida estocar a -20°C / 2 h ou -80°C / 30 min.
9. Centrifugar a 12.000 g / 10 min e remover o etanol.
10. Lavar o pellet com etanol 70%.
11. Ressuspender em 200 ul de água.
12. Usar 2 ul da solução de DNA por uma reação da PCR.

Anexo 5. GEL DE AGAROSE 1,5%.

1. Pesar 0,75 g de agarose e dissolver em 50 ml de tampão 1xTEB (Tris-acetato-EDTA) e misturar.
2. Levar ao microondas e levantar fervura.
3. Esfriar em água corrente.
4. Adicionar 2,5 ul de brometo de etídeo (0,5 ug/ml), misturar bem.
5. Colocar na forma, imediatamente colocar o pente.
6. Esfriar o gel, após retirar as fitas adesivas e o pente.
7. Adicionar o tampão 1xTEB até cobrir o gel em 1 cm.
8. Colocar as amostras no gel: 2 ul do tampão de carregamento (loading buffer = água, azul de bromofenol, xilene cianol e glicerol) e 7 ul do produto da PCR, misturar sugando e soltando com a micropipeta, aplicar um total de 7 ul.
9. Adicionar o padrão de tamanho e concentração, *DNA Low Mass Ladder*, adicionando 2 ul de tampão de carregamento e 2 ul do padrão, aplicar um total de 3 ul.
10. Ligar a cuba eletroforética 60 V / 1 h e 30 min.

Anexo 6. PREPARO DE SOLUÇÕES

SOLUÇÃO L6

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

SOLUÇÃO L2

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

TAMPÃO DE CORRIDA: TBE (TRIS – ACIDO BÓRICO – EDTA) 10 X

0,89 M TRIS
0,89 M ácido bórico
0,02 M EDTA dissodium
Água bidestilada qsp. 1 litro
pH 8,4

TAMPÃO FOSFATO SALINA (PBS)

137 mM NaCl
3 mM KCl
8 mM Na₂HPO₄
15 mM K₂H₂PO₄
Água MilliQ autoclavada qsp. 1 litro
pH 7,2

HIDRATAÇÃO DA SÍLICA

60 g de sílica (SIGMA)

adicionar 500 mL de água MilliQ autoclavada

agitar lentamente e manter em repouso durante 24 h.

Por sucção, desprezar 430 mL do sobrenadante

Ressuspender a sílica em 500 mL de água bidestilada.

Manter em repouso durante 5 h para sedimentar.

Desprezar 440 mL do sobrenadante.

Adicionar 600 uL de HCl (32% w/v) para ajustar o pH (pH 2,0)

Aliquotar e autoclavar.